

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

Ganzzell-Biokatalyse in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten

Holger Pfründer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing. Thomas Sattelmayer
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz
2. Univ.-Prof. Dr. techn. Johannes A. Lercher

Die Dissertation wurde am 18. April 2005 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen
am 8. Juli 2005 angenommen.

Vorwort

Diese Dissertation fasst die Ergebnisse meiner Forschung zur Ganzzell-Biokatalyse in ionischen Flüssigkeiten, die im Rahmen der Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter von Professor Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München betrieben wurde, zusammen. Während der praktischen Arbeit von April 2002 bis Dezember 2004 stand mir die erstklassige Ausstattung der Labore und des Technikums zur Verfügung. Die Unterstützung durch die technischen Mitarbeiter und Kollegen war jederzeit beispielhaft und das Arbeitsklima phantastisch.

Dadurch konnte die Untersuchung einer ganzen Reihe von Mikroorganismen und Reaktionen mit einer Vielzahl unterschiedlicher Methoden durchgeführt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit, die unter tatkräftiger Mithilfe vieler Studenten erreicht wurden, sind in den Kapiteln 5 bis 9 dargestellt und werden am Ende jedes Unterkapitels diskutiert. In Kapitel 9 werden neben neuen Resultaten die für diese und weitere Arbeiten auf gleichem Gebiet wichtigen Erkenntnisse zu den Lösungsmittleigenschaften der ionischen Flüssigkeiten umfassend diskutiert. In Kapitel 10 wird ein Leitfaden formuliert, der anhand eines verallgemeinerten Szenarios die Voraussetzungen für den Einsatz ionsicher Flüssigkeiten als Lösungsmittelphase beschreibt und Hinweise für die Verfahrensentwicklung gibt. Die Zusammenfassung hebt abschließend noch einmal die entscheidenden Ergebnisse der Arbeit hervor.

Zu dieser Dissertation haben viele Personen in unterschiedlichster Weise beigetragen. Bei allen möchte ich mich herzlich bedanken:

Bei Herrn Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz für die Möglichkeit, an seinem mit Leben, Ideen und Forscherdrang erfüllten Lehrstuhl zu promovieren. Ich hatte jederzeit das Gefühl, vollständig von ihm unterstützt zu werden, sei es durch

vertrauensvolles „Machenlassen“ („no news are good news“) oder durch Ratschläge, Informationen und Diskussionen.

Beim Coreferenten Herrn Prof. Dr. Johannes A. Lercher und beim Prüfungsvorsitzenden Herrn Prof. Dr.-Ing. Thomas Sattelmayer (beide Technische Universität München) für die Übernahme der jeweiligen Aufgabe.

Bei Herrn Prof. Dr. Udo Kragl (Universität Rostock) für die Koordination des Verbundprojekts „Biokatalyse in ionischen Flüssigkeiten“, das vom Bundesministerium für Bildung und Forschung finanziert wurde (0312737E), und für die anregenden Diskussionen.

Bei Herrn Prof. Dr. Lutz Fischer (Universität Hohenheim) für die Aufnahme zu zwei Forschungsaufenthalten an seinem Lehrstuhl.

Bei Herrn Dr. Marc Uerdingen (Solvent Innovation) für die Bereitstellung der ionischen Flüssigkeiten und für interessante Diskussionen zu deren Eigenschaften.

Bei Prof. Dr. Uwe Bornscheuer (Universität Greifswald) für die Bereitstellung des Stamms *Escherichia coli* DH5 α PFADH und bei Herrn Dr. Stefan Buchholz von der Degussa AG für die Erlaubnis zur Nutzung dieser Zellen.

Bei Herrn Dr. Günter Wich (Consortium für elektrochemische Industrie) für die Bereitstellung des Stamms *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6.

Bei Herrn Prof. Dr. Michael Müller (Universität Freiburg), Herrn Dr. Michael Wolberg (Forschungszentrum Jülich) und Jülich Fine Chemicals für die Bereitstellung des Dioxohexanoat-Edukts und der Produkte und bei Herrn Dr. Werner Hummel (Universität Düsseldorf) für die Informationen zu *Lactobacillus kefir*.

Bei allen (ehemaligen) Kollegen am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik - Irma Einsle, Karl-Heinz Zacher, Norbert Werth, Georg Kojro, Hendrik Balk, Vera Reimann, Markus Amann, Dr.-Ing. Robert Puskeiler, Dr.-Ing. Ezequiel Franco-Lara, Dr.-Ing. Dariusch Hekmat, Bettina Knorr, Maya Amidjojo, Jan Havel, Helge Engelking, Julia Hiller, Heike Zimmermann, Armin Tiemeyer, Andrea Vester, Andreas Knepper, Andreas Kusterer und Stefan Bräutigam - für die Unterstützung und das motivierende Arbeitsklima.

Bei allen Studenten - Janine Dungs, Christian Zach, Emmanuel Biard, Benedikt Agerer, Florian Hang, David Keerl, Ross Jones und George Dodoros - für die fleißige Mitarbeit.

Bei Maya und Robert für das gründliche Korrekturlesen meiner Dissertation.

Bei allen Freunden und Verwandten für das, wofür man sich sonst nie bedankt.

Bei Ute für das Wichtigste.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Problemstellung und Zielsetzung.....	3
3	Theoretische Grundlagen.....	5
3.1	Ionische Flüssigkeiten.....	5
3.1.1	Eigenschaften ionischer Flüssigkeiten	5
3.1.2	Einsatzgebiete ionischer Flüssigkeiten	10
3.1.3	Herstellung ionischer Flüssigkeiten.....	11
3.2	Ganzzell-Biokatalyse.....	13
3.2.1	Einsatzgebiete der Ganzzell-Biokatalyse.....	13
3.2.2	Prozessgrößen der Ganzzell-Biokatalyse	14
3.2.3	Herstellung von L-Aminosäuren mittels DAO-aktiven Mikroorganismen....	16
3.2.4	Herstellung chiraler Alkohole mittels ADH-aktiven Mikroorganismen	18
3.2.5	Ganzzell-Biokatalyse schlecht wasserlöslicher, toxischer und instabiler Edukte	19
3.3	Charakterisierung von Flüssig-Flüssig-Dispersionen	24
3.3.1	Tropfenbildung in gerührten Systemen.....	25
3.3.2	Berechnung des Stofftransports.....	28
3.3.3	Verteilungskoeffizient gelöster Substanzen	31
3.4	Biologische Grundlagen der Mikroorganismen.....	32
3.4.1	<i>Trigonopsis variabilis</i> (wt).....	32
3.4.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (wt)	33
3.4.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> FasB His6.....	34
3.4.4	<i>Escherichia coli</i> (wt)	34
3.4.5	<i>Escherichia coli</i> DH5 α PFADH.....	35
3.4.6	<i>Lactobacillus kefir</i> (wt).....	35
3.4.7	Zellmembran und Zellwand.....	38

3.5	Herstellung von Zellen für den Einsatz als Biokatalysator	40
3.5.1	Mikrobielles Wachstum	40
3.5.2	Kultivierung im Satzverfahren	42
3.5.3	Kultivierung im Zulaufverfahren	43
3.5.4	Optimierung der Biokatalysatorherstellung	44
4	Material und Methoden	47
4.1	Material	47
4.2	Allgemeine Labormethoden	47
4.2.1	pH-Messung	47
4.2.2	Herstellung der Pufferlösungen	47
4.2.3	Glukoseanalytik	48
4.2.4	Bestimmung der optischen Dichte	48
4.2.5	Bestimmung der Biotrockenmasse	49
4.2.6	Synthese von <i>N</i> -Carbamoyl-D,L-Alanin	49
4.3	Kultivierung von <i>Trigonopsis variabilis</i> DSM 70714 (wt)	49
4.3.1	Stamm und Stammhaltung	49
4.3.2	Kultivierung im Schüttelkolben	50
4.3.3	Kultivierung im 7,5 L-Rührkesselreaktor	50
4.4	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (wt)	52
4.4.1	Stamm und Stammhaltung	52
4.4.2	Kultivierung im Schüttelkolben	52
4.5	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> FasB His 6	52
4.5.1	Stamm und Stammhaltung	52
4.5.2	Kultivierung im Schüttelkolben	52
4.6	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> K12 (wt)	53
4.6.1	Stamm und Stammhaltung	53
4.6.2	Kultivierung im Schüttelkolben	53
4.7	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> DH5α PFADH	53
4.7.1	Stamm und Stammhaltung	53
4.7.2	Kultivierung im Schüttelkolben	53
4.8	Kultivierung von <i>Lactobacillus kefir</i> (wt)	54
4.8.1	Stamm und Stammhaltung	54
4.8.2	Kultivierung im Schüttelkolben	54
4.8.3	Kultivierung im 7,5 L-Rührkesselreaktor im Satzverfahren	54
4.8.4	Kultivierung im 7,5 L-Rührkesselreaktor im Zulaufverfahren	55
4.8.5	Kultivierung im 200 L-Rührkesselreaktor im Zulaufverfahren	55

4.9	Durchführung der Ganzzell-Biokatalyse	56
4.9.1	Vorbereitung der Biokatalysatoren	56
4.9.2	Permeabilisierung	57
4.9.3	Gerührte Glasgefäße im 2 mL-Maßstab	57
4.9.4	Rührkesselreaktor im 200 mL-Maßstab	58
4.10	Charakterisierung der Biokatalysatoren	59
4.10.1	Membranintegritätstest für Bakterien (Viabilität)	59
4.10.2	Membranintegritätstest für Hefen (Viabilität)	60
4.10.3	Zellaufschluss	60
4.10.4	Photometrische Bestimmung der DAO-Aktivität	61
4.10.5	Photometrische Bestimmung der ADH-Aktivität	62
4.11	Charakterisierung der Lösungsmittel	63
4.11.1	Bestimmung des Phasenverhaltens von ionischen Flüssigkeiten und Wasser	63
4.11.2	Bestimmung der Löslichkeit von Amino- und Ketocarbonsäuren in ionischen Flüssigkeiten	64
4.11.3	Bestimmung der Löslichkeit von Ketonen und Alkoholen in Puffer	64
4.11.4	Bestimmung des Verteilungskoeffizienten von Ketonen und Alkoholen zwischen ionischen Flüssigkeiten und Puffer ($\log D$) oder <i>n</i> -Hexan	64
4.11.5	Bestimmung des Verteilungskoeffizienten von Lösungsmitteln zwischen <i>n</i> -Octanol und Wasser ($\log P$)	65
4.12	Flüssigchromatographische Analytik von Edukten und Produkten	65
4.12.1	Probenvorbereitung für die Hochdruck-Flüssigchromatographie	65
4.12.2	Achirale HPLC-Analytik von Tyrosin, HPP und HPA	66
4.12.3	Chirale HPLC-Analytik von Tyrosin	66
4.12.4	Chirale HPLC-Analytik von Alanin	66
4.13	Gaschromatographische Analytik von Edukten und Produkten	67
4.13.1	Probenvorbereitung für die Gaschromatographie	67
4.13.2	Chirale GC-Analytik von 4-Cl-ACE und 4-Cl-HBE	67
4.13.3	Chirale GC-Analytik von 4-Cl-AP und 4-Cl-PE	67
4.13.4	Achirale GC-Analytik von 6-Cl-DOHB, 6-Cl-HOHB und 6-Cl-DHHB	68
4.13.5	Chirale GC-Analytik von 6-Cl-DHHB	68
4.13.6	Chirale GC-Analytik von EBA und HPPE	68
4.13.7	Chirale GC-Analytik von 2,5-Hexandion und 2,5-Hexandiol	69
4.13.8	Achirale GC-Analytik von 2-Octanon und 2-Octanol	69
4.13.9	Chirale GC-Analytik von 2-Octanon und 2-Octanol	69
4.13.10	Chirale GC-Analytik von PFAP und PFPE	70

5	Prozessentwicklungen zur Biokatalysator-Herstellung.....	71
5.1	Herstellung von <i>Trigonopsis variabilis</i> mit DAO-Aktivität.....	71
5.1.1	Steigerung der DAO-Aktivität durch Optimierung des Mineralmediums	71
5.1.2	Entwicklung eines Zulaufverfahrens	72
5.1.3	Diskussion	75
5.2	Herstellung von <i>Lactobacillus kefir</i> mit ADH-Aktivität.....	79
5.2.1	Parameterstudien zur Kultivierung von <i>Lactobacillus kefir</i>	79
5.2.2	Entwicklung eines Zulaufverfahrens im 5 L-Maßstab	80
5.2.3	Vergrößerung des Zulaufverfahrens in den 150 L-Maßstab	81
5.2.4	Diskussion	82
6	Racematspaltung von Aminosäuren mit <i>Trigonopsis variabilis</i> in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten	85
6.1	Zweiphasiger Reaktionsansatz	86
6.1.1	Lösung von Aminosäuren und Ketocarbonsäuren in ionischen Flüssigkeiten.....	86
6.1.2	DAO-Aktivität in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten	88
6.1.3	Diskussion	89
6.2	Einphasiger Reaktionsansatz.....	91
6.2.1	Ionische Flüssigkeiten als Löslichkeitsvermittler von Aminosäuren.....	91
6.2.2	DAO-Aktivität in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten	92
6.2.3	Diskussion	92
7	Asymmetrische Synthesen mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i> FasB His6 im zweiphasigen System ionische Flüssigkeit/Wasser	95
7.1	Synthese von (S)-4-Chlor-3-hydroxybuttersäureethylester	95
7.1.1	Löslichkeit von 4-Cl-ACE und 4-Cl-HBE in Puffer und Verteilungskoeffizienten zwischen ionischen Flüssigkeiten und Puffer	96
7.1.2	Biokompatibilität von ionischen Flüssigkeiten.....	97
7.1.3	Cofaktor-Zugabe.....	98
7.1.4	Art des Cosubstrats und Reaktionstemperatur	99
7.1.5	Biotrockenmasse-Konzentration	100
7.1.6	Diskussion	101
7.2	Synthese von (S)-3-Hydroxy-3-phenylpropionsäureethylester	104
7.2.1	Löslichkeit von EBA und HPPE in Puffer und Verteilungskoeffizienten zwischen ionischen Flüssigkeiten und Puffer	104
7.2.2	Biokompatibilität von ionischen Flüssigkeiten.....	105
7.2.3	Diskussion	105

7.3	Synthese von (S)-1-(2,3,4,5,6-Pentafluorophenyl)ethanol	107
7.3.1	Löslichkeit von PFAP und PFPE in Puffer und Verteilungskoeffizienten zwischen ionischen Flüssigkeiten und Puffer.....	107
7.3.2	Variation der Cosubstrat-Bedingungen.....	108
7.3.3	Cofaktor-Zugabe	110
7.3.4	Diskussion.....	110
8	Asymmetrische Synthesen mit <i>Lactobacillus kefir</i> im zweiphasigen System ionische Flüssigkeit/Wasser	113
8.1	Synthese von (3R,5S)-6-Chlor-3,5-dihydroxyhexansäure-tert-butylester	113
8.1.1	Löslichkeit von 6-Cl-DOHB und 6-Cl-DHNB in Puffer und Verteilungskoeffizienten zwischen ionischen Flüssigkeiten und Puffer ...	114
8.1.2	Substratkonzentration	115
8.1.3	Diskussion.....	116
8.2	Synthese von (R)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol.....	118
8.2.1	Löslichkeit von 4-Cl-AP und 1-4-Cl-PE in Puffer und Verteilungskoeffizienten zwischen ionischen Flüssigkeiten und Puffer ...	118
8.2.2	Biokompatibilität von ionischen Flüssigkeiten	119
8.2.3	Umsetzungen im 2 mL-Maßstab	121
8.2.4	Wiederverwendbarkeit der Zellen	123
8.2.5	Umsetzung im 200 mL-Maßstab	124
8.2.6	Abschätzung der Stofftransportprozesse im 200 mL-Maßstab	126
8.2.7	Diskussion.....	129
9	Erweiterte Untersuchung der Eigenschaften ionischer Flüssigkeiten...	133
9.1	Löslichkeiten und Verteilungskoeffizienten.....	133
9.2	Biokompatibilität	137
10	Leitfaden zur Verwendung ionischer Flüssigkeiten in der Ganzzell-Biokatalyse	141
11	Zusammenfassung und Ausblick.....	145
12	Literaturverzeichnis	149
13	Abkürzungsverzeichnis.....	159
14	Anhang.....	167
14.1	Geräte, Chemikalien, Kultivierungsmedien.....	167
14.1.1	Geräte	167
14.1.2	mL-Reaktorsystem für die Ganzzell-Biokatalyse	170

14.1.3	Chemikalien	172
14.1.4	Eigenschaften der Edukte und Produkte der Ketonreduktionen.....	177
14.1.5	Kultivierungsmedien	184
14.1.6	Bestimmung der DAO-Aktivität mittels Optode	190
14.2	Racematspaltung von Aminosäuren mit <i>Fusarium oxysporum</i>...	191
14.2.1	<i>Fusarium oxysporum</i> (wt)	191
14.2.2	Stamm und Stammhaltung	191
14.2.3	Kultivierung im Schüttelkolben.....	191
14.2.4	Kultivierung von <i>Fusarium oxysporum</i> in Suspension	191
14.2.5	Steigerung der DAO-Aktivität durch Ergänzung des Mediums mit Vitaminen	192
14.3	Herstellung von <i>Escherichia coli</i> DH5α PFADH mit ADH-Aktivität und asymmetrische Synthese von (S)-PFPE	193
14.3.1	Variation der Induktion.....	193
14.3.2	Asymmetrische Synthese von (S)-PFAP im zweiphasigen System ionische Flüssigkeit/Puffer	194
14.4	Eigenschaften ionischer Flüssigkeiten	195
14.4.1	Biokompatibilität ionischer Flüssigkeiten	195
14.4.2	Stoffdaten ionischer Flüssigkeiten	196
14.4.3	Mischbarkeit ionischer Flüssigkeiten mit Wasser und organischen Lösungsmitteln.....	197
14.4.4	Löslichkeiten und Verteilungskoeffizienten von Ketonen und Alkoholen .	198

1 Einleitung

Schon im siebten Jahrtausend vor Christus machten sich die Menschen unbewusst Mikroorganismen zur Herstellung vergorener Getränke zunutze (McGovern *et al.* 2004). Jedoch erst im 19. Jahrhundert nach Christus erkannte Louis Pasteur die Gärung als Stoffwechselfvorgang dieser Kleinstlebewesen. Dem französischen Physiker und Chemiker gelang auch auf einem anderen Gebiet ein entscheidender Durchbruch. Er trennte als erster die Enantiomere einer chemischen Verbindung. Darunter versteht man Stoffe, die eine spiegelbildliche räumliche Struktur besitzen, jedoch nicht zur Deckung gebracht werden können, vergleichbar einer rechten und einer linken Hand. Vom griechischen Wort für „Hand“, *cheir*, leitet sich auch der Name für dieses Phänomen ab: die Chiralität (Hellwich 2002).

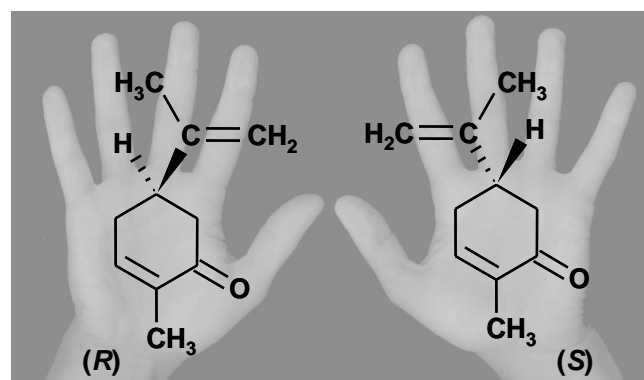


Abbildung 1.1 Chemische Strukturformeln von (*R*)-Carvon und (*S*)-Carvon.

Enantiomere drehen linear polarisiertes Licht in entgegengesetzte Richtungen, unterscheiden sich ansonsten aber nicht in ihren physikalischen Eigenschaften. Auch ihre chemischen Eigenschaften und Reaktionen gegenüber nicht-chiralen Stoffen sind identisch. Die Wechselwirkungen mit lebenden Organismen oder

Stoffen biologischen Ursprungs sind dagegen meistens unterschiedlich, da diese selbst aus chiralen Molekülen bestehen. So nehmen die menschlichen Geruchsrezeptoren zum Beispiel die beiden Formen von Carvon differenziert wahr (Vollhardt und Shore 2000). (*S*)-Carvon riecht nach Kümmel, (*R*)-Carvon dagegen nach Pfefferminze (Abbildung 1.1). Besonders gravierend kann der Unterschied bei Arzneimitteln sein. (*R*)-*N*-Methylphenylpropylbarbiturat wirkt narkotisch, die (*S*)-Form krampfauslösend. Am bekanntesten ist das Beispiel von Thalidomid, das 1958 bis 1962 unter dem Namen Contergan[®] als Schlafmittel vermarktet wurde. Das Medikament wurde als Racemat, also als Gemisch gleicher Anteile beider Enantiomere, verabreicht. Das (*S*)-Enantiomer hat jedoch teratogene Wirkung und führte dadurch zu mehreren Tausend schwer missgebildeten Neugeborenen.

Spätestens seit diesem Unglück ist das Bewusstsein für die unterschiedliche Wirkung von Enantiomeren vorhanden, wodurch die Anforderungen an die Untersuchungen neuer chiraler Arzneimittel und deren enantiomerenreine Herstellung stark gestiegen sind (Food and Drug Administration 1992). Für Arzneimittelvorprodukte, aber auch für Nahrungsergänzungsmittel wie Vitamine oder Agrochemikalien haben sich biotechnologische Verfahren als effektive Methode zur asymmetrischen Synthese etabliert und kombinieren somit die beiden Errungenschaften Louis Pasteurs. In Abgrenzung zur direkten Herstellung pharmazeutischer Wirkstoffe wie zum Beispiel Antikörper mittels Zellkulturen, rote Biotechnologie genannt, und der grünen Pflanzenbiotechnologie, wird diese industrielle Nutzung biologischer Methoden als weiße Biotechnologie bezeichnet (EuropaBio 2003).

2010 werden voraussichtlich 20 % der Chemieprodukte durch die weiße Biotechnologie hergestellt (Festel *et al.* 2004). Dies entspricht einer Größenordnung von 310 Milliarden US-Dollar und somit einem hoch interessanten Markt für die europäische Chemieindustrie (DECHEMA 2004). Die größten Anteile werden dabei auf die Fein- und Spezialitätenchemie entfallen, weshalb in diesem Bereich neue, effiziente und nachhaltige Verfahren gefragt sind, um die bisherigen Probleme bei der Anwendung der Biotechnologie zu beseitigen.

2 Problemstellung und Zielsetzung

Die Nahrungsmittel-, Agro- und Pharmaindustrie benötigt in zunehmendem Maße chirale chemische Verbindungen mit hoher Enantiomerenreinheit. Die Ganzzell-Biokatalyse stellt in vielen Fällen, zum Beispiel wenn Transportmetabolite oder mehrere Enzyme an den Reaktionen beteiligt sind, eine effektive und umweltschonende Methode zur Herstellung dieser Feinchemikalien dar. Nachteile in der Effizienz solcher Prozesse entspringen jedoch oft der geringen Wasserlöslichkeit, der Instabilität in Wasser und der toxischen oder inhibierenden Wirkung der Edukte und Produkte auf den Biokatalysator.

Zur Lösung dieser Probleme wurden bisher häufig organische Lösungsmittel eingesetzt. Diese dienen in einem einphasigen Ansatz als Löslichkeitsvermittler oder in einem zweiphasigen Ansatz als Eduktreservoir und *in situ*-Extraktionsmittel. Dadurch erhöhen sie die Eduktverfügbarkeit und verringern im zweiten Fall zusätzlich die Instabilität der Edukte und Produkte sowie deren schädigende Wirkung auf den Biokatalysator. Da die organischen Lösungsmittel jedoch meistens ebenfalls toxisch für die Zellen sind, ist deren Verwendung nicht optimal. Zudem führt der hohe Dampfdruck und die Brennbarkeit dieser Lösungsmittel zu großen Verlusten und Umweltbeeinträchtigungen sowie zu Explosionsgefahr.

Daher ist die Evaluierung neuartiger Lösungsmittel von großem Interesse. Ionischen Flüssigkeiten stellen eine solche alternative Stoffklasse dar. Es handelt sich dabei um Salze, die bei Raumtemperatur flüssig sind. Sie bestehen also ausschließlich aus Ionen und unterscheiden sich dadurch erheblich von organischen Lösungsmitteln. So besitzen sie einen verschwindend geringen Dampfdruck und sind nicht brennbar. Diese Tatsache macht ionische Flüssigkeiten für einen möglichen Einsatz in der Ganzzell-Biokatalyse interessant.

Da sie aber in diesem Zusammenhang bisher kaum charakterisiert worden sind, soll das Ziel dieser Arbeit sein, das Potenzial ionischer Flüssigkeiten zur Steigerung der Effizienz der Ganzzell-Biokatalyse abzuschätzen und allgemein gültige

Leitlinien für deren Einsatz zu formulieren. Als Beispiele sollen Racematspaltungen mit D-Aminosäureoxidase-aktiven *Trigonopsis variabilis* und asymmetrische Synthesen mit Alkoholdehydrogenase-aktiven *Lactobacillus kefir*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Escherichia coli* durchgeführt werden, da bei diesen Redoxreaktionen der Ganzzellansatz aufgrund der benötigten Cofaktorregenerierung vorteilhaft ist.

Folgende Arbeitsschritte sind zur Erreichung der Zielsetzung geplant:

- Entwicklung effizienter Verfahren zur Herstellung der bisher schlecht verfügbaren Biokatalysatoren (*Trigonopsis variabilis* und *Lactobacillus kefir*) bis in den 150 L-Maßstab.
- Durchführung von Aminosäure-Racematspaltungen und asymmetrischen Ketonreduktionen in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten in mL-Parallelansätzen. Dabei sollen folgende Aspekte untersucht werden:
 - Ermittlung der Löslichkeit von Edukten und Produkten in nicht mit Wasser mischbaren ionischen Flüssigkeiten sowie des Verteilungskoeffizienten dieser Stoffe zwischen ionischer Flüssigkeit und wässriger Pufferlösung im Vergleich zu organischen Lösungsmitteln.
 - Charakterisierung der Löslichkeitsvermittlung von Edukten und Produkten durch mit Wasser mischbare ionische Flüssigkeiten in wässriger Pufferlösung.
 - Ermittlung der Biokompatibilität ionischer Flüssigkeiten im Vergleich zu organischen Lösungsmitteln durch Bestimmung der schädigenden Effekte auf die Mikroorganismen.
 - Evaluierung verschiedener Prozessstrategien, zum Beispiel einphasige Reaktionsansätze aus wässriger Pufferlösung und mit Wasser mischbaren ionischen Flüssigkeiten oder zweiphasige Reaktionsansätze mit wässriger Pufferlösung und nicht mit Wasser mischbaren ionischen Flüssigkeiten.
 - Vergleich von Ausbeute, Enantiomerenreinheit und weiterer Prozessgrößen zwischen rein wässrigen Reaktionsansätzen, solchen mit ionischen Flüssigkeiten und solchen mit organischen Lösungsmitteln.
 - Untersuchungen zur Wiederverwendbarkeit der Biokatalysatoren sowie zur Wiederverwendbarkeit der ionischen Flüssigkeiten.
- Maßstabsvergrößerung in den 200 mL-Rührkesselreaktor und reaktionstechnische Analyse eines ausgewählten Syntheseprozesses.

3 Theoretische Grundlagen

Nachfolgend werden die in dieser Arbeit verwendeten theoretischen Grundlagen aufgeführt. Dazu zählen biologische, chemische und physikalische Eigenschaften der eingesetzten Materialien, die genutzten Verfahren und Theorien inklusive deren Herleitung und Definitionen sowie der Stand der Wissenschaft und Technik in den relevanten Gebieten.

3.1 Ionische Flüssigkeiten

Ionische Flüssigkeiten sind Salze mit relativ niedrigem Schmelzpunkt und relativ geringer Viskosität der Salzschnmelze. Je nach willkürlich festgelegter Definition wird damit ein Schmelzpunkt unter 100°C oder unter 25°C verstanden und eine Viskosität, die eine praktische Handhabung als Flüssigkeit erlaubt, zum Beispiel $< 1000 \text{ mPa s}$. In der wissenschaftlichen Literatur die Biokatalyse betreffend, und somit auch hier, werden ionische Flüssigkeiten verstanden und verwendet, die bei Raumtemperatur im flüssigen Aggregatzustand vorliegen.


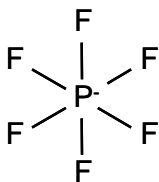
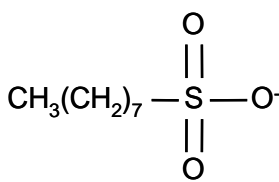
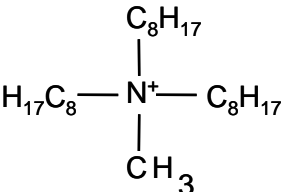
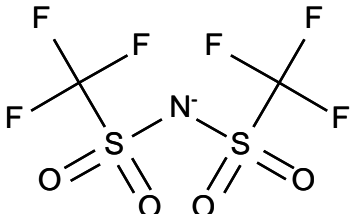
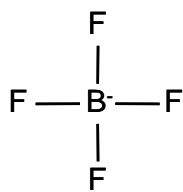
3.1.1 Eigenschaften ionischer Flüssigkeiten

Die Entwicklung und Charakterisierung ionischer Flüssigkeiten ist eine relativ junge Disziplin (Wasserscheid 2001, Wasserscheid und Welton 2003). 1914 wurde das bei Raumtemperatur flüssige Ethylammoniumnitrat hergestellt, 1948 folgten ionische Flüssigkeiten mit Chloroaluminationen als Badflüssigkeiten zum Elektroplatinieren von Aluminium. Ende der siebziger Jahre wurden diese Systeme für elektrochemische Anwendungen zu bei Raumtemperatur flüssigen Elektrolyten weiter entwickelt. Anfang der achtziger Jahre wurden Chloroaluminatschnmelzen erstmals als nicht-wässrige, polare Lösungsmittel zur Untersuchung von Übergangsmetallkomplexen eingesetzt. Wenige Jahre später wurden saure Chloroaluminatschnmelzen als Friedel-Crafts-Katalysatoren beschrieben und als

Reaktionsmedien für die organische Synthese verwendet, so zum Beispiel 1990 als Lösungsmittel für die homogene Übergangsmetallkatalyse.

Chloroaluminatschmelzen können als ionische Flüssigkeiten der ersten Generation bezeichnet werden. Sie sind sowohl instabil, vor allem durch Hydrolyse, als auch reaktiv und besitzen daher ein eingeschränktes Einsatzgebiet. 1992 wurden die ersten hydrolysestabilen ionischen Flüssigkeiten mit Tetrafluoroborationen entwickelt - die zweite Generation. Diese ionischen Flüssigkeiten mit halogenierten Anionen genügen nun den Anforderungen in den meisten Einsatzgebieten. Unter bestimmten Bedingungen und über längere Zeit können sich jedoch hochreaktive Spaltprodukte wie Fluss- und Salzsäure (HF und HCl) bilden. Daher wird in Zukunft die Entwicklung einer dritten Generation halogenfreier ionischer Flüssigkeiten von großem Interesse sein.

Tabelle 3.1: Struktur der Ionen der in dieser Arbeit verwendeten ionischen Flüssigkeiten [BMIM][PF₆], [BMIM][Tf₂N], [BMIM][O_cSO₄], [BMIM][BF₄] und [OMA][Tf₂N].

Kationen		Anionen	
1-<i>n</i>-Butyl-3-methylimidazolium [BMIM]⁺ 	Hexafluorophosphat [PF₆]⁻ 	Octylsulfat [O_cSO₄]⁻ 	
Methyl-trioctylammonium [OMA]⁺ 	Bis(trifluoromethansulfon)imid [Tf₂N]⁻ 	Tetrafluoroborat [BF₄]⁻ 	

Durch die Kombination verschiedener Anionen und Kationen lässt sich theoretisch eine sehr große Zahl, mindestens eine Million, binärer ionischer Flüssigkeiten herstellen (Rogers und Seddon 2003). Damit ist die Einstellung unterschiedlichster Eigenschaften verbunden, so dass für jeden Einsatzbereich ein optimales „Designer-Lösungsmittel“ denkbar ist. Zu den allen ionischen Flüssigkeiten gemeinen Eigenschaften gehören der verschwindend geringe, nicht messbare

Dampfdruck, die Nichtbrennbarkeit, der weite Flüssigkeitsbereich, das große elektrochemische Fenster und die guten Lösungsmiteigenschaften. Die Kationen sind dabei organischer Natur, die Anionen zumeist anorganischer.

Im Folgenden werden die für diese Arbeit wichtigen Eigenschaften ionischer Flüssigkeiten näher beschrieben, wie sie zum Beispiel von Wasserscheid und Welton (2003) ausführlich zusammengefasst wurden. Die Struktur der verwendeten ionischen Flüssigkeiten ist in Tabelle 3.1 dargestellt, deren Eigenschaften sind im Anhang in Tabelle 14.24 aufgelistet.

Schmelzpunkte und Flüssigkeitsbereich

Schmelzpunkt und Flüssigkeitsbereich sind wichtige Größen für das Einsatzgebiet ionischer Flüssigkeiten.

Der Schmelz- oder auch Glasübergangspunkt ionischer Flüssigkeiten wird von mehreren Faktoren bestimmt. Generell liegt er mit zunehmender Symmetrie des Kations höher. Mit zunehmender Länge der Alkylseitenketten bis zu circa acht Kohlenstoffatomen nimmt der Schmelzpunkt ab, darüber steigt er erneut an, wie in Abbildung 3.1 zu sehen. Er verringert sich bei größeren Anionen durch die Reduktion der Coulombkräfte. Weiteren Einfluss auf den Schmelzpunkt haben mögliche Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Kräfte.

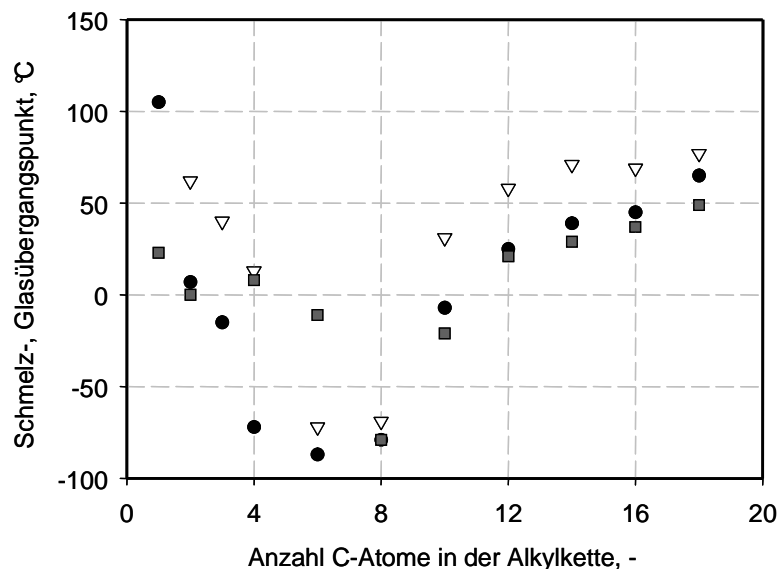


Abbildung 3.1 Darstellung der Schmelz- oder Glasübergangstemperatur ionischer Flüssigkeiten mit 1-Alkyl-3-Methylimidazolium-Kation und den Anionen [BF₄]⁻ ●, [PF₆]⁻ ▽ und [Tf₂N]⁻ ■ in Abhängigkeit der Alkylkettenlänge (nach Wasserscheid und Welton 2003).

Der Flüssigkeitsbereich wird nach unten durch den Schmelzpunkt, den Übergang zum festen oder glasartigen Zustand, markiert, nach oben durch die Zersetzungstemperatur. Mittlerweile sind ionische Flüssigkeiten mit Schmelzpunkten von circa -100°C bekannt. Die Zersetzungstemperatur liegt bei circa 350°C bis 450°C . Daraus ergibt sich ein Flüssigkeitsbereich, der weit über 300 K umfasst. Im Vergleich zu molekularen Lösungsmitteln wie Wasser (100 K) und Dichlormethan (145 K) stellt dies eine beträchtliche Steigerung dar, die in größeren Freiheiten resultiert, zum Beispiel bei der Reaktionsführung von Synthesen mit ionischen Flüssigkeiten als Lösungsmittel.

Viskosität

Die Viskosität ist einerseits wichtig für die Handhabung der ionischen Flüssigkeit und andererseits relevant für Stofftransportphänomene.

Die bisher untersuchten ionischen Flüssigkeiten sind alle Newtonsche Fluide. Ihre dynamische Viskosität ist sehr unterschiedlich und reicht von etwa 10 mPa s bis über 1000 mPa s. Zum Vergleich besitzen molekulare Lösungsmittel bei Raumtemperatur Viskositäten von 0,2 mPa s (Diethylether) bis 934 mPa s (Glycerol). Wasser weist eine Viskosität von 1,0 mPa s auf, Ethylenglycol von 16 mPa s.

Die Viskosität ionischer Flüssigkeiten ist oft stark temperaturabhängig. So steigt sie für [BMIM][PF₆] bei Abkühlung von 25°C auf 20°C um 27 %. Die Viskosität von auf Imidazolium basierenden ionischen Flüssigkeiten steigt tendenziell mit der Länge der Alkylketten. Das Anion hat ebenfalls einen großen Einfluss auf die Viskosität, welcher aber nicht alleine auf dessen Größe zurück geführt werden kann. Andere Faktoren wie Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Anionen und Kationen spielen wahrscheinlich ebenso eine Rolle, sind aber noch nicht näher untersucht. Verunreinigungen können darüber hinaus zu einer starken Änderung der Viskosität führen.

Dichte

Die Dichte ist vor allem für die Geschwindigkeit der Phasentrennung bei Zweiphasensystemen relevant.

Die bekannten ionischen Flüssigkeiten besitzen eine Dichte zwischen $1,05\text{ g mL}^{-1}$ und $2,4\text{ g mL}^{-1}$. Je größer die Masse des Anions, desto größer ist auch die Dichte der ionischen Flüssigkeit. Für die Kationen gilt die entgegengesetzte Beziehung. Im Gegensatz zur Viskosität ist die Dichte wenig abhängig von der Temperatur und der Konzentration möglicher Verunreinigungen.

Löslichkeiten

Die Lösungseigenschaften sind von herausragendem Interesse, falls ionische Flüssigkeiten als Alternative für organische Lösungsmittel, Elektrolyte, chromatographische Phasen und Matrizes für „matrix assisted laser desorption/ionization“ (MALDI)-Techniken eingesetzt werden sollen.

Ionische Flüssigkeiten zeigen ähnliche Lösungseigenschaften wie dipolare, aprotische Lösungsmittel und kurzkettige Alkohole. Je länger die Alkylketten des Kations, desto lipophiler ist die ionische Flüssigkeit. Hydrophile Moleküle, wie zum Beispiel Zucker, oder auch geladene Moleküle werden nur von ionischen Flüssigkeiten mit weniger lipophilen Seitenketten, zum Beispiel solchen mit Ethergruppen, gelöst.

Die Mischbarkeit von ionischen Flüssigkeiten mit Wasser hängt stark vom Anion ab. Die meisten ionischen Flüssigkeiten sind nicht mischbar mit Alkanen oder anderen nicht-polaren organischen Lösungsmitteln.

Die Löslichkeit von Gasen ist für den Einsatz ionischer Flüssigkeiten als Reaktionsmedium bedeutend, jedoch noch wenig untersucht. CO₂ ist beispielsweise in [BMIM][PF₆] bei 40°C und 93 bar bis zu einem Molanteil von 72 % löslich (Blanchard *et al.* 2001). Die Löslichkeiten der für synthetische Reaktionen oft wichtigen Gase H₂, O₂ und CO sind dagegen nach bisherigem Wissensstand nur sehr gering.

Polarität

Die Polarität eines Lösungsmittels hat nicht nur Einfluss auf die Lösungseigenschaften, sondern auch auf den Verlauf und das Gleichgewicht chemischer Reaktionen.

Ionische Flüssigkeiten werden als polare Lösungsmittel angesehen. Abhängig vom Anion können sie nicht-koordinierend sein. Solvatochromatische Untersuchungen zeigen, dass sie ähnliche Polaritäten wie kurzkettige Alkohole und polare, aprotische Lösungsmittel wie Dimethylsulfoxid (DMSO) und Dimethylformamid (DMF) haben. Somit liegen die Polaritäten zwischen denen von Wasser und chlorierten Lösungsmitteln.

Molekulare Struktur und Dynamik

Bislang wurden nur sehr wenige Untersuchungen zur molekularen Struktur und Dynamik ionischer Flüssigkeiten durchgeführt. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass eine enge Korrelation zwischen der Festkörperstruktur und der Struktur der Flüssigkeit besteht.

Toxizität

Über die Toxizität der verwendeten ionischen Flüssigkeiten ist bisher wenig bekannt (Jastorff *et al.* 2003). Im Biolumineszenz-Inhibitions-Test mit *Vibrio fischeri* zeigte beispielsweise [BMIM][BF₄] eine ähnliche Toxizität wie Methyl-*tert*-butylether (MTBE) ($\log_{10}(\text{EC}_{50} (\mu\text{M})) = 3,89$, EC₅₀: effektive Konzentration für 50 % der Bakterien), wie in Abbildung 3.2 dargestellt (Ranke *et al.* 2003). In dieser und anderen Studien entwickelte sich die Vermutung, dass die Toxizität von auf Imidazolium basierenden ionischen Flüssigkeiten mit zunehmender Alkylkettenlänge steigt, da das Kation vermehrt oberflächenaktive Eigenschaften annimmt (Swatloski *et al.* 2004).

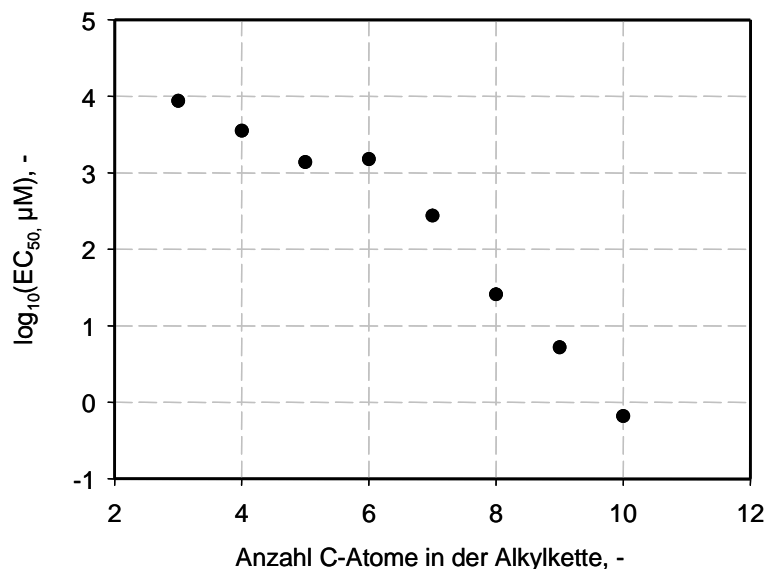


Abbildung 3.2 Dekadischer Logarithmus der effektiven Konzentrationen in μM für 50 % der *Vibrio fischeri* Bakterien ($\log_{10}(\text{EC}_{50}, \mu\text{M})$) von ionischen Flüssigkeiten mit 1-Alkyl-3-Methylimidazolium-Kation verschiedener Alkylkettenlänge und [BF₄]-Anion (nach Ranke *et al.* 2003).

3.1.2 Einsatzgebiete ionischer Flüssigkeiten

Die Entwicklung neuer Einsatzgebiete für ionische Flüssigkeiten ist Gegenstand intensiver Forschung (Rogers und Seddon 2003, Wasserscheid und Welton 2003). Neben der Verwendung als Elektrolyt in der Elektrochemie, in Batterien, Brennstoffzellen und Solarzellen ist der Einsatz als Reaktionsmedium für die organische, anorganische und Polymersynthese sowie die Biokatalyse dominierend. Aktuelle Arbeiten zur enantioselektiven Chemo- und Biokatalyse zeigen, dass ionische Flüssigkeiten oftmals deutliche Vorteile gegenüber

organischen Lösungsmitteln aufweisen, was die Aktivität, Enantioselektivität, Stabilität und Wiederverwendbarkeit des Katalysators betrifft (Song 2004). Des Weiteren können ionische Flüssigkeiten als Katalysator, Extraktionsmittel, Absorptionsmittel für Gasseparationen, Wärmeübertragungsfluide, Schmierstoffe, stationäre Phasen in der Gaschromatographie und mobile Phasen in der Flüssigchromatographie sowie als Matrix für MALDI-Methoden verwendet werden.

Erste großtechnische Anwendungen finden ionische Flüssigkeiten seit Mitte der neunziger Jahre im Difasol-Prozess, einer auf Aluminiumchloridschmelzen beruhenden Variante des Dimersol-Prozesses und seit 2002 im BASIL-Prozess (biphasic acid scavenging utilizing ionic liquids) der Firma BASF in Ludwigshafen (Freemantle 2003). In letzterem Verfahren dient *N*-Methylimidazolium dazu, das bei der Herstellung von Alkoxyphenylphosphinen entstehende HCl abzufangen. Die resultierende ionische Flüssigkeit *N*-Methylimidazoliumchlorid ist mit dem Reaktionsmedium nicht mischbar, lässt sich somit leicht abtrennen und anschließend nach Protonierung wieder verwenden. Dadurch konnte die Verwendung von tertiären Aminen zur Fixierung von HCl vermieden werden, die zu hoch viskosen Suspensionen führen. Darüber hinaus wirkt die ionische Flüssigkeit in diesem Prozess als Katalysator.

3.1.3 Herstellung ionischer Flüssigkeiten

Die Herstellung ionischer Flüssigkeiten erfolgt im Allgemeinen in zwei Schritten: Der Synthese des gewünschten Kations und des anschließenden Anionenaustausches (Wasserscheid und Welton 2003). Tetraalkylammonium- und Trialkylsulfonium-Kationen sind, meist als Halogenid-Salze, kommerziell erhältlich. 1,3-Dialkylimidazolium-Kationen werden über Quarternisierungsreaktionen von kommerziell erhältlichem 1-Methylimidazolium durch Halogenalkane hergestellt, wie in Abbildung 3.3 dargestellt. Die Reaktionsführung ist sehr einfach: Die Mischung der Edukte wird unter Rühren und Inertgasatmosphäre erhitzt. Reaktionstemperatur und -dauer hängen von den verwendeten Halogenalkanen ab. Die Ausbeute liegt oft über 90 % und das Halogenidsalz-Produkt enthält als mögliche Verunreinigungen ausschließlich die Edukte und eventuell verwendete Lösungsmittel. Letzteres und die Halogenalkane stellen aufgrund ihrer Flüchtigkeit in der Regel kein Problem dar. Das in den meisten Fällen feste Produkt kann im Anschluss durch eine Rekristallisierung aus der Lösung in trockenem Acetonitril und Ethylethanoat gereinigt werden.

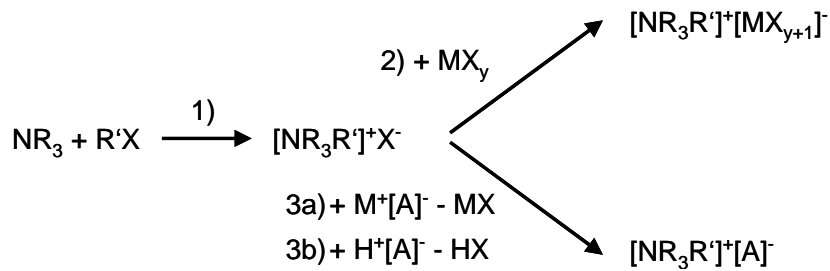


Abbildung 3.3 Schema der Herstellung ionischer Flüssigkeiten über Quarternisierung (1) und Anionenaustausch mittels Lewis-Säuren (2) oder mittels Anionenmetathese mit Metallsalzen (3a) oder Brønsted-Säuren (3b).

Für den Anionenaustausch stehen unter anderem die Behandlung der Halogenidsalze mit Lewis-Säuren und die Anionenmetathese zur Verfügung. Erstere resultiert nach einfacher Mischung der Edukte in Chloroaluminatschmelzen und verwandten ionischen Flüssigkeiten der ersten Generation.

Erste Verfahren der Anionenmetathese verwendeten Silberionen zum Ionenaustausch, was in größerem Maßstab nicht rentabel ist. Für nicht mit Wasser mischbare ionische Flüssigkeiten werden mittlerweile die wässrigen Lösungen der Halogenidionen mit den freien Säuren, dem Alkalimetall- oder Ammoniumsalz der gewünschten Anionen in Verbindung gebracht. Als Nebenprodukt entsteht HCl, HBr, HI oder die Alkali-, oder Ammoniumsalze, welche leicht durch Waschen mit Wasser entfernt werden können. Mit Wasser mischbare ionische Flüssigkeiten werden prinzipiell nach dem selben Verfahren hergestellt. Es müssen allerdings organische Lösungsmittel entweder als Reaktionsmedium oder Extraktionsmittel eingesetzt werden. Für einzelne ionische Flüssigkeiten ist die Synthese in einem Schritt möglich. So kann aus 1-Methylimidazolium und Methyltriflat direkt Dimethylimidazolium-Triflat hergestellt werden.

Aufgrund des verschwindend geringen Dampfdrucks und des niedrigen Schmelzpunktes können ionische Flüssigkeiten nicht per Destillation oder Kristallisation aufgereinigt werden. Von Vorteil ist andererseits, dass alle flüchtigen Verunreinigungen leicht entfernt werden können. Zur Gewinnung eines reinen Produkts wird versucht, bereits möglichst reine Edukte einzusetzen und Synthesewege mit möglichst geringen Nebenprodukt-Konzentrationen zu wählen. So werden 1-Methylimidazolium, die Halogenalkane und alle verwendeten Lösungsmittel vor Gebrauch destilliert. Die ionischen Flüssigkeiten können bei Bedarf mit Aktivkohle weiter aufgereinigt werden. Reine ionische Flüssigkeiten sind farblos. Die oft beobachtete, leicht gelbliche Färbung entsteht durch Reaktionen während des Quaternisierungsschrittes. Die Menge der Verunreinigung ist jedoch meistens so gering, dass sie mittels NMR nicht detektiert

werden kann und somit, außer bei optischer Anwendung, nicht stören dürfte. Die größte Verunreinigung, selbst bei hydrophoben ionischen Flüssigkeiten, kann jedoch Wasser darstellen. In [BMIM][PF₆] sind bis zu 2 % w/w Wasser löslich, in [BMIM][Tf₂N] bis zu 1,4 % w/w. Für die Verwendung in wässrigen Zweiphasensystemen wie in dieser Arbeit stellt dies jedoch kein Problem dar.

Der Preis für kommerziell erhältliche ionische Flüssigkeiten ist mit bis über 2000 € L⁻¹ noch sehr hoch. Die auf Imidazolium basierenden ionischen Flüssigkeiten mit fluorierten Anionen finden sich dabei am oberen Ende der Preisspanne. Es wird allerdings allgemein damit gerechnet, dass mittelfristig ionische Flüssigkeiten, welche im Tonnenmaßstab produziert werden, für circa 50 € L⁻¹ erhältlich sein werden.

3.2 Ganzzell-Biokatalyse

Ganzzell-Biokatalyse ist die Beschleunigung einer chemischen Reaktion durch katalytisch wirksame Bestandteile, vor allem Enzyme, die in biologischen Zellen, meistens Mikroorganismen, hergestellt und ohne weitere Aufreinigung zur Reaktion eingesetzt werden.

3.2.1 Einsatzgebiete der Ganzzell-Biokatalyse

Die Ganzzell-Biokatalyse wird zunehmend dazu eingesetzt, Feinchemikalien, also spezielle, hochreine chemische Verbindungen für die Agro-, Nahrungsmittel- oder Pharmaindustrie, herzustellen (Faber 1997, Liese *et al.* 2000, Patel 2002, Schmid *et al.* 2001, Straathof *et al.* 2002). Vorteile der Biokatalyse, die auch isolierte Enzyme als Katalysatoren einschließt, gegenüber der chemischen Synthese sind die Reaktionsführung bei milden Bedingungen und die hohe Enantio- und Regioselektivität ohne den Nachteil einer Verwendung von Schutzgruppen (Bertau *et al.* 2002, Bommaris und Riebel 2004, Nakamura 2003). Dadurch werden Aufreinigungsschritte eingespart und die Menge unerwünschter Nebenprodukte verringert. In einigen Fällen kann eine biokatalytische Reaktion mehrere chemische Reaktionsschritte ersetzen, andere Reaktionen werden sogar erst durch Biokatalysatoren möglich. Die Vielzahl der Biokatalysatoren ist durch die ungeheure Anzahl von Organismen, auch in den extremsten Biotopen, durch Methoden der Gentechnik, des evolutionären oder rationalen Designs von Enzymen oder Verwendung neuer katalytischer Biomoleküle wie Ribonukleinsäuren, Antikörper oder modifizierte Cyclodextrine fast unbegrenzt (Singh *et al.* 2002, Robertson und Steer 2004).

Die Vorteile der Ganzzell-Biokatalyse gegenüber der enzymatischen Katalyse liegen in der einfachen Katalysatorherstellung ohne kostenintensive Reinigungsschritte und in der Möglichkeit der Nutzung eines intrazellulären Cofaktor-Regenerierungssystems im Falle von Reaktionen, die von diesen Transportmetaboliten, auch Coenzymen genannt, abhängen. So werden zum Beispiel bei Redoxreaktionen Elektronen von den Cofaktoren Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD), Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) oder NAD-Phosphat (NADP) übertragen.

3.2.2 Prozessgrößen der Ganzzell-Biokatalyse

Um einen biokatalytischen Prozess mit ganzen Zellen charakterisieren zu können, werden folgende Größen verwendet:

Der prozentuale Anteil an verbrauchtem Edukt wird als Umsatz X_E bezeichnet:

Gleichung 3.1:
$$X_E = \frac{n_{E,0} - n_E}{n_{E,0}} \cdot 100\%$$

mit $n_{E,0}$ Menge an eingesetztem Edukt, mol
 n_E Menge an verbleibendem Edukt, mol

Die Ausbeute η_P , auch chemische Ausbeute genannt, ist als prozentualer Anteil des gebildeten Produkts am eingesetzten Edukt, korrigiert durch das stöchiometrische Verhältnis, definiert. Sie steht also für die Effektivität der katalysierten Reaktion unter den gegebenen Bedingungen. Bei einem chiralen Produkt wird alleine das gewünschte Enantiomer als Produkt bezeichnet. Die Prozessausbeute gibt die effektiv nutzbare Ausbeute an. Somit wird nur die Menge an Produkt, die in der Extraktionsphase gewonnen wird, berücksichtigt.

Gleichung 3.2:
$$\eta_P = \frac{n_P - n_{P,0}}{n_{E,0}} \cdot \frac{|v_E|}{|v_P|} \cdot 100\%$$

mit $n_{P,0}$ Menge an Produkt zu Beginn der Reaktion, mol
 n_P Menge an Produkt am Ende der Reaktion, mol
 $n_{E,0}$ Menge an eingesetztem Edukt, mol
 v_E Stöchiometrischer Faktor für das Edukt, -
 v_P Stöchiometrischer Faktor für das Produkt, -

Der prozentuale Anteil an gebildetem Produkt pro verbrauchtem Substrat wird als Selektivität σ_P bezeichnet. Sie ist demnach ein reziprokes Maß für die Menge an unerwünschten Nebenprodukten.

Gleichung 3.3:
$$\sigma_P = \frac{n_P - n_{P,0}}{n_{E,0} - n_E} \cdot \frac{|v_E|}{|v_P|} \cdot 100\%$$

Zwischen Umsatz, Ausbeute und Selektivität besteht folgender Zusammenhang:

Gleichung 3.4:
$$\eta_P = \sigma_P \cdot X_E$$

Die Effizienz eines Prozesses als ökonomische Größe hängt stark von der Produktivität einer Reaktoranlage ab. Dafür ist die Raum-Zeit-Ausbeute RZA definiert, die auch volumetrische Produktivität genannt wird:

Gleichung 3.5:
$$RZA = \frac{m_P}{t \cdot V_R} \quad \text{oder} \quad RZA_{EA} = \frac{EA_X \cdot c_X}{t \cdot V_R}$$

mit	RZA	Raum-Zeit-Ausbeute, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ oder $\mu\text{kat L}^{-1} \text{h}^{-1}$
	m_P	Masse des gebildeten Produkts, g
	EA_X	spezifische Enzymaktivität, $\mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$
	c_X	Biotrockenmassekonzentration, $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$
	t	Reaktionszeit (oder Verweilzeit), h
	V_R	Reaktionsvolumen, L

Bei Prozessen mit chiralen Produkten ist der prozentuale Enantiomerenüberschuss (ee, enantiomeric excess) eine entscheidende Größe der Produktreinheit, da anschließende Aufreinigungsschritte, die zu einer Anreicherung des gewünschten Enantiomers führen, sehr aufwändig sind. Als Enantiomere werden spiegelbildliche Stereoisomere bezeichnet.

Gleichung 3.6:
$$ee = \frac{|n_{(R)} - n_{(S)}|}{n_{(R)} + n_{(S)}} \cdot 100\%$$

mit	$n_{(R)}$	Menge an (R)-Enantiomer, mol
	$n_{(S)}$	Menge an (S)-Enantiomer, mol

Besitzt eine Verbindung zwei oder mehr chirale Zentren (Anzahl n), so gibt es theoretisch 2^n Stereoisomere, praktisch aber wegen konstitutioneller Symmetrien oder zu starker sterischer Spannungen oft weniger. Stereoisomere, die sich nicht spiegelbildlich verhalten und deswegen unterschiedliche physikalische und chemische Eigenschaften besitzen können, werden als Diastereomere bezeichnet. Somit kann analog ein Diastereomerenüberschuss (de) definiert werden, der aber nur sinnvoll ist, wenn neben dem gewünschten Diastereomer (fast) nur noch ein weiteres Diastereomer vorliegt. Liegen mehrere weitere Diastereomere vor, muss ein Diastereomerenverhältnis definiert werden.

Gleichung 3.7:
$$de = \frac{|n_{(DS1)} - n_{(DS2)}|}{|n_{(DS1)} + n_{(DS2)}|} \cdot 100\%$$

mit $n_{(DS1)}$ Menge an Diastereomer 1, mol

$n_{(DS2)}$ Menge an Diastereomer 2, mol

Die Produktbildungskapazität PBK drückt die Menge an gebildetem Produkt pro eingesetztem Biokatalysator aus und ist daher ein Maß für die Wertschöpfung des Biokatalysators:

Gleichung 3.8:
$$PBK = \frac{n_P - n_{P,0}}{m_X}$$

mit PBK Produktbildungskapazität des Biokatalysators, mol g_{BTM}^{-1}

$n_{P,0}$ Menge an Produkt zu Beginn der Reaktion, mol

n_P Menge an Produkt am Ende der Reaktion, mol

m_X Biotrockenmasse des eingesetzten Biokatalysators, g_{BTM}

Die Zykluszahl tn (turnover number) bezeichnet die Menge an gebildetem Produkt pro Menge des bei Redoxreaktionen zugegebenen Cofaktors. Für effiziente Prozesse sollte sie mindestens 10^3 betragen, im günstigsten Fall $>10^5$.

Gleichung 3.9:
$$tn = \frac{n_P - n_{P,0}}{n_{Cofactor}} \cdot \frac{1}{|V_P|}$$

3.2.3 Herstellung von L-Aminosäuren mittels DAO-aktiven Mikroorganismen

Enantiomerenreine L-Aminosäuren sind einerseits wichtige Intermediate in der Synthese von Peptiden, Aminoalkoholen, Aminoaldehyden und vielen anderen Synthesebausteinen für die pharmazeutische Industrie. Andererseits werden Aminosäuren in großen Mengen als Nahrungsergänzungsmittel und Bestandteil in Infusionslösungen und Tiernahrung benötigt (Bommarius und Riebel 2004).

Die Herstellung von L-Aminosäuren kann unter anderem über die Aufreinigung aminosäurehaltiger Nebenprodukte der Lebensmittelindustrie (zum Beispiel Zuckerrübenmelasse), durch Kultivierung Aminosäure-exkretierender Mikroorganismen oder biokatalytisch über Racematspaltung von *N*-Acetyl-D,L-Aminosäuren mit L-Acylase oder von D,L-Aminosäuren mit D-Aminosäureoxidase (DAO, EC 1.4.3.3) erfolgen (Fischer 1998, Liese *et al.* 2000, Weuster-Botz 2003). Die biokatalytischen Verfahren besitzen dabei den Vorteil, dass mit ihnen auch eine Vielzahl nicht-natürlicher Aminosäuren zugänglich ist.

Die Racematspaltung von D,L-Aminosäuren mit DAO verläuft nach dem in Abbildung 3.4 dargestellten Reaktionsschema.

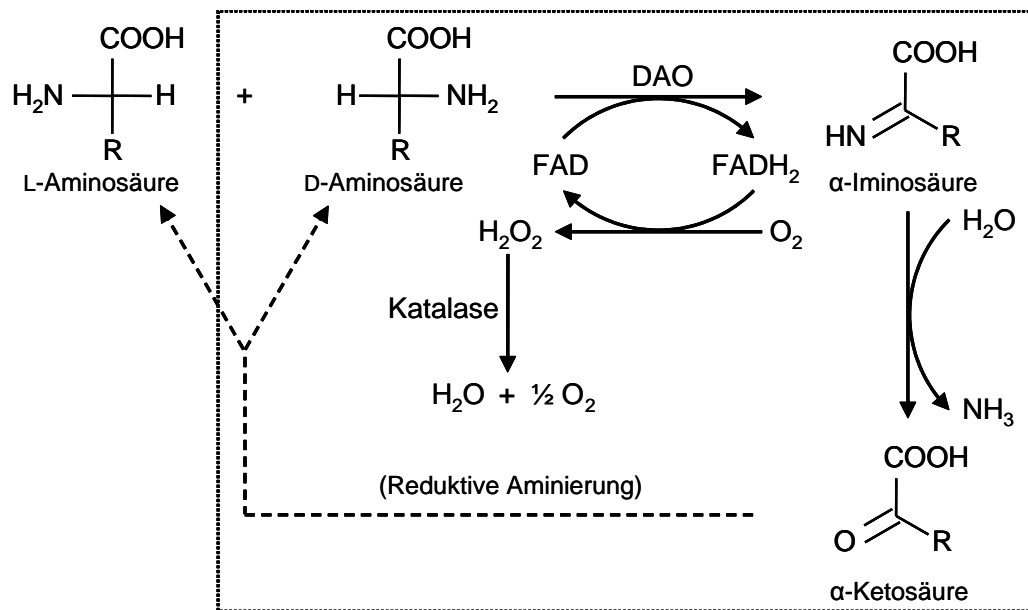


Abbildung 3.4 Racematspaltung von D,L-Aminosäuren mit D-Aminosäureoxidase (DAO) unter Verbrauch von Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD). Die D-Aminosäureoxidase ist dabei absolut stereospezifisch für D-Aminosäuren. Das gebildete Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wird vom ebenfalls in *Trigonopsis variabilis* vorhandenen Enzym Katalase gespalten. Die theoretische Steigerung der Ausbeute von 50 % auf 100 % L-Aminosäure ist über eine reduktive Aminierung möglich, die die gebildete Ketosäure äquimolar zu D- und L-Aminosäure umwandelt.

Zunächst katalysiert die DAO die Oxidation der D-Aminosäure zur α -Iminosäure. Dabei wird der Cofaktor FAD zu FADH_2 reduziert. Die Regenerierung des Cofaktors erfolgt in einer spontanen Reaktion mit molekularem Sauerstoff, wodurch Wasserstoffperoxid entsteht. Dieses kann in der Ganzzell-Biokatalyse durch Katalase, die in den Peroxisomen der meisten aeroben Organismen vorhanden ist, zu Wasser und Sauerstoff gespalten werden. Dadurch wird die toxische Wirkung von Wasserstoffperoxid auf die Zellen, zum Beispiel die Oxidation der SH-Gruppen, unterbunden. In einem zweiten Schritt hydrolysiert die α -Iminosäure unter Abspaltung von Ammoniak spontan zur korrespondierenden α -Ketosäure. Bei dieser Racematspaltung ist eine maximale Ausbeute von 50 % erreichbar. Über die Kopplung mit einer Reduktion der entstehenden α -Ketosäure zu racemischer Aminosäure kann dagegen theoretisch eine Ausbeute von 100 % erreicht werden (Huh *et al.* 1992).

Für die Ganzzell-Biokatalyse können DAO exprimierende Mikroorganismen wie *Trigonopsis variabilis*, *Fusarium oxysporum* oder rekombinante Stämme von *Escherichia coli* oder *Pichia pastoris* eingesetzt werden (Gabler und Fischer 1999, Hörner *et al.* 1996, Luo *et al.* 2004, Yu *et al.* 2002).

3.2.4 Herstellung chiraler Alkohole mittels ADH-aktiven Mikroorganismen

Enantiomerenreine Alkohole sind wichtige Bausteine für pharmazeutische und agrochemische Produkte, wie zum Beispiel HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine) und Antidepressiva. Die asymmetrische Reduktion von Ketonen stellt einen einfachen Zugang zu diesen Substanzen dar (Nakamura *et al.* 2003). Diese Reaktionen können sowohl mit chemischen Katalysatoren als auch mit Biokatalysatoren durchgeführt werden. Zu den möglichen chemischen Methoden gehören boranbasierte Katalysatoren sowie Übergangsmetallkomplexe wie zum Beispiel Ruthenium-BINAP, die die direkte Hydrierung mit Wasserstoff und die Transferhydrogenierung beschleunigen (Himeda *et al.* 2003, Ohkuma *et al.* 2003, Rautenstrauch *et al.* 2003, Wills und Hannedouche 2002). Letztere ist wegen teilweise hoher Aktivitäten und Produktreinheiten bis über 99 % ee attraktiv. In den meisten Fällen muss das gewünschte Produkt jedoch weiterhin in mehreren Schritten, zum Beispiel durch Umkristallisieren, aufgereinigt werden.

Folglich ist die Biokatalyse für viele Synthesen chiraler Alkohole eine Erfolg versprechende Alternative (Hage *et al.* 2001). Dabei werden Alkoholdehydrogenasen (ADH, EC 1.1.1.1 oder EC 1.1.1.2), auch Carbonylreduktasen genannt, in isolierter Form oder als Ganzzell-Biokatalysator eingesetzt. Die Enzyme benötigen dazu als Cofaktor NAD (EC 1.1.1.1) oder NADP (EC 1.1.1.2) in stöchiometrischem Verhältnis zum Edukt. Da die Cofaktoren sehr teuer sind, müssen sie für einen ökonomischen Prozess regeneriert werden. Beim enzymatischen Ansatz kann dies entweder über ein zweites isoliertes Enzym erfolgen, wodurch jedoch der Aufwand deutlich vergrößert wird. Dieser enzymgekoppelte Ansatz ist in Abbildung 3.5a dargestellt. Oder die Regenerierung erfolgt über das selbe Enzym (substratgekoppelter Ansatz), wie in Abbildung 3.5b zu sehen. Dabei hat der zugegebene Alkohol, meistens Isopropanol, oder das gebildete Keton oft toxische oder inhibierende Effekte. Beide Ansätze sind also mit Nachteilen verbunden.

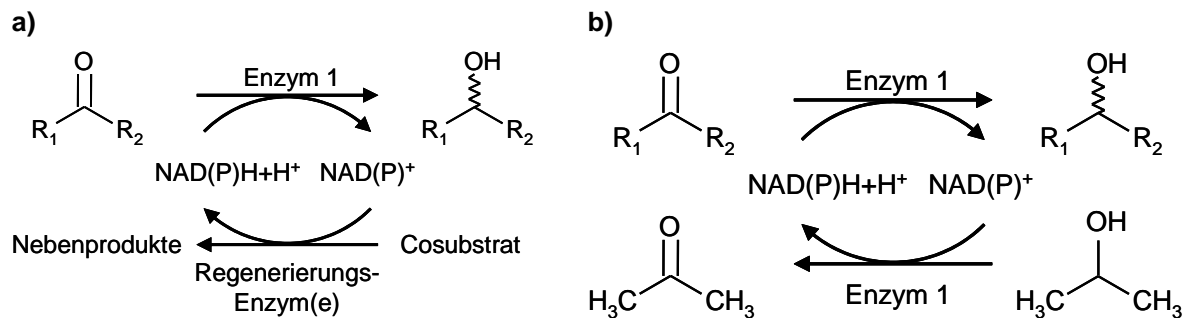


Abbildung 3.5 a) Enzymgekoppelter Ansatz der Enzymkatalyse und b) Substratgekoppelter Ansatz der Enzymkatalyse am Beispiel der Ketonreduktion.

Ganze Zellen haben gegenüber isolierten Enzymen den Vorteil, dass die Cofaktoren durch ein zellinternes Regenerierungs-System leicht wieder reduziert werden können. Zudem kann auf eine Zugabe von Cofaktoren ganz verzichtet werden, wenn die Zellmembran während der Reaktion intakt bleibt, da die Cofaktoren dann in ausreichender Konzentration in der Zelle vorliegen. Wird die Zellmembran jedoch beschädigt, „bluten“ die Zellen an Cofaktoren aus und die Reaktion kann nur durch externe Zugabe von Cofaktoren aufrecht erhalten werden. Bei ganzen Zellen ist der enzymgekoppelte Ansatz über ein einzelnes oxidierendes Enzym oder über einen Stoffwechselweg der Zellen möglich. Der substratgekoppelte Ansatz kann unter Umständen auch sinnvoll sein, wenn dadurch die Selektivität der Alkoholdehydrogenase hin zu einem höheren Enantiomerenüberschuss beeinflusst wird.

In der Industrie werden unter anderem bereits *Neurospora crassa* und *Zygosaccharomyces rouxii* als Ganzzell-Biokatalysatoren verwendet (Liese *et al.* 2000). Weitere Organismen mit interessanten ADH-Aktivitäten sind *Lactobacillus kefir* und *Saccharomyces cerevisiae* sowie rekombinante Stämme von *Escherichia coli* (Hummel 1990, Kometani *et al.* 1996, Nakamura *et al.* 2003).

3.2.5 Ganzzell-Biokatalyse schlecht wasserlöslicher, toxischer und instabiler Edukte

Die Ganzzell-Biokatalyse ist unter anderem wegen der Verwendung von Wasser anstelle organischer Lösungsmittel eine umweltschonende Technologie. Viele Edukte und Produkte, zum Beispiel asymmetrischer Ketonreduktionen, sind jedoch schlecht wasserlöslich oder instabil in Wasser. Zudem sind die Substanzen oft toxisch für die Zellen (molekulare Toxizität). Dadurch wird die Effizienz der rein wässrig durchgeführten Ganzzell-Biokatalyse stark herabgesetzt. Zur Lösung dieses Problems wurden verschiedene Ansätze entwickelt:

Einphasensysteme

Eine Möglichkeit zur Erhöhung der Eduktverfügbarkeit ist der Einsatz von Löslichkeitsvermittlern (Abbildung 3.6a). Wasserlösliche organische Lösungsmittel wie kurzkettige Alkohole oder DMSO und oberflächenaktive Substanzen wie Tenside oder Detergentien erhöhen die Konzentration der Edukte und Produkte im Reaktionsmedium (Lorraine *et al.* 1996, Nakamura *et al.* 2002). Die Instabilität und Toxizität der Substanzen kann dadurch aber nicht unterbunden werden. Zudem wirken die Löslichkeitsvermittler selbst oft toxisch auf die Zellen.

Cyclodextrine, torusförmige, zyklische Oligosaccharide aus sechs bis acht Glukoseeinheiten sind dagegen nicht toxische Löslichkeitsvermittler (Singh *et al.* 2002). Diese Moleküle sind durch ihre hydrophile Außenseite gut wasserlöslich. In ihrer lipophilen Kavität können sie hydrophobe Substanzen speichern (Abbildung 3.6b). Dadurch erhöhen sie die Eduktkonzentration im Reaktionsansatz und verringern gleichzeitig die Konzentrationen im wässrigen Medium. Von Nachteil ist allerdings die Neigung zur Ausfällung von komplexierten Cyclodextrinen bei höherer Konzentration und die Limitierung des Stoffaustausches durch die starke Bindung des Edukts. Diese Probleme können durch die Verwendung von Mono- und Disacchariden unterbunden werden, die sich selbst organisierend zu Cyclodextrin ähnlichen Komplexen mit dem Edukt zusammen lagern (Bertau und Jörg 2004). Von Nachteil ist hierbei allerdings die in einigen Prozessen unerwünschte Verstoffwechselung der Zuckermoleküle.

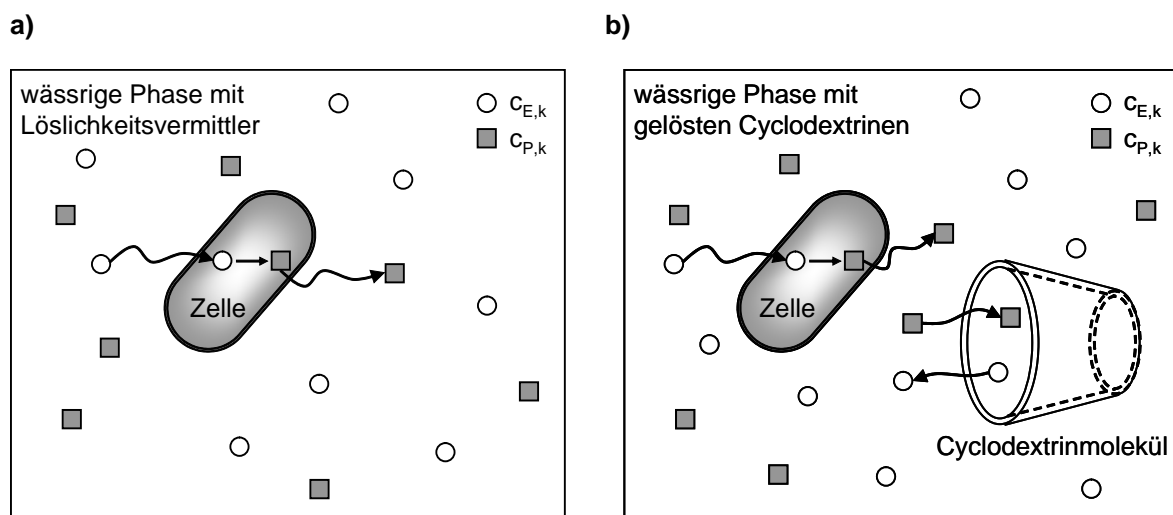


Abbildung 3.6 Einphasensysteme: **a)** Erhöhung der Eduktkonzentration in der kontinuierlichen Phase durch Löslichkeitsvermittler, **b)** Erhöhung der Eduktkonzentration in der kontinuierlichen Phase durch gelöste Cyclodextrine. $c_{E,k}$, $c_{P,k}$ Konzentration Edukt bzw. Produkt in der kontinuierlichen Phase.

Zwei-Flüssigphasen-Systeme

Wird das Edukt über die Löslichkeitsgrenze im wässrigen Medium hinaus eingesetzt, liegt im Reaktor eine zweite Phase aus reinem Edukt vor (Abbildung 3.7a). Diese ist meistens flüssig, kann im mikrokristallinen Ansatz aber auch fest sein (Schmitz *et al.* 2000). Ausreichenden Stoffübergang vorausgesetzt, kann die Mikrodispersion zu einer Erhöhung der Effizienz des Prozesses führen (Amidjojo 2004). Problematisch ist dabei allerdings, dass das Phasenverhältnis der Edukt-/Produktphase meistens $< 0,1$ beträgt, was zu Problemen bei der Phasentrennung führt. Außerdem wird die Stabilität der Substanzen nicht verbessert.

Die Stabilität der Edukte und Produkte kann dagegen durch den Einsatz einer zweiten flüssigen Phase erhöht werden (Abbildung 3.7b). Üblicherweise werden nicht mit Wasser mischbare organische Lösungsmittel verwendet, um die wässrige Konzentration dieser Substanzen zu verringern, wodurch zusätzlich deren Toxizität auf die Zellen herabgesetzt wird (León *et al.* 1998, Matsumoto *et al.* 2001). Gleichzeitig ist es möglich, die Effizienz des Prozesses zu steigern, da die Eduktkonzentration in der zweiten Phase sehr hoch gewählt werden kann. Es muss allerdings auf einen ausreichenden Stoffübergang über die Phasengrenzfläche geachtet werden. Dies erfolgt durch eine gute Dispergierung der zweiten Phase mittels erhöhtem Leistungseintrag oder Verwendung oberflächenwirksamer Substanzen. Problematisch bei diesem Ansatz ist jedoch die molekulare und die Phasentoxizität des Lösungsmittels auf die Zellen (Matsumoto *et al.* 2001).

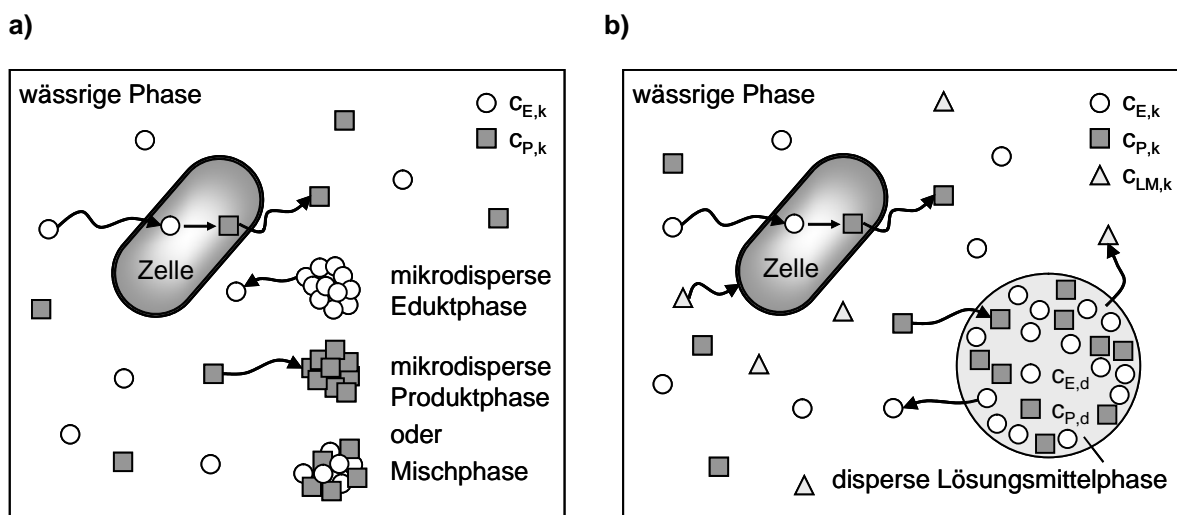


Abbildung 3.7 Zwei-Flüssigphasen-Systeme: **a)** Mikrodisperser Ansatz zur Steigerung der Eduktverfügbarkeit, **b)** Einsatz von organischen Lösungsmitteln als Eduktreservoir. $c_{E,d}$, $c_{P,d}$ Konzentration Edukt bzw. Produkt in der dispersen Phase. $c_{E,k}$, $c_{P,k}$, $c_{LM,k}$ Konzentration in der kontinuierlichen Phase (LM, Lösungsmittel).

Die molekulare Toxizität ergibt sich aufgrund der Membrangängigkeit der organischen Lösungsmittel, wodurch deren semipermeable Barrierefunktion zerstört wird und membrangebundene Enzyme inaktiviert oder denaturiert werden (León *et al.* 1998). Experimentell kann die Toxizität von organischen Lösungsmitteln daher mit Membranintegritätstests ermittelt werden. Über die Hydrophobizität, ausgedrückt durch den $\log P$ der organischen Lösungsmittel, kann deren Toxizität abgeschätzt werden (Laane *et al.* 1987). Der $\log P$ ist als dekadischer Logarithmus des Verteilungskoeffizienten des Lösungsmittels zwischen Wasser und 1-Octanol definiert. Nach Laane gibt es einen kritischen Wert für $\log P$, der einen Übergangsbereich bezeichnet, unter dem die Lösungsmittel stark toxisch wirken und über dem die Lösungsmittel nicht toxisch sind. Der Wert hängt vom jeweiligen Mikroorganismus ab. Generell ist er bei Gram-negativen Bakterien niedriger als bei Gram-positiven. Zusätzlich haben die Reaktionsbedingungen wie der Leistungseintrag einen Einfluss auf den kritischen $\log P$.

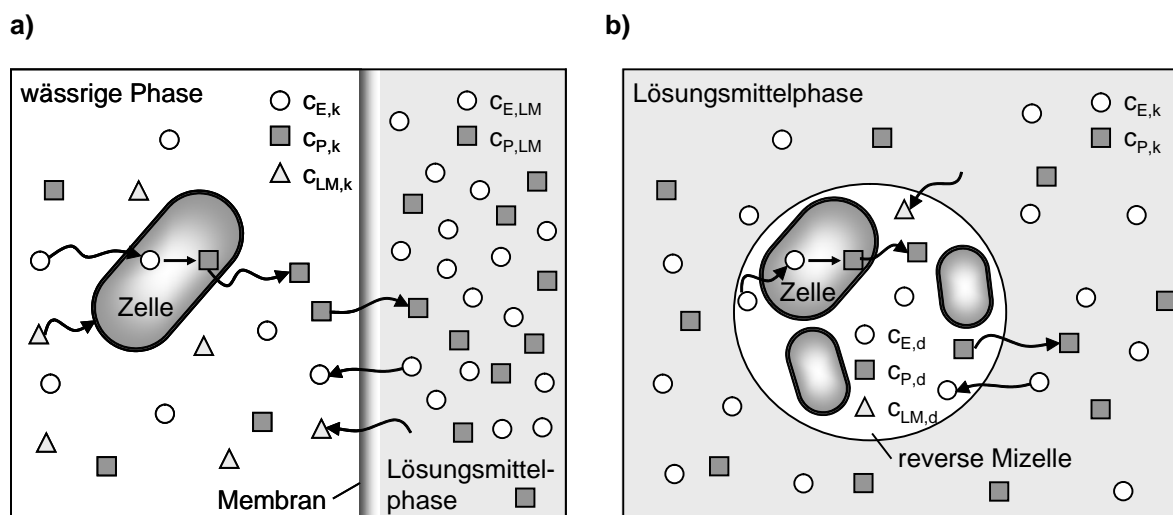


Abbildung 3.8 Zwei-Flüssigphasen-Systeme: **a)** Trennung der Lösungsmittelphase durch eine semipermeable Membran in einem Membranreaktor, **b)** Einsatz reverser Mizellen zum Schutz der Zellen vor der molekularen Toxizität des Lösungsmittels. $c_{E,k}$, $c_{P,k}$, $c_{LM,k}$ Konzentration Edukt, Produkt bzw. Lösungsmittel in der kontinuierlichen Phase. $c_{E,LM}$, $c_{P,LM}$, Konzentration in der Lösungsmittelphase. $c_{E,d}$, $c_{P,d}$, $c_{LM,d}$ Konzentration in der dispersen Phase.

Es ist nicht möglich, die molekulare Toxizität apparativ zu unterbinden. Die Phasentoxizität kann dagegen mit Hilfe eines Membranreaktors vermieden werden (Westgate *et al.* 1998). Dabei werden die beiden Phasen durch eine hydrophile Membran voneinander getrennt (Abbildung 3.8a). Durch leichten Überdruck auf

der Lösungsmittelseite wird die Phasengrenze in die Ebene der Membran gedrängt. Der apparative Aufwand ist allerdings für einen industriellen Maßstab erheblich.

Aussichtreicher ist dagegen der klassische Ansatz einer Dispersion, wenn es gelingt, die molekulare Toxizität der zweiten Phase auf die Zellen zu reduzieren. Dazu können einerseits die Toleranz der Mikroorganismen gegenüber organischen Lösungsmitteln erhöht oder von Natur aus besonders lösungsmittel-tolerante Organismen verwendet werden (Hahn und Botzenhart 2004, Matsumoto *et al.* 2001, Sardessai und Bhosle 2004). Andererseits ist es möglich, alternative Lösungsmittel mit höherer Biokompatibilität einzusetzen. Ein solches Lösungsmittel könnten überkritische Fluide, zum Beispiel überkritisches Kohlendioxid sein (Matsuda *et al.* 2000). Eine weitere Alternative könnten ionische Flüssigkeiten darstellen (Cull *et al.* 2000, Howarth *et al.* 2001). Bei beiden ist allerdings noch wenig über die jeweilige Biokompatibilität bekannt.

Ein weiteres Zwei-Flüssigphasen-System stellen reverse Mizellen dar (Abbildung 3.8b). In diesen Mikroemulsionen sind die Zellen in kleinen, mit oberflächenaktiven Substanzen stabilisierten Tröpfchen der wässrigen Phase enthalten (Prichanont *et al.* 2000). Ein organisches Lösungsmittel bildet die kontinuierliche Phase, in der die Edukte und Produkte gelöst werden. Dieser relativ neue Ansatz leidet zur Zeit noch darunter, dass die Mizellen nur wenige Stunden stabil sind.

Fest-/Flüssigphasen-Systeme

Das Problem der Toxizität der zweiten Phase kann durch die Verwendung von festen Phasen umgangen werden (Abbildung 3.9). Dabei werden entweder Edukt und Substrat an ein Harz wie zum Beispiel Amberlite XAD adsorbiert (Anderson *et al.* 1995). Alternativ werden die Zellen immobilisiert, zum Beispiel auf Celite, oder verkapselt, zum Beispiel mit Calciumalginat oder in Polyamid-Mikrokapseln (Green *et al.* 1996, Buque *et al.* 2002, Fernandes *et al.* 1998). Bei diesen Systemen ist allerdings oft der Stoffübergang limitierend, wodurch die Effizienz der Reaktion reduziert wird. Bei den Verkapselungen bleibt immer noch das Problem der molekularen Toxizität des organischen Lösungsmittels ungelöst.

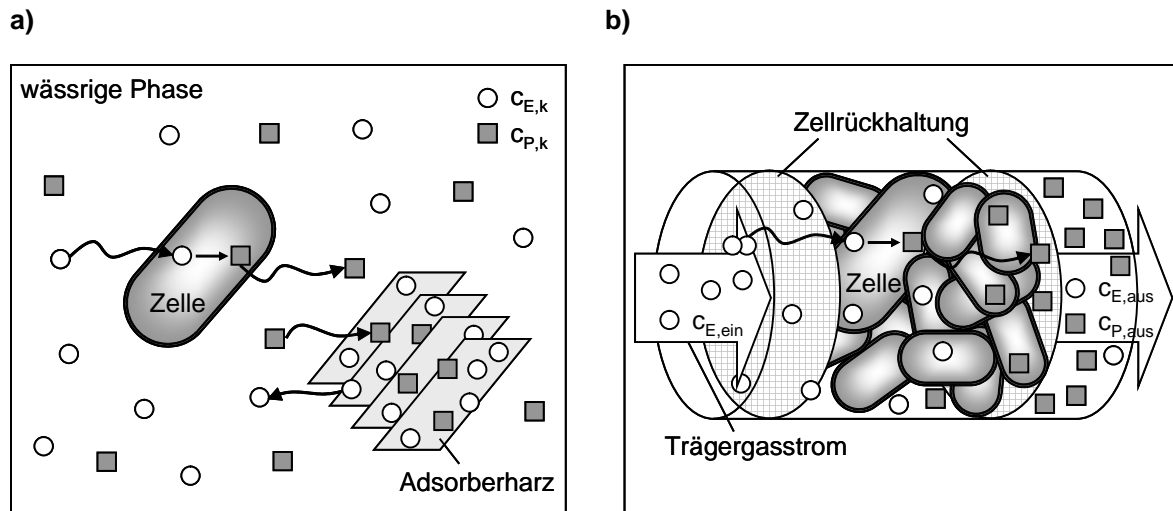


Abbildung 3.9 a) Einsatz von Adsorberharzen als Beispiel für ein Fest-/Flüssigphasen-System. b) Darstellung eines Fest-/Gasphasen-Systems mit Zellrückhaltung in einem Rohrreaktor. $c_{E,k}$, $c_{P,k}$ Konzentration Edukt bzw. Produkt in der kontinuierlichen Phase. $c_{E, \text{ein}}$, Konzentration Edukt im eingetragenen Trägergasstrom. $c_{E, \text{aus}}$, $c_{P, \text{aus}}$ Konzentration Edukt bzw. Produkt im ausgetragenen Trägergasstrom.

Fest-/Gasphasen-Systeme

Fest-/Gasphasen-Systeme nutzen inerte Gase wie Stickstoff als nichttoxische Lösungsmittel für die Ganzzell-Biokatalyse (Maugard *et al.* 2001). Dabei wird zum Beispiel ein Rohrreaktor, der mit immobilisierten, getrockneten Zellen gefüllt ist, mit einem Trägergasstrom durchströmt, der gasförmiges Edukt mitführt. Nachteile dieser recht neuen Methode sind allerdings noch die geringe Effizienz und die Tatsache, dass sie nur für gasförmige Edukte und Produkte einsetzbar ist.

3.3 Charakterisierung von Flüssig-Flüssig-Dispersionen

Dispersionen sind Gemenge mindestens zweier Stoffe, die sich nicht oder kaum ineinander lösen. Die disperse Phase ist dabei fein in der kontinuierlichen Phase verteilt. Beide Phasen sind aber deutlich voneinander abgegrenzt und können normalerweise leicht durch physikalische Methoden getrennt werden. In Flüssig-Flüssig-Dispersionen liegt die disperse Phase idealerweise als kugelförmige Tröpfchen vor. Die Beschreibung der Tropfengrößenverteilung und der Stofftransportprozesse ist die Grundlage für die kinetische Charakterisierung von Reaktionen in Flüssig-Flüssig-Dispersionen, da diese oft stofftransportlimitiert sind. Die Berechnung der Tropfengrößenverteilung ist aufgrund der vielen, vor allem in der Ganzzell-Biokatalyse zum Teil nicht bestimmbar Einflussfaktoren,

oft nicht exakt möglich. Im folgenden sollen die Grundlagen erläutert werden, die zu einer brauchbaren Abschätzung nötig sind. Der Verteilungskoeffizient von Stoffen zwischen beiden Phasen ist wichtig, um die Eignung des Lösungsmittels unter anderem als Extraktionsmittel für den Prozess bestimmen zu können.

3.3.1 Tropfenbildung in gerührten Systemen

Tropfen der dispersen Phase bilden sich durch Dispergierung, also Tropfen-zerteilung, verursacht aufgrund von Scherkräften, die durch das Rührorgan und eventuelle Strömungsbrecher im Reaktor erzeugt werden (Paul *et al.* 2004). Die Tropfen können sich aber bei Kollision wieder vereinigen. Im dynamischen Gleichgewichtszustand hält sich dieser Vorgang, Tropfenkoaleszenz genannt, die Waage mit der Tropfenzerkleinerung. Daraus resultiert allerdings keine einheitliche Tropfengröße, sondern eine Tropfengrößenverteilung, die als Volumen-Verteilungsdichte $q_3(d)$ oder als Volumen-Verteilungssumme $Q_3(d)$ beschrieben werden kann (Zlokarnik 1999).

Gleichung 3.10:
$$q_3(d_i) = \frac{n_i \cdot d_i^3}{\Delta d \cdot \sum_{i=1}^m n_i \cdot d_i^3}$$

mit n_i Anzahl der Tropfen mit dem Durchmesser d_i , -
 d_i Tropfendurchmesser der Klasse i ($0 \leq i \leq m$), μm
 Δd Klassenbreite der Tropfendurchmesser, μm

Gleichung 3.11:
$$Q_3(d_i) = \frac{\sum_{i=1}^n n_i \cdot d_i^3}{\sum_{i=1}^m n_i \cdot d_i^3}$$

mit d_i Tropfendurchmesser der Klasse i ($0 \leq i \leq n \leq m$), μm

Um die Tropfengrößenverteilung auf einen charakteristischen Wert zu reduzieren, wird der mittlere Sauterdurchmesser d_{32} verwendet. Er ist wie folgt definiert:

Gleichung 3.12:
$$d_{32} \equiv \frac{\sum_{i=1}^m n_i \cdot d_i^3}{\sum_{i=1}^m n_i \cdot d_i^2}$$

Je nach Reaktortyp und -geometrie besteht ein proportionaler Zusammenhang zwischen dem Sauterdurchmesser und dem maximalen Tropfendurchmesser d_{max} . Calabrese *et al.* (1986) bestimmten diesen für einen Rührkesselreaktor mit 6-Blatt-Scheibenrührer wie folgt:

Gleichung 3.13: $d_{32} = 0,6 \cdot d_{\max}$

Aus dem mittleren Sauterdurchmesser d_{32} und dem Phasenanteil der dispersen Phase φ_d lässt sich die auf das Volumen V_d der dispersen Phase bezogene Phasengrenzfläche a_d berechnen:

Gleichung 3.14:
$$a_d \equiv \frac{A}{V_d} = \frac{\sum_{i=1}^m \pi \cdot d_i^2}{\sum_{i=1}^m (\pi \cdot d_i^3 \cdot 6^{-1})} = \frac{6 \cdot \varphi_d}{d_{32}}$$

mit $\varphi_d = V_d \cdot V_{\text{ges}}^{-1}$

Unter Annahme einer konstanten Geometrie (Verhältnisse Reaktordurchmesser D_R zu Rührerdurchmesser d_R , Reaktorhöhe H zu Rührerdurchmesser d_R und Einbauhöhe des Rührers h zu Rührerdurchmesser d_R konstant) ist der mittlere Sauterdurchmesser von den Eigenschaften der dispersen und kontinuierlichen Phase sowie der Rührcharakteristik des Reaktors abhängig (Paul *et al.* 2004):

Gleichung 3.15: $d_{32} = f(d_R, \rho_d, \rho_k, \eta_d, \eta_k, \sigma_{d,k}, \varphi_d, g \cdot \Delta\rho, N_R)$

mit	ρ	Dichte, kg m^{-3}
	η	dynamische Viskosität, $\text{mPa s} = \text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1} = \text{N s m}^{-2}$
	$\sigma_{d,k}$	Grenzflächenspannung disperse/kontinuierliche Phase, $\text{N m}^{-1} = \text{kg s}^{-2}$
	g	Erdbeschleunigung, $9,81 \text{ m s}^{-2}$
	N_R	Rührerdrehzahl, s^{-1}

Für verdünnte Dispersionen ($\varphi_d < 0,01$) und disperse Phasen mit niedriger Viskosität ($\eta_d < 10 \text{ mPa s}$) konnte unter den Annahmen lokaler Isotropie und konstantem Leistungseintrag bei turbulenter Strömung ($Re > 10^4$) folgende semiempirische Gleichung zur Bestimmung des mittleren Sauterdurchmessers im Reaktor mit 6-Blatt-Scheibenrührern entwickelt werden (Paul *et al.* 2004):

Gleichung 3.16: $\frac{d_{32}}{d_R} = 0,053 \cdot We^{-0,6}$

Dabei gibt die Weberzahl We das Verhältnis der disruptiven Trägheitskraft zur kohäsiven Oberflächenkraft an:

Gleichung 3.17:
$$We = \frac{\rho_k \cdot N_R^2 \cdot d_R^3}{\sigma_{d,k}}$$

Die Grenzflächenspannung $\sigma_{d,k}$ ist, vereinfacht dargestellt, von den Oberflächenspannungen der einzelnen Phasen und den Dispersionskräften entlang und in der Grenzschicht abhängig (Dörfler 1994). Da letztere für ionische Flüssigkeiten in der Literatur (noch) nicht beschrieben sind, muss auf vergleichende Werte für

organisch/wässrige Dispersionen zurück gegriffen werden. Bei diesen ist zu beobachten, dass die Grenzflächenspannung zwischen den Werten für die Oberflächenspannungen der reinen Phasen liegen.

Für die Berechnung des mittleren Sauterdurchmessers einer leicht konzentrierten Dispersion ($0,01 < \varphi_d < 0,3$) muss der Phasenanteil mit berücksichtigt werden, da die disperse Phase in diesem Fall die Turbulenzkräfte dämpft (Paul *et al.* 2004):

Gleichung 3.18:
$$\frac{d_{32}}{d_R} = 0,053 \cdot (1 + 3 \cdot \varphi_d) \cdot We^{-0,6}$$

Diese Gleichung ist im Bereich $\varphi_d > 0,05$ allerdings nur gültig, wenn die disperse Phase nicht stark zur Koaleszenz neigt. Die Bestimmung der Koaleszenzneigung erfolgt durch Sedimentation nach heftigem Dispergieren. Erfolgt die Phasentrennung nach weniger als 10 Sekunden, handelt es sich um sehr schnelle Koaleszenz, die zur Ungültigkeit obiger Gleichung und Problemen bei der Maßstabsvergrößerung eines Prozesses führen. Bei Phasentrennung bis zu einer Minute muss die Koaleszenz berücksichtigt werden. Allgemein gültige mathematische Beschreibungen konnten dafür jedoch noch nicht entwickelt werden. Daher wird üblicherweise Gleichung 3.18 verwendet, wobei die Konstanten empirisch nach oben angepasst werden.

Bei viskosen dispersen Phasen ($10 \text{ mPa s} < \eta_d < 500 \text{ mPa s}$) darf die Viskositätskraft innerhalb des Tropfens bei der Tropfenzerkleinerung nicht mehr vernachlässigt werden. Für verdünnte Dispersionen ($\varphi_d < 0,01$) kann der mittlere Sauterdurchmesser nach folgender Gleichung berechnet werden (Paul *et al.* 2004):

Gleichung 3.19:
$$\frac{d_{32}}{d_R} = 0,053 \cdot We^{-0,6} \left(1 + 0,92 \cdot Vi^{0,84}\right)^{0,6}$$

Dabei entspricht die Viskositätskennzahl Vi dem Verhältnis der Viskositätskraft zur Oberflächenkraft, die den Tropfen stabilisieren.

Gleichung 3.20:
$$Vi = \left(\frac{\rho_k}{\rho_d}\right)^{0,5} \cdot \frac{\eta_d \cdot N_R \cdot d_R}{\sigma_{d,k}}$$

Für leicht konzentrierte Dispersionen ($0,01 < \varphi_d < 0,3$) mit viskoser disperser Phase ($10 \text{ mPa s} < \eta_d < 500 \text{ mPa s}$) konnte folgende Gleichung empirisch ermittelt werden (Paul *et al.* 2004):

Gleichung 3.21:
$$\frac{d_{32}}{d_R} = 0,053 \cdot (1 + 3 \cdot \varphi_d) \cdot We^{-0,6} \left(1 + 0,92 \cdot (1 - 2,5 \cdot \varphi_d) \cdot Vi^{0,84}\right)^{0,6}$$

Experimentell kann der mittlere Sauterdurchmesser mit folgenden Methoden bestimmt werden:

- Messung der Lichtabsorption/Lichtstreuung zur Bestimmung der mittleren, volumenbezogenen Tropfenoberfläche. Die Berechnung von d_{32} erfolgt mittels Gleichung 3.14. Diese Methode ist nur bei stabilen und verdünnten Dispersionen anwendbar.
- Mikrofotografische/röntgenmikroskopische Aufnahmen der Proben. Diese Methode ist ebenfalls nur bei stabilen Dispersionen anwendbar. Bei instabilen Dispersionen kann in manchen Fällen eine Stabilisierung durch plötzliches Abschrecken der Tropfen oder Grenzflächenpolykondensation der Tropfenoberfläche möglich sein.
- Phasendoppler-Anemometrie oder dreidimensionale optische Laserrückreflexionsmessung. Mit diesen Methoden sind *in situ*-Messungen möglich.

3.3.2 Berechnung des Stofftransports

Die zwei wichtigsten Modelle zur Beschreibung von Stofftransportmechanismen sind das Penetrationsmodell und das Filmmodell. Ersteres geht davon aus, dass die Grenzschicht kontinuierlich in einer charakteristischen Kontaktzeit durch Wirbel ersetzt wird, wodurch ein konvektiver Stofftransport zwischen den Wirbeln und ihrer Umgebung geschwindigkeitsbestimmend ist. Dieses Modell nähert sich der Realität bei neu gebildeten Phasengrenzflächen. Das Filmmodell nimmt dagegen an, dass es in den Phasen nahe der Grenzschicht Regionen (Filme) gibt, in denen ein rein diffusiver Stofftransport geschwindigkeitsbestimmend ist (Zweifilmmodell, Abbildung 3.10a). Dieses Modell trifft die Realität von Phasengrenzflächen, die nicht gerade erst gebildet wurden, besser. Für eine Abschätzung des Stofftransports in dieser Arbeit wurde das Filmmodell verwendet.

Für Flüssig-Flüssig-Dispersionen ist bekannt, dass Tropfen der dispersen Phase als starre Kugeln beschrieben werden können, innerhalb denen der Stofftransport ausschließlich diffusiv erfolgt, wenn diese klein sind ($< 2,5$ mm) (Zlokarnik 1999). Dadurch reduziert sich die Betrachtung des Stoffübergangs auf die Vorgänge an und in der Phasengrenzfläche. Im Allgemeinen wird angenommen, dass der Stofftransportwiderstand der Phasengrenzfläche gegenüber den Widerständen in den Phasen nahe der Grenzschicht vernachlässigbar ist (Schügerl 1994). Das heißt, dass in der Phasengrenzfläche thermodynamisches Gleichgewicht angenommen werden kann.

Ist der Verteilungskoeffizient $\log D$ (Lösungsmittel/wässrige Phase) des gelösten Stoffes groß ($\log D \gg 0$), ist der Stofftransportwiderstand in der Lösungsmittelphase gegenüber dem der wässrigen Phase vernachlässigbar (Schügerl 1994). Damit verringert sich das Zweifilmmodell zum Einfilmmodell (Abbildung 3.10b).

Dadurch kann eine Edukttransfertrate ETR_{\max} für den Übergang von Edukt aus der Eduktreservoir-Phase in die kontinuierliche wässrige Phase beschrieben werden:

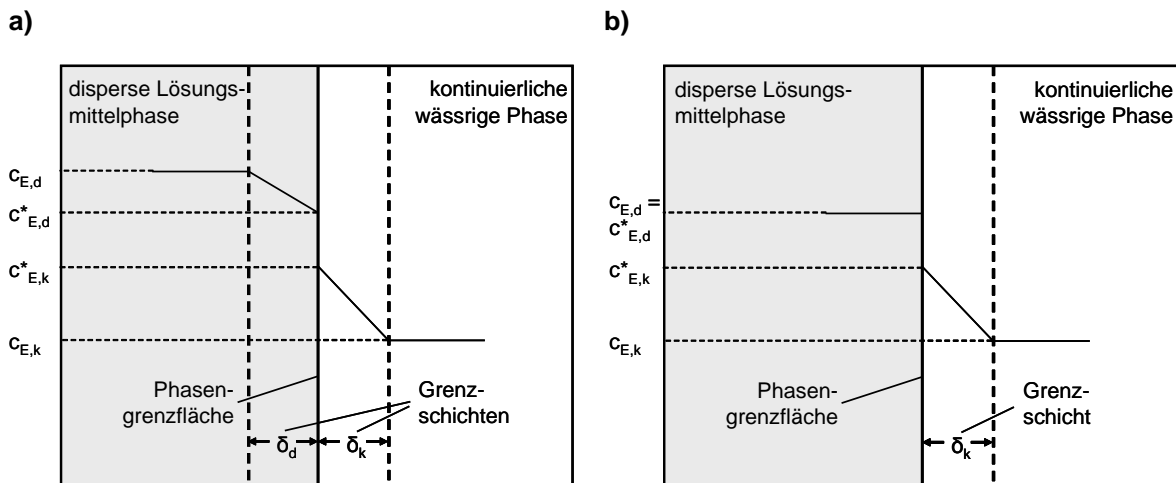


Abbildung 3.10 a) Zweifilmmodell des Edukt-Stoffübergangs in Flüssig-Flüssig-Dispersionen, b) Einfilmmodell. $c_{E,k}^*$, $c_{E,d}^*$ Gleichgewichtskonzentration des Edukts an der Phasengrenzfläche in der kontinuierlichen bzw. dispersen Phase. $c_{E,k}$, $c_{E,d}$ Konzentration des Edukts in der kontinuierlichen bzw. dispersen Kernphase.

Gleichung 3.22:
$$ETR_{\max} = \beta_E \cdot a_d \cdot (c_{E,k}^* - c_{E,k})$$

mit	ETR_{\max}	Edukttransfertrate, $\text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1} = 10^6 \mu\text{kat L}^{-1}$
	β_E	Stoffübergangskoeffizient des Edukts, m s^{-1}
	a_d	Phasengrenzfläche auf Volumen der dispersen Phase bezogen, m^{-1}
	$c_{E,k}^*$	Gleichgewichtskonzentration des Edukts an der Phasengrenzfläche auf Seiten der kontinuierlichen Phase (= Sättigungskonz.), mol L^{-1}
	$c_{E,k}$	Konzentration des Edukts in der kontinuierlichen Phase, mol L^{-1}

Die Edukttransfertrate unterschreitet den Wert von ETR_{\max} , sobald die Gleichgewichtskonzentration an der Phasengrenzfläche durch eine geringere Konzentration in der Kernphase des Lösungsmittels abnimmt.

Der Stoffübergangskoeffizient β_E ist über die Definition der dimensionslosen Sherwoodzahl Sh und die empirische Beziehung für die Sherwoodzahl aus Experimenten mit dispergierten Tropfen im Rührkesselreaktor abschätzbar (Paul *et al.* 2004).

Gleichung 3.23:
$$Sh = \frac{\beta_E \cdot d_{32}}{D_{E,k}}$$

mit	$D_{E,k}$	Diffusionskoeffizient des Edukts in die kontinuierliche Phase, $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$
-----	-----------	--

$$\text{Gleichung 3.24: } Sh = 1,237 \cdot 10^{-5} \cdot Sc_k^{1/3} \cdot Re^{2/3} \cdot Fr^{5/12} \cdot \left(\frac{d_R}{d_{32}}\right)^2 \cdot \left(\frac{d_{32}}{D_R}\right)^{1/2} \cdot \left(\frac{\rho_d \cdot d_{32}^2 \cdot g}{\sigma_{d,k}}\right)^{5/4} \cdot \varphi_d^{-1/2}$$

mit	Schmidtzahl	$Sc_k = \frac{\eta_k}{\rho_k \cdot D_{E,k}}$	(Viskosität/Diffusion)
	Froudezahl	$Fr = \frac{N_R^2 \cdot d_R}{g}$	(Trägheit/Schwerkraft)
	Reynoldszahl	$Re = \frac{d_R^2 \cdot N_R \cdot \bar{\rho}}{\bar{\eta}}$	(Trägheit/Viskosität)

$$\text{Gleichung 3.25: } \bar{\rho} = \rho_k \cdot (1 - \varphi_d) + \rho_d \cdot \varphi_d$$

$$\text{Gleichung 3.26: } \bar{\eta} = \frac{\eta_k}{1 - \varphi_d} \left(1 + \frac{1,5 \cdot \eta_d \cdot (1 - \varphi_d)}{\eta_d - \eta_k} \right) \text{ oder}$$

$$\text{Gleichung 3.27: } \bar{\eta} = \eta_d^{\varphi_d} \cdot \eta_k^{(1-\varphi_d)}$$

Zur Bestimmung der Reynoldszahl müssen die kombinierte Dichte $\bar{\rho}$ und die kombinierte Viskosität $\bar{\eta}$ ermittelt werden. Bei leicht konzentrierten Lösungen ($0,01 < \varphi_d < 0,3$) werden die kombinierten Werte wie oben beschrieben errechnet (Gleichung 3.25, Gleichung 3.26, Gleichung 3.27, Kneule 1986). Bei verdünnten Dispersionen können die Werte der kontinuierlichen Phase verwendet werden. Zu beachten ist weiterhin die Änderung der Viskosität einer Phase durch das Lösen von Edukt, Produkt oder Teilen der anderen Phase.

Zur Ermittlung des Diffusionskoeffizienten $D_{E,k}$ des Edukts aus der dispersen Phase in die kontinuierliche Phase wurde eine Vielzahl von Modellen formuliert, die in Tabelle 3.2 zusammengefasst sind.

Tabelle 3.2: Modelle zur Berechnung des Diffusionskoeffizienten $D_{E,k}$ in Flüssig-Flüssig-Dispersionen.

Modell	Berechnung	Quelle
Wilke-Chang	$D_{E,k} = 7,4 \cdot 10^{-8} \cdot \frac{(\Phi_k \cdot MG_k)^{1/2} \cdot T}{\eta_k \cdot MV_E^{0,6}}$	Sherwood et al. 1975 Reid et al. 1988
Othmer-Thaker	$D_{E,k} = 1,4 \cdot 10^{-4} \cdot \eta_k^{-1,1} \cdot MV_E^{-0,6}$	Sherwood et al. 1975
Reddy-Doraiswamy	$D_{E,k} = k_{RS} \cdot \frac{T}{\eta_k} \cdot \frac{MG_k^{1/2}}{(MV_E \cdot MV_k)^{1/3}}$ mit: $k_{RS} = 8,5 \cdot 10^{-8}$ für $\frac{MV_k}{MV_E} > 1,5$	Sherwood et al. 1975
Tyn-Calus	$D_{E,k} = 8,93 \cdot 10^{-8} \cdot \left(\frac{MV_E}{MV_k^2}\right) \cdot \left(\frac{P_k}{P_E}\right)^{0,6} \cdot \frac{T}{\eta_k}$ mit: $P = MV \cdot \sigma^{1/4}$	Reid et al. 1988
Hayduk-Minhas	$D_{E,k} = 1,25 \cdot 10^{-8} \cdot (MV_E^{-0,19} - 0,292) \cdot T^{1,52} \cdot \eta_k^{\varepsilon^*}$ mit: $\varepsilon^* = \frac{9,58 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}}{MV_E} - 1,12$	Reid et al. 1988
mit	Φ_k	Assoziationskoeffizient der kontinuierlichen Phase, -, für Wasser: 2,6
	MG_k	Molekulargewicht der kontinuierlichen Phase, g mol ⁻¹
	T	absolute Temperatur, K
	MV_E, MV_k	molares Volumen des Edukts, der kontinuierlichen Phase, cm ³ mol ⁻¹
	P_E, P_k	Parachor des Edukts, der kontinuierlichen Phase, cm ³ g ^{1/4} mol ⁻¹ s ^{-1/2}
	σ	Oberflächenspannung, dyn cm ⁻¹ = g s ⁻² = 10 ⁻³ N m ⁻¹

3.3.3 Verteilungskoeffizient gelöster Substanzen

Nach dem Verteilungssatz von Nernst ist bei gegebenem Druck und Temperatur das Verhältnis der Konzentrationen eines gelösten Stoffes zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Flüssigkeiten konstant, unabhängig von den absoluten Konzentrationen. Nach diesem Grundsatz kann ein Verteilungskoeffizient $D_{1/2}$ des gelösten Stoffes zwischen den beiden Phasen ermittelt werden (Schügerl 1994):

Gleichung 3.28:
$$D_{1/2} = \frac{C_{\text{Phase1}}}{C_{\text{Phase2}}}$$

mit $C_{\text{Phase } i}$ Konzentration des gelösten Stoffs in Phase i , mol L⁻¹

In dieser Arbeit wird der dekadische Logarithmus $\log D_{1/2}$ verwendet.

3.4 Biologische Grundlagen der Mikroorganismen

Die in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen unterscheiden sich in ihrem Aufbau und in ihren nutzbaren katalytischen Eigenschaften. So sind darunter Repräsentanten der Eukaryonten sowie der Gram-positiven und Gram-negativen Prokaryonten. Sie besitzen als Wildtyp- oder rekombinante Zellen FAD-, NAD- oder NADP-abhängige Redoxenzyme sowie unkatalysierte, einzelenzymatische oder metabolische Regenerierungssysteme.

3.4.1 *Trigonopsis variabilis* (wt)

Trigonopsis variabilis ist ein Hefepilz und gehört somit zur Familie der Saccharomycetaceae (Abbildung 3.11). Die Zellen wachsen abhängig von den Nährstoffbedingungen in dreieckiger oder elipsoider Morphologie (Sasek und Becker 1969). Sie vermehren sich durch unipolare Sprossung und bilden keine Sporen (Walker 1999). Der Organismus ist obligat aerob und nicht fähig zur Gärung (Montes *et al.* 1998).

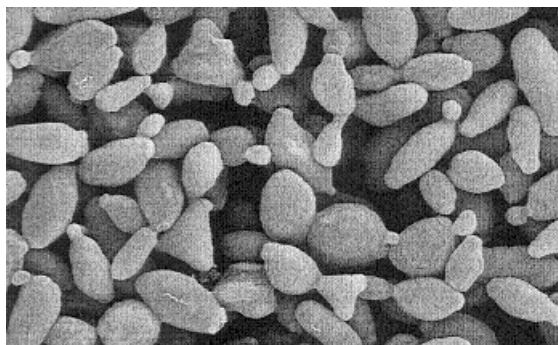


Abbildung 3.11 Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Trigonopsis variabilis* (Müller 2000). Es sind dreieckige Zellen zu erkennen, die dieser Species den Namen gaben.

Trigonopsis variabilis exprimiert eine D-Aminosäureoxidase, die zur Racematspaltung von Aminosäuren und zur Herstellung von α -Ketosäuren und 7-Aminocephalosporansäure, einer Schlüsselsubstanz vieler semisynthetischer β -Lactam-Antibiotika, genutzt werden kann (Shenthesanmugan und Nickerson 1962,

Brodelius *et al.* 1981, Serizawa 1980). Die Expression des Enzyms kann durch D-Aminosäuren oder deren Analoga, wie zum Beispiel *N*-Carbamoyl-D-Alanin, das von *Trigonopsis variabilis* nicht als Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle verwendet wird, um ein Vielfaches gesteigert werden (Hörner *et al.* 1996). Die meist als Homodimer vorliegende DAO ist vom Cofaktor FAD abhängig. Ein Molekül FAD pro Monomer ist zwar nicht kovalent, aber dennoch sehr stabil mit dem Enzym verbunden. Es kann weder durch Trypsinbehandlung noch durch Kochen oder Phenolextraktion vom Enzym getrennt werden (Szwajcer und Mosbach 1985). Das während der Aminosäureoxidation reduzierte FAD wird bei Anwesenheit von Sauerstoff unter Bildung von Wasserstoffperoxid spontan regeneriert (Abbildung 3.4). *Trigonopsis variabilis* besitzt außerdem eine starke Katalase-Aktivität, die das entstandene Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff spaltet.

Die DAO aus *Trigonopsis variabilis* wurde inzwischen in einer Reihe von Wirtsorganismen, darunter *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* und *Schizosaccharomyces pombe* exprimiert (Lin *et al.* 2000, Yu *et al.* 2002, Isoai *et al.* 2002). In *Escherichia coli* wird mit Hilfe eines Lactose-induzierbaren Promotors eine sehr hohe DAO-Aktivität von $390 \mu\text{kat L}^{-1}$ erreicht (Hwang *et al.* 2002). Für einen sinnvollen Einsatz als Ganzzell-Biokatalysator der D-Aminosäureoxidation muss aber eine ausreichend hohe Katalase-Aktivität gewährleistet sein. Dazu müsste eventuell eine rekombinante Katalase coexprimiert werden.

3.4.2 *Saccharomyces cerevisiae* (wt)

Saccharomyces cerevisiae gehört ebenfalls zur Familie der Saccharomyceticeae (Abbildung 3.12). Die elipsoiden Zellen vermehren sich asexuell in multilateraler Sprossung oder sexuell durch Sporenbildung (Walker 1999). Der Organismus ist sowohl zur Atmung mit den Endprodukten CO_2 und Wasser als auch zur Gärung mit den Endprodukten CO_2 , Ethanol, Succinat, Glycerin und anderen Stoffen fähig.

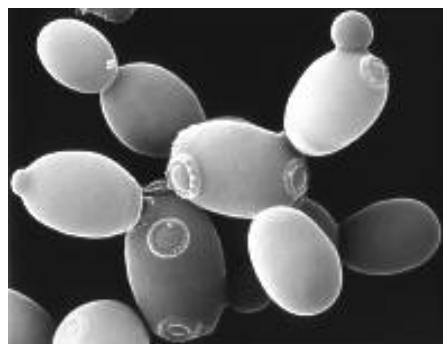


Abbildung 3.12 Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Saccharomyces cerevisiae* (Foodnews 2005). Es sind Sprosse und Sprossnarben zu erkennen.

Saccharomyces cerevisiae exprimiert eine ganze Reihe von Enzymen mit ADH-Aktivität (Sybesma *et al.* 1998, Katz *et al.* 2003, Kaluzna *et al.* 2004). Da diese oft überlappende Substratspektren und entgegengesetzte Stereospezifitäten aufweisen, können bei Ganzzell-Biotransformationen mit Wildtypstämmen meist nur unzureichende Enantiomerenreinheiten erreicht werden. Strategien diesem entgegenzuwirken bestehen entweder darin, konkurrierende Enzymaktivitäten zu unterbinden oder das gewünschte Enzym überzuexprimieren.

3.4.3 *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6

Saccharomyces cerevisiae FasB His6 ist ein rekombinanter *Saccharomyces cerevisiae* CM3260-Stamm, der die zelleigene Fettsäuresynthase unter dem Phosphoglyceratkinase-Promotor überexprimiert (Engelking 2004a). Das Enzym akzeptiert sowohl NAD als auch NADP als Cofaktor, wobei die Aktivität mit NAD nur ein Viertel der Aktivität mit NADP beträgt (Lynen 1969). Zur Cofaktorregenerierung enthält er zusätzlich eine thermostabile Variante der Glukosedehydrogenase (GDH) aus *Bacillus subtilis* unter dem *Saccharomyces cerevisiae* ADH-Promotor.

3.4.4 *Escherichia coli* (wt)

Escherichia coli gehört zur Familie der Enterobacteriaceae, Gram-negative, fakultativ anaerobe Stäbchen-Bakterien, die keine Sporen bilden (Singleton 1999, Abbildung 3.13). Sie können sowohl durch Atmung als auch durch Gärung Energie gewinnen und wachsen auf synthetischen Minimalmedien. Die einfache Kultivierung und gentechnische Manipulierbarkeit von *Escherichia coli* prädestinierten diesen Organismus zu seiner prominenten Rolle in der Biotechnologie und speziell in der Biokatalyse (Liese *et al.* 2000).

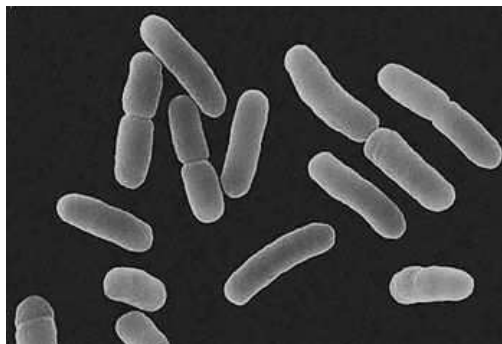


Abbildung 3.13 Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Escherichia coli* (vbi 2005).

Ein großer Vorteil für die Verwendung von *Escherichia coli*-Stämmen für die heterologe Expression von ADHs ist die im Vergleich zu Hefen sehr niedrige bis inexistente ADH-Aktivität homologer Enzyme gegenüber interessanten Edukten (Hildebrandt *et al.* 2002). Dadurch können bei der Ganzzell-Biokatalyse mit diesen Stämmen hoch enantiomerenreine Alkohole gewonnen werden.

3.4.5 *Escherichia coli* DH5 α PFADH

Der rekombinante Stamm *Escherichia coli* DH5 α PFADH enthält eine stereospezifische ADH aus *Pseudomonas fluorescens* DSM 50106 (PF-ADH) unter einem Rhamnose-induzierbaren Promotor (Hildebrandt 2002). Das Enzym hydriert eine Reihe zyklischer und aromatischer Ketone mit NADH als Cofaktor. Im Unterschied zu den meisten bekannten Dehydrogenasen stellt das Enzym das Hydrid-Ion nach der anti-Prelog-Regel von der *si*-Seite bereit, wodurch, in einfachen Fällen, ein (*R*)-Alkohol gebildet wird (Faber 1997, Hildebrandt *et al.* 2001). Der Stamm enthält kein rekombinantes Enzym zur Cofaktorregenerierung. Somit muss diese bei der Ganzzell-Biokatalyse entweder über den Zentralstoffwechsel oder über einen substratgekoppelten Ansatz erfolgen.

3.4.6 *Lactobacillus kefir* (wt)

Lactobacillus kefir gehört zu den Milchsäurebakterien (Axelsson 1998, Kandler und Kunath 1983). Diese in der Familie der Lactobacteriaceae zusammengefassten Gram-positiven, obligat fermentativen Stäbchen oder Kokken bilden keine Sporen und sind meist unbeweglich (Schlegel 1992, Abbildung 3.14). Sie sind auf Kohlenhydrate angewiesen, können Lactose verwerten und scheiden Milchsäure als Stoffwechselendprodukt aus. Sie benötigen meist einige Vitamine, Aminosäuren, Purine und Pyrimidine, weshalb sie auf Komplexmedien kultiviert werden.

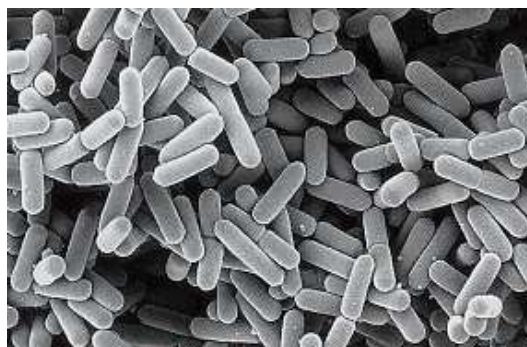


Abbildung 3.14 Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Lactobacillus* (Species unbekannt) (uppi 2005).

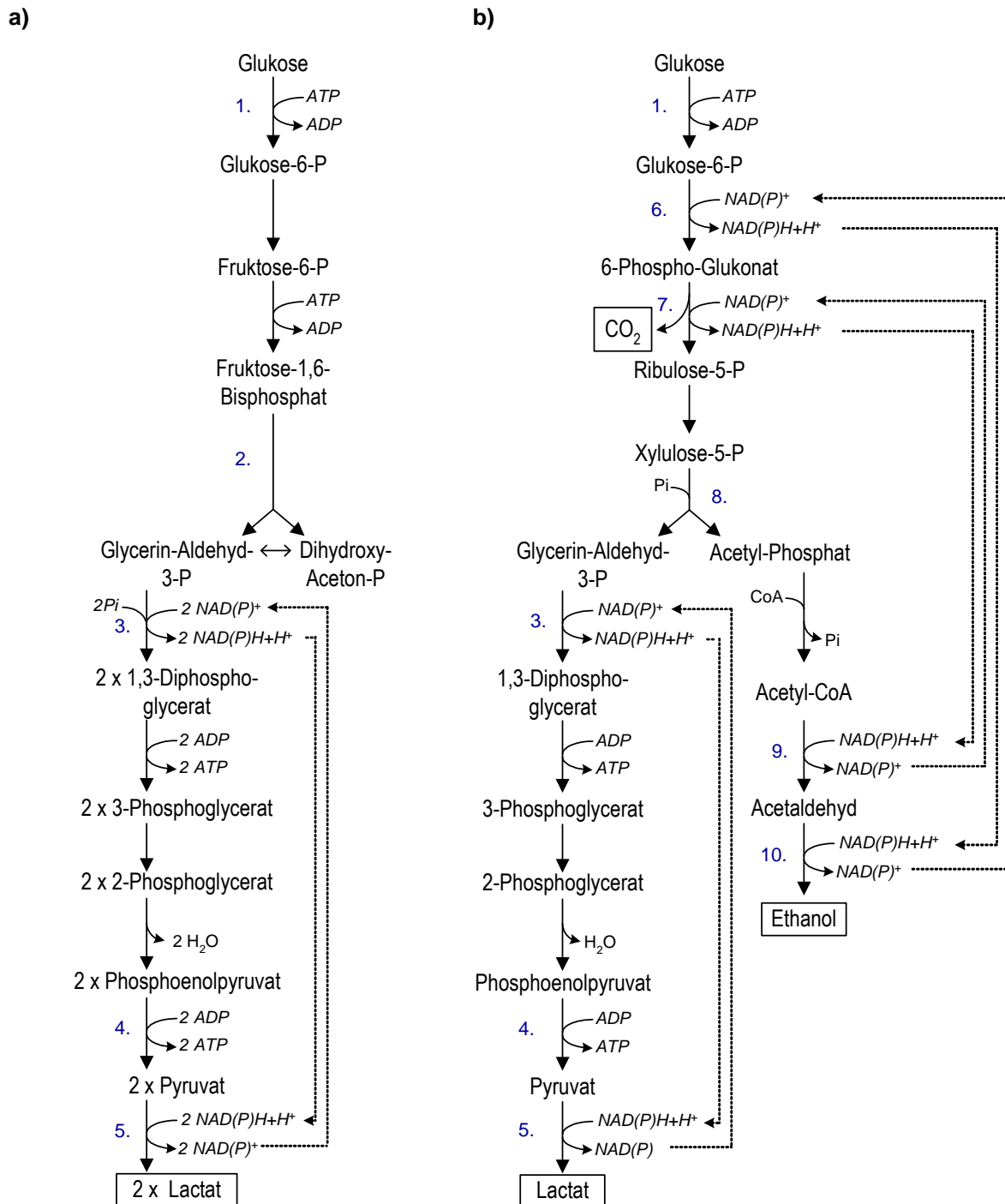


Abbildung 3.15 Zentralstoffwechselwege für Glukose bei Milchsäurebakterien: **a)** Homofermentative Milchsäuregärung. **b)** Heterofermentative Milchsäuregärung. Gekennzeichnete Enzyme: 1. Glukokinase, 2. Fruktose-1,6-Diphosphat-Aldolase, 3. Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 4. Pyruvatkinase, 5. Lactatdehydrogenase, 6. Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 7. 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase, 8. Phosphoketolase, 9. Acetaldehyd-Dehydrogenase, 10. Alkoholdehydrogenase (aus Axelsson 1998).

Die heterogene Gattung *Lactobacillus* umfasst Stäbchen, die je nach Ausstattung mit Fruktose-1,6-Diphosphat-Aldolase (Enzym 2) und Phosphoketolase (Enzym 8) obligat homofermentativ ($2^+, 8^-$), fakultativ heterofermentativ ($2^+, 8^+$) oder obligat heterofermentativ ($2^-, 8^+$) sind (Abbildung 3.15). Homofermentative Milchsäurebakterien verstoffwechseln Glukose ausschließlich zu Lactat. Die heterofermentative Gärung resultiert dagegen auch in den Produkten Ethanol, Acetat und Kohlendioxid. In Gegenwart eines externen Elektronenakzeptors wie Sauerstoff ist die Menge des gebildeten Acetats größer (Abbildung 3.16). Dadurch kann pro Mol Glukose mehr Energie in Form von ATP gewonnen und somit mehr Biomasse gebildet werden. Das entstehende Wasserstoffperoxid ist aber möglicherweise schädlich für die Zellen, da Milchsäurebakterien keine Katalase-Aktivität besitzen. *Lactobacillus kefir* gehört zu den heterofermentativen Milchsäurebakterien, ob fakultativ oder obligat ist nicht bekannt.

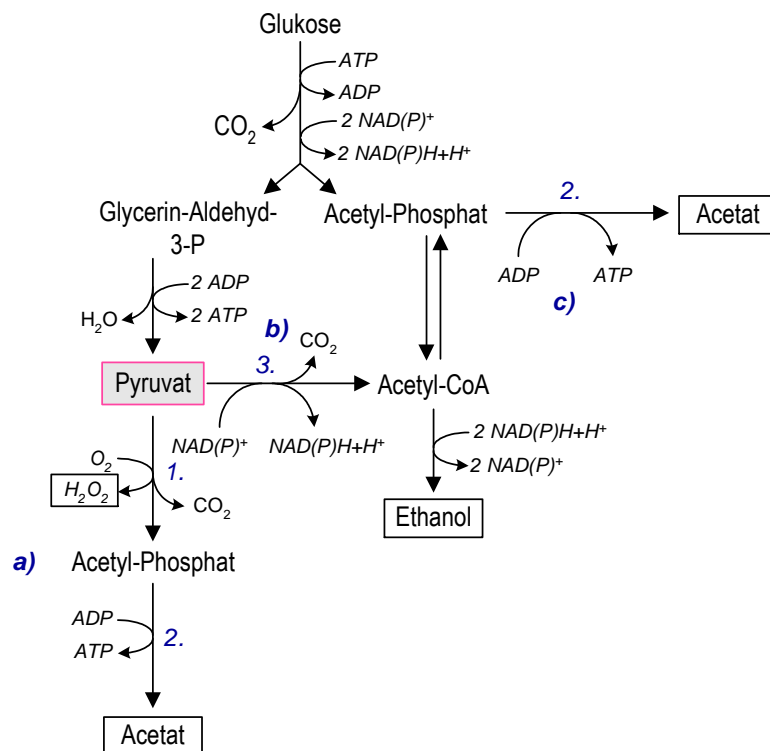


Abbildung 3.16 Mögliche Wege des Pyruvatmetabolismus: **a)** Metabolisierung zum Acetat über Acetylphosphat unter aeroben Bedingungen (Enzyme 1 und 2). **b)** Metabolisierung zum Acetylphosphat unter Bildung von NAD(P)H (Enzym 3). **c)** Konkurrenz zur Ethanol-Bildung (Enzyme 3 und 2). Gekennzeichnete Enzyme: 1. Pyruvatdehydrogenase, 2. Acetatkinase, 3. Pyruvatoxidase (aus Axelsson 1998).

Lactobacillus kefir DSM 20587 besitzt eine stereospezifische Alkoholdehydrogenase (LK-ADH₁) mit Aktivität gegenüber Ketonen und eine bisher nicht näher charakterisierte Alkoholdehydrogenase (LK-ADH₂), die Hydroxyketone stereospezifisch reduziert (Hummel 1990, Bradshaw *et al.* 1992, persönliche Mitteilung W. Hummel, Universität Düsseldorf). LK-ADH₁ reduziert prochirale Ketone wie auch die PF-ADH nach der anti-Prelog-Regel. Das Enzym benötigt NADPH als Cofaktor für die Reduktionsreaktion und Mg²⁺-Ionen zum Erhalt der Aktivität. Der Cofaktor kann über den Zentralstoffwechsel unter Verbrauch von Glukose regeneriert werden. Dabei entstehen neben Kohlendioxid hauptsächlich Lactat und Acetat und in kleineren Mengen Ethanol (Amidjojo 2004).

3.4.7 Zellmembran und Zellwand

Für die Cofaktor-abhängige Ganzzell-Biokatalyse ist es von entscheidender Bedeutung, dass die Cytoplasmamembran der Zellen intakt bleibt, um ein „Ausbluten“ der Cofaktoren zu verhindern. Die Prozessbedingungen dürfen daher nicht zu einer Schädigung der Membranen führen, wie es zum Beispiel beim Einsatz organischer Lösungsmittel oft der Fall ist. Um die Schädigungen verstehen zu können, muss der Aufbau der Zellmembranen und der schützenden Zellwand bekannt sein.

Die allen Zellen gemeinsame Grundstruktur der Cytoplasmamembran besteht aus einer Lipiddoppelschicht, in die Proteine integriert sind (Abbildung 3.17). Die Lipiddoppelschicht ist semipermeabel, sehr gut durchlässig für hydrophobe, unpolare Moleküle (O₂, Benzen), gut durchlässig für kleine, ungeladene polare Moleküle (H₂O, CO₂, Harnstoff, Glycerin) und undurchlässig für große, ungeladene polare Moleküle (Zucker), Ionen und große geladene Moleküle. Die Zusammensetzung der Zellmembranen verschiedener Mikroorganismen unterscheiden sich vor allem in den Anteilen unterschiedlicher Phospholipide und Sterole. Die Zellmembran der Hefen besteht aus Vertretern beider Gruppen, hauptsächlich Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin sowie Ergosterol und Zymosterol (Walker 1999). Die Zellmembran fast aller Prokaryonten enthält dagegen überwiegend Phospholipide und kleine Mengen an Glykolipiden, aber kaum Sphingolipide und mit Ausnahme von Mycoplasmataceae keine Sterole (Singleton 1999). In Gram-positiven Bakterien findet sich kein Phosphatidylcholin wie in manchen Gram-negativen Bakterien, die auch größere Anteile an Phosphatidylethanolamin enthalten. Letzteres ist das Hauptlipid in *Escherichia coli*, daneben existieren Phosphatidylglycerol und Diphosphatidylglycerol.

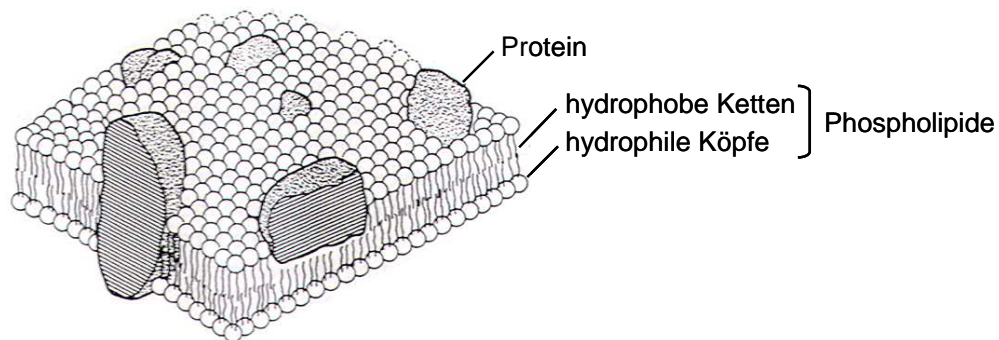


Abbildung 3.17 Schematischer Aufbau der Zellmembran aus einer Lipiddoppelschicht und integrierten Proteinen (aus Singleton 1999).

Die Zellwand fungiert unter anderem als Schutz der Zellen vor mechanischer Beschädigung. Außerdem agiert sie als Sieb, das die meisten Salze und niedermolekularen Substanzen frei passieren lässt, andere Substanzen, zum Beispiel manche Antibiotika, dagegen nicht. Der Zellwand-Aufbau zwischen Hefen, Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien ist sehr unterschiedlich. Die Zellwand der Hefen ist relativ dick (100-200 nm). Sie besteht zu 80-90 % aus Polysacchariden, hauptsächlich Glucane und Mannane und aus kleineren Mengen Chitin (Walker 1999). *Saccharomyces cerevisiae* besitzt eine innere Schicht aus Glucanen komplexiert mit Chitin, die der Zellwand ihre Stärke verleiht und aus einer äußeren Schicht aus Mannoproteinen, die überwiegend kovalent mit der Glucanschicht verbunden sind und die Oberflächeneigenschaften der Zelle bestimmen. Die Zellwand Gram-positiver Bakterien ist 30-100 nm dick und besteht zu 40-80 % aus dem Peptidoglycan Murein, dessen Polysaccharid-Ketten durch kurze Peptide zu einem Netz verknüpft sind (Singleton 1999, Schlegel 1992). Diese Netze bilden mehrere Schichten um die Zelle, an die Teichonsäuren kovalent gebunden sind. Der Proteingehalt ist gering. Das Mureinnetz der Gram-negativen Zellen ist hingegen einschichtig und enthält keine Teichonsäuren. Dafür umgibt die Zellen noch eine äußere Membran aus einer proteinhaltigen Lipiddoppelschicht und Lipopolysacchariden. In dieser äußeren Membran befinden sich verschiedene wassergefüllte Kanäle, Porine, die niedermolekulare Substanzen hindurchlassen.

3.5 Herstellung von Zellen für den Einsatz als Biokatalysator

Für die Kultivierung von Mikroorganismen ist ein Verständnis der Stoffwechselfvorgänge der Zellen notwendig. Daraus können Modelle für das Wachstum und die Zellpopulation entwickelt werden, die zusammen mit den verfahrenstechnischen Methoden genutzt werden können, um eine effiziente Herstellung der Zellen für einen bestimmten Einsatz zu entwickeln.

3.5.1 Mikrobielles Wachstum

Heterotrophe Mikroorganismen benötigen für ihr Wachstum organische Kohlenstoffverbindungen, organische oder anorganische Stickstoffverbindungen sowie Mineralsalze und eventuell Vitamine. Somit enthalten definierte Nährmedien (Minimalmedien) eine Kohlenstoffquelle (zum Beispiel Glukose), eine Stickstoffquelle (zum Beispiel Ammonium) und eine Reihe von Salzen und Vitaminen. Damit sind reproduzierbare Kultivierungen, einfache Elementbilanzen und eine erleichterte Produktaufreinigung möglich. Komplexmedien enthalten Bestandteile wie zum Beispiel Hefeextrakt, Pepton, Melasse oder Maisquellwasser, die aus einer Vielzahl von Zuckern, Aminosäuren, Mineralsalzen und Vitaminen bestehen. Komplexmedien werden bei der Kultivierung anspruchsvoller Mikroorganismen, zum Beispiel *Lactobacillus kefir*, verwendet oder wenn die Bestandteile als Nebenprodukte der Lebensmittelindustrie günstig zur Verfügung stehen.

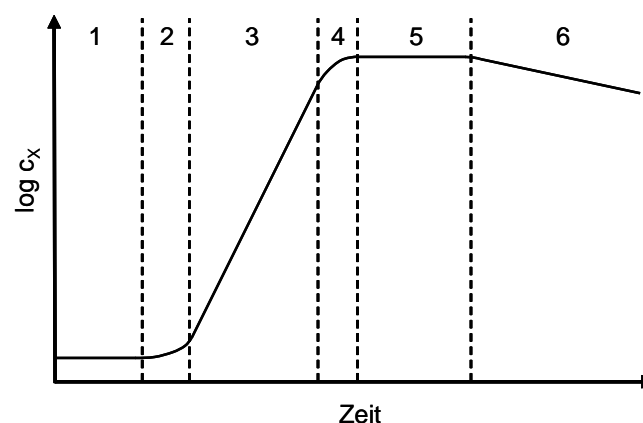


Abbildung 3.18 Wachstumsphasen einer typischen Kultivierung von Mikroorganismen im Satzverfahren. 1: Adaptionphase, 2: Übergangsphase I, 3: exponentielle Phase, 4: Übergangsphase II, 5: stationäre Phase, 6: Absterbephase.

Wachsen die Organismen unter nicht limitierenden, aber begrenzten Nährstoffbedingungen, also im Satzverfahren, so ergibt sich eine typische Wachstumskurve (Abbildung 3.18). In der Adaptionsphase passen sich die Zellen den Kultivierungsbedingungen an. Dabei ist noch kein Wachstum erkennbar. Einer Übergangsphase, in der sich alle Zellen nach und nach an die Bedingungen adaptiert haben, schließt sich das exponentielle Wachstum an, für das eine konstante Wachstumsrate μ_{\max} erreicht wird. Die Wachstumsrate ist wie folgt definiert:

Gleichung 3.29:
$$\mu \equiv \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_X}{dt}$$

mit μ Wachstumsrate, h^{-1}
 c_X Konzentration der Biotrockenmasse, $g L^{-1}$

Da sich die meisten Mikroorganismen durch Teilung oder Sprossung vermehren, ist bei bestimmten Kultivierungsbedingungen ohne Substratlimitierung eine charakteristische Verdopplungszeit t_d zu beobachten. Für die Vermehrung gilt also folgende Gleichung 3.30:

Gleichung 3.30:
$$n_{X,i} = n_{X,0} \cdot 2^{t_i \cdot t_d^{-1}}$$

mit $n_{X,i}; n_{X,0}$ Zellzahl zum Zeitpunkt i ; zum Zeitpunkt 0, -
 t_i Zeitpunkt i nach Zeitpunkt $t = 0$ (Vielfaches von t_d), h
 t_d Verdopplungszeit, h

Unter der Annahme, dass die mittlere Größenverteilung der Zellen konstant ist, kann somit die konstante Wachstumsrate μ_{\max} anschaulich erklärt werden:

Gleichung 3.31:
$$m_X(t) = m_{X,0} \cdot e^{\mu_{\max} \cdot t}$$

mit $m_X \cdot n_X^{-1} = \text{konst.}$ und $\mu = \ln 2 \cdot t_d^{-1}$
 m_X Biotrockenmasse, g

In der anschließenden Übergangsphase liegen ein oder mehrere Substrate in limitierender Konzentration vor (Substratlimitierungsphase). Nach Monod (1949) kann in einer vereinfachten Modellvorstellung die Wachstumsrate μ in einem formalkinetischen Ansatz als Funktion der Konzentration des limitierenden Substrats c_S beschrieben werden:

Gleichung 3.32:
$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S}$$

mit μ_{\max} Wachstumsrate unter nicht limitierenden Bedingungen, h^{-1}
 c_S Konzentration des limitierenden Substrats, $mol L^{-1}$
 K_S Sättigungskonstante des limitierenden Substrats, $mol L^{-1}$

Werden weitere limitierende Substrate und die Substrataufnahme für den Erhaltungsstoffwechsel $q_{S,m}$ mit berücksichtigt, erweitert sich Gleichung 3.32 zu:

Gleichung 3.33:
$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_{S_1}}{K_{S_1} + c_{S_1}} \cdot \frac{c_{S_2}}{K_{S_2} + c_{S_2}} - q_{S,m} \cdot Y_{XS,\mu}$$

mit $q_{S,m}$ spezifische Substrataufnahmerate für den Erhaltungsstoffwechsel (maintenance), $g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$
 $Y_{XS,\mu}$ Ertragskoeffizient Biotrockenmasse aus Substrat, $g_{\text{BTM}} \text{ g}^{-1}$

Die spezifische Substrataufnahmerate q_S ist analog zur Wachstumsrate definiert:

Gleichung 3.34:
$$q_S \equiv \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_S}{dt}$$

Ohne Berücksichtigung des Erhaltungsstoffwechsels lässt sich die Formalkinetik wie folgt darstellen:

Gleichung 3.35:
$$q_{S,\mu} = \frac{\mu}{Y_{XS,\mu}}$$

mit $Y_{XS,\mu} \equiv \frac{dc_X}{dc_S}$
 $q_{S,\mu}$ spezifische Substrataufnahmerate, $g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$

Nach der Substratlimitierungsphase wird die stationäre Phase erreicht, in der sich die Wachstums- und die Absterberate ausgleichen, bis letztere schließlich in der Absterbephase überwiegt.

3.5.2 Kultivierung im Satzverfahren

Im Satzverfahren werden die Zellen in ein Medium übertragen, das alle zum Wachstum nötigen Nährstoffe enthält. Während der Kultivierung ist nur noch die Zugabe von Sauerstoff und eventuell Titrationsmittel notwendig. Es gelten die in Kapitel 3.5.1 dargestellten Gleichungen. Aus Gleichung 3.31 wird unter Berücksichtigung des (konstanten) Reaktionsvolumens für die exponentielle Wachstumsphase (mit $c_X = c_{X,0}$ zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase zum Zeitpunkt $t = 0$):

Gleichung 3.36:
$$c_X(t) = c_{X,0} \cdot e^{\mu_{\max} \cdot t}$$

Der Verlauf der Substratkonzentration ergibt sich dann aus der Bilanz zu:

Gleichung 3.37:
$$c_S(t) = c_{S,0} - \frac{c_{X,0}}{Y_{XS,\mu}} \cdot (e^{\mu_{\max} \cdot t} - 1)$$

Die obigen, auf das Substrat bezogenen Gleichungen der Aufnahme­rate (Gleichung 3.34) sowie der Formalkinetik und des Ertragskoeffizienten (Gleichung 3.35) gelten ebenso für Sauerstoff. Da Sauerstoff aber selbst im Satzverfahren kontinuierlich nachgeliefert wird, gilt (bei konstantem Reaktionsvolumen und idealer Rückvermischung im Reaktor):

Gleichung 3.38:
$$\frac{dc_{O_2}}{dt} = \text{OTR} - \text{OUR} = k_L a \cdot (c_{O_2}^* - c_{O_2}) - \frac{\mu}{Y_{XO,\mu}} \cdot c_X$$

mit	OTR	Sauerstoff-Transferrate (oxygen transfer rate), $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
	OUR	Sauerstoff-Aufnahmerate (oxygen uptake rate), $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
	$k_L a$	volumetrischer Stoffübergangskoeffizient für Sauerstoff, s^{-1}
	c_{O_2}	Sauerstoffkonzentration im Medium, g L^{-1}
	$c_{O_2}^*$	Sättigungskonzentration von Sauerstoff im Medium bei Sauerstoffpartialdruck der Gasphase gleich dem des Abgases, g L^{-1}
	$Y_{XO,\mu}$	Ertragskoeffizient Biotrockenmasse aus Sauerstoff, $\text{g}_{\text{BTM}} \text{g}^{-1}$

Dies bedeutet, dass bei konstanter Sauerstoffkonzentration im Medium der Sauerstoffverbrauch der eingetragenen Menge entspricht. Somit kann der Verbrauch (OUR) über die Zugabe eingestellt werden, was bei manchen Prozessen wichtig ist. Über Gleichung 3.39 kann die Sauerstoff-Aufnahmerate aus den Messwerten der Abgasanalytik errechnet werden:

Gleichung 3.39:
$$\text{OUR} = (\dot{V}_{\text{Luft,ein}} \cdot x_{O_2,\text{ein}} - \dot{V}_{\text{Luft,aus}} \cdot x_{O_2,\text{aus}}) \cdot V_R^{-1} \cdot V_{\text{mol}}$$

mit	$\dot{V}_{\text{Luft,ein}}$	Gasvolumenstrom in den Reaktor (Zuluft), L h^{-1}
	$\dot{V}_{\text{Luft,aus}}$	Gasvolumenstrom aus dem Reaktor (Abgas, meist mangels Messwert gleich Zuluftvolumenstrom gesetzt), L h^{-1}
	$x_{O_2,\text{ein}}$	Sauerstoff-Anteil in der Zuluft, %
	$x_{O_2,\text{aus}}$	Sauerstoff-Anteil im Abgas, %
	V_R	Reaktionsvolumen, L
	V_{mol}	Molvolumen idealer Gase ($22,414 \text{ L mol}^{-1}$)

3.5.3 Kultivierung im Zulaufverfahren

Im Zulaufverfahren wird den Zellen während der Kultivierung Substrat zugegeben, wodurch die Substratkonzentration von Beginn an niedrig gehalten werden kann.

Dies wird im Falle von Substratinhibierung oder Überschussmetabolismus (zum Beispiel Crabtree-Effekt bei Hefen) genutzt, um hohe Wachstumsraten über eine lange Zeit aufrecht zu halten. Die Formalkinetiken können weiterhin angewendet werden, allerdings muss nun bei den Bilanzen der Substratzulauf und die Volumenzunahme berücksichtigt werden. Dadurch ergeben sich für die Biomassekonzentration und die Substratkonzentration folgende Beziehungen:

Gleichung 3.40:
$$\frac{dc_X}{dt} = -\frac{\dot{V}_{S,\text{ein}}}{V_R} \cdot c_X + \mu \cdot c_X$$

mit $\dot{V}_{S,\text{ein}}$ Zulaufvolumenstrom, L h⁻¹

Gleichung 3.41:
$$\frac{dc_S}{dt} = \frac{\dot{V}_{S,\text{ein}}}{V_R} \cdot (c_{S,0} - c_S) - q_{S,\mu} \cdot c_X$$

mit $c_{S,0}$ Substratkonzentration im Zulaufmedium, g L⁻¹

Der Zulaufvolumenstrom kann unter den vereinfachenden Annahmen, dass sowohl die Substratkonzentration im Reaktor im Vergleich zum Zulaufmedium als auch die Volumenzunahme vernachlässigbar ist, wie folgt eingestellt werden, um eine konstante Wachstumsrate aufrecht zu halten:

Gleichung 3.42:
$$\dot{V}_{S,\text{ein}} = V_R \cdot \frac{\mu \cdot c_{X,0}}{Y_{XS} \cdot c_{S,0}} \cdot e^{\mu \cdot (t-t_0)}$$

Dieser Zustand kann aber nur beibehalten werden, solange weder eine Substratkomponente noch Sauerstoff limitierend wirken oder Produkte in inhibierender Konzentration gebildet werden. Da der Sauerstoffeintrag bei aerober Kultivierung oft begrenzt ist, wird in der Praxis oft ein lineares oder gar konstantes Zulaufprofil angelegt, obwohl dadurch die Wachstumsrate im Verlauf der Kultivierung kontinuierlich sinkt. Zur Berechnung der Sauerstoffaufnahme rate kann die Gleichung 3.39 eingesetzt werden, wenn das zum jeweiligen Zeitpunkt vorliegende Reaktionsvolumen bekannt ist.

3.5.4 Optimierung der Biokatalysatorherstellung

Werden Mikroorganismen kultiviert, um sie anschließend als Ganzzell-Biokatalysator zu verwenden, muss die Zielgröße klar definiert werden. Bei der Kultivierung von Mikroorganismen zur Produktion von Enzymen wird als Zielgröße je nach Aufwand der Kultivierung entweder die Raumzeitausbeute an Enzymaktivität (RZA_{EA}, volumetrische Produktivität) oder die absolute Enzymaktivität EA herangezogen (Gleichung 3.5 oder Gleichung 4.10).

Für die Ganzzell-Biokatalyse sind diese Werte aber nur dann ausschlaggebend, wenn die Enzymaktivität im Katalyse-Prozess die limitierende Größe darstellt. Oft

ist aber nicht die Enzymaktivität, also die Reaktionsgeschwindigkeit limitierend, sondern der Stofftransport der Edukte und/oder der Cosubstrate. In diesem Fall kann es günstiger sein, einen Prozess auf eine hohe Biomasse-Ausbeute hin zu optimieren oder die Kultivierungsbedingungen so einzustellen, dass zum Beispiel vermehrt Transporter für die entsprechenden Stoffe exprimiert werden, wodurch die Aufnahmeraten erhöht werden können. Außerdem ist es möglich, dass nicht das katalytische Enzym limitierend wirkt, sondern das oder die Enzyme der Cofaktor-Regenerierung (zum Beispiel Glukosedehydrogenase) oder Enzyme, die toxische Nebenprodukte abbauen (zum Beispiel Katalase). In diesen Fällen muss der Prozess auf diese Größen hin optimiert werden.

4 Material und Methoden

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Methoden beschrieben.

4.1 Material

Die verwendeten Laborgeräte sind in Kapitel 14.1.1 zusammengestellt und werden dort zum Teil ausführlich beschrieben. Eine Liste der eingesetzten Chemikalien findet sich in Kapitel 14.1.3.

4.2 Allgemeine Labormethoden

Nachfolgend werden die verwendeten, für ein biotechnologisches Labor typischen Methoden sowie die Synthese von *N*-Carbamoyl-D,L-Alanin beschrieben.

4.2.1 pH-Messung

Der pH wässriger Lösungen wurde mit dem Messgerät CG 843 nach einer Zweipunktkalibrierung der pH-Elektrode bei pH 4,00 und 7,00 bestimmt.

4.2.2 Herstellung der Pufferlösungen

Kaliumphosphat-Pufferlösungen wurden nach Holtzhauer (1997) hergestellt. Dazu wurden die mit Gleichung 4.1 und Gleichung 4.2 errechneten Mengen der Puffersalze in VE-Wasser gelöst. Anschließend wurde der pH überprüft.

Tris-HCl- und Natriumcitrat-Pufferlösungen wurden in der gewünschten Konzentration mit VE-Wasser hergestellt. Anschließend wurde der pH mit 10 %iger HCl und 10 M NaOH eingestellt.

Gleichung 4.1: $m_{K_2HPO_4} = MG_{K_2HPO_4} \cdot M \cdot x$

Gleichung 4.2: $m_{KH_2PO_4} = MG_{KH_2PO_4} \cdot M \cdot (1 - x)$

mit	m	Masse, g
	MG	Molekulargewicht, g mol ⁻¹
	M	Molarität des Puffers, mol L ⁻¹
	x	Molenbruch nach Holtzhauer (1997), -

4.2.3 Glukoseanalytik

Die Konzentration wässriger Glukose-Lösungen wurde mit dem Blutzucker-messgerät Accu-Chek[®] nach Verdünnung mit dem entsprechenden Puffer auf einen Wert innerhalb des Messbereichs (0,1 - 6,0 g L⁻¹) bestimmt. Die Kalibrierung erfolgte bereits durch den Hersteller.

4.2.4 Bestimmung der optischen Dichte

Die optische Dichte (OD) von Zellsuspensionen wurde mit einem Einstrahlphotospektrometer gemessen. Die dabei verwendete Wellenlänge sowie der experimentell bestimmte Korrelationsfaktor zur Ermittlung der Biotrocken-masse aus der optischen Dichte sind Tabelle 4.1 zu entnehmen. Die Umrechnung der optischen Dichte in die Biotrockenmasse-Konzentration erfolgte nach Gleichung 4.3.

Tabelle 4.1: Wellenlänge zur Messung der optischen Dichte und Korrelationsfaktor zur Bestimmung der Biotrockenmasse aus der optischen Dichte.

Mikroorganismus	Wellenlänge, nm	Korrelationsfaktor f_x , $g_{BTM} L^{-1} OD^{-1}$
<i>Trigonopsis variabilis</i> DSM 70714	546	0,485
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS 8066 (wt)	600	0,334
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> FasB His6	600	0,251
<i>Escherichia coli</i> K12 (wt)	650	0,323
<i>Escherichia coli</i> DH5α PFADH	600	0,400
<i>Lactobacillus kefir</i> DSM 20587	660	0,451

Gleichung 4.3: $c_x = OD \cdot f_x$

mit	OD	Optische Dichte bei Wellenlänge nach Tabelle 4.1, -
-----	----	---

4.2.5 Bestimmung der Biotrockenmasse

Die direkte Bestimmung der Biotrockenmasse erfolgte gravimetrisch. Dazu wurde 1 mL der Zellsuspension in nach Trocknung gewogenen Probengefäßen pelletiert (Tischzentrifuge, 13000 min^{-1} , 5 min). Die Zellen wurden einmal mit physiologischer Kochsalzlösung ($9 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$) gewaschen und erneut pelletiert. Die Trocknung erfolgte bei 80°C bis zur Gewichtskonstanz. Die Biotrockenmasse-Konzentration errechnet sich anschließend nach Gleichung 4.4.

Gleichung 4.4:
$$c_x = (m_{\text{voll}} - m_{\text{leer}}) \cdot V^{-1}$$

mit	m_{voll}	Masse des Probengefäßes mit Zellen nach Trocknung, g
	m_{leer}	Masse des leeren Probengefäßes nach Trocknung, g
	V	Volumen der Zellsuspension vor Pelletierung, L

4.2.6 Synthese von *N*-Carbamoyl-D,L-Alanin

In einem 2 L-Dreihalskolben mit Thermometer, Rührerwelle und Rückflusskühler wurden 80 g D,L-Alanin, 91,2 g Kaliumcyanat und 1,2 L VE-Wasser für 2 Stunden mit circa 200 min^{-1} gerührt. Die Temperierung auf 70°C erfolgte durch ein Wasserbad. Anschließend wurde das Wasser des Wasserbades durch Eiswasser ersetzt und die Lösung somit auf 4°C abgekühlt. Der Kühler wurde durch einen Tropftrichter ersetzt, mit dem langsam 250 mL 12 %ige HCl zugetropft wurden. Dabei bildete sich ein weißer Niederschlag aus *N*-Carbamoyl-D,L-Alanin. Das Produkt wurde in zwei Schritten über eine Filternutsche abgetrennt und mit je 70 mL 12 %iger HCl gewaschen.

Das Produkt wurde auf Glaspetrischalen flach verteilt, bei -80°C vorgefroren und anschließend über Nacht gefriergetrocknet. Die Lagerung erfolgte bei -20°C . Die Ausbeute betrug 62,9 g (53 %). Die Güte des Produkts im Vergleich zu älteren, von der Arbeitsgruppe Prof. Fischer (Universität Hohenheim) erhaltenen Chargen wurde durch die Verwendung als Induktor in parallelen Schüttelkolben-Ansätzen von *Trigonopsis variabilis* überprüft. Die DAO-Aktivität der Zellen war identisch, somit war die neue Charge von vergleichbar guter Qualität.

4.3 Kultivierung von *Trigonopsis variabilis* DSM 70714 (wt)

4.3.1 Stamm und Stammhaltung

Trigonopsis variabilis DSM 70714 (wt) wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH als Aktivkultur erworben. Zum Anlegen

einer Zellbank erfolgte daraus durch Impfösenabstrich eine Schüttelkolben-Kultivierung nach Kapitel 4.3.2 in Komplexmedium. Gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{546} = 33$) wurden 500 μL Zellsuspension zu 500 μL steriler Glycerinlösung (60 % v/v) in sterile 1,5 mL Reaktionsgefäße gegeben. Die Gefäße wurden bei -80°C gelagert.

4.3.2 Kultivierung im Schüttelkolben

Schüttelkolben ohne Schikanen wurden mit 20 % des Nominalvolumens befüllt und mit Alukappen als Sterilbarriere verschlossen. Die Kulturen wurden in einem Schüttelinkubator bei 30°C , 250 min^{-1} und 5 cm Exzentrizität inkubiert. Die erste Vorkultur in Komplexmedium (Tabelle 14.11) wurde mit einem Impfösenabstrich aus der Zellbank inokuliert und für 64 Stunden inkubiert. Die zweite Vorkultur in Minimalmedium (Tabelle 14.12) ohne Induktor wurde mit 5% v/v aus der ersten Vorkultur angeimpft und für 24 Stunden inkubiert. Diese Vorkultur diente Kultivierungen im Schüttelkolben und im 7,5 L-Rührkesselreaktor als Inokulum.

4.3.3 Kultivierung im 7,5 L-Rührkesselreaktor

Als Reaktor für Kultivierungen im 3-5 L-Maßstab diente der 7,5 L-Labor-Rührkesselreaktor Labfors (Abbildung 4.1).

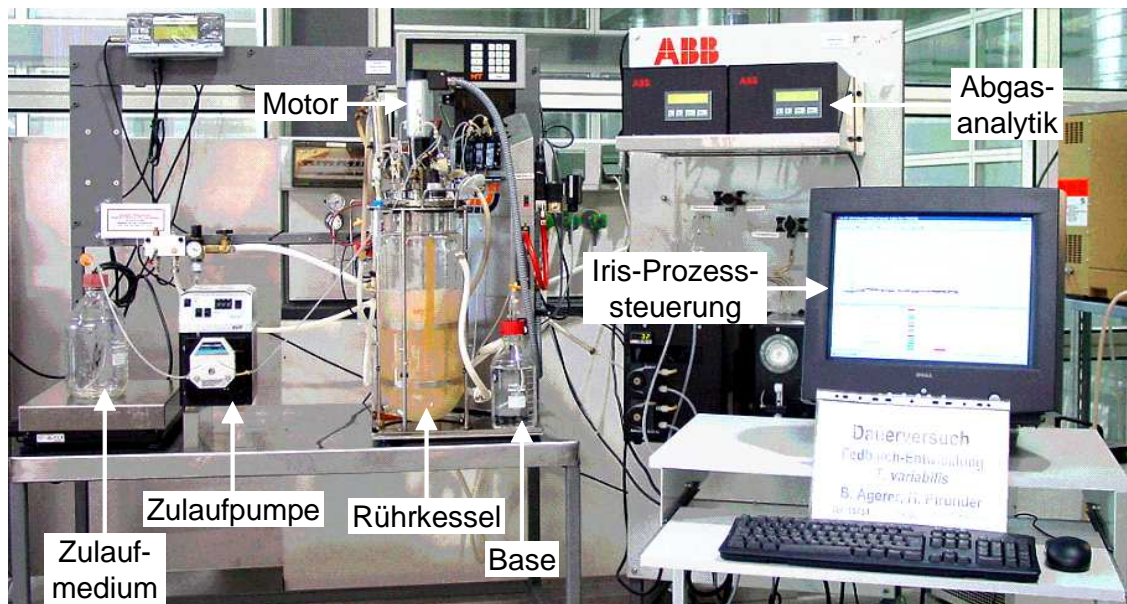


Abbildung 4.1 Aufbau des 7,5 L-Rührkesselreaktors „Labfors“.

Der Kessel wurde mit 400 mL Salzlösung und 2400 mL VE-Wasser befüllt und autoklaviert. Anschließend wurden 400 mL Glukoselösung, 400 mL Puffer und 2 mL Vitaminlösung über eine sterile Anstechvorrichtung ergänzt. Nach Erreichen der Kultivierungsbedingungen von 30°C und Umgebungsdruck sowie Kalibrierung der pO₂-Elektrode wurde mit dem Volumen der Vorkultur 2 angeimpft, das 1,5 g_{BTM} enthielt (circa 250 mL). Dann wurde der Reaktor mit sterilem VE-Wasser auf 4,0 L aufgefüllt. Während des Prozesses wurden Proben entnommen und auf Glukose, optische Dichte, Biotrockenmasse und DAO-Aktivität untersucht.

Im 2-stufigen Zulaufprozess wurde der pH von 6,0 durch Säureproduktion der Zellen auf 3,0 abgesenkt und durch Zugabe von 10 %-iger w/v Ammoniak-Lösung auf diesem Wert gehalten. Der Sauerstoffpartialdruck im Medium fiel zunächst von 100 % Luftsättigung auf 20 % und wurde dann über die Rührerdrehzahl (Anfangswert: 400 min⁻¹) und die Begasungsrate (Anfangswert: 3,0 L min⁻¹) auf diesen Wert geregelt. Die Zudosierung von Zulaufmedium (Tabelle 14.13) nach Gleichung 4.5 wurde gestartet, als die Glukose-Konzentration im Medium auf 5 g L⁻¹ abgesunken war.

Gleichung 4.5: $\dot{m} = 7,55 \text{ gh}^{-1} \cdot e^{0,1h^{-1} \cdot t}$

mit \dot{m}_S Zudosierungsrate, g_{Glukose} h⁻¹
 t Prozesszeit nach Start der Zudosierung, h

Im 4-stufigen Zulaufprozess wurde der pH zunächst durch Zugabe von 10 %-iger w/v Ammoniak-Lösung bei 6,0 gehalten. Der Sauerstoffpartialdruck im Medium fiel zunächst von 100 % Luftsättigung auf 45 % und wurde dann über die Rührerdrehzahl (Anfangswert: 600 min⁻¹) und die Begasungsrate (Anfangswert: 3,0 L min⁻¹) auf diesen Wert geregelt. Die Zulaufphase 1 mit dem Profil aus Gleichung 4.6 wurde gestartet, als die Glukose im Medium verbraucht war, angezeigt durch den schnellen Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks. Das Zulaufmedium ist in Tabelle 14.14 beschrieben. Als etwa 30 g_{BTM} L⁻¹ erreicht waren, wurde der Induktor *N*-Carbamoyl-D,L-Alanin zugegeben und eine konstante Zudosierungsrate eingestellt (Gleichung 4.7). Der pH-Sollwert wurde auf 3,0 abgesenkt. Durch die von den Zellen produzierte Säure wurde dieser nach 5-8 Stunden erreicht. Daraufhin folgte die Zulaufphase 3 mit weiterhin konstanter Zudosierung nach Gleichung 4.7 und einem erhöhten Sauerstoffpartialdruck von 60 % Luftsättigung bis das maximale Reaktionsvolumen von 5 L erreicht wurde.

Gleichung 4.6: $\dot{m} = 9,13 \text{ gh}^{-1} + 1,66 \text{ gh}^{-1} \cdot e^{0,065h^{-1} \cdot t}$

Gleichung 4.7: $\dot{m} = 15,8 \text{ gh}^{-1}$

4.4 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* (wt)

4.4.1 Stamm und Stammhaltung

Saccharomyces cerevisiae CBS 8066 (wt) wurde am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik als Glycerin-Zellbank etabliert und bei -80°C gelagert (Engelking 2004).

4.4.2 Kultivierung im Schüttelkolben

Schüttelkolben ohne Schikanen wurden zu 20 % des Nominalvolumens mit YNB-Medium (Tabelle 14.15) befüllt, mit 0,05 % v/v Zellsuspension aus der Zellbank angeimpft und mit Alukappen als Sterilbarriere verschlossen. Die Kulturen wurden in einem Schüttelinkubator bei 30°C, 300 min⁻¹ und 5 cm Exzentrizität bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase (35 h) inkubiert.

4.5 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* FasB His 6

4.5.1 Stamm und Stammhaltung

Saccharomyces cerevisiae FasB His6 wurde vom Consortium für elektrochemische Industrie, München, zur Verfügung gestellt und am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik als Glycerin-Zellbank etabliert und bei -80°C gelagert (Engelking 2004a).

4.5.2 Kultivierung im Schüttelkolben

Schüttelkolben ohne Schikanen wurden zu 20 % des Nominalvolumens mit Medium befüllt und mit Alukappen als Sterilbarriere verschlossen. Standardmäßig wurde CSL-Medium verwendet (Tabelle 14.16). Als Inokulum wurden 0,05 % v/v Zellsuspension aus der Zellbank verwendet. Die Kulturen wurden in einem Schüttelinkubator bei 28°C, 250 min⁻¹ und 5 cm Exzentrizität inkubiert und in der stationären Wachstumsphase nach 3 Tagen geerntet.

4.6 Kultivierung von *Escherichia coli* K12 (wt)

4.6.1 Stamm und Stammhaltung

Escherichia coli K12 (DSM 498) wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH erworben und am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik als 30 % v/v-Glycerin-Zellbank etabliert und bei -80°C gelagert (Puskeiler 2004).

4.6.2 Kultivierung im Schüttelkolben

Schüttelkolben ohne Schikanen wurden zu 20 % des Nominalvolumens mit LB-Medium befüllt (Tabelle 14.17), mit 0,005 % v/v Zellsuspension aus der Zellbank angeimpft und mit Alukappen als Sterilbarriere verschlossen. Die Kulturen wurden in einem Schüttelinkubator bei 37°C, 200 min⁻¹ und 5 cm Exzentrizität inkubiert und in der stationären Wachstumsphase nach 17 Stunden geerntet.

4.7 Kultivierung von *Escherichia coli* DH5α PFADH

4.7.1 Stamm und Stammhaltung

Escherichia coli DH5α PFADH wurde von der Degussa AG zur Verfügung gestellt. Zur Erstellung einer Zellbank wurde eine Schüttelkolben-Kultivierung nach Kapitel 4.7.2 in LB-Amp-Medium (Tabelle 14.18) durchgeführt. Diese wurde mit einem Impfösenabstrich von der erhaltenen Aktivkultur angeimpft. In der exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{650} = 0,9$) wurden 40 mL Zellsuspension mit 20 mL sterilem Glycerin (87 % v/v) vermischt und in sterile 1,5 mL Reaktionsgefäße gegeben. Die Gefäße wurden bei -80°C gelagert.

4.7.2 Kultivierung im Schüttelkolben

Schüttelkolben ohne Schikanen wurden zu 20 % des Nominalvolumens mit LB-Amp-Medium befüllt (Tabelle 14.18), mit 0,005 % v/v Zellsuspension aus der Zellbank angeimpft und mit Alukappen als Sterilbarriere verschlossen. Die Kulturen wurden in einem Schüttelinkubator bei 37°C, 200 min⁻¹ und 5 cm Exzentrizität inkubiert und in der stationären Wachstumsphase nach 17 Stunden geerntet.

4.8 Kultivierung von *Lactobacillus kefir* (wt)

4.8.1 Stamm und Stammhaltung

Lactobacillus kefir DSM 20587 (wt) wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH als lyophilisierte Zellen erworben. Zum Anlegen einer Zellbank wurden die Zellen in 1 mL modifiziertem MRS-Medium (Tabelle 14.19) resuspendiert. Davon wurden 150 μ L als Inokulum für eine 75 mL-Schüttelkolbenkultur (Kapitel 4.8.2) verwendet. Nach 5 Tagen wurde die Kultur auf $OD_{660} = 8,8$ aufkonzentriert und als Inokulum (5 % v/v) für eine zweite Kultur verwendet. Nach 24 Stunden wurde daraus eine 30 % v/v Glycerin-Lösung mit Zellen der Konzentration $OD_{660} = 10$ hergestellt und in sterile 1,5 mL Reaktionsgefäße gegeben. Die Gefäße wurden bei -80°C gelagert.

4.8.2 Kultivierung im Schüttelkolben

Schüttelkolben ohne Schikanen wurden zu 30 % des Nominalvolumens mit modifiziertem MRS-Medium befüllt (Tabelle 14.19), mit 3 % v/v Zellsuspension aus der Zellbank angeimpft und mit Alukappen als Sterilbarriere verschlossen. Die Kulturen wurden in einem Schüttelinkubator bei 30°C , 150 min^{-1} und 5 cm Exzentrizität inkubiert und in der stationären Wachstumsphase nach 22 Stunden geerntet. Weitere Schüttelkolbenkulturen wurden daraus mit 5 % v/v angeimpft.

4.8.3 Kultivierung im 7,5 L-Rührkesselreaktor im Satzverfahren

Als Reaktor für Kultivierungen im 5 L-Maßstab diente der 7,5 L-Labor-Rührkesselreaktor Labfors (Abbildung 4.1). Dieser wurde mit 4,35 L 1,1-fach konzentrierter Salz-/Hefeextraktlösung befüllt und autoklaviert (Tabelle 14.19). Anschließend wurden 400 mL Glukoselösung und Tween 80 über eine sterile Anstechvorrichtung ergänzt. Nach Erreichen der Kultivierungsbedingungen von 30°C und Umgebungsdruck sowie Kalibrierung der $p\text{O}_2$ -Elektrode wurde mit 5 % v/v einer Schüttelkolben-Kultur ($OD_{660} \sim 5,5$) angeimpft. Der pH wurde durch 10 M NaOH auf 6,0 geregelt, die Rührerdrehzahl betrug 150 min^{-1} und die Begasungsrate $0,5 \text{ NL min}^{-1}$ ($0,1 \text{ min}^{-1}$). Während des Prozesses wurden Proben entnommen und auf Glukose, optische Dichte, Biotrockenmasse und ADH-Aktivität untersucht.

4.8.4 Kultivierung im 7,5 L-Rührkesselreaktor im Zulaufverfahren

Die Kultivierung erfolgte wie im Satzverfahren, jedoch mit 3 L Anfangsvolumen an modifiziertem MRS-Medium mit reduzierter Hefeextrakt-Konzentration (Tabelle 14.19). Sobald die Glukose-Konzentration auf 5 g L^{-1} abgesunken war, 12 Stunden nach dem Animpfen, wurde das Zulaufmedium (Tabelle 14.20) mit einem Volumenstrom von 27 mL h^{-1} zudosiert, was der Gleichung 4.8 entspricht. Der Sauerstoffpartialdruck wurde über die Rührerdrehzahl ($400\text{-}500 \text{ min}^{-1}$) und die Begasungsrate ($\sim 0,6 \text{ min}^{-1}$) zwischen 0 und 2 % Luftsättigung geregelt. Die gemessene Sauerstofftransferrate betrug dadurch $5\text{-}7 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Nach 76 Stunden wurde das maximale Reaktionsvolumen erreicht und der Prozess gestoppt.

Gleichung 4.8: $\dot{m}_S = 10,8 \text{ gh}^{-1}$

4.8.5 Kultivierung im 200 L-Rührkesselreaktor im Zulaufverfahren

Als Reaktor für Kultivierungen im 150 L-Maßstab diente der 200 L-Technikums-Rührkesselreaktor Techfors (Abbildung 4.2).

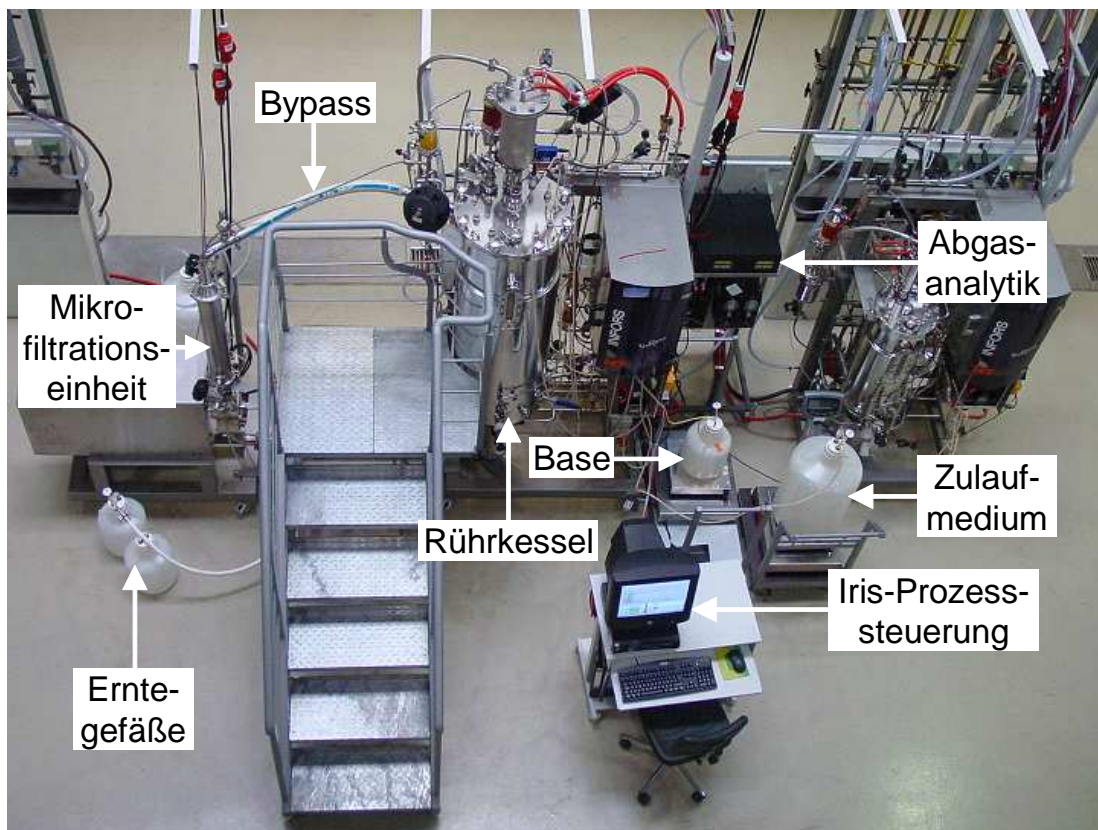


Abbildung 4.2 Aufbau des 200 L-Rührkesselreaktors „Techfors“.

Die Kultivierung erfolgte analog zum Labormaßstab mit 100 L Anfangsvolumen an modifiziertem MRS-Medium mit reduzierter Hefeextrakt-Konzentration (Tabelle 14.19). Als Inokulum diente eine 5 L-Satzkultur ohne pH-Regelung. Die Zudosierungsrate betrug 810 mL h^{-1} , was Gleichung 4.9 entspricht. Die Begasungsrate lag bei 20 L min^{-1} ($0,13\text{-}0,2 \text{ min}^{-1}$). Über die Rührerdrehzahl ($100\text{-}200 \text{ min}^{-1}$) wurde die Sauerstofftransferrate auf $7\text{-}9 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ geregelt. Die Zellen wurden über eine Mikrofiltrationseinheit aufkonzentriert, zentrifugiert und als Pellet bei -20°C eingefroren. Diese Zellen wurden neben kommerziell von Jülich Fine Chemicals erworbenen Zellen für Biotransformationen eingesetzt.

Gleichung 4.9: $\dot{m}_S = 337 \text{ gh}^{-1}$

4.9 Durchführung der Ganzzell-Biokatalyse

4.9.1 Vorbereitung der Biokatalysatoren

Trigonopsis variabilis für die Biokatalyse wurde aus Schüttelkolben-Kultivierungen gewonnen. Die bei -20°C gelagerten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und einmal mit Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 8,0), der auch als Umsetzungspuffer diente, gewaschen, in der Standzentrifuge (3000 min^{-1} , 4°C , 10 min) pelletiert und wieder in Puffer auf $40 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ resuspendiert. Entweder wurden diese ruhenden Zellen als Biokatalysator eingesetzt oder sie wurden zuvor noch permeabilisiert (Kapitel 4.9.2), zweimal mit Puffer gewaschen und wieder in Puffer auf $50 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ resuspendiert.

Saccharomyces cerevisiae FasB His6 wurde für die Verwendung als Biokatalysator immer frisch hergestellt (Kapitel 4.5.2). Die Zellen wurden einmal mit Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7,0, 100 mM NaCl), der auch als Umsetzungspuffer diente, gewaschen, in der Standzentrifuge (4500 min^{-1} , 4°C , 30 min) pelletiert und wieder in Puffer auf $50\text{-}100 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ resuspendiert.

Lactobacillus kefir von Jülich Fine Chemicals und aus eigener Herstellung wurde als Biokatalysator verwendet. Die Zellen wurden aus dem bei -20°C gelagerten Vorrat entnommen und bei Raumtemperatur aufgetaut. Nach einmaligem Waschen mit Kaliumphosphatpuffer (200 mM, pH 6,5, 5 mM MgCl_2), der auch als Umsetzungspuffer diente, und Pelletieren in der Standzentrifuge (4500 min^{-1} , 4°C , 15 min) wurden sie in Puffer auf $80\text{-}120 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ resuspendiert.

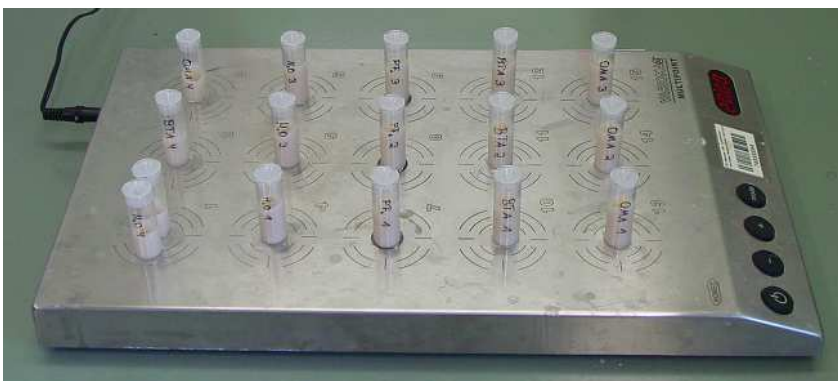
4.9.2 Permeabilisierung

Trigonopsis variabilis wurde einmal mit Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 (Standard) oder Kaliumphosphat-Puffer 100 mM, pH 8,0 oder Natriumcitrat-Puffer 50 M, pH 4,0 gewaschen und auf circa $40 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ konzentriert. Dann wurde 0,5 % v/v Triton X 100 zugegeben und unter Schütteln mit 50 min^{-1} 1 Stunde bei Raumtemperatur im Inkubationsschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Puffer gewaschen.

4.9.3 Gerührte Glasgefäße im 2 mL-Maßstab

Zylindrische Glasgefäße mit 4 mL Nominalvolumen dienen als Reaktionsgefäße für die Biokatalyse im 1,4-2,8 mL-Maßstab. Diese wurden mit Kreuzmagnetstäbchen gerührt, angetrieben von einer Mehrfachrührplatte (Abbildung 4.3, Tabelle 14.6). In den Reaktionsgefäßen wurde die Zellsuspension in Umsetzungspuffer mit Cosubstrat vorgelegt. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Edukts gestartet. In den rein wässrigen Ansätzen wurde das Edukt in reiner Form zugegeben. Die Konzentration wurde auf das Volumen der wässrigen Phase berechnet. In den Zweiphasenansätzen wurde das Edukt gelöst in der Lösungsmittelphase zugegeben. Die Konzentration des Edukts, auf das Volumen der wässrigen Phase bezogen, war in vergleichbaren Ansätzen gleich. Der Phasenanteil der Lösungsmittelphase betrug $\varphi_d = 0,2$, mit Ausnahme der 4-Cl-ACE-Reduktionen mit *n*-Butylacetat als Lösungsmittel, bei denen ein dreifaches Volumen an *n*-Butylacetat im Verhältnis zum Edukt verwendet wurde.

a)



b)



Abbildung 4.3 a) Aufbau des mL-Reaktorsystems auf dem Mehrfachrührplatz. b) Als mL-Reaktor verwendetes Glasgefäß mit Kreuzmagnetrührstäbchen.

Die meisten Reaktionen wurden im Lösungsmittelabzug bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Bei Drehzahlen $> 1000 \text{ min}^{-1}$ wurde die Temperatur in den Reaktionsgefäßen jedoch durch die Erwärmung der Rührplatte erhöht. Daher wurde die Temperatur immer überprüft. Die Reaktionen bei 20°C wurden im Kühlbrutschrank durchgeführt.

Die Gefäße wurden mit gasdichten Deckeln verschlossen. Bei starker Gasentwicklung wurden kleine Löcher in die Deckel gestochen oder von Zeit zu Zeit entlüftet. Die Probenahme erfolgte mittels einer Pipette. Die Proben rein wässriger Ansätze und von Zweiphasenansätzen mit organischen Lösungsmitteln wurden direkt mit Ethylacetat extrahiert. Die Proben von Zweiphasenansätzen mit ionischen Flüssigkeiten wurden erst in der Tischzentrifuge bei 13000 min^{-1} für 5 min zentrifugiert, bevor die wässrige Phase mit Ethylacetat und die ionische Flüssigkeit mit *n*-Hexan extrahiert wurde (Kapitel 4.13.1). Zur Ermittlung der Viabilität wurden Proben aus Zweiphasenansätzen im Erdschwerefeld von der Lösungsmittelphase getrennt und die Zellsuspension für den Test verwendet. Die wässrigen Phasen konnten auf die Glukosekonzentration hin untersucht werden.

4.9.4 Rührkesselreaktor im 200 mL-Maßstab

Als Rührkesselreaktor im 200 mL-Maßstab wurde eine modifizierte gerührte Blasensäule mit 400 mL Nominalvolumen verwendet (Weuster-Botz *et al.* 2002, Abbildung 4.4). Da für die Reaktionen keine aktive Begasung nötig war, wurde die Sinterplatte durch eine Edelstahlplatte ersetzt. Der Reaktor verfügt über drei Strömungsbrecher mit einer Breite von je 15 mm und einen 6-Blatt-Scheibenrührer mit Magnetantrieb. Ein Scheibenblatt hat die Maße 8 mm x 8 mm. Die Durchführung der Biokatalyse, die Probenahme und Probenaufbereitung erfolgte analog zu Kapitel 4.9.3.

Darüber hinaus konnten in diesem Maßstab Proben aus beiden Phase untersucht werden, von denen die Reaktion in jeweils einem Teil mit Salzsäure abgestoppt wurde und im anderen Teil nicht. Dadurch sollte die effektive Konzentration der Edukte und Produkte in der wässrigen Phase ermittelt werden. Der Stoffaustausch war jedoch so schnell, dass das Konzentrationsverhältnis während der Zentrifugation bereits angeglichen wurde. Des Weiteren führte die Zugabe von HCl zu Beeinträchtigungen bei der Analytik und dadurch zu einem maximalen Fehler in der Stoffbilanz von 17,5 %. Ohne HCl betrug der maximale Fehler in der 200 mL-Umsetzung nur 3,8 %.

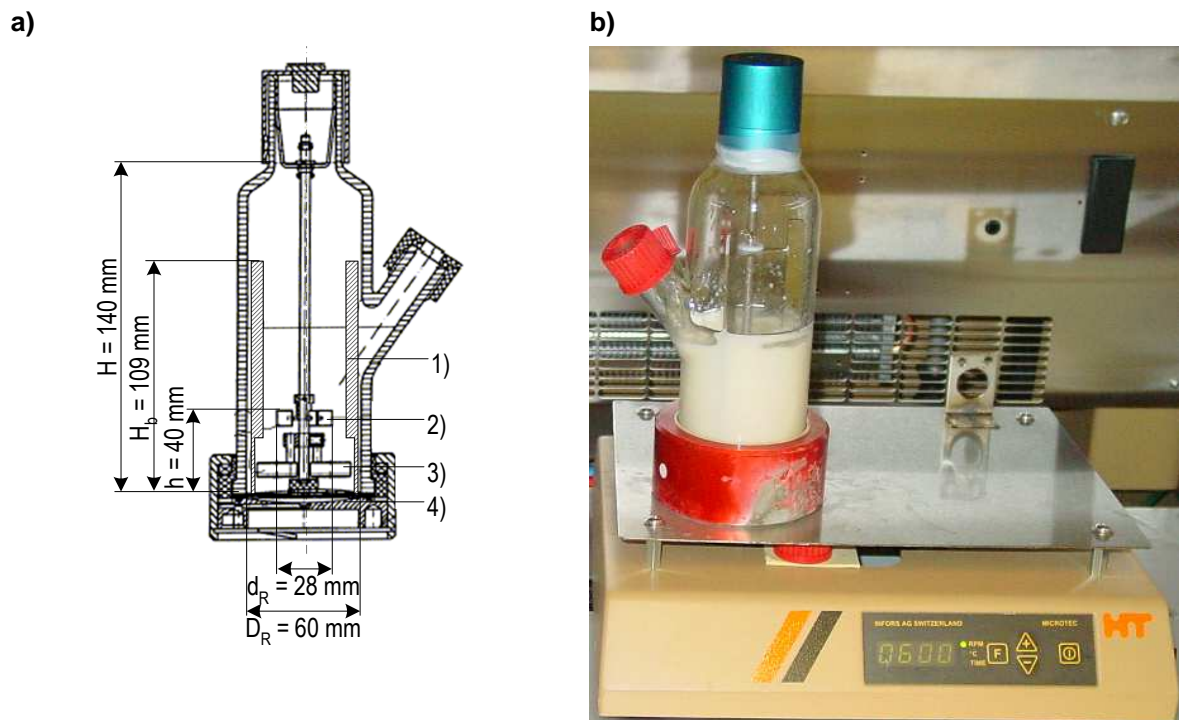


Abbildung 4.4 a) Schematische Darstellung des 200 mL-Rührkesselreaktors „Rührfors“. b) Aufbau des 200 mL-Rührkesselreaktors „Rührfors“.

4.10 Charakterisierung der Biokatalysatoren

4.10.1 Membranintegritätstest für Bakterien (Viabilität)

Als Membranintegritätstest für Bakterien wurde die differentielle Aufnahme der Farbstoffe SYTO[®]9 (3,34 mM in DMSO) und Propidiumiodid (20 mM in DMSO) aus dem LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Viabilitätstest von Molecular Probes bestimmt. Beide Farbstoffe binden spezifisch an Nukleinsäuren. Sie unterscheiden sich jedoch in ihrer Fähigkeit, intakte bakterielle Zellmembranen zu überqueren und in ihren spektralen Eigenschaften. Für SYTO[®]9 stellt die Zellmembran keine Barriere dar. Somit werden alle Zellen, sowohl solche mit intakter als auch solche mit beschädigter Zellmembran, grün fluoreszierend angefärbt. Propidiumiodid dringt dagegen nur in beschädigte Zellen ein, konkurriert dort mit SYTO[®]9 und färbt diese rot fluoreszierend an.

Zur Durchführung des Tests wurden je 3 μL der Farbstoff-Stammlösungen gemeinsam zu 1 mL VE-Wasser gegeben. Die zu untersuchende Zellsuspension wurde mit 0,9 % w/v NaCl-Lösung auf $\text{OD} = 0,05$ verdünnt. Je 100 μL der Farbstofflösung und der Zellsuspension wurden in die Vertiefung einer Flachboden-Mikrotiterplatte gegeben und 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte im Fluoreszenzphotometer bei 485 nm

Anregungswellenlänge und 520 nm (Verstärkungswert 28) und 620 nm (Verstärkungswert 56) Auslesewellenlänge gemessen. Das Verhältnis der beiden Lichtintensitäten diente als Merkmal für die Membranintegrität. Die Kalibrierung erfolgte durch verschiedene Mischungen frischer Zellen und mit 70 % v/v Isopropanol oder 20 % v/v 1-Decanol geschädigter Zellen.

Als Viabilitätstest wurde auch die photometrische Ermittlung der Wachstumskurve von Zellen in Gegenwart von 5 % v/v ionischen Flüssigkeiten durchgeführt (Abbildung 14.5). Dieser Test wird aber durch eventuelle Änderungen im Sauerstoffeintrag aufgrund der ionischen Flüssigkeiten und durch das Mitreißen von Zellen während der Sedimentation der ionischen Flüssigkeit vor der photometrischen Messung verfälscht. Aus diesem Grund wurde standardmäßig der Membranintegritätstest eingesetzt.

4.10.2 Membranintegritätstest für Hefen (Viabilität)

Der Membranintegritätstest, eigentlich Vitaltest, für Hefen wurde nach Bast (1999) durchgeführt. Dabei wird der Farbstoff Methyleneblau in alle Zellen aufgenommen, jedoch von Zellen mit Atmungsaktivität zu einem farblosen Stoff oxidiert. Voraussetzung für die Atmungsaktivität sind intakte Membranen, um den Protonengradienten über die Mitochondrienmembran aufrecht zu erhalten und um ein Ausbluten von Cofaktoren der Redox-Enzyme aus den Zellen zu verhindern.

Zur Durchführung des Tests wurde eine 1 % v/v Lösung aus Methyleneblau-gesättigtem Ethanol in Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7,0, 100 mM NaCl) erstellt, 1:1 mit Zellsuspension gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Unter dem Lichtmikroskop können farblose vitale Zellen von blauen inaktiven, also geschädigten Zellen unterschieden werden. Zur Kontrolle wurden frische Zellen in verschiedenen Verhältnissen mit in 70 % v/v Isopropanol oder 20 % v/v 1-Decanol geschädigten Zellen gemischt und analysiert. Das gezählte Verhältnis von farblosen zu blauen Zellen entsprach dem Mischungsverhältnis.

4.10.3 Zellaufschluss

Trigonopsis variabilis wurde einmal mit Kaliumphosphat-Puffer (0,1 M, pH 8,0) gewaschen und mit circa $50 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ in Zellaufschlusspuffer (Kaliumphosphat-Puffer 0,1 M, pH 8,0, 0,1 M Saccharose, 3 mM EDTA) resuspendiert. Dann wurden 500 μL Zellsuspension und 500 μL Glasperlen (0,4-0,6 mm Durchmesser) in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gefüllt und in einer Schwingarmmühle für 20 min bei 1800 min^{-1} und 4°C aufgeschlossen. Nach Zentrifugation in der Kühlzentrifuge (20000 min^{-1} , 4°C , 5 min) wurde der Überstand auf Eis gelagert.

Escherichia coli DH5 α PFADH wurde einmal mit Tris-HCl-Puffer (0,1 M, pH 8,0) gewaschen und mit circa 2 g_{BTM} L⁻¹ resuspendiert. Dann wurden 500 μ L Zellsuspension und 500 μ L Glasperlen (0,17-0,18 mm Durchmesser) in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gefüllt und in einer Schwingarmmühle für 2 min bei 1800 min⁻¹ und Raumtemperatur aufgeschlossen. Nach Zentrifugation in der Kühlzentrifuge (13000 min⁻¹, 4°C, 5 min) wurde der Überstand auf Eis gelagert.

Lactobacillus kefir wurde einmal mit Kaliumphosphat-Puffer (0,1 M, pH 7,5, 2 mM MgCl₂) gewaschen und mit circa 3 g_{BTM} L⁻¹ resuspendiert. Dann wurden 500 μ L Zellsuspension und 500 μ L Glasperlen (0,17-0,18 mm Durchmesser) in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gefüllt und in einer Schwingarmmühle für 6 min bei 1800 min⁻¹ und Raumtemperatur aufgeschlossen. Nach Zentrifugation in der Kühlzentrifuge (13000 min⁻¹, 4°C, 5 min) wurde der Überstand auf Eis gelagert.

4.10.4 Photometrische Bestimmung der DAO-Aktivität

Bei der Oxidation von D-Aminosäuren durch DAO wird FADH₂ gebildet, das durch Sauerstoff unter Bildung von H₂O₂ reoxidiert wird. Peroxidase ist unter Verbrauch von H₂O₂ in der Lage, das Chromogen *o*-Dianisidin zu einem braunen Farbstoff zu oxidieren, der bei geringem pH intensiv rot wird. (Abbildung 4.5).

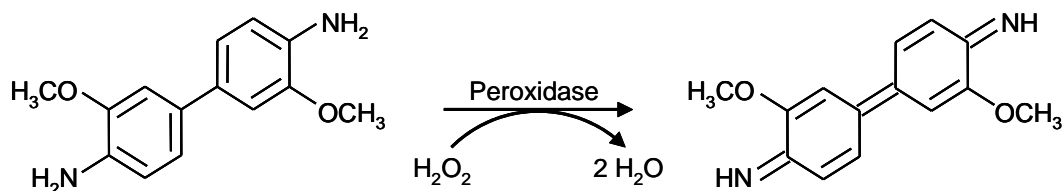


Abbildung 4.5 Schematische Darstellung der Peroxidase-katalysierten Oxidation von *o*-Dianisidin mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂).

Dabei wird gleichzeitig eventuell im Zellextrakt vorhandene Katalase inhibiert, die ansonsten für eine Unterschätzung der DAO-Aktivität durch Spaltung von H₂O₂ führen würde (Müller 2000, Gabler 1999). Zur Durchführung des Aktivitätstests wurde zunächst die *o*-Dianisidin- und Peroxidaselösung (2,1 g L⁻¹ *o*-Dianisidin-HCl, 500 μ kat L⁻¹ Horse Radish Peroxidase in 50 % v/v Glycerin in VE-Wasser) sowie der Kaliumphosphat-Puffer (0,1 M, pH 8,0) und die D-Alanin-Lösung (20 g L⁻¹ in Kaliumphosphat-Puffer) nach Tabelle 4.2 in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß bei 30°C im Thermomixer bei 1000 min⁻¹ für 5 Minuten vortemperiert. Dann wurde das Zellextrakt in einer Konzentration zugegeben, die eine deutliche Braunfärbung des Reaktionsansatzes nach 30-300 Sekunden verursacht.

Während dieser Zeit, die mit einer Stoppuhr gemessen wurde, wurde weiterhin geschüttelt. Sobald eine deutliche Braunfärbung zu erkennen war, wurde die Reaktion durch Zugabe von 30 % w/v Schwefelsäure abgestoppt und die Stoppuhr angehalten. Nach Zentrifugation in der Tischzentrifuge (13000 min^{-1} , RT, 3 min) wurde die Farbstoffbildung im Photospektrometer bei 540 nm gemessen. Über eine Kalibrierung mit H_2O_2 -Lösung (0,1 M in Kaliumphosphat-Puffer) konnte die spezifische DAO-Aktivität aus Gleichung 4.10 berechnet werden.

Tabelle 4.2: Pipettierschema für den Test der D-Aminosäureoxidase-Aktivität.

Lösung	Kalibrierung	Blindprobe	Probe
α -Dianisidin-Peroxidase-Lösung	250 μL	250 μL	250 μL
D-Alanin-Lösung	---	350 μL	350 μL
Kaliumphosphat-Puffer	745, 740, 730, 700, 650 μL	400 μL	380 μL
Zellextrakt	---	---	20 μL
H_2O_2	5, 10, 20, 50, 100 μL	---	---
Schwefelsäure	500 μL	500 μL	500 μL

Gleichung 4.10:
$$EA_X = \frac{\Delta c_E}{\Delta t \cdot c_X}$$

mit	EA_X	spezifische Enzymaktivität, $\mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1} = \mu\text{mol s}^{-1} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$
	Δc_E	Differenz der Eduktkonzentration/ H_2O_2 -Konzentration, $\mu\text{mol L}^{-1}$
	Δt	Zeitintervall, s
	c_X	Konzentration des Ganzzell-Biokatalysators, $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$

4.10.5 Photometrische Bestimmung der ADH-Aktivität

Bei der Reduktion von Ketonen durch eine ADH wird der Cofaktor NAD(P)H zu NAD(H)^+ oxidiert. Die Abnahme der Absorption von NAD(P)H kann in einem Photometer bei 340 nm verfolgt werden. Zur Bestimmung der ADH-Aktivität von Zellextrakten wurden die in Tabelle 4.3 angegebenen Lösungen bei Raumtemperatur in einer Flachboden-Mikrotiterplatte vereinigt. Die spezifische Aktivität wurde daraus mit dem Lambert-Beer'schen-Gesetz ermittelt (Gleichung 4.11).

Tabelle 4.3: Pipettierschema für den Test der Aktivität verschiedener Alkoholdehydrogenasen.

	ADH (<i>E. coli</i> DH5α PFADH)	ADH₁ (<i>L. kefir</i> DSM 70587)	ADH₂ (<i>L. kefir</i> DSM 70587)	Blind- probe	Probe
Cofaktor (6,4 g L ⁻¹)	NADH	NADPH	NADPH	20 μL	20 μL
Puffer (0,1 M)	Tris-HCl pH 8,0	KPi pH 7,5	KPi pH 7,5	160 μL	140 μL
Substrat (50 mM)	Acetophenon	Acetophenon	4-Hydroxy-4-Methyl- 2-Pentanon	20 μL	20 μL
Zellextrakt	Verdünnung, so dass lineare Abnahme der Absorption			---	20 μL

Gleichung 4.11:

$$EA_x = \frac{\Delta c_{\text{NAD(P)H}} \cdot V_R}{\Delta t \cdot V_x \cdot c_x} = \frac{\Delta A_{340} \cdot V_R \cdot 10^6}{\Delta t \cdot \epsilon_{\text{NAD(P)H}} \cdot b \cdot V_x \cdot c_x}$$

mit	EA_x	spezifische Enzymaktivität, $\mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$
	$\Delta A_{340} / \Delta t$	Änderung der Absorption bei 340 nm über die Zeit, s^{-1}
	V_R	Reaktionsvolumen, μL (hier 200 μL)
	$\epsilon_{\text{NAD(P)H}}$	molarer Extinktionskoeffizient für NAD(P)H ($630 \text{ L mol}^{-1} \text{ mm}^{-1}$)
	b	Länge des Lichtweges, mm (hier 5,3 mm)
	V_x	Volumen des zugegebenen Zellextrakts, L (hier 20 μL)
	c_x	Biotrockenmasse-Konzentration, aus der das Zellextrakt gewonnen wurde, g L^{-1}

4.11 Charakterisierung der Lösungsmittel

Nach folgenden Methoden wurden einige physiko-chemischen Lösungsmittel-eigenschaften von ionischen Flüssigkeiten und organischen Lösungsmitteln bestimmt:

4.11.1 Bestimmung des Phasenverhaltens von ionischen Flüssigkeiten und Wasser

In einem 1,5 mL Reaktionsgefäß wurden die zu untersuchenden Flüssigkeiten in verschiedenen Volumenverhältnissen bei einem Gesamtvolumen von 200 μL vorgelegt und 5 Minuten auf dem Reagenzglasschüttler dispergiert. Nach Zentrifugation in der Tischzentrifuge (13000 min^{-1} , RT, 10 min) wurden die Phasenverhältnisse optisch beurteilt. Bei der Ausbildung von zwei Phasen wurden die Volumina der beiden Phasen ermittelt, um eine teilweise Mischbarkeit zu erkennen.

4.11.2 Bestimmung der Löslichkeit von Amino- und Ketocarbonsäuren in ionischen Flüssigkeiten

Die Untersuchung eines Löslichkeit vermittelnden Effekts von mit Wasser mischbaren ionischen Flüssigkeiten erfolgte durch Zugabe der zu untersuchenden Stoffe im vielfachen Überschuss zur erwarteten Löslichkeit zu verschiedenen konzentrierten Lösungen der ionischen Flüssigkeiten in Puffer. Die Versuche wurden in gasdicht verschlossenen 2 mL Analysegefäßen durchgeführt, die 1 Stunde bei 1800 min^{-1} in der Schwingarmmühle geschüttelt wurden. Nach einer Zentrifugation in der Standzentrifuge (4500 min^{-1} , RT, 10 min) wurde der Überstand mittels HPLC auf die Konzentration der untersuchten Stoffe analysiert.

Die Löslichkeit von Amino- und Ketocarbonsäuren in nicht mit Wasser mischbaren ionischen Flüssigkeiten wurde untersucht, indem eine wässrige Lösung der Stoffe vor und nach Kontakt mit 20 % v/v ionischen Flüssigkeiten (1 Stunde bei 1800 min^{-1} in der Schwingarmmühle, Zentrifugation in der Standzentrifuge bei 4500 min^{-1} , RT, 10 min) mittels HPLC analysiert wurde.

4.11.3 Bestimmung der Löslichkeit von Ketonen und Alkoholen in Puffer

Die Ketone und Alkohole wurden separat in einem gasdicht verschlossenen 2 mL Analysegefäß in vielfachem Überschuss zur erwarteten Löslichkeit zu Puffer zugegeben. Dieser hatte die identische Zusammensetzung wie der bei den Versuchen zur Biokatalyse verwendete Puffer. Nach 1 Stunde bei 1800 min^{-1} in der Schwingarmmühle, Zentrifugation in der Standzentrifuge (4500 min^{-1} , RT, 10 min) und Extraktion der wässrigen Phase wurden die Konzentrationen mittels Gaschromatographie (GC) bestimmt.

4.11.4 Bestimmung des Verteilungskoeffizienten von Ketonen und Alkoholen zwischen ionischen Flüssigkeiten und Puffer ($\log D$) oder *n*-Hexan

Die Ketone und Alkohole wurden gemeinsam mit je circa 300 mM in der ionischen Flüssigkeit gelöst. Dann wurden 100 μL ionische Flüssigkeit und 400 μL Puffer, der die identische Zusammensetzung hatte, wie der bei den Versuchen zur Biokatalyse verwendete Puffer, in ein gasdicht verschlossenes 2 mL Analysegefäß gegeben. Nach 1 Stunde bei 1800 min^{-1} in der Schwingarmmühle, Zentrifugation in der Standzentrifuge (4500 min^{-1} , RT, 10 min) und Extraktion der wässrigen Phase wurden die Konzentrationen mittels GC bestimmt. Daraus und aus den verbleibenden Konzentrationen in der ionischen Flüssigkeit konnte der Verteilungskoeffizient $\log D$ nach Gleichung 4.12 berechnet werden.

Gleichung 4.12:
$$\log D_{\text{IL/Puffer}} = \log_{10} \frac{c_{\text{S},0} - (\varphi_{\text{d}}^{-1} - 1) \cdot c_{\text{S}}}{c_{\text{S}}}$$

mit	$\log D_{\text{IL/Puffer}}$	dekadischer Logarithmus des Verteilungskoeffizienten einer Substanz zwischen ionischer Flüssigkeit und Puffer, -
	$c_{\text{S},0}$	vorgelegte Konzentration der Substanz in IL, mol L ⁻¹
	c_{S}	im Puffer gemessene Konzentration der Substanz nach Einstellung des Gleichgewichts zwischen IL und Puffer, mol L ⁻¹
	φ_{d}	Phasenanteil der ionischen Flüssigkeit, -

Zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten zwischen ionischer Flüssigkeit und *n*-Hexan wurden 325 µL ionische Flüssigkeit und 325 µL *n*-Hexan vorgelegt. Nach Schütteln und Zentrifugation analog zur Prozedur mit Puffer wurde die *n*-Hexan-Phase analysiert.

4.11.5 Bestimmung des Verteilungskoeffizienten von Lösungsmitteln zwischen *n*-Octanol und Wasser ($\log P$)

Für die Verteilungskoeffizienten von Lösungsmitteln zwischen *n*-Octanol und Wasser ($\log P$) wurden die experimentellen Werte aus der Datenbank LogKow entnommen (Syrres 2004).

4.12 Flüssigchromatographische Analytik von Edukten und Produkten

Zur Analytik von Edukten und Produkten der Racematspaltung von Aminosäuren wurde der Hochdruck-Flüssigchromatograph Serie 1100 eingesetzt (Tabelle 14.4). Dieser wurde mit unterschiedlichen Trennsäulen ausgerüstet. Die Trennmethode variierte für die verschiedenen Substanzen. Die Quantifizierung erfolgte über selbst hergestellte Kalibrierstandards.

4.12.1 Probenvorbereitung für die Hochdruck-Flüssigchromatographie

Da auf die Trennsäule keine ionischen Flüssigkeiten aufgebracht werden dürfen, konnten nur Proben aus rein wässrigen Reaktionsansätzen oder Ansätzen mit nicht mit Wasser mischbaren ionischen Flüssigkeiten nach Abtrennung derselben durch Zentrifugation analysiert werden.

4.12.2 Achirale HPLC-Analytik von Tyrosin, HPP und HPA

Tyrosin, *p*-Hydroxyphenylpyruvat (HPP) und *p*-Hydroxyphenylacetat (HPA) wurden mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule:	C18 GromSil 100 2 Fe
Probeninjektion:	10 μ L
Säulenströmung:	0,2 mL min ⁻¹ KH ₂ PO ₄ 20 mM
Ofentemperatur:	50°C für 8 min
Detektor:	UV 190 nm
Retentionszeiten:	Tyrosin: 3,28 min; HPP: 3,96 min; HPA: 5,43 min

Auf dieser relativ unempfindlichen Säule wurden auch einzelne Proben, die mit Wasser mischbare ionische Flüssigkeiten enthielten analysiert. Danach wurde die Säule jedoch gründlich mit Flussmittel gespült.

4.12.3 Chirale HPLC-Analytik von Tyrosin

D-Tyrosin und L-Tyrosin wurden mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule:	Chiral 1
Probeninjektion:	10 μ L
Säulenströmung:	1,0 mL min ⁻¹ CuSO ₄ 0,5 mM : Ethanol 96 % (4:1)
Ofentemperatur:	60°C für 9 min
Detektor:	UV 190 nm
Retentionszeiten:	L-Tyrosin: 6,04 min; D-Tyrosin: 7,28 min

4.12.4 Chirale HPLC-Analytik von Alanin

D-Alanin und L-Alanin wurden mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule:	Chiral 1
Probeninjektion:	10 μ L
Säulenströmung:	1,0 mL min ⁻¹ CuSO ₄ 0,5 mM
Ofentemperatur:	60°C für 7 min
Detektor:	UV 240 nm
Retentionszeiten:	L-Alanin: 4,88min; D-Tyrosin: 5,34 min

4.13 Gaschromatographische Analytik von Edukten und Produkten

Zur Analytik von Edukten und Produkten der asymmetrischen Keton-Reduktionen wurde der Gaschromatograph CP-3800 eingesetzt (Tabelle 14.5). Dieser wurde mit unterschiedlichen Trennsäulen ausgerüstet. Die Trennmethode variierte für die verschiedenen Substanzen. Die Quantifizierung erfolgte über selbst hergestellte Kalibrierstandards und den internen Standard Acetophenon (AP) in jeder Probe.

4.13.1 Probenvorbereitung für die Gaschromatographie

Da auf die Trennsäule weder Wasser noch ionische Flüssigkeiten aufgebracht werden dürfen, wurden die Proben mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert. Dies geschah mit Ethylacetat (36 mM Acetophenon) im Verhältnis 1:1 aus wässrigen Lösungen sowie aus Dispersionen von organischen Lösungsmitteln in wässriger Phase. Aus ionischen Flüssigkeiten wurde im Verhältnis 1:1 mit *n*-Hexan (36 mM Acetophenon) extrahiert. Die Extraktion erfolgte in einem im Thermomixer geschüttelten Probengefäß (1400 min^{-1} , RT, >15 min). Anschließend wurden die beiden Phasen in einer Tischzentrifuge getrennt (13000 min^{-1} , RT, 5 min). Die organische Phase wurde mit Kaliumcarbonat-getrocknetem Ethylacetat verdünnt und bis zur Analyse eventuell bei -20°C gelagert.

4.13.2 Chirale GC-Analytik von 4-Cl-ACE und 4-Cl-HBE

4-Chloracetessigsäureethylester (4-Cl-ACE) und 4-Chlor-3-hydroxybuttersäureethylester (4-Cl-HBE) wurden mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule:	Lipodex E
Probeninjektion:	1 μL ; Split 50
Säulenströmung:	5,0 mL min^{-1} Helium 5.0
Ofentemperatur:	110°C für 15 min
Retentionszeiten:	AP: 2,14 min; 4-Cl-ACE: 3,68 min; (R)-4-Cl-HBE: 4,91 min; (S)-4-Cl-HBE: 5,22 min

4.13.3 Chirale GC-Analytik von 4-Cl-AP und 4-Cl-PE

4-Chloracetophenon (4-Cl-AP) und 1-(4-Chlorphenyl)ethanol (4-Cl-PE) wurden mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule:	BGB-174
Probeninjektion:	1 μ L; Split 40
Säulenströmung:	9,0 mL min ⁻¹ Helium 5.0
Ofentemperatur:	75°C für 0 min; mit 2,5°C min ⁻¹ auf 150°C für 1 min
Retentionszeiten:	AP: 9,74 min; 4-Cl-AP: 20,75 min; (<i>R</i>)-4-Cl-PE: 25,98 min; (<i>S</i>)-4-Cl-PE: 26,33 min

4.13.4 Achirale GC-Analytik von 6-Cl-DOHB, 6-Cl-HOHB und 6-Cl-DHHB

6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester (6-Cl-DOHB), 6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure-*tert*-butylester (6-Cl-5-HOHB) und 6-Chlor-3,5-dihydroxyhexansäure-*tert*-butylester (6-Cl-3,5-DHHB) wurden mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule:	CP-Sil 8 CB-MS
Probeninjektion:	1 μ L; Split 20
Säulenströmung:	3,0 mL min ⁻¹ Helium 5.0
Ofentemperatur:	100°C für 0 min; mit 5°C min ⁻¹ auf 160°C für 23 min
Retentionszeiten:	AP: 6,07 min; 6-Cl-DOHB: 15,18 min; 6-Cl-5-HOHB: 14,73 min; 6-Cl-3,5-DHHB: 21,70 min; Furanon: 15,22 min

4.13.5 Chirale GC-Analytik von 6-Cl-DHHB

Um die Stereoisomere von 6-Chlor-3,5-Dihydroxyhexansäure-*tert*-Butylester analysieren zu können, mussten die verdünnten GC-Proben mit 60 μ L Trifluoressigsäureanhydrid versetzt werden. Die verschlossenen Probenfläschchen wurden bei 40°C für 10 Minuten inkubiert. Danach wurden 30 μ L Pyridin zur Neutralisation zugegeben und erneut verschlossen bei 40°C für 5 Minuten inkubiert. Daraufhin wurden sie mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule:	BGB-174
Probeninjektion:	1 μ L; Split 40
Säulenströmung:	1,5 mL min ⁻¹ Helium 5.0
Ofentemperatur:	130°C für 15 min; mit 10°C min ⁻¹ auf 160°C für 10 min
Retentionszeiten:	(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-6-Cl-3,5-DHHB: 18,2 min; (3 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-6-Cl-3,5-DHHB: 18,0 min; (3 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-6-Cl-3,5-DHHB: 18,0 min

4.13.6 Chirale GC-Analytik von EBA und HPPE

Benzoylessigsäureethylester (EBA) und 3-Hydroxy-3-phenylpropionsäureethylester (HPPE) wurden mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule:	Lipodex E
Probeninjektion:	1 μL ; Split 50
Säulenströmung:	3,0 mL min^{-1} Helium 5.0
Ofentemperatur:	110°C für 30 min; mit 15°C min^{-1} auf 200°C für 15 min
Retentionszeiten:	AP: 3,04 min; EBA: 31,09 min; (<i>R</i>)-HPPE: 32,49 min; (<i>S</i>)-HPPE: 32,63 min

4.13.7 Chirale GC-Analytik von 2,5-Hexandion und 2,5-Hexandiol

2,5-Hexandion und 2,5-Hexandiol wurden mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule:	Lipodex E
Probeninjektion:	1 μL ; Split 50
Säulenströmung:	2,0 mL min^{-1} Helium 5.0
Ofentemperatur:	110°C für 10 min
Retentionszeiten:	AP: 4,13 min; Hexandion: 5,42 min; (2 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-Hexandiol: 5,87 min; <i>meso</i> -Hexandiol: 6,09 min; (2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-Hexandiol: 6,56 min

4.13.8 Achirale GC-Analytik von 2-Octanon und 2-Octanol

2-Octanon und 2-Octanol wurden mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule:	BGB-174
Probeninjektion:	1 μL ; Split 40
Säulenströmung:	5,0 mL min^{-1} Helium 5.0
Ofentemperatur:	75°C für 0 min; mit 2,5°C min^{-1} auf 106°C für 1 min; mit 10°C min^{-1} auf 140°C für 1 min
Retentionszeiten:	AP: 11,78 min; 2-Octanon: 9,03 min; 2-Octanol: 9,61 min

4.13.9 Chirale GC-Analytik von 2-Octanon und 2-Octanol

Trennsäule:	Lipodex E
Probeninjektion:	3 μL ; Split 30
Säulenströmung:	12,0 mL min^{-1} Helium 5.0
Ofentemperatur:	28°C für 55 min; mit 10°C min^{-1} auf 150°C für 5 min
Retentionszeiten:	AP: 61,81 min; (<i>S</i>)-2-Octanol: 47,97 min; (<i>R</i>)-2-Octanol: 49,44 min

4.13.10 Chirale GC-Analytik von PFAP und PFPE

2,3,4,5,6-Pentafluoroacetophenon (PFAP) und 1-(2,3,4,5,6-Pentafluorophenyl)-ethanol (PFPE) wurden mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule:	BGB-174
Probeninjektion:	5 μ L; Split 40
Säulenströmung:	5,0 mL min ⁻¹ Helium 5.0
Ofentemperatur:	80°C für 0 min; mit 1°C min ⁻¹ auf 100°C für 2 min; mit 15°C min ⁻¹ auf 150°C für 2 min
Retentionszeiten:	AP: 14,10 min; PFAP: 13,23 min; (<i>R</i>)-PFPE: 22,91 min; (<i>S</i>)-PFPE: 23,27 min

5 Prozessentwicklungen zur Biokatalysator-Herstellung

Zur effizienten Herstellung der Biokatalysatoren *Trigonopsis variabilis* mit D-Aminosäureoxidase-Aktivität und *Lactobacillus kefir* mit Alkoholdehydrogenase-Aktivität wurden Prozesse im Zulaufverfahren entwickelt.

5.1 Herstellung von *Trigonopsis variabilis* mit DAO-Aktivität

Als Grundlage für die Herstellung von *Trigonopsis variabilis* mit DAO-Aktivität diente der von Hörner *et al.* (1996) beschriebene Prozess im Satzverfahren. Darauf aufbauend sollte ein Zulaufverfahren entwickelt werden, mit dem höhere Zellausbeuten bei möglichst hoher DAO-Aktivität erreicht werden können.

5.1.1 Steigerung der DAO-Aktivität durch Optimierung des Mineralmediums

Schüttelkolben-Kultivierungen von *Trigonopsis variabilis* in Minimalmedium nach Hörner *et al.* (1996) mit *N*-Carbamoyl-D,L-Alanin als Induktor ergaben eine spezifische DAO-Aktivität im Bereich von $3 \mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$ anstelle der angegebenen $12\text{-}14 \mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$. Nachdem als Grund für die niedrigere Aktivität Unterschiede der Chemikalienhersteller, der Zellen, der verwendeten Laborgeräte und der Art der Mediumsterilisation ausgeschlossen worden waren, lieferte die Verwendung von Leitungswasser anstelle von vollentsalztem Wasser den Hinweis, dass Spurenelemente für eine höhere Aktivität benötigt werden. Daraufhin wurde der Einfluss verschiedener Metallsalze im Medium auf die DAO-Aktivität untersucht. Die Zugabe eines einzelnen Salzes hat keinen Effekt (Ergebnisse nicht gezeigt). In Abbildung 5.1 ist zu erkennen, dass Kupfer- und Mangansalze dagegen gemeinsam die DAO-Aktivität auf circa $9 \mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$ erhöhen.

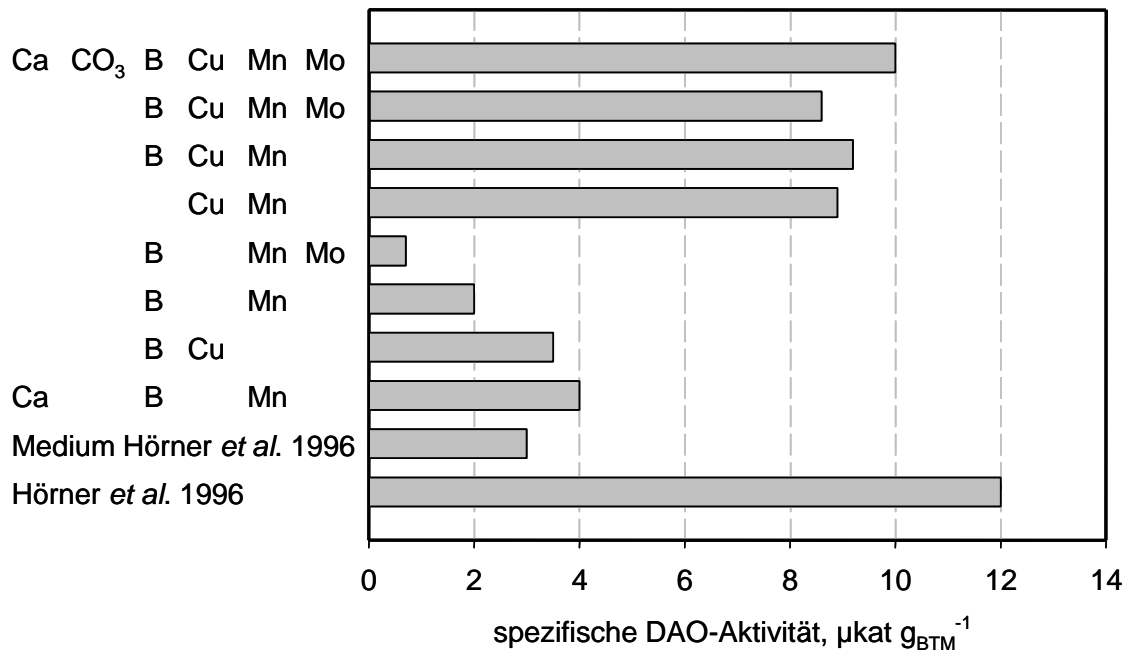


Abbildung 5.1 Spezifische D-Aminosäureoxidase (DAO)-Aktivität von *Trigonopsis variabilis* in der stationären Phase nach Kultivierung in Minimalmedium nach Hörner *et al.* (1996) und Zusatz verschiedener Mineralsalze im Vergleich zum Literaturwert von Hörner. Ca ($400 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), CO₃ ($400 \text{ mg L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$), B ($50 \text{ mg L}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$), Cu ($20 \text{ mg L}^{-1} \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), Mn ($40 \text{ mg L}^{-1} \text{ MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), Mo ($40 \text{ mg L}^{-1} (\text{NH})_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$). Alle ergänzten Medien enthielten zusätzlich $40 \text{ mg L}^{-1} \text{ NaCl}$, welches aber keinen Einfluss auf die DAO-Aktivität hatte (Ergebnisse nicht gezeigt).

Da die in diesem Versuch eingesetzte Kupfersulfatkonzentration von 20 mg L^{-1} eine erhebliche Verlangsamung des Wachstums verursacht, wurde der Einfluss der Konzentration zwischen $0,5$ und 20 mg L^{-1} auf die DAO-Aktivität und das Wachstum untersucht. Gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase erreichen alle Ansätze außer derjenige mit 20 mg L^{-1} eine DAO-Aktivität von 15 – $17 \mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$ (Ergebnisse nicht gezeigt). In der Kultivierung mit 1 mg L^{-1} Kupfersulfat wird die stationäre Wachstumsphase mit $5,6 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ nach 56 Stunden erreicht. Diese Kupferkonzentration ermöglicht also mit $0,1 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ die größte Raum-Zeit-Ausbeute bei hoher DAO-Aktivität und wurde deshalb für alle weiteren Kultivierungen verwendet (Tabelle 14.12).

5.1.2 Entwicklung eines Zulaufverfahrens

Die Entwicklung eines effizienten Herstellungsverfahrens für *Trigonopsis variabilis* erfolgte im $7,5 \text{ L}$ -Rührkesselreaktor. Zum Vergleich mit den Schüttelkolben-Kultivierungen wurde zunächst eine 3 L -Satzkultivierung mit *N*-Carbamoyl-

D,L-Alanin als Induktor, 1 min^{-1} Luftbegasung, 600 min^{-1} Rührerdrehzahl und ohne pH-Regelung durchgeführt. Im Verlauf der Kultivierung sinkt der pH auf 2,5. Eine pH-Absenkung unter pH 3,5 ist zur Induktion notwendig, da *N*-Carbamoyl-D,L-Alanin nur in der protonierten Form in die Zellen aufgenommen wird (Müller 2000). Abbildung 5.2 zeigt, dass in diesem Prozess $8,7 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ Zellen erhalten werden, etwa 55 % mehr als im Schüttelkolben. Die DAO-Aktivität sinkt jedoch von $10,7 \text{ } \mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$ in der späten exponentiellen Wachstumsphase auf $4,7 \text{ } \mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$ in der stationären Wachstumsphase ab, wie in Abbildung 5.3 zu erkennen ist.

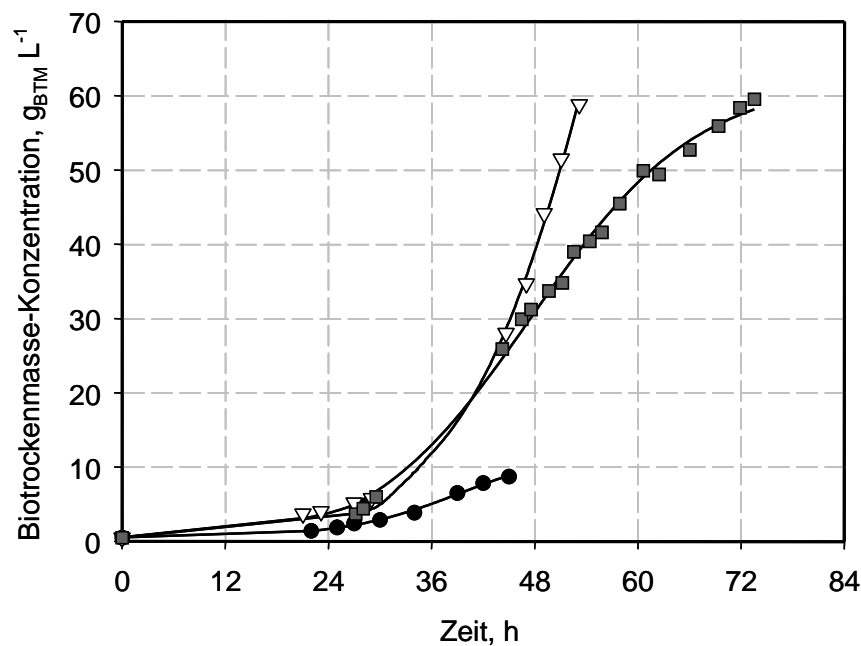


Abbildung 5.2 Verlauf der Biotrockenmasse-Konzentration während der Kultivierungen von *Trigonopsis variabilis* im 3 L-Satzverfahren ●, im 2-stufigen 5 L-Zulaufverfahren ▽ und im 4-stufigen 5 L-Zulaufverfahren ■. Die Linien dienen nur als visuelle Hilfe.

Daraufhin wurde versucht, ein Zulaufverfahren zu entwickeln, das die Prozessbedingungen zum Zeitpunkt der maximalen DAO-Aktivität des Satzverfahrens durch Glukosezudosierung und Regelung auf pH 3,0 aufrecht erhält. In diesem 2-stufigen Prozess mit identischen Anfangsbedingungen wie im Satzverfahren wurde nach 29 Stunden bis zur Erreichung des Endvolumens von 5 L mit einem exponentiellen Profil zudosiert, so dass die Glukosekonzentration im Medium nie unter 3 g L^{-1} abfiel (Gleichung 4.5). Der Sauerstoffpartialdruck wurde über die Rührerdrehzahl auf etwa 20 % Luftsättigung geregelt.

In Abbildung 5.2 ist zu sehen, dass mit dieser Strategie eine sehr hohe Zelldichte von fast $60 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ erreicht wird. Abbildung 5.3 zeigt, dass es allerdings nicht gelingt, die Reduzierung der DAO-Aktivität im Verlauf der Zulaufphase zu unterbinden.

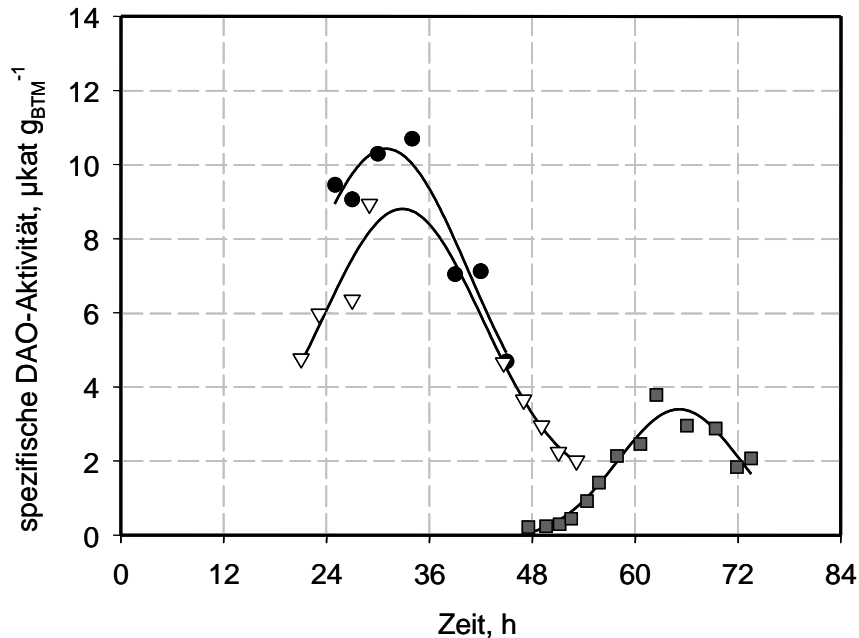


Abbildung 5.3 Verlauf der spezifischen D-Aminosäureoxidase (DAO)-Aktivität während der Kultivierungen von *Trigonopsis variabilis* im 3 L-Satzverfahren ●, im 2-stufigen 5 L-Zulaufverfahren ▽ und im 4-stufigen 5 L-Zulaufverfahren ■. Die Linien dienen nur als visuelle Hilfe.

Da die Expression der DAO durch *N*-Carbamoyl-D,L-Alanin induzierbar ist, wurde im Folgenden versucht, durch eine 4-stufige Prozess-Strategie zu höheren spezifischen DAO-Aktivitäten im Zulaufverfahren zu gelangen. Der Satzphase schloss sich nach 24-28 h zunächst eine erste Zulaufphase mit dem Zudosierungsprofil aus Gleichung 4.6 an, in der die Zellen vermehrt wurden, jedoch ohne Induktion der DAO-Expression. Es wurde also noch kein *N*-Carbamoyl-D,L-Alanin ins Medium zugegeben. Der pH wurde auf 6,0 und der Sauerstoffpartialdruck auf 40 % Luftsättigung gehalten. Bei Erreichen von circa $30 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ nach 41-49 h wurde in einer Übergangsphase durch Stopp der Basetitration und der Produktion saurer Nebenprodukte des Zellwachstums der pH im Medium auf 3,0 abgesenkt. Dies dauerte etwa 5-8 h. Anschließend wurde die Produktionsphase durch Zugabe von $0,66 \text{ g L}^{-1}$ *N*-Carbamoyl-D,L-Alanin eingeleitet. In dieser Phase wurde die Zudosierung auf einen konstanten Wert eingestellt (Gleichung 4.7), so dass das

Zellwachstum verlangsamt wurde. In Abbildung 5.2 ist zu sehen, dass nach 70-74 h etwa $60 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ Zellen erreicht wurden.

Des Weiteren wurde der Einfluss von Sauerstoff auf die DAO-Aktivität durch Variation des Sauerstoffpartialdrucks in der Produktionsphase des 4-stufigen Prozesses untersucht. In Abbildung 5.3 ist der Prozess mit 60 % Luftsättigung dargestellt, mit dem mit $2,9 \mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$ die höchste DAO-Aktivität erhalten wird. Bei 5 % Luftsättigung beträgt die Aktivität $2,4 \mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$, bei 0 % nur noch $1,0 \mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$, bei einer gleichzeitig reduzierten Biomassekonzentration von etwa $40 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$.

5.1.3 Diskussion

Bei der Schüttelkolben-Kultivierung von *Trigonopsis variabilis* mit *N*-Carbamoyl-D,L-Alanin als Induktor werden statt der von Hörner *et al.* (1996) berichteten DAO-Aktivität von $12 \mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$ nur $3 \mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$ erreicht. Erst eine Ergänzung des Mediums durch Kupfer- und Mangansalze erbringt eine Aktivität von etwa $9 \mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$. Durch Optimierung der Kupfersulfat-Konzentration auf 1 mg L^{-1} wird diese weiter auf $16 \mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$ gesteigert. Das entspricht einer Verbesserung von 33 % gegenüber den Aktivitäten von Hörner *et al.* (1996).

Hörner berichtete für eine Satzkultivierung im 50 L-Rührkesselreaktor, dass die DAO-Aktivität im Verlauf des Prozesses auf $7,0 \mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ansteigt. Im Gegensatz dazu wird in dieser Arbeit in einem 3 L-Satzverfahren ein Aktivitätsmaximum in der späten exponentiellen Wachstumsphase von $10,7 \mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$ und ein anschließendes Abfallen der Aktivität auf $4,7 \mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$ zu Beginn der stationären Phase festgestellt. Möglicherweise ist der Grund dafür die größere Sauerstoffzufuhr im 3 L-Satzverfahren, in dem mit $1,0 \text{ min}^{-1}$ begast und mit 600 min^{-1} gerührt wird. Im Prozess von Hörner lagen die Werte bei $0,6 \text{ min}^{-1}$ und 400 min^{-1} .

Die Entwicklung eines Zulaufverfahrens im 5 L-Maßstab führte zu zwei unterschiedlichen Prozess-Strategien. Die erste, 2-stufige Strategie besteht darin, die Bedingungen zum Zeitpunkt der höchsten DAO-Aktivität im Satzverfahren durch Glukosezudosierung und Regelung auf pH 3,0 über einen längeren Zeitraum aufrecht zu erhalten. Dabei zeigt sich, dass die Biomasseproduktion sehr hoch ist, die DAO-Aktivität jedoch wie im Satzverfahren nach Erreichen des Maximums nach circa 30 h kontinuierlich abfällt. Abbildung 5.4 zeigt, dass die größte Raum-Zeit-Ausbeute der DAO-Aktivität in diesem Prozess nach 44,7 Stunden mit $2,9 \mu\text{kat L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht wird ($28,1 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$, $4,6 \mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$). Dies entspricht einer volumetrischen Enzymaktivität von $129,3 \mu\text{kat L}^{-1}$, wie in Abbildung 5.5 zu erkennen ist.

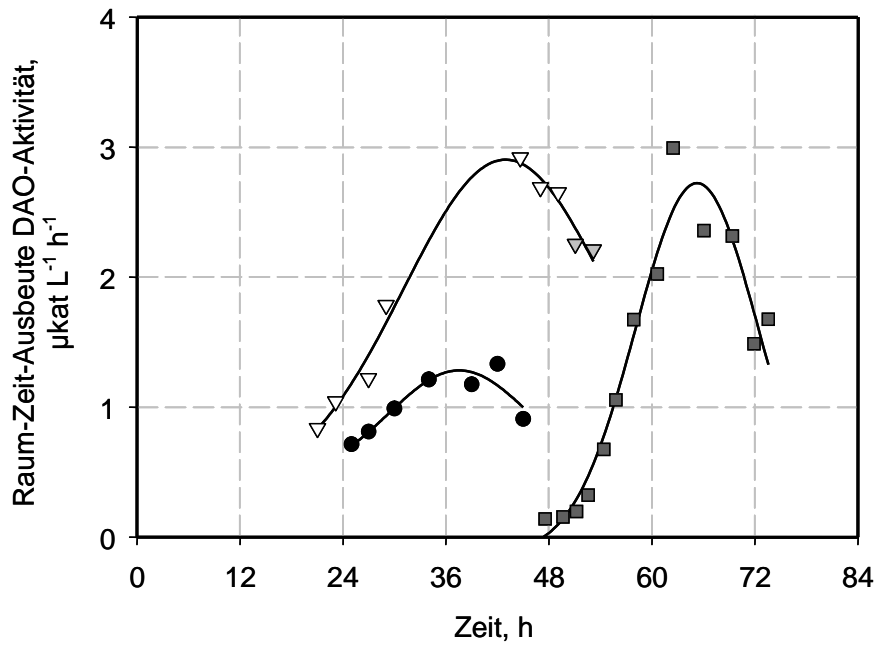


Abbildung 5.4 Verlauf der Raum-Zeit-Ausbeute der D-Aminosäureoxidase (DAO)-Aktivität während der Kultivierungen von *Trigonopsis variabilis* im 3 L-Satzverfahren ●, im 2-stufigen 5 L-Zulaufverfahren ▽ und im 4-stufigen 5 L-Zulaufverfahren ■. Die Linien dienen nur als visuelle Hilfe.

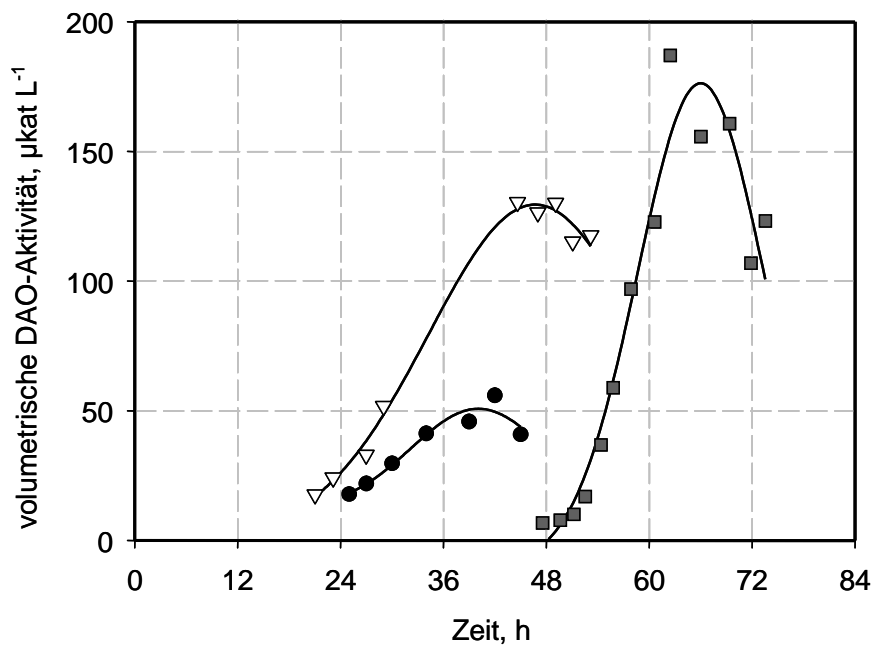


Abbildung 5.5 Verlauf der volumetrischen D-Aminosäureoxidase (DAO)-Aktivität während der Kultivierungen von *Trigonopsis variabilis* im 3 L-Satzverfahren ●, im 2-stufigen 5 L-Zulaufverfahren ▽ und im 4-stufigen 5 L-Zulaufverfahren ■. Die Linien dienen nur als visuelle Hilfe.

Im 4-stufigen Prozess folgt der Satzphase eine reine Wachstumsphase, dann eine Übergangsphase zur pH-Absenkung und anschließend eine DAO-Produktionsphase. In Abbildung 5.4 ist zu sehen, dass diese Strategie nach 69 h eine Raum-Zeit-Ausbeute der DAO von $2,4 \mu\text{kat L}^{-1} \text{h}^{-1}$ erbringt ($56,7 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$, $2,9 \mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$). Damit wird die volumetrische Enzymaktivität auf $164,4 \mu\text{kat L}^{-1}$ gesteigert, wie Abbildung 5.5 verdeutlicht. Der hohe Wert der volumetrischen DAO-Aktivität bei 62,5 h konnte nicht reproduziert werden und ist deshalb wahrscheinlich ein Messfehler. In der Produktionsphase konnte ein positiver Einfluss von Sauerstoff auf die DAO-Aktivität festgestellt werden.

Die bisher veröffentlichten Verfahren zur Herstellung von *Trigonopsis variabilis* mit DAO-Aktivität erzielten im Satzprozess $77 \mu\text{kat L}^{-1}$ (Hörner *et al.* 1996) und $68 \mu\text{kat L}^{-1}$ (Singh *et al.* 2001), im Zulaufprozess $117 \mu\text{kat L}^{-1}$ (Huber *et al.* 1992) und $121 \mu\text{kat L}^{-1}$ (Kujan *et al.* 2001). Abbildung 5.6a veranschaulicht, dass mit dem neu entwickelten 4-stufigen Zulaufverfahren $164 \mu\text{kat L}^{-1}$ DAO-Aktivität gewonnen werden, was einer Steigerung um 36 % zum besten in der Literatur beschriebenen Wert entspricht. Abbildung 5.6b zeigt, dass bei Betrachtung der Raum-Zeit-Ausbeute der DAO-Aktivität das neu entwickelte 2-stufige Zulaufverfahren mit $2,9 \mu\text{kat L}^{-1} \text{h}^{-1}$ einen um 21 % höheren Wert als bisher beschrieben erzielt.

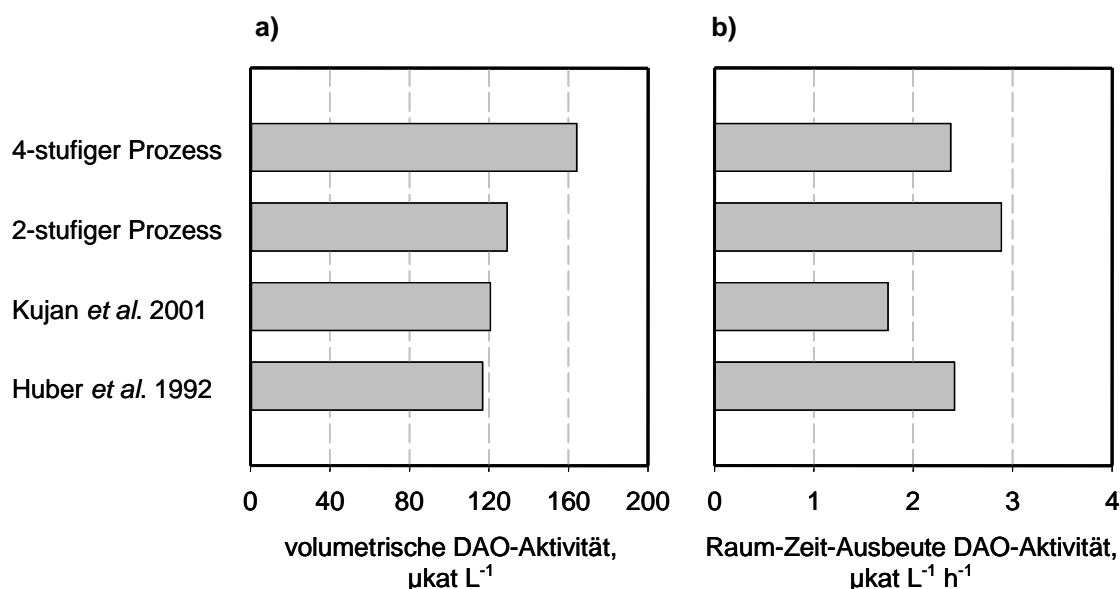


Abbildung 5.6 Vergleich des 2-stufigen und des 4-stufigen Zulaufprozesses zur Herstellung von *Trigonopsis variabilis* mit D-Aminosäureoxidase (DAO)-Aktivität zu den bisher in der Literatur beschriebenen Zulaufverfahren. **a)** Volumetrische DAO-Aktivität. **b)** Raum-Zeit-Ausbeute der DAO-Aktivität.

Zu beachten ist allerdings, dass in den einzelnen Veröffentlichungen und in dieser Arbeit unterschiedliche DAO-Aktivitäts-Tests verwendet wurden, die einen Vergleich verzerren können. Fischer *et al.* (1996) untersuchten zwar verschiedene Tests, darunter den in dieser Arbeit verwendeten, allerdings nicht die eher unüblichen Tests von Kujan *et al.* (2001) und Huber *et al.* (1992).

Inzwischen ist es Hwang *et al.* (2000) gelungen, die DAO aus *Trigonopsis variabilis* mit sehr hoher Ausbeute ($390 \mu\text{kat L}^{-1}$) rekombinant in *Escherichia coli* herzustellen. Ob dieser Mikroorganismus eine ausreichend hohe Katalase-Aktivität besitzt, um als Biokatalysator für die Racematspaltung von Aminosäuren eingesetzt werden zu können, ist nicht bekannt.

5.2 Herstellung von *Lactobacillus kefir* mit ADH-Aktivität

Als Grundlage für die Herstellung von *Lactobacillus kefir* mit Alkoholdehydrogenase (ADH₁)-Aktivität diente der von Hummel (1990) und Haberland *et al.* (2002) beschriebene Prozess im Satzverfahren. Darauf aufbauend sollte ein Zulaufverfahren entwickelt werden, mit dem höhere Zellausbeuten bei möglichst hoher ADH₁-Aktivität erreicht werden können.

5.2.1 Parameterstudien zur Kultivierung von *Lactobacillus kefir*

Hummel (1990) und Haberland *et al.* (2002) erreichten nach 48 Stunden 2,0 g_{BTM} L⁻¹ *Lactobacillus kefir* mit einer ADH₁-Aktivität zwischen 5 µkat g_{BTM}⁻¹ und 15 µkat g_{BTM}⁻¹. Dabei verwendeten sie für die Anzucht das sogenannte „MRS-Medium“, welches die teuren Komplexbestandteile Hefeextrakt, Casein-Pepton und Fleischextrakt in Reinheit für die Mikrobiologie enthält. Um Kosten und Aufwand der Mediumherstellung zu verringern, wurden diese durch Hefeextrakt technischen Reinheitsgrades ersetzt (Tabelle 14.19). Mit diesem „modifizierten MRS-Medium“ wurde eine 5 L-Satzkultivierung im 7,5 L-Rührkesselreaktor mit 0,1 min⁻¹ Luftbegasung und 150 min⁻¹ Rührerdrehzahl durchgeführt. Abbildung 5.7 zeigt, dass in diesem Prozess nach 24 Stunden eine Biomassekonzentration von 2,1 g_{BTM} L⁻¹ und eine ADH₁-Aktivität von 10 µkat g_{BTM}⁻¹ erreicht wird.

Bevor mit der Entwicklung eines Zulaufverfahrens begonnen werden konnte, mussten einige Vorbedingungen untersucht werden. So ist ein Zulaufprozess nur möglich, wenn der pH geregelt werden kann, ohne dass die Enzymaktivität davon beeinträchtigt wird. Dies wurde in einer Kultivierung im 7,5 L-Rührkesselreaktor bestätigt (Ergebnisse nicht gezeigt, siehe Amidjojo 2004). Des Weiteren muss die limitierende Mediumkomponente bekannt sein. Dazu wurden Kultivierungen im Schüttelkolben mit unterschiedlicher Anfangskonzentration an Glukose und im 7,5 L- Rührkesselreaktor mit Glukosezudosierung durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass Glukose die erste limitierende Mediumkomponente ist. Der Ausbeutekoeffizient für Glukose $Y_{X,S}$ wurde dabei abhängig von der Sauerstoffversorgung zu 0,05-0,06 g_{BTM} g_{Glukose}⁻¹ bestimmt. Ab einer Biomassekonzentration von circa 7,3 g_{BTM} L⁻¹ entpuppte sich Hefeextrakt als zweiter limitierender Bestandteil des Mediums. Somit muss das Zulaufmedium für ein Zulaufverfahren Glukose und Hefeextrakt in einem Verhältnis von 2,5 zu 1 w/w enthalten.

Während dieser Versuche wurde festgestellt, dass die Begasung einen positiven Einfluss auf das Wachstum, jedoch stark negative Auswirkungen auf die ADH₁-Aktivität hat. Eine Sauerstofftransferrate (OTR) über 10 mmol L⁻¹ h⁻¹ während der

Kultivierung resultiert in einer niedrigen ADH_1 -Aktivität von ungefähr $3,3 \mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$, wohingegen für $OTR < 1,5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ eine ADH_1 -Aktivität von $23 \mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$ und mehr erreicht wird. Des Weiteren führt eine Glukosekonzentration von $> 2,5 \text{ g L}^{-1}$ zu einer erhöhten ADH_1 -Aktivität. Mit diesen Informationen konnte nun ein Zulaufverfahren zur Herstellung von *Lactobacillus kefir* mit hoher ADH_1 -Aktivität entwickelt werden.

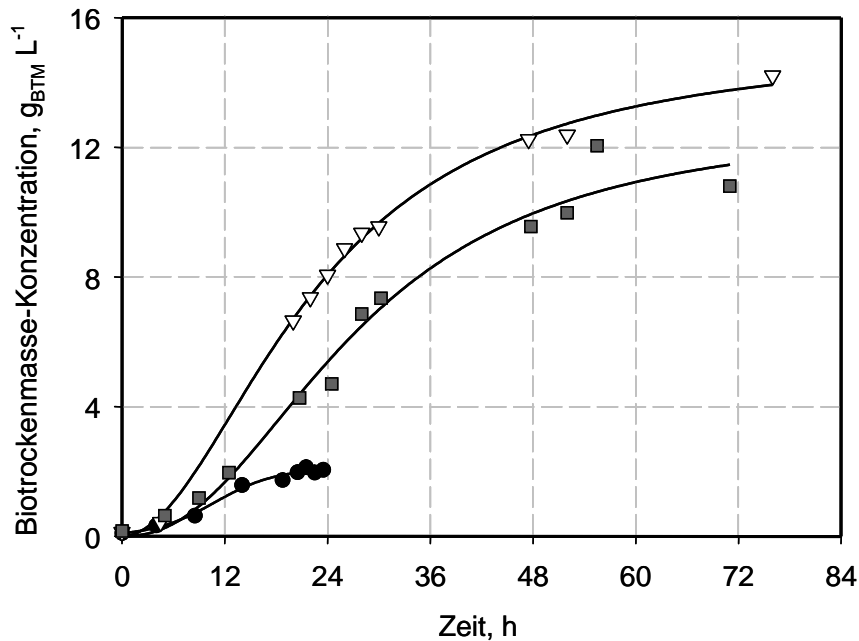


Abbildung 5.7 Verlauf der Biotrockenmasse-Konzentration während der Kultivierungen von *Lactobacillus kefir* im 5 L-Satzverfahren ●, im 5 L-Zulaufverfahren ▽ und im 150 L-Zulaufverfahren ■. Die Linien dienen nur als visuelle Hilfe.

5.2.2 Entwicklung eines Zulaufverfahrens im 5 L-Maßstab

Auf Grundlage der Vorbedingungen wurde ein 3-stufiges Zulaufverfahren entwickelt. In der etwa 4 Stunden dauernden ersten Phase wurde der Sauerstoffpartialdruck bei konstanter Begasung mit $0,6 \text{ min}^{-1}$ und konstanter Rührerdrehzahl von 100 min^{-1} durch das Wachstum der Zellen auf 2 % Luftsättigung abgesenkt. In der zweiten Phase wurde der Sauerstoffpartialdruck über die Rührerdrehzahl, die bei etwa $400\text{-}500 \text{ min}^{-1}$ ab Start der Zudosierung lag, zwischen 0 % und 2 % geregelt. Dies entspricht einer gemessenen Sauerstofftransferrate von $5\text{-}7 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Nach 12 Stunden war die Glukosekonzentration im Medium unter 5 g L^{-1} gefallen. Daraufhin wurde mit der konstanten Zudosierung von Zulaufmedium nach Gleichung 4.8 begonnen, so dass die Glukosekonzentration im Verlauf des restlichen Prozesses bei $3\text{-}5 \text{ g L}^{-1}$ gehalten wurde. Der konstante Zulauf anstelle einer ansteigenden Zudosierung ist ausreichend, da das

Wachstum durch den konstanten Sauerstoffeintrag begrenzt ist, welcher aufgrund des Einflusses auf die ADH₁-Aktivität nicht höher gewählt werden kann.

Die Vergrößerung des Reaktionsvolumens durch die Zugabe von Zulauflösung und Titrationsmittel führt zu einem Abweichen der Wachstumskurve vom linearen Verlauf. Bei größer werdender Zelldichte nimmt zusätzlich der Anteil des Erhaltungsstoffwechsels am Nährstoffverbrauch zu, so dass die Wachstumskurve weiter abflacht. Nach 76 Stunden wird das maximale Reaktionsvolumen von 5 L erreicht. In Abbildung 5.7 und Abbildung 5.8 ist zu erkennen, dass zu diesem Zeitpunkt 14,2 g_{BTM} L⁻¹ Zellen mit einer ADH₁-Aktivität von 14,2 µkat g_{BTM}⁻¹ erhalten werden.

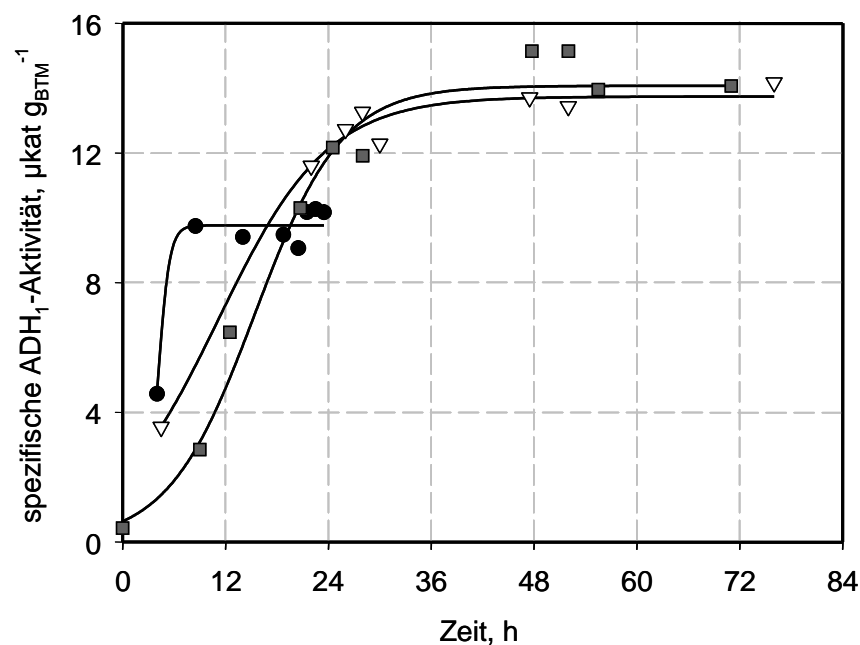


Abbildung 5.8 Verlauf der spezifischen Alkoholdehydrogenase (ADH₁)-Aktivität während der Kultivierungen von *Lactobacillus kefir* im 5 L-Satzverfahren ●, im 5 L-Zulaufverfahren ▽ und im 150 L-Zulaufverfahren ■. Die Linien dienen nur als visuelle Hilfe.

5.2.3 Vergrößerung des Zulaufverfahrens in den 150 L-Maßstab

Zur Herstellung einer größeren Menge *Lactobacillus kefir* für die Verwendung als Ganzzell-Biokatalysator wurde das 5 L-Zulaufverfahren in den 150 L-Maßstab übertragen. Der Prozess wurde im 200 L-Techfors-Reaktor mit einer Begasung von 0,2 min⁻¹ und einer Rührerdrehzahl von 100 min⁻¹ gestartet. In der zweiten und dritten Phase wurde die Sauerstofftransferrate über die Rührerdrehzahl, die bei 100-200 min⁻¹ lag, auf 7-9 mmol L⁻¹ h⁻¹ geregelt. Der Zulauf erfolgte wieder mit konstanter Zudosierung nach Gleichung 4.9.

Für diesen Prozess ist ein gegenüber dem 5 L-Zulaufverfahren leicht reduziertes Wachstums zu beobachten. Bei Abbruch des Prozesses nach 71 Stunden beträgt die Biomassekonzentration $10,8 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$, wie in Abbildung 5.7 zu sehen. Die Entwicklung der spezifischen ADH₁-Aktivität ist dagegen vergleichbar mit der 5 L-Kultivierung. Abbildung 5.8 zeigt, dass am Ende Zellen mit einer ADH₁-Aktivität von $14,1 \text{ } \mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$ erhalten werden. Die ADH₂-Aktivität beträgt $2,5 \text{ } \mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$.

Die Zellmasse wurde über eine Mikrofiltrationseinheit auf circa $200 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ aufkonzentriert und geerntet. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und bei -20°C gelagert. Insgesamt konnte n mit dieser Kultivierung $1,6 \text{ kg}_{\text{BTM}}$ *Lactobacillus kefir*-Biokatalysator gewonnen werden.

5.2.4 Diskussion

Im Satzverfahren mit dem „modifizierten MRS-Medium“ wurde die gleiche Zellausbeute und spezifische ADH₁-Aktivität erhalten wie im Referenzprozess von Hummel (1990) und Haberland *et al.* (2002). Durch die verkürzte Prozessdauer konnte die Raum-Zeit-Ausbeute verdoppelt werden. Damit steht nun ein einfacheres und kostengünstigeres Komplexmedium für das Satzverfahren zur Herstellung von *Lactobacillus kefir* zur Verfügung.

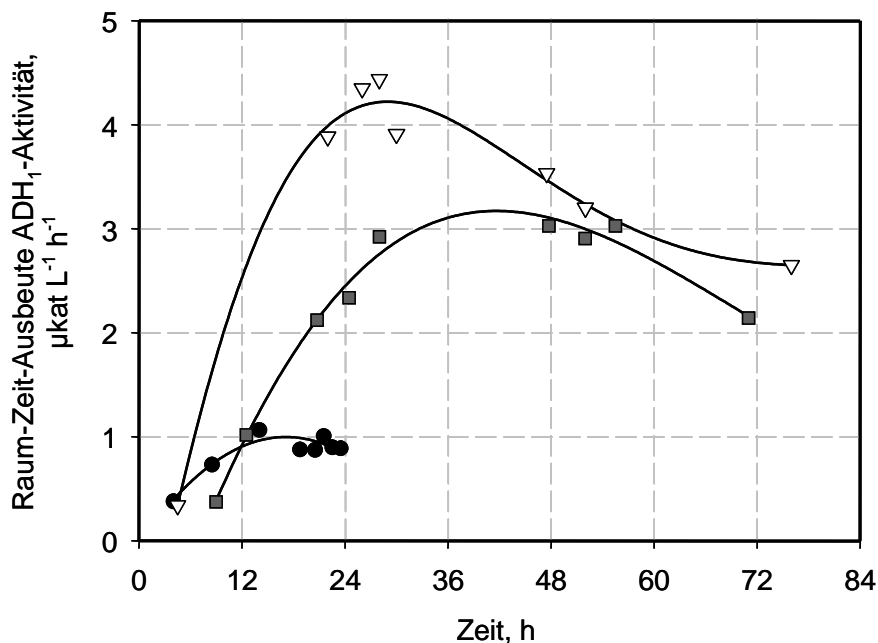


Abbildung 5.9 Verlauf der Raum-Zeit-Ausbeute der Alkoholdehydrogenase (ADH₁)-Aktivität während der Kultivierungen von *Lactobacillus kefir* im 5 L-Satzverfahren ●, im 5 L-Zulaufverfahren ▽ und im 150 L-Zulaufverfahren ■. Die Linien dienen nur als visuelle Hilfe.

Darauf aufbauend wurde ein 3-stufiges Zulaufverfahren im 5 L-Maßstab entwickelt. In Abbildung 5.9 ist die Raum-Zeit-Ausbeute der Enzymaktivität dargestellt. Sie liegt mit $2,7 \mu\text{kat L}^{-1} \text{h}^{-1}$ um 350 % über der des von Haberland beschriebenen Prozesses. Bei kürzerer Prozessdauer könnte sogar noch ein höherer Wert erreicht werden, wobei dann allerdings die volumetrische ADH₁-Aktivität reduziert wäre, wie in Abbildung 5.10 zu erkennen ist. Diese beträgt im durchgeführten Prozess $200 \mu\text{kat L}^{-1}$, was auf die um 610 % gegenüber dem Prozess von Haberland gesteigerte Zellausbeute zurückzuführen ist. Die ADH₁-Aktivität ist mit $14,2 \mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$ sehr hoch.

Dieser Prozess wurde erfolgreich in den 150 L-Maßstab übertragen. Hier liegt die erreichte Biomassekonzentration mit $10,8 \text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$ etwas niedriger als im 5 L-Maßstab, was eventuell durch Sauerstoffgradienten im großen Kessel aufgrund der niedrigen Drehzahl bedingt ist. Da die spezifische ADH₁-Aktivität aber gleich hoch ist, konnte in dieser Kultivierung mit $2,1 \mu\text{kat L}^{-1} \text{h}^{-1}$ trotzdem eine Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute um 250 % gegenüber dem Prozess von Haberland erreicht werden. Bei der ökonomischen Betrachtung kommt hinzu, dass die Kosten für die Komplexbestandteile des Mediums auf 11,4 % reduziert werden konnten.

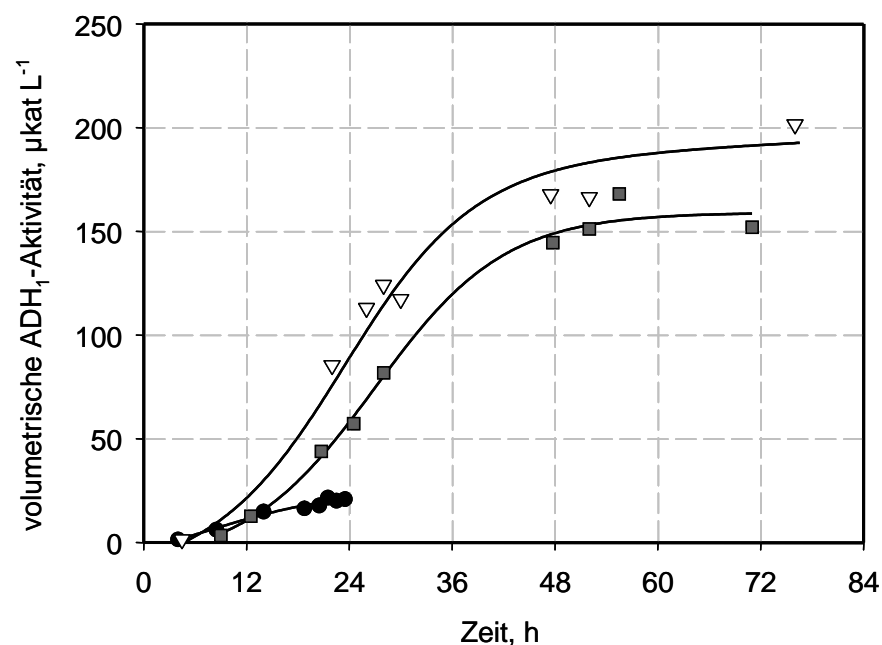


Abbildung 5.10 Verlauf der volumetrischen Alkoholdehydrogenase (ADH₁)-Aktivität während der Kultivierungen von *Lactobacillus kefir* im 5 L-Satzverfahren ●, im 5 L-Zulaufverfahren ▽ und im 150 L-Zulaufverfahren ■. Die Linien dienen nur als visuelle Hilfe.

Abbildung 5.9 zeigt, dass hinsichtlich einer optimalen Raum-Zeit-Ausbeute der Prozess im 150 L-Maßstab nach etwa 54 Stunden gestoppt werden müsste. Dabei würden circa $3 \mu\text{kat L}^{-1} \text{h}^{-1}$ erreicht, ohne Verlust der volumetrischen ADH₁-Aktivität. Das würde eine Steigerung von 400 % gegenüber Haberland *et al.* (2002) bedeuten.

Je nach Verwendung von *Lactobacillus kefir* ist es möglich, die Prozessführung zu variieren, um eine höhere Katalysatorkapazität zu erhalten. Ist bei der Ganzzell-Biokatalyse die spezifische ADH₁-Aktivität limitierend, könnten Zellen mit bis zu $23 \mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$ hergestellt werden, indem die Sauerstofftransferrate auf $< 1,5 \text{ mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ begrenzt wird. Andererseits wäre es durch Steigerung der Sauerstofftransferrate auf $> 10 \text{ mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ möglich, mehr Biomasse zu gewinnen. Die spezifische ADH₁-Aktivität läge dann zwar nur bei $3,3 \mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$, was aber ausreichen kann, wenn bei der Katalyse zum Beispiel der Stoffübergang des Edukts über die Zellmembran oder die Phasengrenzfläche hinweg limitierend ist.

6 Racematspaltung von Aminosäuren mit *Trigonopsis variabilis* in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten

Die in Abbildung 6.1 dargestellte Racematspaltung von Aminosäuren mit *Trigonopsis variabilis* diente als erstes Modellsystem für die Evaluierung des Potenzials ionischer Flüssigkeiten für die Ganzzell-Biokatalyse. Wichtige Punkte der Untersuchungen waren die Ermittlung der Lösungsmiteleigenschaften ionischer Flüssigkeiten gegenüber Aminosäuren und deren Oxidationsprodukten sowie die D-Aminosäureoxidase-Aktivität der Hefezellen in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten. Der Biokatalysator wurde hierfür aus Schüttelkolben-Kultivierungen gewonnen und bis zur Verwendung für 2-8 Wochen bei -20°C gelagert.

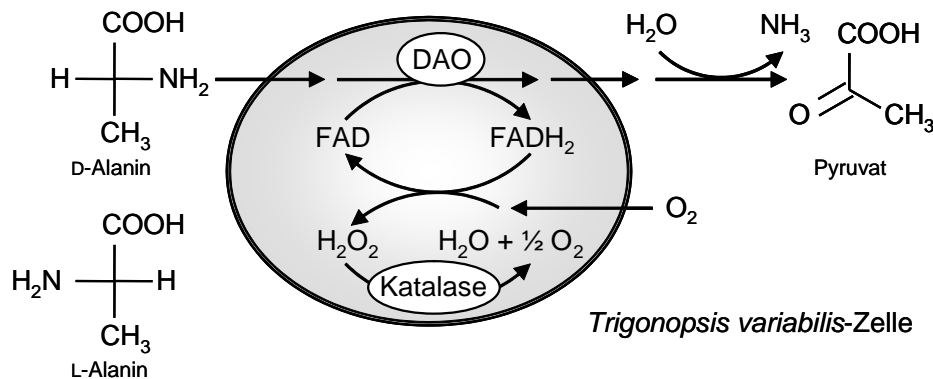


Abbildung 6.1 Reaktionsschema der Racematspaltung von D,L-Alanin mit *Trigonopsis variabilis* über die selektive Oxidation von D-Alanin mit D-Aminosäureoxidase (DAO) und die anschließende Spaltung von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) durch Katalase.

6.1 Zweiphasiger Reaktionsansatz

Zunächst wurde untersucht, ob die nicht mit Wasser mischbaren ionischen Flüssigkeiten [BMIM][PF₆], [BMIM][Tf₂N] und [OMA][Tf₂N] geeignet sind, als zweite flüssige Phase in der Ganzzell-Biokatalyse eingesetzt zu werden und dabei als Eduktreservoir und *in situ*-Produktextraktionsmittel zu fungieren. Alle Schlussfolgerungen sind also nur auf diese ionischen Flüssigkeiten bezogen.

6.1.1 Lösung von Aminosäuren und Ketocarbonsäuren in ionischen Flüssigkeiten

Die Aminosäure Tyrosin ist sehr schlecht wasserlöslich. Die Löslichkeitsgrenze bei 20°C beträgt weniger als 2 mM. Zur Erhöhung der Eduktverfügbarkeit bei Racematspaltungen von Tyrosin muss die als Lösungsmittel eingesetzte ionische Flüssigkeit daher in der Lage sein, höhere Tyrosin-Konzentrationen zu lösen. Des Weiteren muss sie die Aminosäure über einen Verteilungskoeffizienten $\log D \gg 0$ in größerer Menge im Reaktionsgemisch bereit stellen, ohne dass diese durch Überschreiten der Löslichkeitsgrenze in der wässrigen Pufferlösung ausfällt.

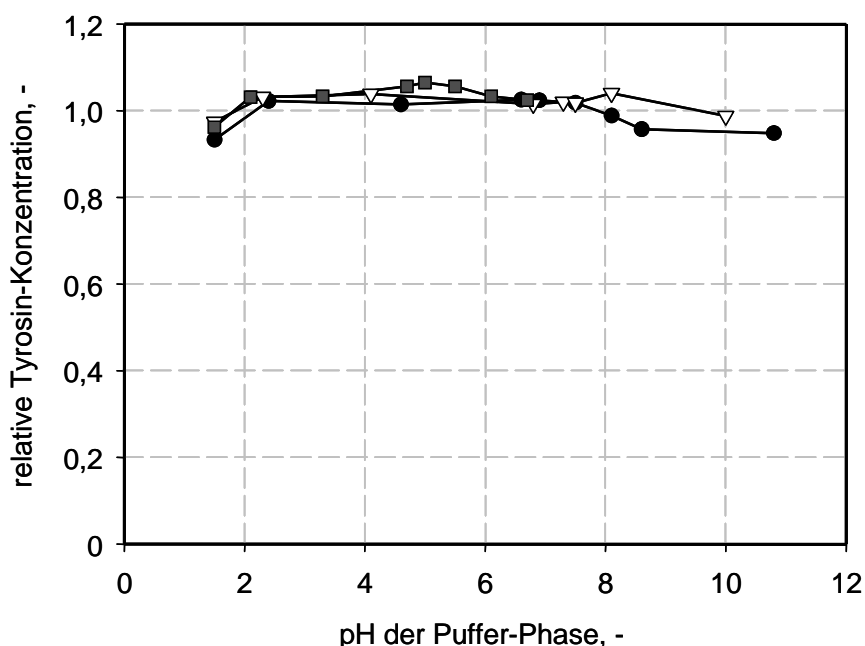


Abbildung 6.2 Relative Konzentration von Tyrosin in Puffer nach Einstellung des Verteilungsgleichgewichts zwischen Puffer und 20 % v/v [BMIM][PF₆] ●, [BMIM][Tf₂N] ▽ bzw. [OMA][Tf₂N] ■ im Vergleich zum vorgelegten Puffer. Die Konzentration von Tyrosin im vorgelegten Puffer betrug circa 0,5 mM.

Da die Bestimmung von Aminosäurekonzentrationen mittels HPLC nur in wässrigen Lösungen möglich ist, wurde in einem Extraktionsversuch die Aufnahme von Tyrosin aus wässriger Phase in ionische Flüssigkeiten ermittelt. In Abbildung 6.2 ist das Verhältnis der wässrigen Tyrosin-Konzentrationen nach der Extraktion mit 20 % v/v ionischer Flüssigkeit zur vorgelegten Lösung bei unterschiedlichem pH dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die ionischen Flüssigkeiten (fast) kein Tyrosin aufnehmen. Vielmehr wird die gemessene Tyrosin-Konzentration eher größer, was auf die Aufkonzentrierung der wässrigen Phase durch Verdunstung und Aufnahme von Wasser in die ionische Flüssigkeit zurück zu führen ist. Somit ist auch kein Verteilungskoeffizient darstellbar.

Die gleichen Untersuchungen wurden für die Oxidationsprodukte *p*-Hydroxyphenylpyruvat (HPP) und *p*-Hydroxyphenylacetat (HPA) durchgeführt, um die Eignung der ionischen Flüssigkeiten als *in situ*-Extraktionsmittel zur Nebenproduktabtrennung einzusetzen. Abbildung 6.3 zeigt, dass HPP ebenfalls, wenn überhaupt, nur in geringem Maße in die ionische Flüssigkeit übergeht. In wässriger Phase ist HPP bei pH > 8,3 instabil. Anscheinend tritt der Abbau in Gegenwart von ionischen Flüssigkeiten schon bei geringerem pH auf. Für HPA ergibt sich ein ganz ähnliches Bild (Ergebnisse nicht gezeigt).

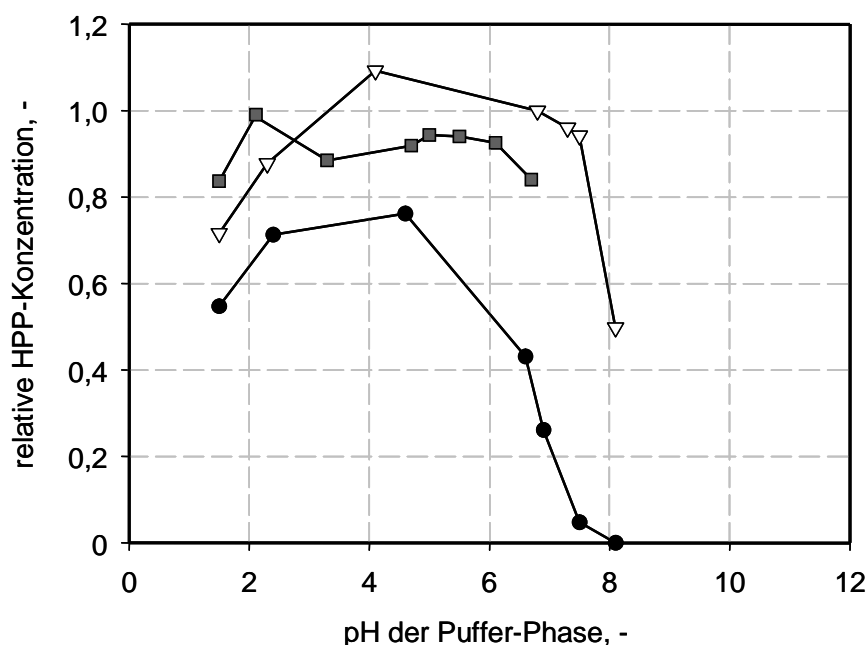


Abbildung 6.3 Relative Konzentration von *p*-Hydroxyphenylpyruvat (HPP) in Puffer nach Einstellung des Verteilungsgleichgewichts zwischen Puffer und 20 %v/v [BMIM][PF₆] ●, [BMIM][Tf₂N] ▽ bzw. [OMA][Tf₂N] ■ im Vergleich zum vorgelegten Puffer. Die Konzentration von HPP im vorgelegten Puffer betrug circa 0,4 mM.

Smirnova *et al.* (2004) konnten zeigen, dass die ionische Flüssigkeit [BMIM][PF₆] unter Verwendung des Kronenethers Dicyclohexano-18-Crown-6 als Löslichkeitsvermittler zu einem guten Extraktionsmittel für Aminosäuren aus saurer wässriger Phase (pH < 4) wird. Die Verteilungskoeffizienten liegen zwischen $\log D = 1,5$ und 1,9. Damit dieses System jedoch für die Ganzzell-Biokatalyse einsetzbar ist, muss der Biokatalysator im sauren Milieu aktiv sein. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob *Trigonopsis variabilis* bei pH 4 DAO-Aktivität aufweist. Dafür wurden rein wässrige Ansätze mit 1 mM D,L-Tyrosin und 1 g_{BTM} L⁻¹ ruhenden oder permeabilisierten Zellen bei pH 4 oder pH 8 hergestellt. Die Reaktion wurde für 95 min durchgeführt und regelmäßig Proben mittels HPLC untersucht. Es zeigte sich, dass die Zellen, die bei pH 8 in permeabilisierter Form eine Aktivität von 2,7 $\mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$ aufweisen, diese bei pH 4 sowohl in permeabilisierter als auch ruhender Form fast vollständig verlieren ($< 0,01 \mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$).

Die Ergebnisse zur Löslichkeit von Aminosäuren und deren Oxidationsprodukten in nicht mit Wasser mischbaren ionischen Flüssigkeiten sowie der Aktivitätsverlust des Biokatalysators bei pH 4 lassen somit deren sinnvollen Einsatz als Eduktreservoir und *in situ*-Extraktionsmittel für das Modellsystem der Racematspaltung mit *Trigonopsis variabilis* nicht zu.

6.1.2 DAO-Aktivität in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten

Zur Untersuchung der DAO-Aktivität in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten wurden Racematspaltungen mit permeabilisierten *Trigonopsis variabilis* bei pH 8 durchgeführt.

Die Löslichkeit von Alanin ist in Wasser sehr viel höher als diejenige von Tyrosin. Um höhere Konzentrationen einsetzen und die Reaktion bei hoher Biomassekonzentration länger verfolgen zu können, wurde diese Aminosäure daher als Edukt verwendet. Die Konzentration betrug auf die wässrige Phase bezogen 50 mM. *Trigonopsis variabilis* wurde in einer Konzentration von 1 g_{BTM} L⁻¹ bezogen auf das Gesamtvolumen eingesetzt. Die ionischen Flüssigkeiten wurden in unterschiedlichen Anteilen den Reaktionsansätzen zugegeben. In Abbildung 6.4 ist die spezifische DAO-Aktivität der Zellen dargestellt, die aus der Abnahme von D-Alanin errechnet wurden. Die Annahme, dass sich der Biokatalysator ausschließlich in der wässrigen Phase befindet, konnte durch mikroskopische Untersuchungen der Reaktionsmischung bestätigt werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die spezifische DAO-Aktivität durch [BMIM][PF₆] und [BMIM][Tf₂N] unabhängig vom Volumenanteil auf circa 30 % beziehungsweise 50 % der Aktivität im rein wässrigen System reduziert wird. Bei [OMA][Tf₂N] ist die

Aktivität ebenfalls reduziert. Sie scheint allerdings vom Volumenanteil der ionischen Flüssigkeit abhängig zu sein. Die Zugabe von [BMIM][O_cSO₄] zum Reaktionsansatz unterbindet die Racematspaltung schon nach wenigen Minuten komplett (Ergebnisse nicht gezeigt). Der Grund dafür ist wahrscheinlich die schlechtere Reinheit dieser ionischen Flüssigkeit, die sich auch in einem großen pH-Effekt bei Zugabe zur wässrigen Phase äußert.

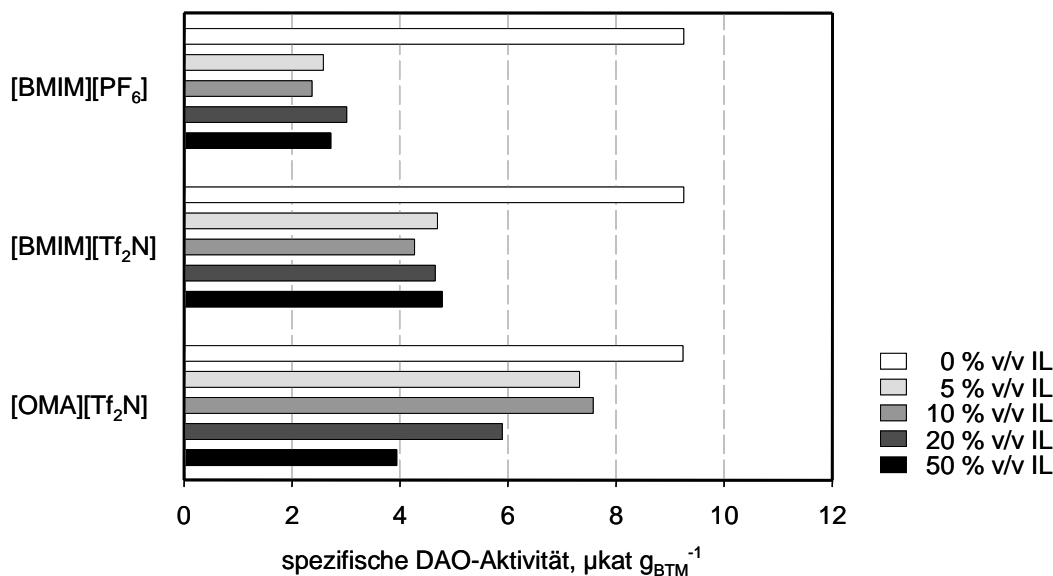


Abbildung 6.4 Spezifische D-Aminosäureoxidase (DAO)-Aktivität von permeabilisierten *Trigonopsis variabilis* bei der Racematspaltung von D,L-Alanin in Tris-HCl-Puffer (pH 8) in Gegenwart verschiedener Volumenanteile ionischer Flüssigkeiten (IL).

Untersuchungen mit ruhenden Zellen in rein wässrigem Medium ergaben, dass die Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich zu permeabilisierten Zellen um mindestens 90 % reduziert ist. Deshalb wurden ruhende Zellen nicht weiter verwendet.

6.1.3 Diskussion

Die Untersuchungen zeigen, dass Tyrosin nicht in ionischen Flüssigkeiten löslich ist, unabhängig von dessen Ladungszustand, der bei $\text{pH} < \text{pK}_{\text{a,COOH}} = 2,2$ überwiegend positiv und bei $\text{pH} > \text{pK}_{\text{a,NH}_2} = 9,1$ überwiegend negativ ist. Dies wird inzwischen auch in der Literatur bestätigt (Carda-Broch *et al.* 2003). Zwar ist es möglich, durch Einsatz von Kronenethern die Löslichkeitsvermittlung von Aminosäuren in nicht mit Wasser mischbaren ionischen Flüssigkeiten zu erreichen, so dass diese zur Extraktion von Aminosäuren aus wässriger Phase

eingesetzt werden können. Dieses Verfahren hat aber entscheidende Nachteile. So werden die teuren Kronenether (10 € g^{-1}) in äquimolarem Verhältnis zur Aminosäure benötigt. Darüber hinaus ist die Wiederverwendbarkeit der ionischen Flüssigkeit fraglich, da der Extraktion ein Ionenaustausch zugrunde liegt. Das heißt, dass die Kationen der ionischen Flüssigkeit an das Wasser abgegeben werden, damit die Aminosäure in ihrer positiv geladenen Form in der ionischen Flüssigkeit aufgenommen werden kann. Des Weiteren ist die von den Autoren zur Produktgewinnung vorgeschlagene Rückextraktion in eine wässrige Phase bei $\text{pH} > 4$ mit schlecht wasserlöslichen Aminosäuren nicht möglich.

Versuche mit permeabilisierten *Trigonopsis variabilis* zur DAO-Aktivität bei $\text{pH} 4$ bestätigen die Ergebnisse von Müller (2000), dass dieses Enzym im sauren Milieu nicht aktiv ist. Da mit ruhenden Zellen ebenfalls keine Racematspaltung von D,L-Tyrosin beobachtet wird, sind keine Verfahren mit diesem System anwendbar, die eine positiv geladene Form der Aminosäure voraussetzen.

Racematspaltungen von D,L-Alanin mit permeabilisierten *Trigonopsis variabilis* zeigen, dass die untersuchten, nicht mit Wasser mischbaren ionischen Flüssigkeiten einen negativen Effekt auf die Umsetzungsgeschwindigkeit haben. Die DAO-Aktivität wird auf 0 % bis 80 % des Wertes, der im rein wässrigen System erreicht wird, reduziert. Die Ursache dafür konnte nicht ermittelt werden. Einerseits ist es möglich, dass die ionische Flüssigkeit den Sauerstoffübergang aus der Umgebungsluft in die Zellen herabsetzt. Andererseits kann auch ein direkter Einfluss der ionischen Flüssigkeit auf die DAO nicht ausgeschlossen werden, da davon ausgegangen werden kann, dass Ionenaggregate in die permeabilisierten Zellen eindringen. Eine Reduzierung der Cofaktorverfügbarkeit in den Zellen ist unwahrscheinlich, da die FAD-Moleküle sehr stabil mit den Enzymen verbunden sind (Szwajcer und Mosbach 1985).

Eine Limitierung durch die Katalase-Aktivität der Zellen kann für alle Umsetzungen durch die Ergebnisse der Versuche zur Ermittlung eines geeigneten Reaktorsystems für die Ganzzell-Biokatalyse ausgeschlossen werden (Abbildung 14.1). Dabei wurde für das in allen Umsetzungen verwendete Reaktorsystem der gerührten Glasgefäße eine Reaktionsgeschwindigkeit festgestellt, die der zuvor im DAO-Aktivitätstest ermittelten Aktivität entspricht.

Nicht mit Wasser mischbare ionische Flüssigkeiten können also nicht als Eduktreservoir und *in situ*-Extraktionsmittel eingesetzt werden. Zudem ist die DAO-Aktivität in deren Gegenwart reduziert. Damit ist das zweiphasige System ionische Flüssigkeit/Wasser mit dem Modellsystem der Racematspaltung von Aminosäuren mit *Trigonopsis variabilis* kein sinnvoller Ansatz.

6.2 Einphasiger Reaktionsansatz

Da nicht mit Wasser mischbare ionische Flüssigkeiten im Modellsystem der Racematspaltung von Aminosäuren nicht für den Zwei-Flüssigphasen-Ansatz geeignet sind, wurden mit Wasser mischbare ionische Flüssigkeiten auf ihre Eignung als Löslichkeitsvermittler von Aminosäuren im einphasigen wässrigen Ansatz untersucht.

6.2.1 Ionische Flüssigkeiten als Löslichkeitsvermittler von Aminosäuren

Zunächst wurde die Löslichkeit von Tyrosin in Tris-HCl-Puffer (pH 8) bei unterschiedlichen Anteilen der mit Wasser mischbaren ionischen Flüssigkeit [BMIM][BF₄] im Vergleich zum reinen Puffer ermittelt. In Abbildung 6.5 ist zu erkennen, dass im Bereich von 3-10 % v/v [BMIM][BF₄] eine Erhöhung der Tyrosin-Löslichkeit um circa 20 % eintritt. In verdünnten [BMIM][BF₄]-Lösungen ($\leq 0,1$ % v/v) ist dagegen kein Effekt feststellbar. Bei einem sehr hohen Anteil der ionischen Flüssigkeit von 50 % v/v ist eine Löslichkeitserhöhung von circa 5 % zu beobachten.

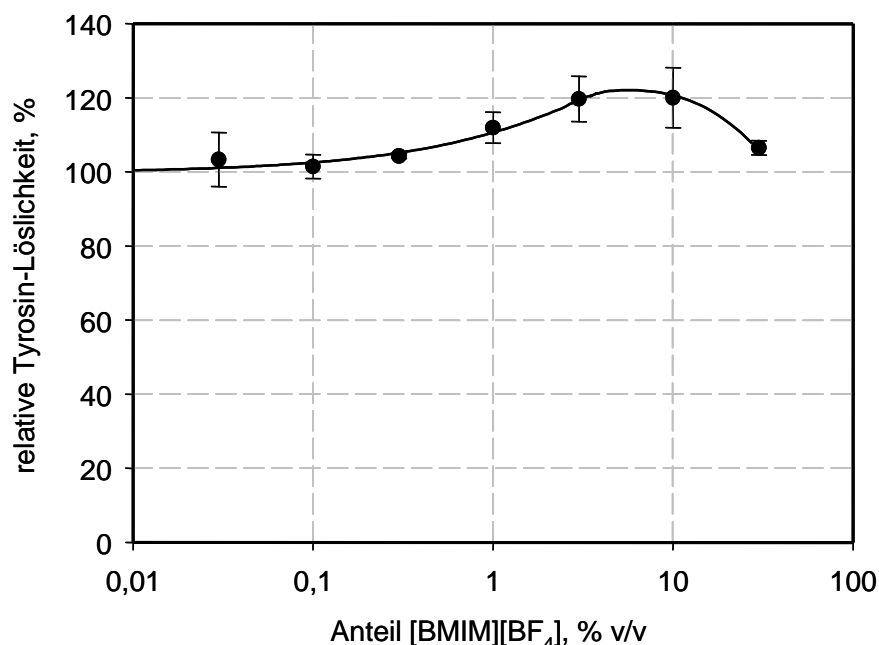


Abbildung 6.5 Relative Löslichkeit von Tyrosin in Tris-HCl-Puffer (pH 8) mit verschiedenen Volumenanteilen [BMIM][BF₄] im Vergleich zum reinen Puffer. Die Linie dient nur als visuelle Hilfe.

6.2.2 DAO-Aktivität in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten

Zur Ermittlung der DAO-Aktivität in Gegenwart verschiedener Volumenanteile [BMIM][BF₄] wurde eine Racematspaltung von D,L-Alanin mit permeabilisierten *Trigonopsis variabilis* durchgeführt. Abbildung 6.6 zeigt, dass bei einer verdünnten [BMIM][BF₄]-Lösung ($\leq 0,1$ % v/v) die DAO-Aktivität nicht signifikant erhöht ist. Bei Ansätzen mit höherem Volumenanteil [BMIM][BF₄] ($> 0,3$ % v/v) nimmt die DAO-Aktivität kontinuierlich bis unter 10 % der Aktivität im rein wässrigen Medium ab.

Ein ähnlicher Versuch mit ruhenden *Trigonopsis variabilis* bei verschiedenen Volumenanteilen [BMIM][BF₄] und D,L-Tyrosin als Edukt bestätigte diese Ergebnisse (nicht gezeigt).

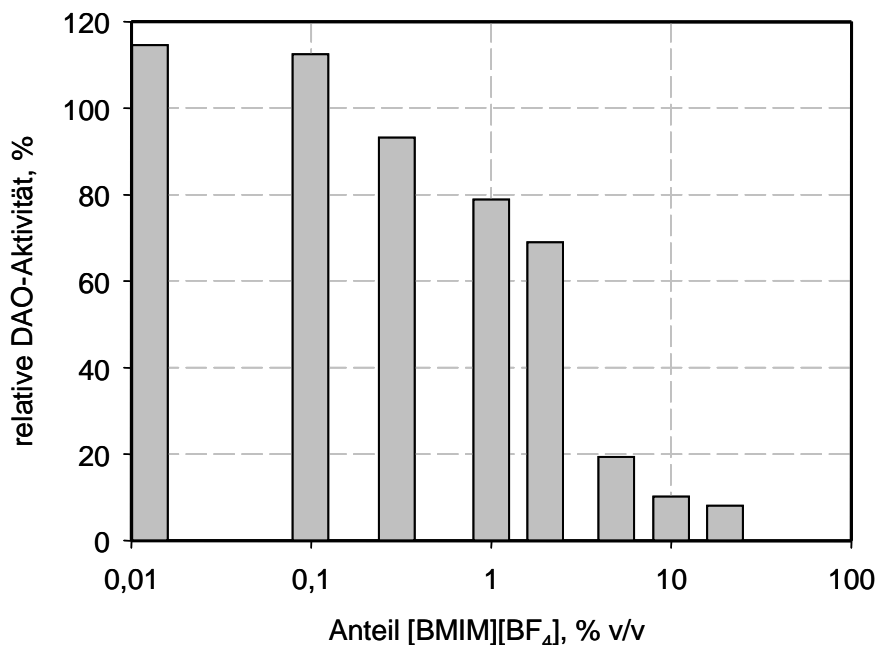


Abbildung 6.6 Relative D-Aminosäureoxidase (DAO)-Aktivität von permeabilisierten *Trigonopsis variabilis* bei der Racematspaltung von D,L-Alanin in Tris-HCl-Puffer (pH 8) in Gegenwart verschiedener Volumenanteile [BMIM][BF₄].

Somit konnte weder mit permeabilisierten noch mit ruhenden Zellen eine signifikante Steigerung der DAO-Aktivität von *Trigonopsis variabilis* erzielt werden.

6.2.3 Diskussion

Im einphasigen Reaktionssystem können ionische Flüssigkeiten theoretisch eine Prozessverbesserung durch Erhöhung der Eduktlöslichkeit oder durch Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit erreichen. Aus den durchgeführten Untersuchungen

kann geschlossen werden, dass die ionische Flüssigkeit [BMIM][BF₄] nicht geeignet ist, als Löslichkeitsvermittler von Aminosäuren in wässrigem Medium eingesetzt zu werden. Eine leichte Löslichkeitserhöhung der Aminosäure Tyrosin von maximal 20 % bei 3-10 % v/v [BMIM][BF₄] rechtfertigt deren Einsatz in keiner Weise. Da die Gegenwart von [BMIM][BF₄] darüber hinaus auch zu keiner signifikant gesteigerten Reaktionsgeschwindigkeit führt, ist der Einsatz dieser mit Wasser mischbaren ionischen Flüssigkeit für das Modellsystem der Racematspaltung von Aminosäuren mit *Trigonopsis variabilis* nicht sinnvoll.

Andere mit Wasser mischbare ionische Flüssigkeiten könnten jedoch durchaus die Funktion von Enzymen positiv beeinflussen und somit zum Beispiel zu einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit führen. Für einen effizienten Einsatz der ionischen Flüssigkeiten müsste diese dabei bereits in katalytischen Mengen wirksam sein.

7 Asymmetrische Synthesen mit *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 im zweiphasigen System ionische Flüssigkeit/Wasser

Die asymmetrische Reduktion prochiraler Ketone mit rekombinanten *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 diente als weiteres Modellsystem zur Evaluierung des Potenzials ionischer Flüssigkeiten für die Ganzzell-Biokatalyse. Dabei wurde aufgrund der Toxizität der Ketone und der korrespondierenden Alkohole nur der zweiphasige Ansatz verfolgt. Es wurden wieder beispielhaft die nicht mit Wasser mischbaren ionischen Flüssigkeiten [BMIM][PF₆], [BMIM][Tf₂N] und [OMA][Tf₂N] eingesetzt.

Wichtige Punkte der Untersuchungen waren auch hier die Ermittlung der Lösungsmitelegenschaften ionischer Flüssigkeiten gegenüber Edukten und Produkten sowie die Alkoholdehydrogenase-Aktivität der Hefezellen in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten. Im Gegensatz zur Aminosäureoxidation mit *Trigonopsis variabilis* kam der Untersuchung der Zellviabilität eine große Bedeutung zu, da nur intakte Zellen in der Lage sind, ein „Ausbluten“ des Cofaktors NADP(H) zu unterbinden. Der Biokatalysator wurde für alle Experimente jeweils frisch aus Schüttelkolben-Kultivierungen gewonnen. Die Synthesen wurden im mL-Maßstab durchgeführt.

7.1 Synthese von (S)-4-Chlor-3-hydroxybuttersäureethylester

Saccharomyces cerevisiae FasB His6 ist in der Lage, 4-Chloracetessigsäureethylester (4-Cl-ACE) stereoselektiv zu (S)-4-Chlor-3-hydroxybuttersäureethylester ((S)-4-Cl-HBE) zu reduzieren, wie in Abbildung 7.1 dargestellt (Engelking 2004a). Anhand dieser Reaktion sollte die Eignung von nicht mit Wasser mischbaren ionischen Flüssigkeiten als Lösungsmittelfase in der Ganzzell-Biokatalyse untersucht werden. Neben den physiko-chemischen Eigenschaften und der

Biokompatibilität der ionischen Flüssigkeiten sollte auch die Möglichkeit der Optimierung eines solchen Reaktionsansatzes untersucht werden.

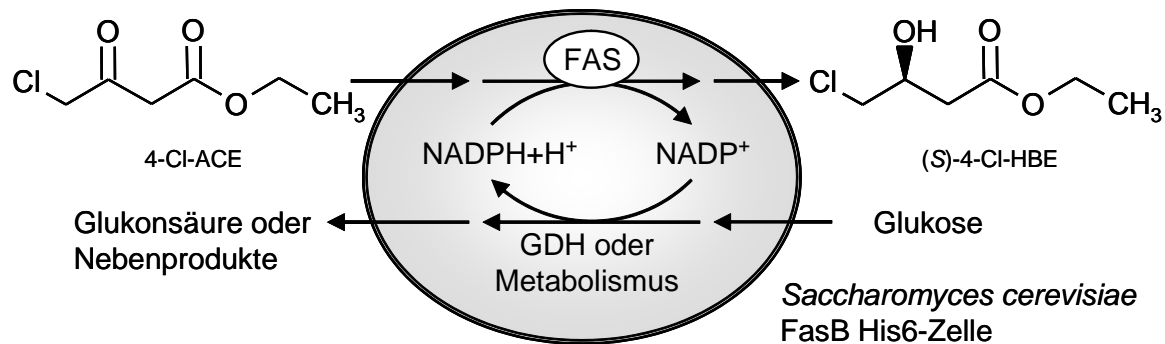


Abbildung 7.1 Reaktionsschema der asymmetrischen Reduktion von 4-Chloracetessigsäureethylester (4-Cl-ACE) zu (S)-4-Chlor-3-hydroxybuttersäureethylester ((S)-4-Cl-HBE) mit *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6.

7.1.1 Löslichkeit von 4-Cl-ACE und 4-Cl-HBE in Puffer und Verteilungskoeffizienten zwischen ionischen Flüssigkeiten und Puffer

Die Löslichkeit von 4-Cl-ACE und 4-Cl-HBE in Puffer wurde von Engelking (2004a) zu 286 mM und 759 mM angegeben, wie in Abbildung 7.2a dargestellt. In den verwendeten ionischen Flüssigkeiten sind die Stoffe mindestens bis 600 mM löslich.

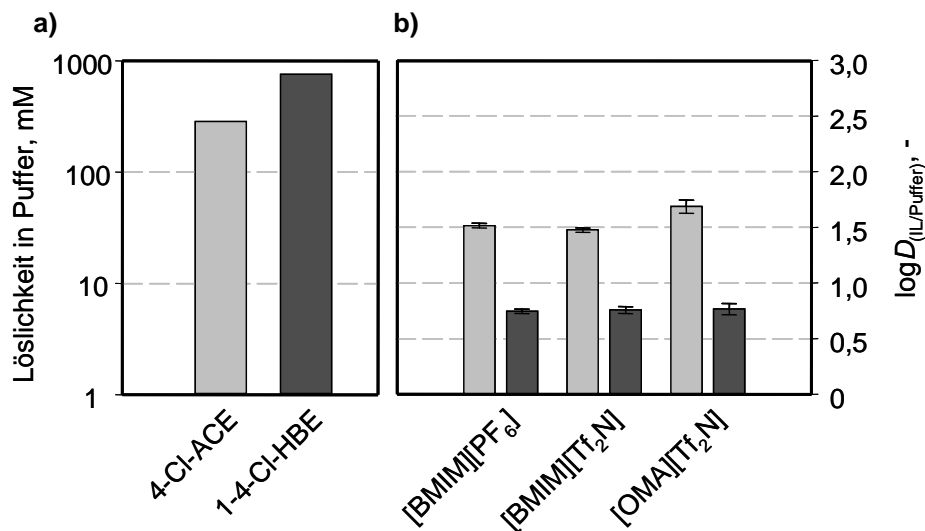


Abbildung 7.2 a) Löslichkeitsgrenzen von 4-Chloracetessigsäureethylester (4-Cl-ACE) und 4-Chlor-3-hydroxybuttersäureethylester (4-Cl-HBE) in wässriger Phase (Puffer). b) Verteilungskoeffizienten $\log D$ von 4-Cl-ACE \square und 4-Cl-HBE \blacksquare zwischen verschiedenen ionischen Flüssigkeiten (IL) und Puffer.

Die Verteilungskoeffizienten von 4-Cl-ACE und 4-Cl-HBE zwischen den ionischen Flüssigkeiten [BMIM][PF₆], [BMIM][Tf₂N] und [OMA][Tf₂N] und Puffer wurden bestimmt. Abbildung 7.2b zeigt, dass der $\log D$ für 4-Cl-ACE im Bereich von 1,5 bis 1,7 liegt, für 4-Cl-HBE etwa bei 0,75. Dies bedeutet, dass in einem zweiphasigen Ansatz mit 20 % v/v ionischer Flüssigkeit im Gleichgewichtszustand circa 40 % des Alkohols in der wässrigen Phase vorliegen. Somit ist die ionische Flüssigkeit nur eingeschränkt als *in situ*-Extraktionsmittel wirksam.

7.1.2 Biokompatibilität von ionischen Flüssigkeiten

Neben der Edukt- und Produktlöslichkeit sowie den Verteilungskoeffizienten zwischen den beiden Flüssigphasen ist die Wirkung auf den Katalysator das wichtigste Kriterium eines Lösungsmittels in der Ganzzell-Biokatalyse. Deshalb wurde der schädigende Einfluss von verschiedenen ionischen Flüssigkeiten mit dem typischer organischer Lösungsmittel verglichen. Dazu wurde *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 unter Reaktionsbedingungen mit 20 % v/v Lösungsmittelphase jedoch ohne Edukt und Cosubstrat für 20 Stunden inkubiert.

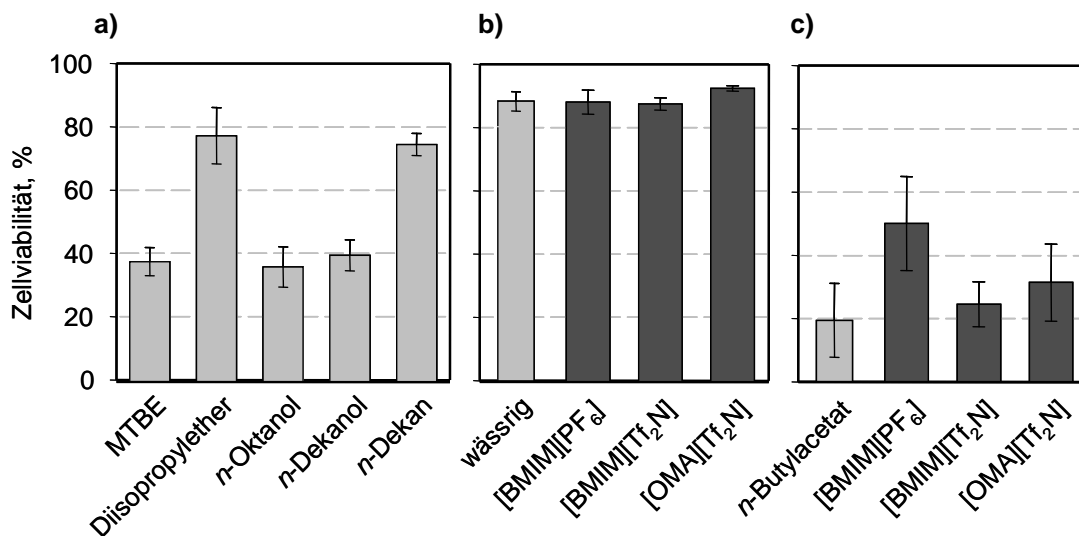


Abbildung 7.3 Prozentuale Viabilität von $20 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 bestimmt mittels der Methylenblau-Färbemethode nach 20 Stunden Inkubation bei 27°C und 300 min^{-1} mit: **a)** 20 % v/v organischen Lösungsmitteln (Methyl-*tert*-butylether, MTBE), **b)** 20 % v/v ionischen Flüssigkeiten im Vergleich zum einphasig-wässrigen Ansatz und **c)** 20 % v/v ionischen Flüssigkeiten mit 4-Chloracetessigsäureethylester (4-Cl-ACE) im Vergleich zum Ansatz mit 7 % v/v *n*-Butylacetat mit 4-Cl-ACE. Es wurden 150 mM 4-Cl-ACE, 200 mM Glukose und 100 μM NADP vorgelegt. Alle Konzentrationen sind auf das Volumen der wässrigen Phase bezogen.

In Abbildung 7.3a ist zu erkennen, dass MTBE ($\log P = 0,9$), *n*-Oktanol ($\log P = 3,0$) und *n*-Dekanol ($\log P = 4,6$) den Anteil intakter Zellen auf circa 40 % reduzieren. Mit Diisopropylether ($\log P = 1,5$) und *n*-Dekan ($\log P = 5,0$) beträgt dieser Anteil noch etwa 75 %. In Abbildung 7.3b zeigen die Ergebnisse für die rein wässrige Referenz und die Ansätze mit ionischen Flüssigkeiten, dass letztere keinen schädigenden Einfluss auf die Zellen haben.

Zur Untersuchung, ob ionische Flüssigkeiten in der Lage sind, die Toxizität von Edukt und Produkt in einer Umsetzung zu reduzieren, wurde die Zellviabilität nach einer Biotransformation von 4-Cl-ACE ermittelt. Abbildung 7.3c zeigt, dass der Ansatz mit dem organischen Lösungsmittel *n*-Butylacetat nach 20 h nur noch 20 % intakte Zellen aufweist, mit [BMIM][PF₆] dagegen etwa 50 %. Der schädigende Einfluss von Edukt und Substrat wird also durch die Verwendung dieser ionischen Flüssigkeit als Eduktreservoir und *in situ*-Extraktionsmittel deutlich verringert.

7.1.3 Cofaktor-Zugabe

Bleiben durch den Einsatz ionischer Flüssigkeiten als Lösungsmittelphase mehr Hefezellen während der Umsetzung intakt, kann eventuell auf die Zugabe des Cofaktors NADP verzichtet werden. Um dies zu überprüfen, wurden 4-Cl-ACE-Reduktionen mit [BMIM][PF₆], [BMIM][Tf₂N] und *n*-Butylacetat durchgeführt.

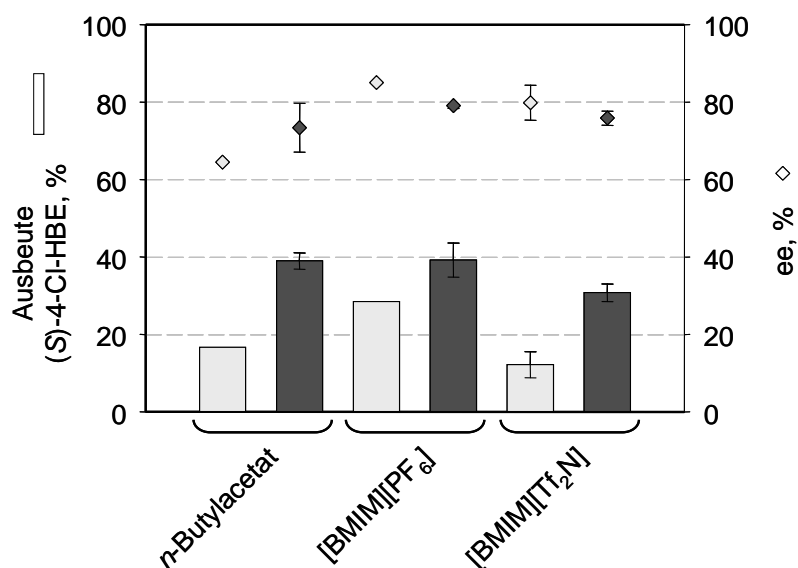


Abbildung 7.4 Chemische Ausbeute und Enantiomerenüberschuss (ee) von (S)-4-Chlor-3-hydroxybuttersäureethylester ((S)-4-Cl-HBE) nach 20 h bei Umsetzungen mit 20 g_{BTM} L⁻¹ *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6, 170 mM 4-Cl-ACE, 7 % v/v *n*-Butylacetat bzw. 20 % v/v ionische Flüssigkeit, 200 mM Glukose bei 27°C und 300 min⁻¹ ohne Zugabe von NADP □ und mit 100 µM NADP ■. Alle Konzentrationen sind auf das Volumen der wässrigen Phase bezogen.

In Abbildung 7.4 ist zu erkennen, dass die höchste Ausbeute an (S)-4-Cl-HBE bei Zugabe von NADP in den Ansätzen mit *n*-Butylacetat und [BMIM][PF₆] erreicht wird (circa 39 %). Ohne zusätzlichen Cofaktor liegt die Ausbeute zwar niedriger, aber mit [BMIM][PF₆] als Lösungsmittelphase wird deutlich mehr Produkt erhalten als mit *n*-Butylacetat (29 % gegenüber 17 %). Darüber hinaus ist der Enantiomerenüberschuss von (S)-4-Cl-HBE in diesem Ansatz mit 85 % viel größer als derjenige, der bei Verwendung von *n*-Butylacetat erzielt wird (65 %).

7.1.4 Art des Cosubstrats und Reaktionstemperatur

Da die Ausbeute der Versuche zur Cofaktor-Zugabe mit maximal 40 % und der Enantiomerenüberschuss mit maximal 85 % nicht zufrieden stellend sind, wurde untersucht, ob durch die Verwendung eines alternativen Cosubstrats oder die Variation der Reaktionstemperatur höhere Werte erreicht werden.

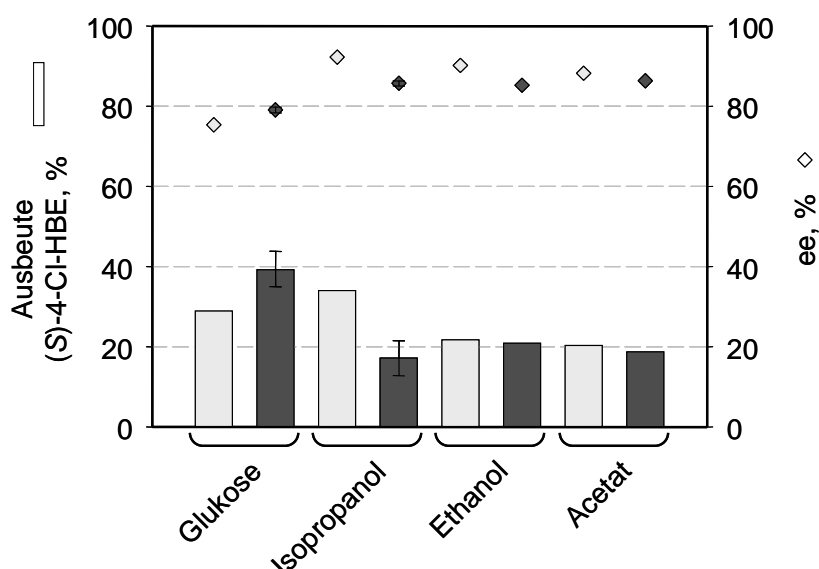


Abbildung 7.5 Chemische Ausbeute und Enantiomerenüberschuss (ee) von (S)-4-Chlor-3-hydroxybuttersäureethylester ((S)-4-Cl-HBE) nach 20 h bei Umsetzungen mit $20 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6, 170 mM 4-Cl-ACE, 100 μM NADP, 20 % v/v [BMIM][PF₆] und unterschiedlichen Cosubstraten (200 mM), bei 300 min^{-1} und 20°C ■ oder 27°C ■. Alle Konzentrationen sind auf das Volumen der wässrigen Phase bezogen.

Abbildung 7.5 zeigt, dass die Ausbeute bei keinem der untersuchten Ansätze über die 39 % mit Glukose als Cosubstrat und 27°C Reaktionstemperatur gesteigert werden kann. Der Enantiomerenüberschuss ist jedoch mit den alternativen Cosubstraten und insbesondere bei 20°C höher. Mit Isopropanol wird beispiels-

weise bei 20°C ein Enantiomerenüberschuss von 92 % erreicht. Dies ist für das Produkt allerdings immer noch nicht ausreichend, um ohne weitere Aufreinigung als pharmazeutisches Intermediat verwendet werden zu können.

7.1.5 Biotrockenmasse-Konzentration

Eine weitere Möglichkeit zur Steigerung der Ausbeute einer Ganzzell-Biokatalyse besteht darin, die Katalysatorkonzentration zu erhöhen. In Abbildung 7.6b sind die Ergebnisse von Ansätzen mit 50 g_{BTM} L⁻¹ Hefezellen im Vergleich zu den bisher eingesetzten 20 g_{BTM} L⁻¹ dargestellt, die in Abbildung 7.6a zu sehen sind.

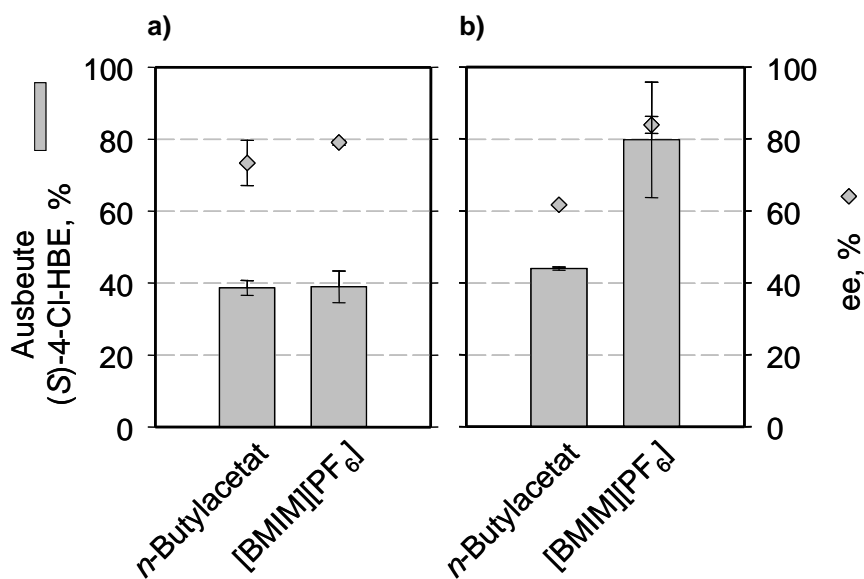


Abbildung 7.6 Chemische Ausbeute und Enantiomerenüberschuss (ee) von (S)-4-Chlor-3-hydroxybuttersäureethylester ((S)-4-Cl-HBE) nach 20 h bei Umsetzungen mit *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6, 170 mM 4-Cl-ACE, 100 µM NADP, 7 % v/v *n*-Butylacetat bzw. 20 % v/v [BMIM][PF₆], 200 mM Glukose, bei 27°C und 300 min⁻¹. **a)** Biomassekonzentration 20 g_{BTM} L⁻¹, **b)** Biomassekonzentration 50 g_{BTM} L⁻¹. Alle Konzentrationen sind auf das Volumen der wässrigen Phase bezogen.

Im zweiphasigen System mit *n*-Butylacetat bewirkt die Erhöhung der Katalysatorkonzentration nur eine geringe Steigerung der Ausbeute von 39 % auf 44 %, jedoch einen deutlich negativen Effekt auf den Enantiomerenüberschuss (62 % statt 73 %). Bei Verwendung von [BMIM][PF₆] als Lösungsmittelphase wird dagegen die Ausbeute mit höherer Katalysatorkonzentration von 39 % auf 80 % verdoppelt bei sogar leicht erhöhtem Enantiomerenüberschuss von 84 % anstelle von 79 %.

7.1.6 Diskussion

Die hohe Löslichkeit von 4-Cl-ACE in Puffer von 286 mM erzwingt nicht den Einsatz einer Lösungsmittelphase zur Steigerung der Eduktverfügbarkeit. Da dieser Stoff aber instabil in Wasser und toxisch für die als Biokatalysator eingesetzten *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 ist, wird eine zweite Phase zur Verringerung der wässrigen Konzentration benötigt (Engelking 2004a). Die untersuchten, nicht mit Wasser mischbaren ionischen Flüssigkeiten weisen für 4-Cl-ACE Verteilungskoeffizienten $\log D$ von 1,5-1,7 auf, womit die wässrigen Konzentrationen des Ketons um den Faktor 30-50 reduziert werden. Für das Produkt der asymmetrischen Reduktion, (S)-4-Cl-HBE kann diese jedoch nur um den Faktor 5-6 erniedrigt werden ($\log D \sim 0,75$), die Unterbindung einer eventuellen Produkttoxizität ist dadurch kaum möglich. Andererseits konnte gezeigt werden, dass die ionischen Flüssigkeiten im Gegensatz zu organischen Lösungsmitteln keinen schädigenden Einfluss auf die Viabilität der Hefezellen haben. Damit war ein Vergleich zwischen dem von Engelking (2004a) verfolgten Ansatz mit *n*-Butylacetat und einem Prozess mit ionischen Flüssigkeiten interessant.

Engelking gab seinem Ansatz 100 μM des teuren Cofaktors NADP zu, was dieses Verfahren für den größeren Maßstab unattraktiv macht. Daher wurde untersucht, ob darauf bei Verwendung von [BMIM][PF₆] verzichtet werden kann. Die Ergebnisse zeigen, dass die Ausbeute ohne eine NADP-Zugabe im Verfahren mit der ionischen Flüssigkeit mit 29 % deutlich besser ist als im Ansatz mit *n*-Butylacetat (17 %). Allerdings kann die Ausbeute, die bei Zugabe von NADP 39 % beträgt, nicht erreicht werden. Diese Ergebnisse lassen sich aus der Betrachtung der Zellviabilitäten nach der Reaktion erklären. Mit [BMIM][PF₆] sind noch 50 % der Zellen intakt, mit *n*-Butylacetat dagegen nur 20 %. Das heißt, dass die ionische Flüssigkeit über die Verringerung der wässrigen Konzentrationen von Edukt und Produkt deren Toxizität reduziert. Der erhöhte Anteil ungeschädigter Zellen reicht zwar nicht aus, um auf die Zugabe von NADP ganz verzichten zu können, eventuell ist aber eine geringere Menge bereits ausreichend, um eine gleich hohe Ausbeute zu erreichen. Zur Untersuchung weiterer Reaktionsparameter wurden zur besseren Vergleichbarkeit allen Ansätzen 100 μM NADP zugegeben.

Es ist bekannt, dass die Art des Cosubstrats und die Reaktionstemperatur einen Einfluss auf die Ausbeute und den Enantiomerenüberschuss haben können (Amidjojo 2004). Das ist mit ionischen Flüssigkeiten als Lösungsmittelphase nicht anders. So erwirken die alternativen Cosubstrate Isopropanol, Ethanol und Acetat im Vergleich zu Glukose zwar eine geringere Ausbeute, dafür jedoch einen höheren Enantiomerenüberschuss des Produkts. Letzterer wird durch die Absenkung der Reaktionstemperatur von 27°C auf 20°C noch bis auf 92 % gesteigert.

Im Gegensatz zum Ansatz mit *n*-Butylacetat kann bei Verwendung von [BMIM][PF₆] die Ausbeute durch den Einsatz einer höheren Biomassekonzentration von 50 g_{BTM} L⁻¹ und Glukose als Cosubstrat auf 80 % erhöht werden. Diese beiden Verfahren werden in Tabelle 7.1 mit dem 1 L-Rührkesselreaktor-Prozess von Engelking (2004a) verglichen. In dieser Arbeit wurden Zellen verwendet, die in Komplexmedium kultiviert wurden, da dieses leichter herzustellen ist und höhere Zellausbeuten liefert. Hinzu kommt, dass vergleichende Ansätze mit 20 g_{BTM} L⁻¹ dieser Zellen nahezu identische Werte für die Ausbeute und den Enantiomerenüberschuss ergaben wie mit Zellen, die im definierten Medium kultiviert wurden. Triton X-100 wurde nicht eingesetzt, da ein Ziel der Verwendung von ionischen Flüssigkeiten darin besteht, die Zellmembran intakt zu halten. Der Einsatz dieses Stoffes, der zur Permeabilisierung der Membran führt, stünde diesem Ziel entgegen. 1-Buten-3-ol wurde zur Verdeutlichung des Effekts der ionischen Flüssigkeit auf den Enantiomerenüberschuss nicht eingesetzt.

Tabelle 7.1 Asymmetrische Synthese von (S)-4-Chlor-3-hydroxybuttersäureethylester ((S)-Cl-HBE) mit *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6. Vergleich zwischen den Prozessen mit und ohne ionische Flüssigkeit [BMIM][PF₆] als Lösungsmittelphase und dem Verfahren von Engelking (2004a).

	Engelking (2004a)	diese Arbeit	diese Arbeit
Anzuchtmedium der Zellen	definiertes Medium	Komplexmedium (CSL)	Komplexmedium (CSL)
Zellkonzentration für Umsetzung	100 g _{BTM} L ⁻¹	50 g _{BTM} L ⁻¹	50 g _{BTM} L ⁻¹
Lösungsmittelphase	20 % v/v <i>n</i> -Butylacetat	7 % v/v <i>n</i> -Butylacetat	20 % v/v [BMIM][PF ₆]
Eduktkonzentration	200 mM	170 mM	170 mM
Zusätze	100 μM NADP 0,3 % v/v 1-Buten-3-ol 2,7 % v/v Triton X-100	100 μM NADP	100 μM NADP
Cosubstratkonzentration	320 mM Glukose	200 mM Glukose	200 mM Glukose
Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0)	50 mM, 190 mM NaCl, pH-Regelung mit NaOH	100 mM, 100 mM NaCl	100 mM, 100 mM NaCl
Ausbeute (S)-Cl-HBE	94 %	44 %	80 %
Enantiomerenüberschuss	90 %	62 %	84 %
Produktbildungskapazität	1,8 mmol g _{BTM} ⁻¹	1,5 mmol g _{BTM} ⁻¹	2,7 mmol g _{BTM} ⁻¹

In Tabelle 7.1 ist zu erkennen, dass das Verfahren mit [BMIM][PF₆] zu einer etwas geringeren Ausbeute und Produktreinheit führt als der Prozess von Engelking (2004a). Dafür ist die Herstellung der eingesetzten Zellen einfacher und deren Produktbildungskapazität im Prozess liegt um 50 % über denjenigen von Engelking. Eventuell könnte der Enantiomerenüberschuss durch Zugabe von 1-Buten-3-ol und die Ausbeute durch eine pH-Regelung noch weiter gesteigert werden.

Die Ermittlung der genauen Raum-Zeit-Ausbeute war nicht möglich, da der Reaktionsverlauf nicht aufgenommen werden konnte. Aus dem gleichen Grund konnte auch nicht bestimmt werden, ob die Reaktion eventuell kinetisch limitiert ist. Dies ist aufgrund des zu erwartenden schlechten Eduktübergangs aus der ionischen Flüssigkeit bei geringem Leistungsertrag denkbar, da auch der K_m der Fettsäuresynthase mit 1,82 mM relativ hoch ist (Sybesma *et al.* 1998).

Das Potenzial der nicht mit Wasser mischbaren ionischen Flüssigkeiten für den Einsatz als Lösungsmittelphase in der Ganzzell-Biokatalyse wurde mit diesem Modell sicher nicht ausgereizt, da einem effizienten Einsatz der geringe Verteilungskoeffizient für das Reaktionsprodukt im Wege steht. Dieser sollte also sinnvollerweise deutlich höher liegen, um einerseits die Toxizität des Produkts stärker zu reduzieren und andererseits eine bessere Extraktion und damit eine höhere Prozessausbeute zu gewährleisten.

Mittlerweile ist bekannt, dass *Lactobacillus kefir* ein sehr viel besserer Biokatalysator für die Reduktion von 4-Cl-ACE zu (S)-4-Cl-HBE ist. Amidjojo und Weuster-Botz (2005) erreichten damit im mikrodispersen Ansatz eine Ausbeute von 97 % und einen Enantiomerenüberschuss von 99,5 % bei einer Produktbildungskapazität von 24 mmol g_{BTM}⁻¹.

7.2 Synthese von (S)-3-Hydroxy-3-phenylpropionsäureethylester

Saccharomyces cerevisiae FasB His6 reduziert Benzoylessigsäureethylester (EBA) stereoselektiv zu (S)-3-Hydroxy-3-phenylpropionsäureethylester ((S)-HPPE) (Engelking 2004a). Abbildung 7.7 veranschaulicht diese Reaktion.

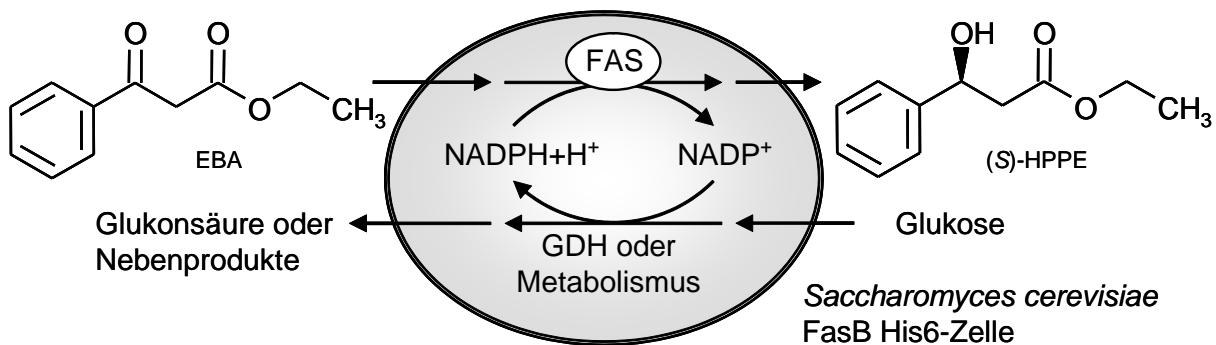


Abbildung 7.7 Reaktionsschema der asymmetrischen Reduktion von Benzoylessigsäureethylester (EBA) zu (S)-3-Hydroxy-3-phenylpropionsäureethylester ((S)-HPPE) mit *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6.

Nach den Erfahrungen mit der Reduktion von 4-Cl-ACE sollte die Untersuchung dieser Reaktion ein weiterführendes Verständnis der Eignung von nicht mit Wasser mischbaren ionischen Flüssigkeiten als Lösungsmittelphase in der Ganzzell-Biokatalyse ermöglichen. Dabei sollten vor allem die Lösungsmittelleigenschaften der ionischen Flüssigkeiten wie Verteilungskoeffizienten und Biokompatibilität im Vordergrund stehen.

7.2.1 Löslichkeit von EBA und HPPE in Puffer und Verteilungskoeffizienten zwischen ionischen Flüssigkeiten und Puffer

Für EBA und HPPE wurde von Engelking (2004a) eine maximale Löslichkeit von 14 mM und 65 mM in Puffer angegeben, wie in Abbildung 7.8a dargestellt. In den verwendeten nicht mit Wasser mischbaren ionischen Flüssigkeiten sind die Stoffe mindestens bis 600 mM löslich.

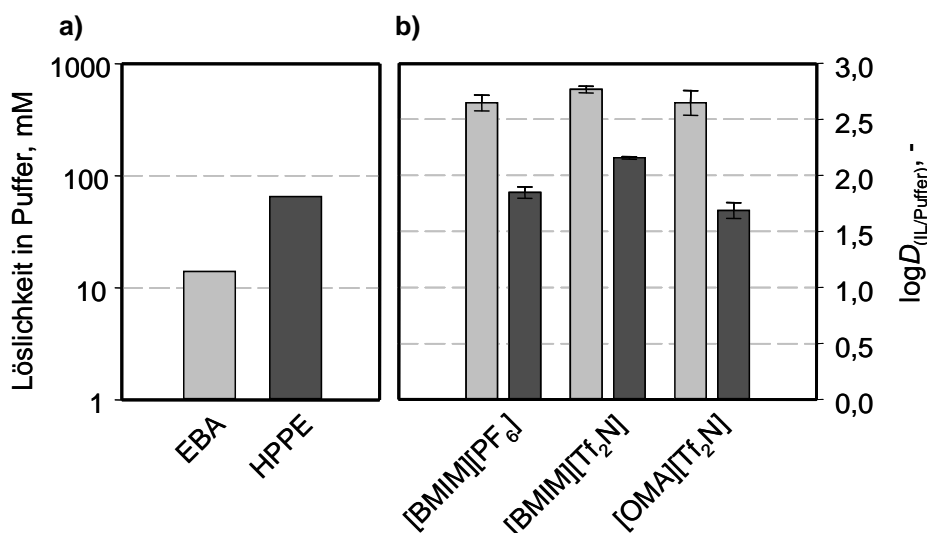


Abbildung 7.8 a) Löslichkeitsgrenzen von Benzoylessigsäureethylester (EBA) und 3-Hydroxy-3-phenylpropionsäureethylester (HPPE) in wässriger Phase (Puffer). b) Verteilungskoeffizienten $\log D$ von EBA und HPPE zwischen verschiedenen ionischen Flüssigkeiten (IL) und Puffer.

Abbildung 7.8b zeigt, dass sich EBA zwischen den ionischen Flüssigkeiten [BMIM][PF₆], [BMIM][Tf₂N] und [OMA][Tf₂N] und Puffer mit $\log D = 2,7-2,8$ verteilt. Für HPPE ist der Unterschied zwischen den ionischen Flüssigkeiten größer. Es wurden $\log D$ zwischen 1,7 und 2,2 ermittelt. Somit verbleiben in einem zweiphasigen Ansatz mit 20 % v/v Phasenanteil der ionischen Flüssigkeit im Gleichgewichtszustand nur etwa 2,7-7,5 % des Alkohols in der wässrigen Phase. In diesem System sind die ionischen Flüssigkeiten also gut als *in situ*-Extraktionsmittel geeignet.

7.2.2 Biokompatibilität von ionischen Flüssigkeiten

Analog zur Synthese von (S)-4-Cl-HBE wurde untersucht, ob [BMIM][Tf₂N] eine eventuelle Schädigung der *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 während der Biotransformation von EBA reduzieren kann. Ausgehend von einem optimierten Ansatz von Engelking (2004a) wurden 60 g_{BTM} L⁻¹ Zellen und 55 mM EBA eingesetzt. Nach 20 Stunden betrug der Anteil intakter Zellen im rein wässrigen System noch 45 % (± 13 %), im zweiphasigen Ansatz 62 % (± 8 %). Damit ist keine eindeutige Verbesserung des Prozesses durch den Einsatz der ionischen Flüssigkeit zu beobachten.

7.2.3 Diskussion

Das Ergebnis der Untersuchung der Zellviabilität bestätigt die Beobachtung von Engelking (2004a), dass EBA weniger toxisch für die Zellen ist als 4-Cl-ACE. Als

Folge kann die ionische Flüssigkeit trotz der höheren Verteilungskoeffizienten für EBA und HPPE keinen deutlich positiven Effekt auf die Zellen ausüben. Da Engelking (2004a) im einphasigen Reaktionsansatz mit 97 % Umsatz, 83 % Ausbeute und 97,5 % Enantiomerenüberschuss für (S)-HPPE bereits sehr gute Werte erzielte, wurde diese Reaktion nicht weiter als Modellsystem für die Untersuchung des effizienten Einsatzes ionischer Flüssigkeiten verwendet.

Somit lässt sich festhalten, dass ionische Flüssigkeiten aufgrund ihrer guten Biokompatibilität wahrscheinlich am Besten eingesetzt werden, wenn Edukt und/oder Produkt einer Ganzzell-Biotransformation toxisch auf die Zellen wirken.

7.3 Synthese von (S)-1-(2,3,4,5,6-Pentafluorophenyl)ethanol

Die einzige biokatalytische Reduktion von 2,3,4,5,6-Pentafluoroacetophenon (PFAP) zu (S)-1-(2,3,4,5,6-Pentafluorophenyl)ethanol ((S)-PFPE) wurde bisher von Nakamura *et al.* (2000) beschrieben. Dabei werden die Cyanobakterien *Synechococcus* sp. PCC 7942 unter Beleuchtung als Biokatalysator eingesetzt. Ob *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 diese Reaktion, wie in Abbildung 7.9 schematisiert, ebenfalls katalysiert, war bisher nicht bekannt. Da sowohl das Edukt als auch das Produkt leicht flüchtig sind, sollte untersucht werden, ob die Verwendung von ionischen Flüssigkeiten als Lösungsmittelphase zu höheren Ausbeuten führt.

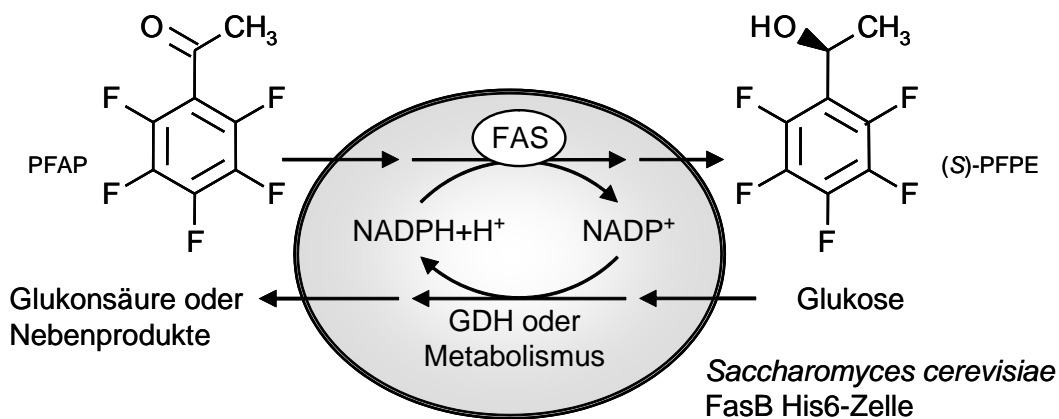


Abbildung 7.9 Reaktionsschema der asymmetrischen Reduktion von 2,3,4,5,6-Pentafluoroacetophenon (PFAP) zu (S)-1-(2,3,4,5,6-Pentafluorophenyl)ethanol ((S)-PFPE) mit *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6.

7.3.1 Löslichkeit von PFAP und PFPE in Puffer und Verteilungskoeffizienten zwischen ionischen Flüssigkeiten und Puffer

Abbildung 7.10a zeigt, dass die Löslichkeitsgrenzen von PFAP und PFPE in Puffer 2 mM und 15 mM betragen. In den verwendeten, nicht mit Wasser mischbaren ionischen Flüssigkeiten sind die Stoffe mindestens bis 600 mM löslich.

In Abbildung 7.10b sind die Verteilungskoeffizienten zwischen den ionischen Flüssigkeiten [BMIM][PF₆], [BMIM][Tf₂N] und [OMA][Tf₂N] und Puffer dargestellt. Für PFAP wurden diese zu $\log D = 2,6$ bis $\log D = 2,9$ bestimmt, für PFPE liegen sie zwischen $\log D = 1,7$ und $\log D = 2,1$. Dies bedeutet für das Produkt der Ketonreduktion, dass in einem zweiphasigen Ansatz mit 20 % v/v Phasenanteil der ionischen Flüssigkeit im Gleichgewichtszustand nur 3,4-7,4 % des Stoffes in

der wässrigen Phase zurückbleiben. Somit sind die ionischen Flüssigkeiten gut als *in situ*-Extraktionsmittel geeignet.

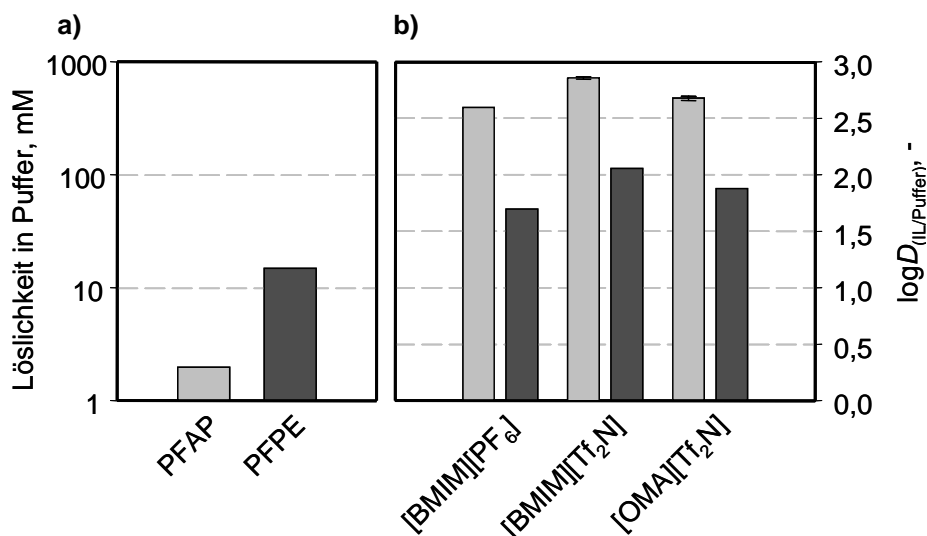


Abbildung 7.10 a) Löslichkeitsgrenzen von 2,3,4,5,6-Pentafluoroacetophenon (PFAP) und 1-(2,3,4,5,6-Pentafluorophenyl)ethanol (PFPE) in wässriger Phase (Puffer). b) Verteilungskoeffizienten $\log D$ von PFAP und PFPE zwischen verschiedenen ionischen Flüssigkeiten (IL) und Puffer.

7.3.2 Variation der Cosubstrat-Bedingungen

Vorversuche zeigten, dass *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 PFAP mit sehr hohem Enantiomerenüberschuss (> 99 %) zu (S)-PFPE reduziert, allerdings bei einer geringen Ausbeute von < 10 %. Daraufhin wurde versucht, diese durch einen mehrfachen Überschuss des Cosubstrats Glukose zu steigern. In Abbildung 7.11a ist zu erkennen, dass dies für den rein wässrigen Ansatz in gewissem Maße gelingt. Bei Zugabe von Glukose im Verhältnis 1 zu 1 (Cosubstrat zu Edukt) beträgt die Ausbeute 10,8 %, bei einem 20-fachen Überschuss 22,1 %. In Gegenwart ionischer Flüssigkeiten wird die höchste Ausbeute bei 4-fachem Überschuss erhalten, für [BMIM][Tf₂N] zum Beispiel 22,4 %. Bei Betrachtung des Enantiomerenüberschusses zeigt sich ein Vorteil für die Verwendung der ionischen Flüssigkeit. Er beträgt in allen Ansätzen > 99,5 %, während er im rein wässrigen Ansatz bei einer Steigerung der Glukosekonzentration von 99,9 % auf 99,0 % fällt.

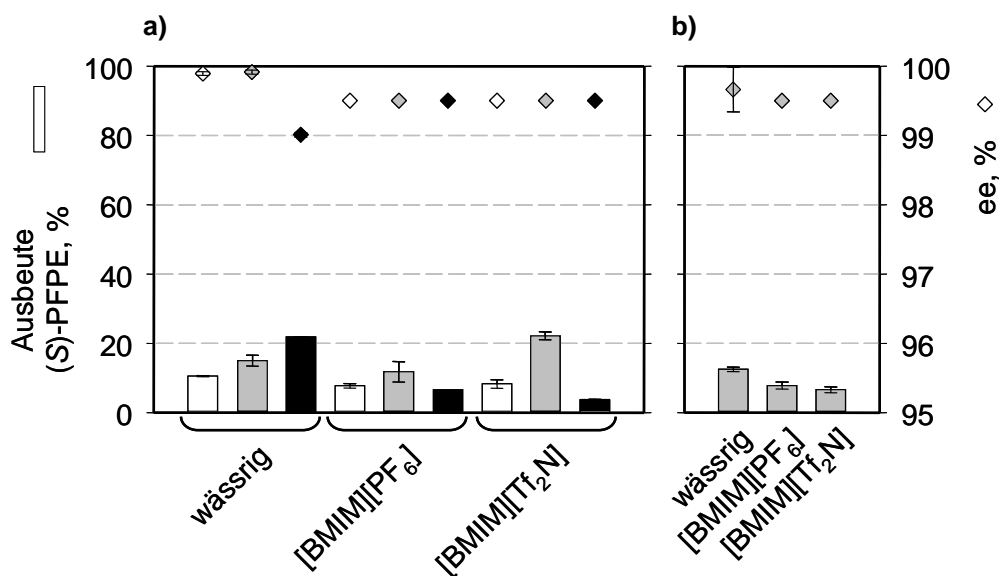


Abbildung 7.11 Chemische Ausbeute und Enantiomerenüberschuss (ee) von (S)-1-(2,3,4,5,6-Pentafluorphenyl)ethanol ((S)-PFPE) nach 20 h bei Umsetzungen mit $50 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6, 50 mM PFAP, 100 μM NADP bei 27°C und 300 min^{-1} im rein wässrigen Ansatz und mit 20 % v/v ionischen Flüssigkeiten bei einer Glukosekonzentrationen von 0,05 M □, 0,2 M ■ bzw. 1,0 M ■ in der wässrigen Phase: **a)** unter aeroben Bedingungen, **b)** unter anaeroben Bedingungen. Der Enantiomerenüberschuss (ee) bei Umsetzungen mit ionischen Flüssigkeiten beträgt > 99,5 %. Höhere Werte sind aufgrund der Detektionsgrenze von (R)-PFPE nicht bestimmbar. Alle Konzentrationen sind auf das Volumen der wässrigen Phase bezogen.

Des Weiteren wurde der Einfluss von Sauerstoff auf die Reaktion untersucht, da unter der Annahme, dass ein Teil der Cofaktorregenerierung über den Metabolismus erfolgt, die Abwesenheit von Sauerstoff zur Nutzung anderer Stoffwechselwege und damit eventuell zu einer effizienteren NADP-Reduktion führt. In Abbildung 7.11b sind die Ergebnisse von Ansätzen gezeigt, aus denen zu Beginn der Reaktion der Sauerstoff aus dem Kopfraum durch Begasung mit Stickstoff ausgetrieben wurde. Es ist allerdings zu erkennen, dass dieses Vorgehen zu geringeren Ausbeuten sowohl des rein wässrigen Ansatzes als auch der zweiphasigen Ansätze mit ionischen Flüssigkeiten führt.

Durch den Einsatz alternativer Cosubstrate analog zur Biotransformation von 4-Cl-ACE bei Umsetzungen unter aeroben Bedingungen konnte keine Steigerung der Ausbeute erreicht werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

7.3.3 Cofaktor-Zugabe

Analog zur Synthese von (S)-4-Cl-HBE wurde untersucht, ob *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 auch ohne Zugabe des Cofaktors NADP in der Lage ist, PFAP zu reduzieren. Dazu wurden Reaktionen mit 200 mM Glukose als Cosubstrat angesetzt. Abbildung 7.12 zeigt, dass sowohl im rein wässrigen System als auch im zweiphasigen System mit [BMIM][PF₆] ohne NADP-Zugabe etwa die gleiche Ausbeute an (S)-PFPE erzielt wird. Die relativ hohe Ausbeute von 22,4 % bei Verwendung von [BMIM][Tf₂N] als Lösungsmittelphase wird allerdings ohne zusätzlichen Cofaktor nicht erreicht, sondern lediglich 17,5 %.

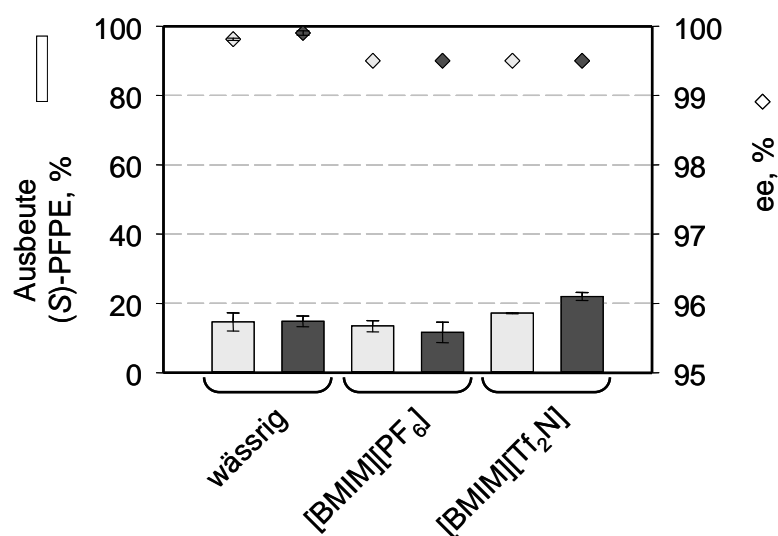


Abbildung 7.12 Chemische Ausbeute und Enantiomerenüberschuss (ee) von (S)-1-(2,3,4,5,6-Pentafluorophenyl)ethanol ((S)-PFPE) nach 20 h bei Umsetzungen mit 50 g_{BTM} L⁻¹ *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6, 50 mM PFAP, 200 mM Glukose bei 27°C und 300 min⁻¹ ohne NADP (■) und mit Zugabe von 100 μM NADP (■). Der Enantiomerenüberschuss (ee) bei Umsetzungen mit ionischen Flüssigkeiten beträgt > 99,5 %. Höhere Werte sind aufgrund der Detektionsgrenze von (R)-PFPE nicht bestimmbar. Alle Konzentrationen sind auf das Volumen der wässrigen Phase bezogen.

7.3.4 Diskussion

Saccharomyces cerevisiae FasB His6 reduziert PFAP mit hoher Stereoselektivität zu (S)-PFPE. Damit ist es gelungen, diese Reaktion, die bisher nur von Cyanobakterien unter Lichteinfluss katalysiert wurde (Nakamura *et al.* 2000), in einem leicht im Maßstab zu vergrößernden Prozess mit einfach kultivierbaren Mikroorganismen durchzuführen. Die höchste Ausbeute von 22,4 % bei exzellentem Enantiomerenüberschuss von > 99,5 % wird dabei durch die Verwendung von [BMIM][Tf₂N] als Eduktreservoir und *in situ*-Extraktionsmittel

erreicht. Die Selektivität dieser Reaktion wurde zu $> 98\%$ und die Produktbildungskapazität zu $0,9 \text{ mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ bestimmt. Da kein Reaktionsverlauf aufgenommen werden konnte, ist eine genaue Bestimmung der Raum-Zeit-Ausbeute nicht möglich.

Im rein wässrigen Ansatz ist der Enantiomerenüberschuss mit $99,0\%$ geringer und es bleibt das Problem des leicht flüchtigen Produkts bestehen. Dies lässt sich wahrscheinlich nur durch Einsatz eines organischen Lösungsmittels sinnvoll lösen, was aber gerade vermieden werden sollte. Das zweiphasige System mit ionischer Flüssigkeit ermöglicht eine Produktkonzentration von $9,0 \text{ mM}$ auf das gesamte Reaktionsvolumen bezogen. Das sind 76% mehr als im Verfahren von Nakamura *et al.* (2000). In der ionischen Flüssigkeit liegt das Produkt mit 43 mM vor. Daraus sollte es leicht mittels Destillation oder einer anderen Methode isoliert werden können.

8 Asymmetrische Synthesen mit *Lactobacillus kefir* im zweiphasigen System ionische Flüssigkeit/Wasser

Da sich die asymmetrische Reduktion prochiraler Ketone aufgrund der überwiegend hohen Verteilungskoeffizienten der Edukte und Produkte als gutes Modell für die Evaluierung des Potenzials ionischer Flüssigkeiten für die Ganzzell-Biokatalyse erwies, wurden diese Reaktionen mit einem weiteren Biokatalysator, *Lactobacillus kefir* DSM 20587, untersucht. Dabei wurde wieder nur der zweiphasige Ansatz verfolgt. Neben der Ermittlung der Lösungsmiteigenschaften der ionischen Flüssigkeiten [BMIM][PF₆], [BMIM][Tf₂N] und [OMA][Tf₂N] stand die reaktionstechnische Untersuchung und die Maßstabsvergrößerung eines erfolgreichen Ansatzes im Mittelpunkt. Als Biokatalysator wurden Zellen verwendet, die entweder von Jülich Fine Chemicals kommerziell erworben wurden (Abkürzung „JFC“) oder im Rahmen dieser Arbeit selbst hergestellt wurden (Kapitel 5.2.3, Abkürzung „BioVT“). Welche Zellen für die Experimente jeweils frisch aus einem bei -20°C gelagerten Vorrat aufgetaut und verwendet wurden, ist in der Versuchsbeschreibung angegeben. Die Umsetzungen wurden bis auf den Prozess im 200 mL-Maßstab (Kapitel 8.2.5) im mL-Maßstab durchgeführt.

8.1 Synthese von (3*R*,5*S*)-6-Chlor-3,5-dihydroxyhexansäure-*tert*-butylester

Lactobacillus kefir besitzt zwei Alkoholdehydrogenasen, die nacheinander 6-Chlor-3,5-diohexansäure-*tert*-butylester (6-Cl-DOHB) regio- und stereoselektiv zu (S)-6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure-*tert*-butylester ((S)-6-Cl-5-HOHB) und weiter zu (3*R*,5*S*)-6-Chlor-3,5-dihydroxyhexansäure-*tert*-butylester ((3*R*,5*S*)-6-Cl-3,5-DHHB) reduzieren können, wie in Abbildung 8.1 dargestellt (Hummel 1990 und persönliche Mitteilung). Derselbe Syntheseweg wird bisher chemisch oder

chemoenzymatisch katalysiert, um das Produkt, das als Intermediat für einen neuen synthetischen Zugang für HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren dienen kann, zu erhalten. Anhand dieser Reaktion sollte die Eignung ionischer Flüssigkeiten als Lösungsmittelphase für eine Zweischritt-Biokatalyse untersucht werden.

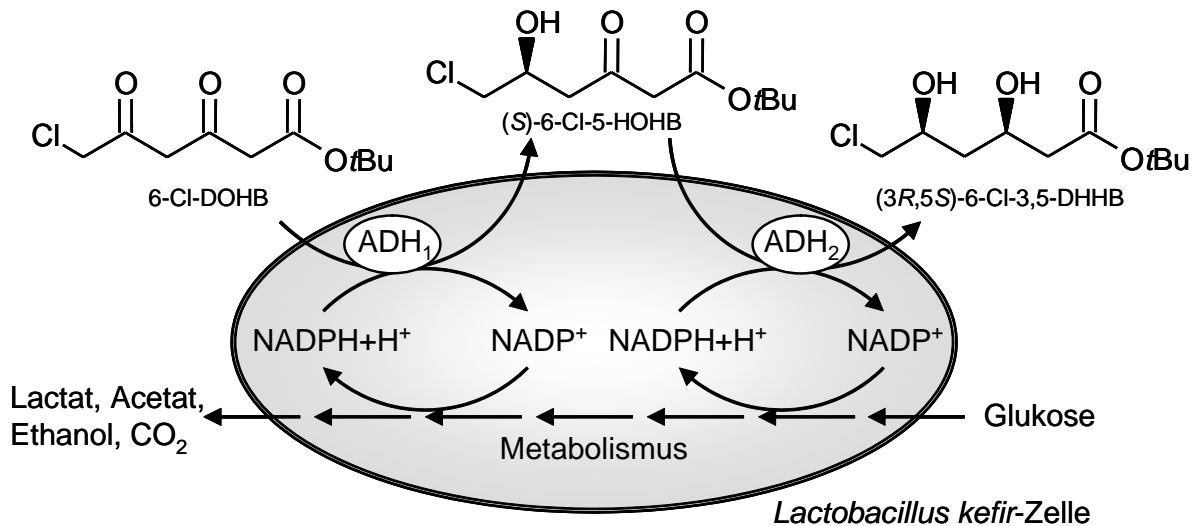


Abbildung 8.1 Reaktionsschema der asymmetrischen Reduktion von 6-Chlor-3,5-dioxyhexansäure-*tert*-butylester (6-Cl-DHOB) zu (3*R*,5*S*)-6-Chlor-3,5-dihydroxyhexansäure-*tert*-butylester ((3*R*,5*S*)-6-Cl-3,5-DHOB) mit *Lactobacillus kefir*.

8.1.1 Löslichkeit von 6-Cl-DOHB und 6-Cl-DHOB in Puffer und

Verteilungskoeffizienten zwischen ionischen Flüssigkeiten und Puffer

Die Löslichkeitsgrenzen von 6-Cl-DOHB und 6-Cl-DHOB in Puffer wurden von Amidjojo (2004) zu 0,6 mM und 29 mM angegeben und sind in Abbildung 8.2a dargestellt. In den verwendeten nicht mit Wasser mischbaren ionischen Flüssigkeiten sind die Stoffe mindestens bis 600 mM löslich.

In Abbildung 8.2b sind die Verteilungskoeffizienten zwischen den ionischen Flüssigkeiten [BMIM][PF₆], [BMIM][Tf₂N] und [OMA][Tf₂N] und Puffer aufgetragen. Für 6-Cl-DOHB wurden sie zu $\log D = 1,8$ bis $\log D = 2,0$ ermittelt. Für das Zwischenprodukt 6-Cl-HOHB stand nur eine sehr geringe Stoffmenge zur Verfügung, so dass keine Verteilungskoeffizienten bestimmt werden konnten. Von 6-Cl-DHOB konnte aus gleichem Grund nur der Verteilungskoeffizient zwischen [BMIM][Tf₂N] und Puffer ermittelt werden. Diese ionische Flüssigkeit wurde gewählt, da sie bei den bisher untersuchten Alkoholen meistens die höchsten Werte ergab. Doch mit $\log D = 1,2$ verbleibt in einem zweiphasigen Ansatz mit 20 % v/v Phasenanteil der ionischen Flüssigkeit im Gleichgewichtszustand etwa

20 % des Stoffes in der wässrigen Phase. Somit ist [BMIM][Tf₂N] nur eingeschränkt als *in situ*-Extraktionsmittel geeignet.

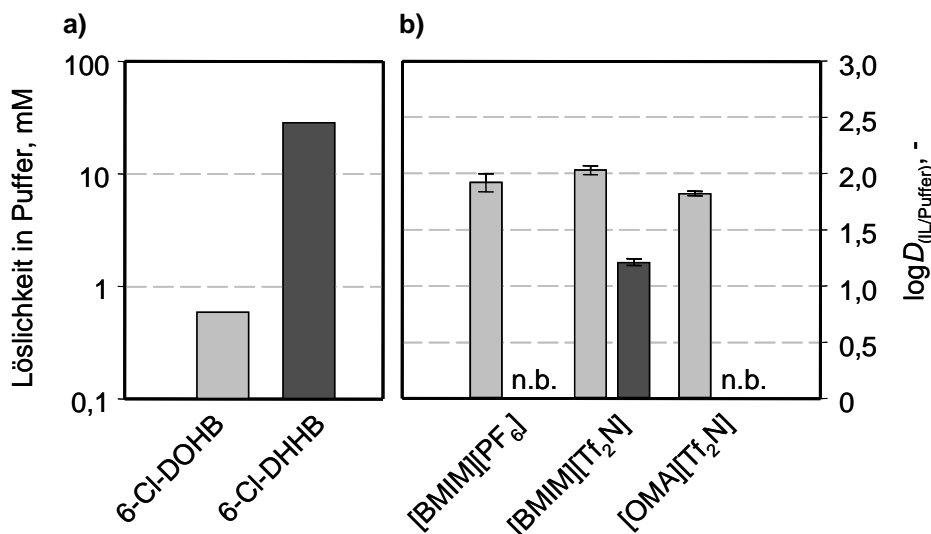


Abbildung 8.2 a) Löslichkeitsgrenzen von 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester (6-Cl-DHHB) und 6-Chlor-3,5-dihydroxyhexansäure-*tert*-butylester (6-Cl-DOHB) in wässriger Phase (Puffer). b) Verteilungskoeffizienten $\log D$ von 6-Cl-DHHB (■) und 6-Cl-DOHB (□) zwischen verschiedenen ionischen Flüssigkeiten (IL) und Puffer (n.b. nicht bestimmt).

8.1.2 Substratkonzentration

Trotz des ungünstigen Verteilungskoeffizienten für das Produkt, wurde die asymmetrische Reduktion von 6-Cl-DHHB im zweiphasigen System Puffer/[BMIM][Tf₂N] untersucht, da Vorversuche im rein wässrigen System mit 100 mM Edukt und 50 g_{BTM} L⁻¹ *Lactobacillus kefir* (BioVT) nach Stickstoffbegasung zu einer relativ geringen Ausbeute von 47,5 % führten.

In Abbildung 8.3 ist zu sehen, dass mit der ionischen Flüssigkeit eine chemische Ausbeute von 81,3 % erreicht werden kann. Die höchste Produktkonzentration von 285 mM in der Lösungsmittelphase wird bei Einsatz von 500 mM Edukt erreicht. Der Diastereomerenüberschuss am C₃ zwischen (3*R*,5*S*)-6-Cl-3,5-DHHB und (3*S*,5*S*)-6-Cl-3,5-DHHB beträgt etwa 97 % und damit deutlich weniger als im wässrigen Ansatz (> 99,0 %). Der Diastereomerenüberschuss am C₅ zwischen (3*R*,5*S*)-6-Cl-3,5-DHHB und (3*R*,5*R*)-6-Cl-3,5-DHHB ist in beiden Fällen > 99,0 %.

Die gleiche Reaktion wurde mit Zellen von Jülich Fine Chemicals durchgeführt, die für etwa 2,5 Jahre bei -20°C gelagert waren. Mit diesen Zellen wurde eine stetige Abnahme der Ausbeute von 70 % bei 100 mM Edukt in BMIM][Tf₂N] zu 10 % bei 600 mM beobachtet. Die maximale Produktkonzentration betrug 129 mM bei 300 mM eingesetztem Edukt.

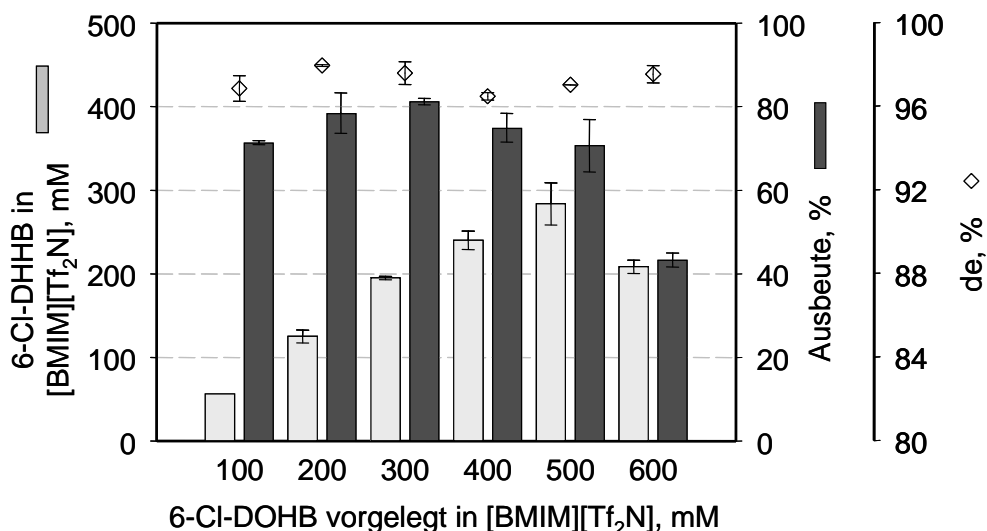


Abbildung 8.3 Chemische Ausbeute und Diastereomerenüberschuss am C₃ (de) von (3*R*,5*S*)-6-Chlor-3,5-dihydroxyhexansäure-*tert*-butylester (6-Cl-DHHB) nach 22 h bei Umsetzungen mit 50 g_{BTM} L⁻¹ *Lactobacillus kefir* (BioVT), 200 mM Glukose (beide Konzentrationen sind auf die wässrige Phase bezogen) bei 30°C und 2000 min⁻¹, mit unterschiedlicher vorgelegter Konzentration an 6-Chlor-3,5-Dioxohexansäure-*tert*-Butylester (6-Cl-DHHB) in [BMIM][Tf₂N].

8.1.3 Diskussion

In Tabelle 8.1 sind verschiedene Herstellungsverfahren von (3*R*,5*S*)-6-Cl-3,5-DHHB zusammengefasst. Die asymmetrische Zweischnitt-Reduktion von 6-Cl-DHHB zu (3*R*,5*S*)-6-Cl-3,5-DHHB mit *Lactobacillus kefir* DSM 20587 im rein wässrigen System stellt bereits ein im Vergleich zur chemischen und chemoenzymatischen Reduktion interessantes Verfahren dar (Beck *et al.* 1995, Thottathil *et al.* 1994, Wolberg *et al.* 2000 und 2001). Für die chemoenzymatische Herstellung von (3*R*,5*S*)-6-Cl-3,5-DHHB wurden zum Beispiel Ausbeuten von 72 % und 62 % für die beiden Teilschritte berichtet (Wolberg *et al.* 2001). Damit ist die kombinierte Ausbeute mit 44,6 % etwas niedriger als die in dieser Arbeit im wässrigen Ansatz erreichte Ausbeute von 47,5 %. Die Reinheit des Produkts genügt mit de > 99,0 % an beiden Chiralitätszentren ohne weitere Aufreinigung den Anforderungen der pharmazeutischen Industrie (Müller 2005). Die Tatsache, dass bei der Ganzzell-Biokatalyse kein Cofaktor zugegeben wird, macht dieses Verfahren noch attraktiver.

Durch den Einsatz der ionischen Flüssigkeit [BMIM][Tf₂N] als Eduktreservoir und *in situ*-Extraktionsmittel kann die Ausbeute auf 81,3 % gesteigert werden, mehr als mit der chemischen Synthese erreicht wird. Dabei ist allerdings zu beachten, dass es sich hierbei nur um die chemische Ausbeute handelt. Die Prozessausbeute liegt durch den niedrigen Verteilungskoeffizienten für das Produkt bei 65,3 %.

Durch die Verwendung einer anderen ionischen Flüssigkeit mit einem höheren Verteilungskoeffizienten wäre dieses Problem aber eventuell leicht zu beseitigen. Die Differenz zwischen dem Umsatz und der Ausbeute deutet darauf hin, dass Nebenprodukte gebildet werden, die aber nicht näher bestimmt werden konnten.

Tabelle 8.1 Vergleich der Herstellungsverfahren von (3*R*,5*S*)-6-Chlor-3,5-dihydroxyhexansäure-*tert*-butylester (n.b. nicht bekannt).

	Beck et al. (1995)^a	Wolberg et al. (2001)	Amidjojo (2004)	wässriger Ansatz	zweiphasiger Ansatz
Verfahren	chemisch (Ru-BINAP, Boran)	chemo- enzymatisch (recLB-ADH, Boran)	Ganzzell- biokatalyse <i>L. kefir</i> , Zulaufverfahren	Ganzzell- biokatalyse <i>L. kefir</i> , Satzverfahren	Ganzzell- biokatalyse <i>L. kefir</i> , Satzverfahren
Umsatz	n.b.	n.b.	100 %	86,0 %	95,3 %
Ausbeute	64,5 %	44,6 %	85,0 %	47,5 %	81,3 % ^b
de	> 98 %	> 99 %	> 99 %	> 99,0 %	~ 97 %

^a Im Verlauf der Reaktion wird das Chloratom am C₆ durch einen Benzyloxysubstituenten ersetzt

^b chemische Ausbeute

Die höhere Ausbeute des zweiphasigen Ansatzes gegenüber dem rein wässrigen Verfahren liegt wahrscheinlich sowohl in der verringerten Toxizität der Stoffe für den Biokatalysator, der geringeren Instabilität und einer verminderten Inhibierung der Enzyme begründet. Alle diese Effekte können durch die von der Anwesenheit der ionischen Flüssigkeit verringerten wässrigen Konzentrationen der Stoffe hervorgerufen werden.

Inzwischen ist ein Zulaufverfahren zur Herstellung von (3*R*,5*S*)-6-Cl-3,5-DHHB mit *Lactobacillus kefir* bekannt (Amidjojo 2004). Neben der Eduktzudosierung unterscheidet es sich von den Ansätzen dieser Arbeit in einer permanenten Stickstoffbegasung und einer Reaktionstemperatur von 22°C. Amidjojo konnte zeigen, dass die Stickstoffbegasung zu einer verringerten Nebenproduktbildung führt. Somit ist zu erwarten, dass auch im zweiphasigen Ansatz mit ionischen Flüssigkeiten eine höhere Ausbeute erreicht werden kann, wenn die Reaktionsmischung permanent mit Stickstoff begast wird. Des Weiteren konnte Amidjojo zeigen, dass die Temperatur einen Einfluss auf die Produktreinheit hat. Würde der zweiphasige Prozess daher auch bei 22°C durchgeführt werden, könnte wahrscheinlich die nötige Reinheit von > 99,0 % de erreicht werden.

8.2 Synthese von (*R*)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol

Lactobacillus kefir DSM 20587 katalysiert mit seiner Alkoholdehydrogenase 1 (ADH₁) die asymmetrische Reduktion von 4-Chloracetophenon (4-Cl-AP) zu (*R*)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol ((*R*)-1-4-Cl-PE), wie in Abbildung 8.4 dargestellt (Hummel 1990). Der chirale Alkohol ist möglicherweise ein interessantes Intermediat für die Synthese von Pharmazeutika und Agrochemikalien, da er leicht weiter funktionalisiert werden kann. Aufgrund der guten Verfügbarkeit des Biokatalysators und des Edukts sowie der einfachen Analytik wurde diese Reaktion als Modell für eine eingehendere Untersuchung des Potenzials ionischer Flüssigkeiten für die Ganzzell-Biokatalyse gewählt. Unter anderem wurden die Auswirkungen auf die Zellviabilität studiert, die Reaktionsverläufe verschiedener Ansätze verglichen, eine Maßstabsvergrößerung auf 200 mL durchgeführt und die Stofftransportprozesse abgeschätzt.

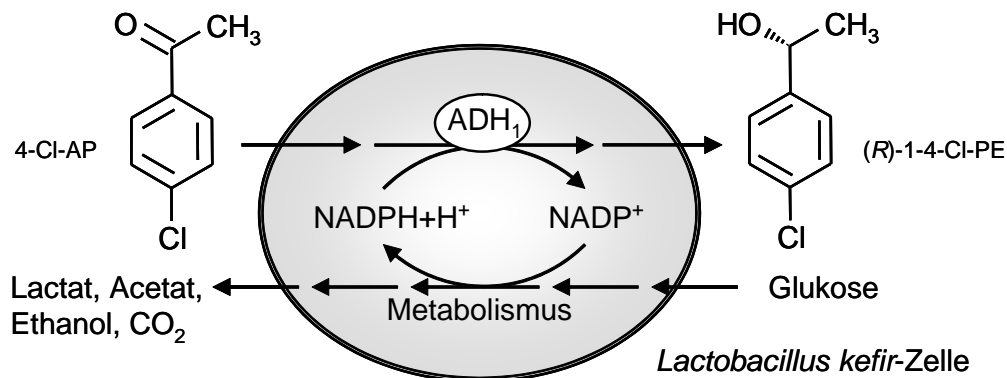


Abbildung 8.4 Reaktionsschema der asymmetrischen Reduktion von 4-Chloracetophenon (4-Cl-AP) zu (*R*)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol ((*R*)-1-4-Cl-PE) mit *Lactobacillus kefir*.

8.2.1 Löslichkeit von 4-Cl-AP und 1-4-Cl-PE in Puffer und Verteilungskoeffizienten zwischen ionischen Flüssigkeiten und Puffer

Die Löslichkeitsgrenzen von 4-Cl-AP und 1-4-Cl-PE in Puffer wurden zu 6 mM und 25 mM bestimmt und in Abbildung 8.5a aufgetragen. In den verwendeten, nicht mit Wasser mischbaren ionischen Flüssigkeiten sind die Stoffe mindestens bis 1000 mM löslich.

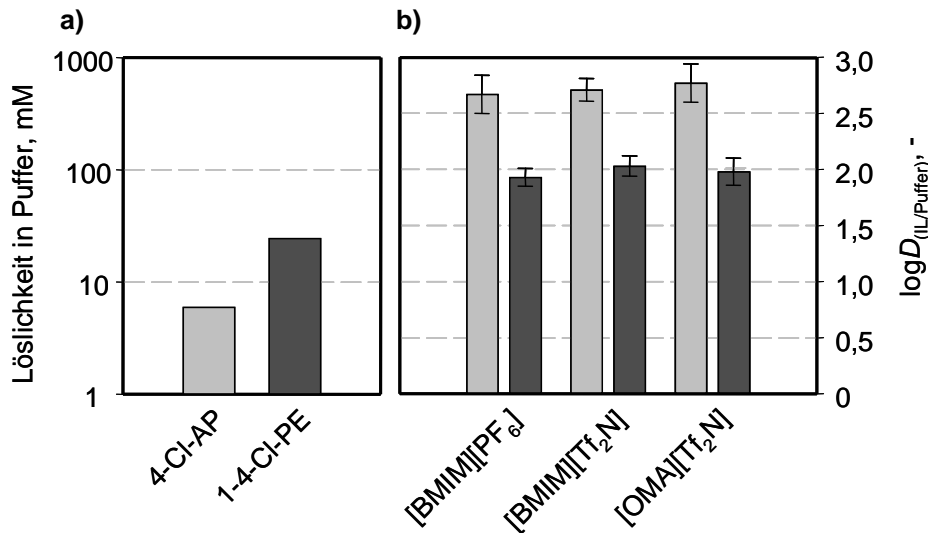


Abbildung 8.5 a) Löslichkeitsgrenzen von 4-Chloracetophenon (4-Cl-AP) und 1-(4-Chlorphenyl)ethanol (1-4-Cl-PE) in wässriger Phase (Puffer). b) Verteilungskoeffizienten $\log D$ von 4-Cl-AP █ und 1-4-Cl-PE █ zwischen verschiedenen ionischen Flüssigkeiten (IL) und Puffer.

In Abbildung 8.5b sind die Verteilungskoeffizienten zwischen den ionischen Flüssigkeiten [BMIM][PF₆], [BMIM][Tf₂N] und [OMA][Tf₂N] und Puffer dargestellt. Für 4-Cl-AP und 1-4-Cl-PE betragen sie $\log D = 2,7-2,8$ und $\log D = 1,9-2,0$. Die Unterschiede zwischen den ionischen Flüssigkeiten sind für diese Stoffe also relativ gering. Von 1-4-Cl-PE verbleiben in einem zweiphasigen Ansatz mit 20 % v/v Phasenanteil der ionischen Flüssigkeit im Gleichgewichtszustand nur etwa 3,6-4,5 % in der wässrigen Phase. Somit sind die ionischen Flüssigkeiten gut als *in situ*-Extraktionsmittel für dieses System geeignet. Zum Vergleich wurden die Verteilungskoeffizienten von 4-Cl-AP und 1-4-Cl-PE zwischen MTBE beziehungsweise *n*-Dekan und Puffer ermittelt. Für 4-Cl-AP ergaben sich Werte von $\log D = 2,73$ (MTBE) und $\log D = 2,38$ (*n*-Dekan), für 1-4-Cl-PE von $\log D = 2,54$ (MTBE) und $\log D = 1,54$ (*n*-Dekan). Bei Betrachtung der Verteilungskoeffizienten wäre MTBE also im Gegensatz zu *n*-Dekan ebenfalls gut für den Einsatz als Lösungsmittelphase geeignet.

8.2.2 Biokompatibilität von ionischen Flüssigkeiten

Mit *Lactobacillus kefir* wurden die gleichen Versuche zur Biokompatibilität von organischen Lösungsmitteln und ionischen Flüssigkeiten durchgeführt wie mit *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6. Die Pufferzusammensetzung, die Rührgeschwindigkeit und die Dauer wurden den Bedingungen der 4-Cl-AP-Reduktion mit *Lactobacillus kefir* angepasst. In Abbildung 8.6a ist zu erkennen, dass die

untersuchten organischen Lösungsmittel nach 5-stündiger Inkubation über 90 % der Zellen beschädigen, nur *n*-Dekan ($\log P = 5,0$) ist mit 46,2 % restlicher Zellviabilität etwas besser biokompatibel. Das bestätigt den für *Lactobacillus brevis* ermittelten Wert des kritischen $\log P$ von 5,1 (Inoue und Horikoshi 1991). Abbildung 8.6b zeigt, dass die verwendeten ionischen Flüssigkeiten dagegen nicht zu einer Zellschädigung führen.

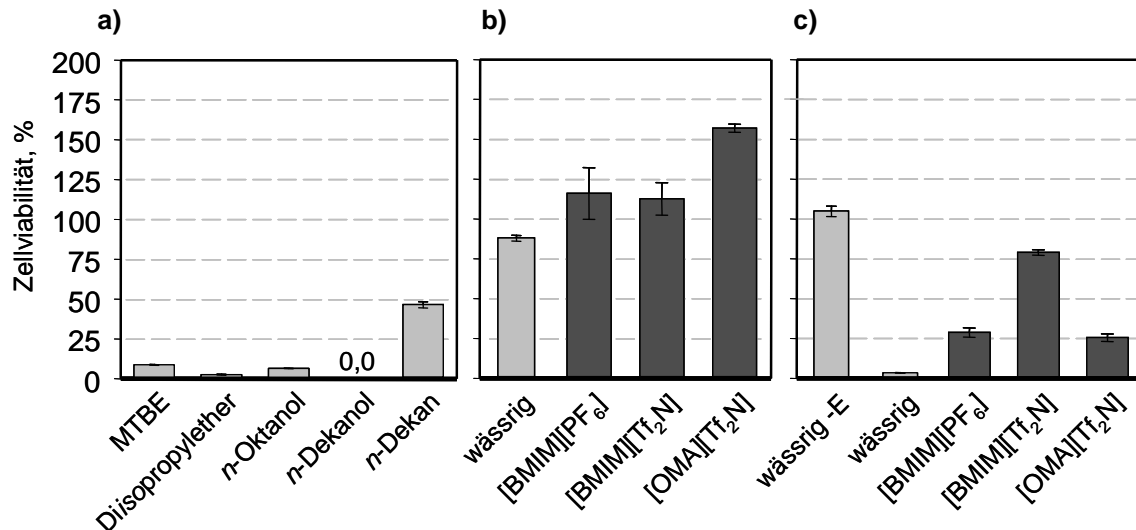


Abbildung 8.6 Prozentuale Viabilität von *Lactobacillus kefir* bestimmt mittels der BacLight-Methode nach 5 Stunden Inkubation bei 30°C und 2000 min⁻¹ mit: **a)** 20 % v/v organischen Lösungsmitteln (Methyl-*tert*-butylether, MTBE) **b)** 20 % v/v ionischen Flüssigkeiten im Vergleich zum einphasig-wässrigen Ansatz und **c)** 200 mM Glukose und 20 % v/v ionischen Flüssigkeiten mit 150 mM 4-Chloracetophenon (4-Cl-AP) im Vergleich zum rein wässrigen Ansatz mit 4-Cl-AP (wässrig) und ohne 4-Cl-AP (wässrig -E). Alle Konzentrationen sind auf das Volumen der wässrigen Phase bezogen.

In Abbildung 8.6c ist zu erkennen, dass die Zellen nach der Umsetzung von 4-Cl-AP im rein wässrigen System durch die Toxizität von Edukt und/oder Produkt fast komplett geschädigt sind. Der Einsatz der ionischen Flüssigkeiten als Eduktreservoir und *in situ*-Extraktionsmittel verringert dagegen die toxischen Effekte. Mit [BMIM][Tf₂N] kann eine Schädigung sogar fast vollständig unterbunden werden. Am Ende der Reaktion beträgt die Zellviabilität noch 79 %. Dadurch wird es eventuell möglich, hohe Ausbeuten ohne Zugabe von Cofaktoren zu erzielen und die Zellen für erneute Ansätze wieder zu verwenden.

8.2.3 Umsetzungen im 2 mL-Maßstab

Aufgrund der guten Biokompatibilität ionischer Flüssigkeiten im Vergleich zu organischen Lösungsmitteln wurden Umsetzungen von 4-Cl-AP im zweiphasigen Ansatz mit verschiedenen ionischen Flüssigkeiten, mit MTBE und im rein wässrigen Ansatz durchgeführt.

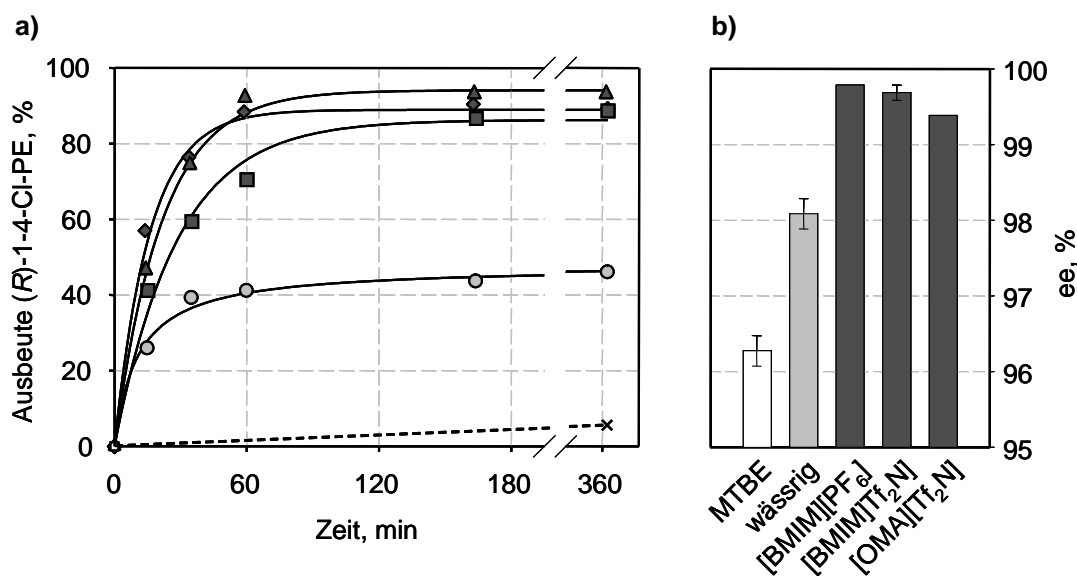


Abbildung 8.7 a) Chemische Ausbeute an (*R*)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol ((*R*)-1-4-Cl-PE) im Verlauf des Satzverfahrens mit 50 g_{BTM} L⁻¹ *Lactobacillus kefir* (JFC), 200 mM Glukose, 150 mM 4-Chloracetophenon ohne pH-Regelung bei circa 30°C und 2000 min⁻¹ im rein wässrigen Ansatz \circ und im zweiphasigen Ansatz mit 20 % v/v [BMIM][PF₆] \diamond , [BMIM][Tf₂N] \blacktriangle , [OMA][Tf₂N] \blacksquare bzw. Methyl-*tert*-butylether (MTBE) \times . Alle Konzentrationen sind auf das Volumen der wässrigen Phase bezogen. Die Linien dienen nur als visuelle Hilfe. b) Enantiomerenüberschuss (ee) von (*R*)-1-4-Cl-PE in den verschiedenen Ansätzen am Ende der Reaktion nach 6 Stunden.

In Abbildung 8.7a sind die Verläufe der Ausbeute an (*R*)-1-4-Cl-PE dargestellt. Mit ionischen Flüssigkeiten als Eduktreservoir und *in situ*-Extraktionsmittel werden Ausbeuten von 88,2 % ([BMIM][PF₆]), 88,4 % ([BMIM][Tf₂N]) und 92,8 % ([OMA][Tf₂N]) erreicht, wohingegen die Ausbeute ohne eine Lösungsmittelphase nur 46,2 % beträgt. Die Verwendung von MTBE als Lösungsmittelphase resultiert in einem dramatischen Ausbeuteverlust. Es werden nur 4,2 % (*R*)-1-4-Cl-PE gebildet. In allen Fällen werden für den Umsatz etwa die gleichen Werte erreicht wie für die Ausbeute. Das einzige Nebenprodukt stellt (*S*)-1-4-Cl-PE dar.

Der Enantiomerenüberschuss an (*R*)-1-4-Cl-PE wird durch den Einsatz der ionischen Flüssigkeiten im Vergleich zum wässrigen Ansatz ebenfalls gesteigert. In Abbildung 8.7b ist zu sehen, dass er mit [BMIM][PF₆] 99,8 %, mit [BMIM][Tf₂N] 99,7 % und mit [OMA][Tf₂N] 99,4 % beträgt, wohingegen im wässrigen Ansatz 98,1 % und mit MTBE nur 96,3 % erreicht werden.

Ein Prozess mit pH-Regelung führt weder im rein wässrigen noch im zweiphasigen System zu einer Steigerung der Ausbeute. Die Reduzierung der eingesetzten Biokatalysatormenge auf 25 g_{BTM} L⁻¹ resultiert in einer etwas langsameren Reaktion und in etwas geringeren Ausbeuten (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die Versuche mit 50 g_{BTM} L⁻¹ *Lactobacillus kefir* und [BMIM][Tf₂N] als Lösungsmittelphase ohne pH-Regelung wurden mit Zellen aus eigener Herstellung wiederholt. Dabei zeigte sich, dass mit diesen Zellen sogar eine Ausbeute von 99,0 % erzielt wird, wie in Abbildung 8.8b (1 Monat) dargestellt. Daraufhin wurde der Einfluss der Lagerungsdauer der Zellen auf die erreichbare Ausbeute untersucht.

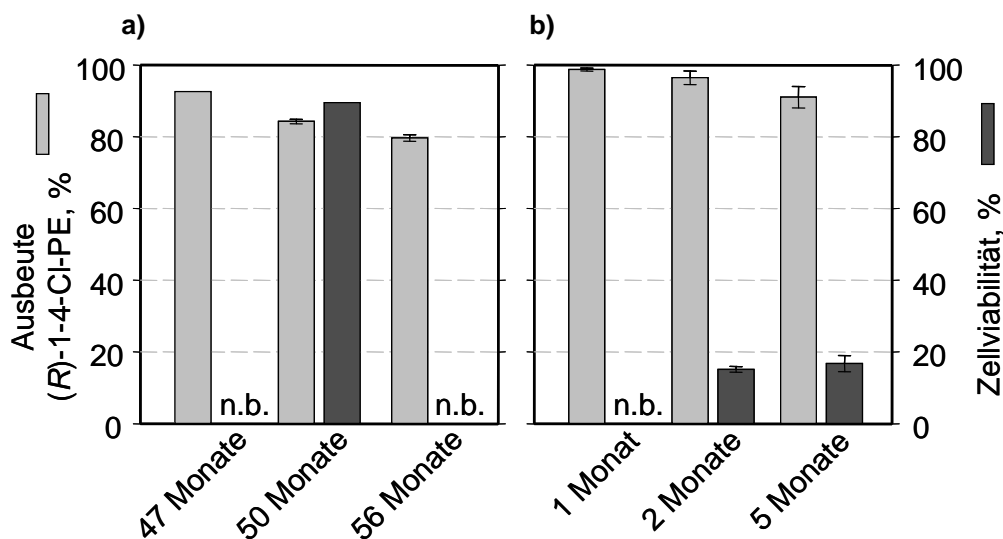


Abbildung 8.8 Chemische Ausbeute an (*R*)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol ((*R*)-1-4-Cl-PE) und Zellviabilität nach 5-stündiger Umsetzung von 150 mM 4-Chloracetonphenon (4-Cl-AP) im Satzverfahren mit 50 g_{BTM} L⁻¹ *Lactobacillus kefir*, 20 % v/v [BMIM][Tf₂N], 200 mM Glukose, bei circa 30°C und 2000 min⁻¹. Die Zellen unterschiedlichen Ursprungs waren vor dem Einsatz unterschiedlich lange bei -20°C gelagert. Alle Konzentrationen sind auf das Volumen der wässrigen Phase bezogen. **a)** Zellen von Jülich Fine Chemicals (JFC). **b)** Zellen aus eigener Herstellung (BioVT). Versuche nach 2 und nach 5 Monaten bei 1000 min⁻¹ (n.b. nicht bestimmt).

Abbildung 8.8 zeigt, dass sowohl die Zellen, die kommerziell von Jülich Fine Chemicals erworben wurden, als auch die Zellen aus eigener Herstellung mit der Zeit an Qualität einbüßen. Dabei scheint es so, als ob die selbst hergestellten

Zellen eine geringere Lagerstabilität aufweisen als die Zellen von Jülich Fine Chemicals. Außerdem ist ein deutlicher Unterschied in der verbliebenen Zellviabilität nach der Umsetzung von 4-CI-AP zwischen den beiden Biokatalysatorchargen zu erkennen.

8.2.4 Wiederverwendbarkeit der Zellen

Die hohe Viabilität der *Lactobacillus kefir* aus der Charge von Jülich Fine Chemicals (JFC) nach dem Einsatz als Biokatalysator in Umsetzungen von 4-Chloracetophenon im zweiphasigen System mit [BMIM][Tf₂N] lässt vermuten, dass sie gut wiederverwendet werden können. Allerdings waren diese Zellen zu dem Zeitpunkt, als die Versuche zur Wiederverwendbarkeit durchgeführt werden sollten, nicht mehr verfügbar. Daraufhin wurden die Zellen aus eigener Herstellung für die Experimente verwendet, obwohl diese am Ende der Reaktion nur etwa 15 % Viabilität aufweisen.

Abbildung 8.9 zeigt die Ausbeute bei drei aufeinander folgenden Versuchen. Bei den ersten beiden Umsetzungen wurden die Zellen nach 5 Stunden pelletiert, in Puffer resuspendiert und sofort für den nächsten Ansatz eingesetzt. Die Zellkonzentration betrug in allen Ansätzen 50 g_{BTM} L⁻¹, aufgrund von Verlusten bei der Handhabung wurde deshalb das Reaktionsvolumen jeweils entsprechend angepasst. Von der dritten Umsetzung wurde nach 5 Stunden und nach 21 Stunden eine Probe entnommen.

Die Zellviabilität verringert sich vom ersten bis zum dritten Einsatz der Zellen nicht weiter. Trotzdem sinkt die nach 5 Stunden erreichte Ausbeute von 91,3 % auf 58,0 % und weiter auf 45,2 %. Im dritten Prozess wird nach 21 Stunden jedoch immer noch eine Ausbeute von 75,9 % erzielt.

Ein ähnlicher Versuch, bei dem die Zellen allerdings nach jedem Einsatz über Nacht bei -20°C gelagert und am nächsten Morgen aufgetaut und in Puffer gewaschen wurden, führte hingegen zu weiter abnehmenden Zellviabilitäten und weit geringeren Ausbeuten (Ergebnisse nicht gezeigt).

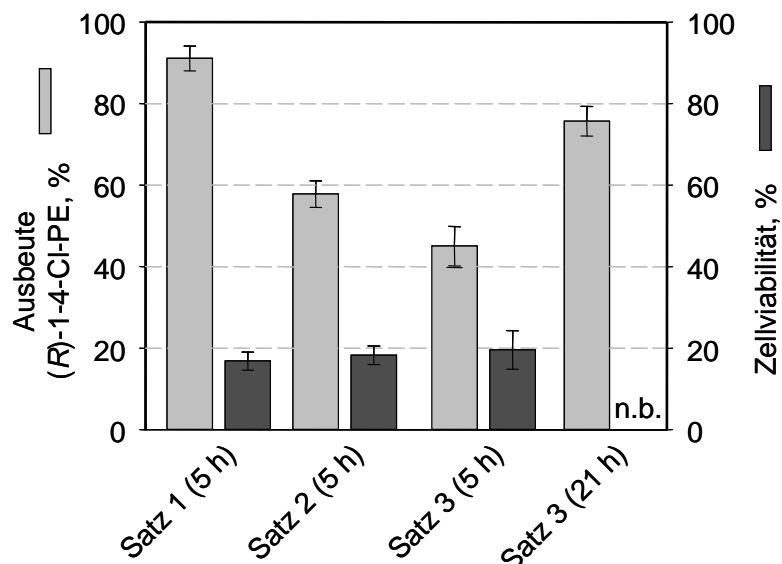


Abbildung 8.9 Chemische Ausbeute an (*R*)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol ((*R*)-1-4-Cl-PE) \square und Zellviabilität \blacksquare aufeinander folgender Umsetzungen von 150 mM 4-Chloracetophenon (4-Cl-AP) im Satzverfahren mit $50 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ *Lactobacillus kefir* (BioVT), 200 mM Glukose, bei circa 30°C und 1000 min^{-1} mit 20 % v/v [BMIM][Tf₂N]. Die Zellen wurden in den ersten beiden Prozessen nach 5 Stunden pelletiert, in Umsetzungspuffer resuspendiert und für den nächsten Prozess eingesetzt. Im dritten Prozess wurde die Reaktion erst nach 21 Stunden beendet (n.b. nicht bestimmt).

8.2.5 Umsetzung im 200 mL-Maßstab

Um zu zeigen, dass die Ganzzell-Biokatalyse im zweiphasigen System mit ionischer Flüssigkeit auch in größerem Maßstab als 2,8 mL effizient ist und um weitere Prozessparameter bestimmen zu können, wurde ein 200 mL-Ansatz mit $50 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ *Lactobacillus kefir* aus der Charge von Jülich Fine Chemicals und 600 mM 4-Cl-AP in 20 % v/v [BMIM][Tf₂N] durchgeführt.

In Abbildung 8.10 ist zu sehen, dass die Reaktion zwar langsamer verläuft als im 2,8 mL-Maßstab, jedoch zur gleichen chemischen Ausbeute von 93,8 % ($\pm 1,0$) führt. Der Enantiomerenüberschuss von (*R*)-1-4-Cl-PE beträgt ebenfalls 99,6 % ($\pm 0,1$). Die Prozessausbeute, also die relative Menge (*R*)-1-4-Cl-PE in [BMIM][Tf₂N] am Ende der Reaktion bezogen auf die zu Beginn vorgelegte Menge 4-Cl-AP liegt bei 88,3 % ($\pm 1,4$). Damit ist die Übertragbarkeit des Prozesses gelungen, obwohl der Leistungseintrag im 2,8 mL-Ansatz nicht bekannt war.

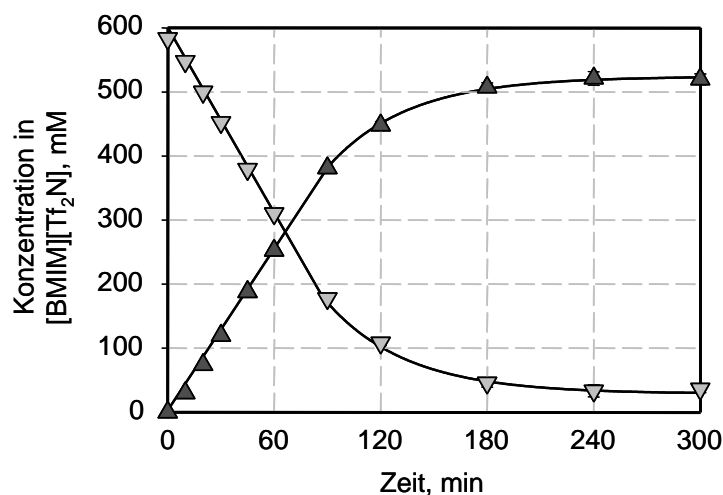


Abbildung 8.10 Konzentrationen von 4-Chloracetophenon (4-Cl-AP) ▽ und (R)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol ((R)-1-4-Cl-PE) ▲ in [BMIM][Tf₂N] im Verlauf des Satzverfahrens mit 50 g_{BTM} L⁻¹ *Lactobacillus kefir* (JFC), 200 mM Glukose (beide Konzentrationen auf die wässrige Phase bezogen) und 20 % v/v [BMIM][Tf₂N] bei 30°C und 600 min⁻¹ (2,3 W L⁻¹) im 200 mL-Maßstab ohne pH-Regelung. Die Linien dienen nur als visuelle Hilfe.

In Abbildung 8.11 sind die Verläufe der Glukosekonzentration und des pH in der wässrigen Phase dargestellt. Aus dem Verbrauch an Glukose lässt sich erkennen, dass etwa ein Drittel der eingesetzten Glukose während des Prozesses verbraucht wird. Unter der Annahme, dass die Zellen keine Stoffwechselaktivität entfalten, werden also aus jedem Molekül Glukose zwei Moleküle NADPH regeneriert.

Lactobacillus kefir liegt am Ende der Reaktion völlig intakt vor. Die Viabilität beträgt 101,7 % (± 5,8) und damit noch etwas mehr als im 2,8 mL-Maßstab. Während der Reaktion ist allerdings eine verminderte Viabilität zu beobachten.

Es wurden Proben der Dispersion in einer Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop betrachtet. Dabei wurde für die [BMIM][Tf₂N]-Tropfen ein Durchmesser von < 250 µm ermittelt.

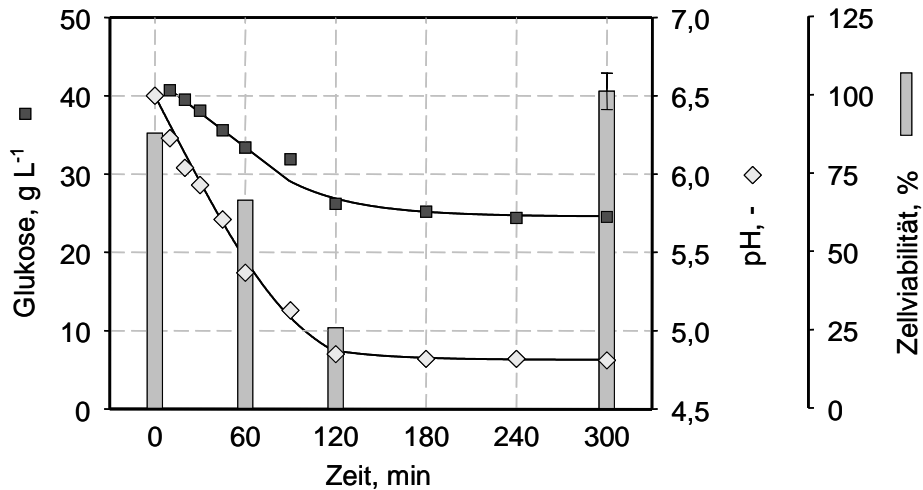


Abbildung 8.11 Verlauf der Glukosekonzentration ■ und des pH ◇ in der wässrigen Phase des Prozesses zur Synthese von (*R*)-1-4-Cl-PE mit *Lactobacillus kefir* im 200 mL-Maßstab. Zu ausgewählten Zeitpunkten wurde die Zellviabilität □ des Biokatalysators mit der BacLight-Methode ermittelt. Die Linien dienen nur als visuelle Hilfe.

8.2.6 Abschätzung der Stofftransportprozesse im 200 mL-Maßstab

Um eine Aussage über die vorherrschende Limitierung des Prozesses im 200 mL-Maßstab machen zu können, wurde der Stofftransport des Edukts über die Phasengrenzfläche [BMIM][Tf₂N]/Puffer abgeschätzt. Dazu wurden die Annahmen und Berechnungen aus Kapitel 3.3.2 verwendet. Die verschiedenen Modelle zur Berechnung des Diffusionskoeffizienten führen bei den eingesetzten Zahlenwerten zu vergleichbaren Ergebnissen ($\pm 5\%$), mit Ausnahme des Modells von Tyn-Calus (-45%), so dass vereinfachend nur mit dem Modell von Wilke-Chang gearbeitet wurde. Damit wurde der Diffusionskoeffizient $D_{E,k}$ zu $8,24 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ abgeschätzt.

Für die Ermittlung des Sauterdurchmessers d_{32} und der Edukttransferrate ETR_{\max} wurden verschiedene Annahmen getroffen, die in Tabelle 8.2 zusammengefasst sind. Bei Berücksichtigung der Viskosität der dispersen Phase (Gleichung 3.21) wird mit 1,8 mm ein recht hoher Wert für den Sauterdurchmesser erhalten (Fall 1). Mit Gleichung 3.13 würde das eine maximale Tropfengröße von 3 mm bedeuten. Visuell werden aber nur Tropfen mit Durchmessern $< 250 \mu\text{m}$ beobachtet. Also führt die Verwendung von Gleichung 3.21 wahrscheinlich zu falschen Ergebnissen, da die Viskosität der dispersen Phase mit 27 mPa s am unteren Rand des für die Formel vorgesehenen Bereichs liegt. Eventuell ist die Viskosität der dispersen Phase sogar noch geringer als für die mit Wasser gesättigte ionische Flüssigkeit angegeben, da eine nicht unerhebliche Menge Edukt und Produkt darin gelöst ist.

Tabelle 8.2 Abgeschätzte Werte für den Sauterdurchmesser d_{32} , die Phasengrenzfläche a_d , den Stoffübergangskoeffizienten β_E und die maximale Edukttransfertrate ETR_{max} unter verschiedenen Annahmen (Fälle 1-6).

Fall	verwendete Gleichungen, Annahmen	d_{32} , μm	a_d , m^{-1}	β_E , m s^{-1}	ETR_{max} , $\mu\text{kat L}^{-1}$
1)	viskose disperse Phase (Gleichung 3.21) kombinierte Viskosität (Gleichung 3.26) Grenzflächen- = Mittelwert Oberflächenspannungen	1818	660	$5,7 \cdot 10^{-8}$	0,23
2)	nicht viskose disperse Phase (Gleichung 3.18) kombinierte Viskosität (Gleichung 3.26) Grenzflächen- = Mittelwert Oberflächenspannungen	257	4667	$5,7 \cdot 10^{-8}$	1,63
3)	nicht viskose disperse Phase (Gleichung 3.18) kombinierte Viskosität (Gleichung 3.27) Grenzflächen- = Mittelwert Oberflächenspannungen	257	4667	$7,3 \cdot 10^{-8}$	2,09
4)	nicht viskose disperse Phase (Gleichung 3.18) kombinierte Viskosität (Gleichung 3.27) Grenzflächen- = Oberflächenspannung [BMIM][Tf ₂ N]	204	5875	$1,2 \cdot 10^{-7}$	4,24
5)	nicht viskose disperse Phase (Gleichung 3.18) kombinierte Viskosität = Viskosität Wasser Grenzflächen- = Oberflächenspannung [BMIM][Tf ₂ N]	204	5875	$1,8 \cdot 10^{-7}$	6,59
6)	nicht viskose disperse Phase (Gleichung 3.18) kombinierte Viskosität = Viskosität Wasser Grenzflächenspannung = $21,05 \text{ g s}^{-2}$	146	8214	$3,7 \cdot 10^{-7}$	18,5

Unter Vernachlässigung der Viskosität ergibt sich mit Gleichung 3.18 ein Wert von 0,26 mm für den Sauterdurchmesser, was den beobachteten Tropfen näher kommt (Fälle 2 und 3). Damit wird eine Phasengrenzfläche von 4667 m^{-1} erhalten und je nach verwendeter Gleichung für die kombinierte Viskosität eine Edukttransfertrate von 1,6-2,1 $\mu\text{kat L}^{-1}$.

Durch die hohe Zellkonzentration ist es möglich, dass die wässrige Phase eine geringere Oberflächenspannung hat als reines Wasser und damit auch eine geringere Grenzflächenspannung. Setzt man letztere gleich der Oberflächenspannung der ionischen Flüssigkeit, so wird eine Phasengrenzfläche von 5875 m^{-1} erhalten und eine Edukttransfertrate von 4,24-6,59 $\mu\text{kat L}^{-1}$ (Fälle 4 und 5).

Aus den Ergebnissen des 200 mL-Prozesses ergibt sich die gemessene Reaktionsgeschwindigkeit und damit die Edukttransfertrate zu 18,5 $\mu\text{kat L}^{-1}$. Damit

liegt die Berechnung der Edukttransfertrate zwar in der richtigen Größenordnung, aber etwa 64 % zu niedrig. Der größte Fehler liegt wahrscheinlich in der unbekanntem Grenzflächenspannung. Mit der Vorgabe der Edukttransfertrate zu $18,5 \mu\text{kat L}^{-1}$ kann aus der Umkehrung der verwendeten Formeln die Grenzflächenspannung zu $21,05 \text{ g s}^{-2}$ ermittelt werden (Fall 6). Diese Annahme wird durch den beobachteten Tropfendurchmesser von $< 250 \mu\text{m}$ bestätigt, der gut mit dem ermittelten Wert von $d_{\text{max}} = 243 \mu\text{m}$ übereinstimmt.

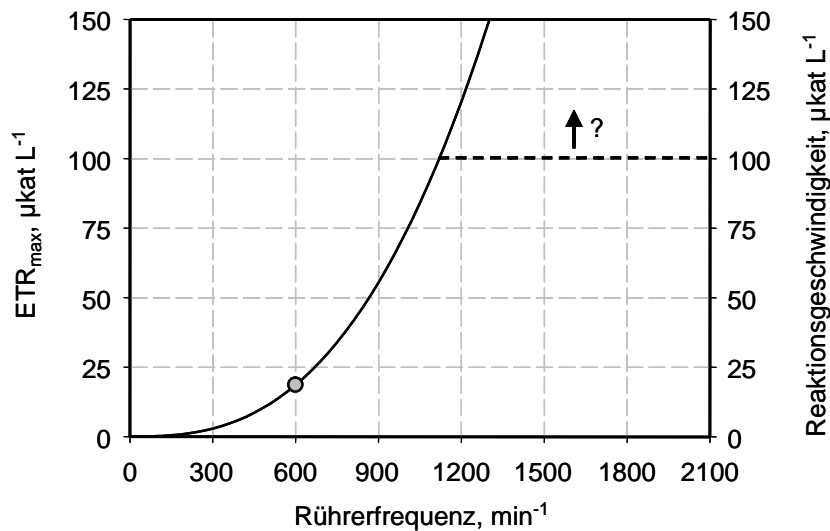


Abbildung 8.12 Darstellung der abgeschätzten Edukttransfertrate (ETR_{max}) bei Erhöhung der Rührerdrehzahl. Die Reaktionsgeschwindigkeit steigt analog bis mindestens $100 \mu\text{kat L}^{-1}$. Arbeitspunkt \circ der durchgeführten Umsetzung.

Für den Fall 6 wurde daraufhin abgeschätzt, wie sich eine Änderung der Rührerdrehzahl auf die Edukttransfertrate auswirkt. Abbildung 8.12 zeigt, wie sich die Edukttransfertrate noch deutlich steigern ließe. Bis circa $100 \mu\text{kat L}^{-1}$ wird die Reaktionsgeschwindigkeit in gleichem Maße folgen, wie im 2,8 mL-Ansatz bewiesen wurde. Darüber ist jedoch nicht klar, ob eine Reaktionsgeschwindigkeit in der Höhe der maximalen Enzymaktivität der Zellen erreicht werden kann ($710 \mu\text{kat L}^{-1}$) oder ob zuvor zum Beispiel der Stoffübergang über die Zellmembran oder die Cofaktor-Regenerierung limitierend wirkt oder ob die Zellen durch die zunehmende Scherbelastung geschädigt werden. Der verwendete Rührfors-Reaktor kann in der vorliegenden Ausstattung bei einer maximalen Rührerdrehzahl von $18,3 \text{ s}^{-1}$ betrieben werden.

8.2.7 Diskussion

Die asymmetrische Reduktion von 4-Cl-AP zu (R)-1-4-Cl-PE mit *Lactobacillus kefir* ist ein gutes Beispiel für den sinnvollen Einsatz von ionischen Flüssigkeiten als Eduktreservoir und *in situ*-Extraktionsmittel in der Ganzzell-Biokatalyse. Die ionischen Flüssigkeiten sind im Gegensatz zu organischen Lösungsmitteln nicht schädlich für die Zellen. Das Signal im Membranintegritätstest für die Reaktionsansätze mit ionischen Flüssigkeiten, besonders mit [OMA][Tf₂N], liefert sogar einen höheren Werte als 100 %. Das gleiche Phänomen in noch stärkerem Ausmaß wurde auch bei Zellen beobachtet, die im exponentiellen Wachstum geerntet und frisch untersucht wurden. Es wird somit vermutet, dass Unterschiede in der Zellkonstitution, die nicht näher untersucht werden konnten, zu abweichenden Ergebnissen im verwendeten Viabilitätstest führen. Dennoch kann den ionischen Flüssigkeiten aufgrund der Ergebnisse eine sehr gute Biokompatibilität bescheinigt werden.

Des Weiteren sind die Verteilungskoeffizienten von Edukt und Produkt zwischen den beiden Phasen so groß, dass sie die toxischen Effekte dieser Stoffe auf die Zellen zum Teil stark verringern. Dadurch wird die Ausbeute an (R)-1-4-Cl-PE von 46 % auf über 90 % verdoppelt und der Enantiomerenüberschuss von 98,0 % auf 99,7 % gesteigert. Diese Prozessführung stellt auch im Vergleich zum mikrodispersen Ansatz mit intermittierender Eduktzudosierung von Amidjojo (2004) eine deutliche Verbesserung dar, mit dem eine Ausbeute von etwa 73 % bei einem Enantiomerenüberschuss von 97,4 % erhalten wurde, wie Abbildung 8.13a veranschaulicht.

Im Vergleich der Reaktionsverläufe zwischen dem einphasigen und den zweiphasigen Reaktionsansätzen wird deutlich, dass im System mit ionischen Flüssigkeiten keine kinetische Limitierung durch dieselben vorliegt. Daraus lässt sich ableiten, dass der Stofftransport des Edukts über die Phasengrenzfläche und die Zellmembran in beiden Systemen gleich schnell verläuft. Die Eduktkonzentration in den Zellen ist jedoch vermutlich < 0,39 mM (K_m der LK-ADH₁, Hummel 1990), da die im Enzymtest gemessene Aktivität während der Umsetzung bei Weitem nicht erreicht wird. Eine andere Erklärungsmöglichkeit für die geringere Reaktionsgeschwindigkeit stellt eine Limitierung in der Cofaktorregenerierung dar.

Nachdem Cull *et al.* (2000) und Howarth *et al.* (2001) nur die prinzipielle Aktivität von Mikroorganismen in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten demonstrieren konnten, ohne einen Nutzen aus deren Anwendung zu ziehen, gelang es nun zum ersten Mal, eine Prozessverbesserung in der Ganzzell-Biokatalyse durch den Einsatz ionischer Flüssigkeiten zu erreichen.

Amidjojo (2004) beobachtete im mikrodispersen Prozess eine Produktbildungskapazität von $4,9 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}$, wie in Abbildung 8.13b zu sehen ist. Im Ansatz mit ionischen Flüssigkeiten wurde zwar nur eine Produktbildungskapazität von $2,8 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ erzielt, eine Steigerung auf $7,6 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ konnte aber durch die Wiederverwendung der Zellen erreicht werden. Beim dritten Einsatz des Biokatalysator wird dabei mit 75,9 % immer noch eine gegenüber dem rein wässrigen Ansatz mit frischen Zellen (46,2 %) und dem mikrodispersen Ansatz (73 %) gesteigerte Ausbeute erzielt. Die gemessene Membranintegrität im dritten Ansatz beträgt noch 19,8 %, was durch die Überlegung bestätigt wird, dass bei den Umsetzungen kein Cofaktor zugegeben wurde und daher noch intakte Zellen vorhanden sein müssen, damit eine Reaktion aufrecht erhalten werden kann.

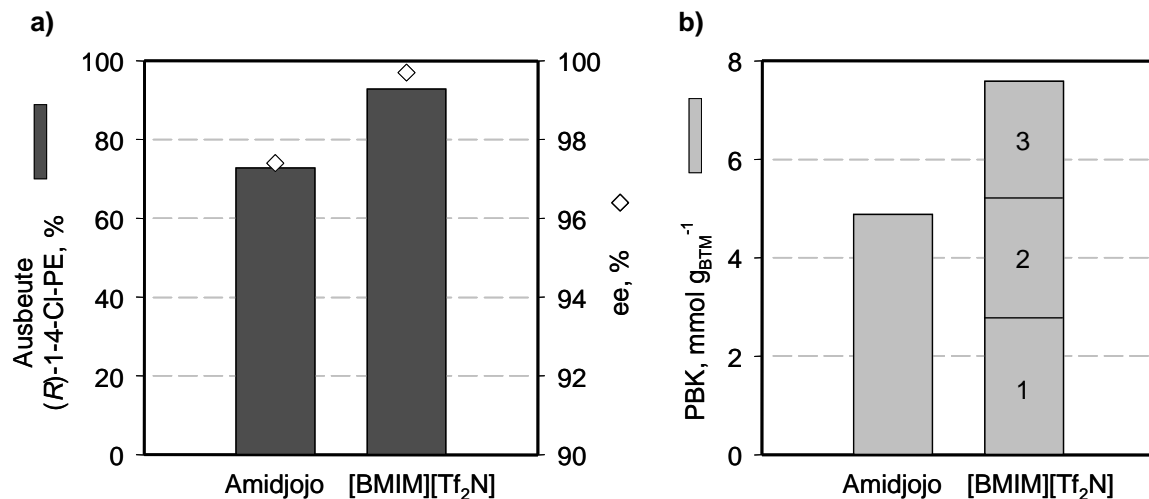


Abbildung 8.13 Asymmetrische Reduktion von 4-Chloracetophenon mit *Lactobacillus kefir*. Vergleich zwischen dem zweiphasigen Prozess mit [BMIM][Tf₂N] als Lösungsmittelphase und dem mikrodispersen Ansatz von Amidjojo (2004). **a)** Chemische Ausbeute an (R)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol (R)-1-4-Cl-PE und Enantiomerenüberschuss (ee). **b)** Produktbildungskapazität (PBK) von *Lactobacillus kefir*. Berücksichtigung des dreifachen Einsatzes der Zellen im zweiphasigen Ansatz.

Der Satzprozess konnte erfolgreich in den 200 mL-Maßstab übertragen werden. Dabei wurde eine Raum-Zeit-Ausbeute von $20,4 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht. Durch Abschätzung des Stoffübergangs konnte gezeigt werden, dass die Reaktion stofftransportlimitiert ist. Daher ist wahrscheinlich durch Erhöhung des Leistungseintrags und folglich des Stofftransports noch eine deutliche Steigerung bis mindestens $100 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ möglich. Dieser Wert wurde im 2,8 mL-Maßstab gemessen. Es wurde aber auch deutlich, dass die Viskosität der ionischen Flüssigkeit für einen

effizienten Prozess nicht viel höher als diejenige von [BMIM][Tf₂N] sein darf, da sonst der Stoffübergang stark verringert wird.

Die Produktkonzentration in [BMIM][Tf₂N] beträgt im 200 mL-Maßstab 81,6 g L⁻¹, was ein sehr guter Wert für einen biokatalytischen Prozess ist (Straathof *et al.* 2002). Auch hier sollte eine weitere Steigerung durch eine höhere Eduktkonzentration möglich sein. Dann ist aber eventuell eine pH-Regelung nötig, was technisch einfach realisierbar ist. Vielleicht ist dies sogar besser für eine Wiederverwendbarkeit der Zellen, da diese dann weniger Stress durch Schwankungen des pH ausgesetzt wären. Dieser Stress könnte auch die verringerte Viabilität während des Prozesses erklären, von dem sie sich nach Ende der pH-Absenkung zwar wieder erholen. Bei mehrmaliger Verwendung als Biokatalysator könnte dies aber eventuell nicht mehr der Fall sein.

Die Produktisolierung und Wiederverwendbarkeit der ionischen Flüssigkeit wurde in dieser Arbeit zwar nicht durchgeführt, sie sollte aber mit herkömmlichen Methoden kein Problem darstellen. Von Vorteil ist dabei, dass die ionische Flüssigkeit im Gegensatz zu vielen organischen Lösungsmitteln nicht zur Ausbildung stabiler Emulsionen mit der Zellsuspension führt, so dass eine Phasentrennung leicht möglich ist (Schmid *et al.* 1998, Abbildung 8.14). Bei Verwendung organischer Lösungsmittel muss die entstandene Emulsion zum Beispiel aufwändig durch Zugabe isolierter Hydrolase-Enzyme aufgearbeitet werden (Jörg *et al.* 2004).

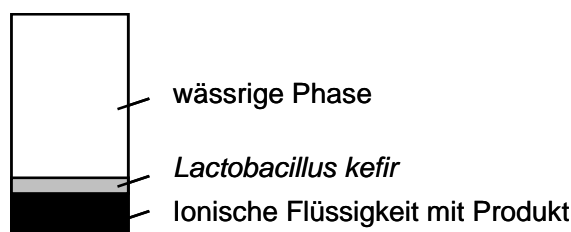


Abbildung 8.14 Schematische Darstellung der Phasenverteilung nach Zentrifugation eines Ansatzes zur Ganzzell-Biokatalyse im System ionische Flüssigkeit/Wasser.

Die Produktextraktion mit organischen Lösungsmitteln wurde in dieser Arbeit zwar zu analytischen Zwecken durchgeführt. Für die Aufreinigung stellt sie aber keine sinnvolle Alternative dar, weil der Einsatz organischer Lösungsmittel den Bemühungen um einen umweltfreundlichen Prozess entgegen steht. Die Produktisolierung mittels Destillation ist dagegen eine einfache und effiziente Methode, da die ionische Flüssigkeit selbst keinen Dampfdruck besitzt (Schöfer *et al.* 2001). Bei schwieriger zu verdampfenden Stoffen können die Membranfiltration, Perva-

poration oder Extraktion mit überkritischen Fluiden durchgeführt werden (Blanchard *et al.* 1999, Kröckel und Kragl 2003, Schäfer *et al.* 2001).

Die großen Viabilitätsunterschiede zwischen Zellen von Jülich Fine Chemicals und aus eigener Herstellung sind eventuell auf die verschiedenartige Kultivierung, die Aufkonzentrierung und die Einfrierprozedur zurückzuführen. Amidjojo (2004) stellte bereits Differenzen in den formalkinetischen Parametern der Zellen fest.

Bei Umsetzungen im 2,8 mL-Maßstab wird eine ADH₁-Aktivität der Zellen von circa 1,5-2 $\mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$ genutzt, im 200 mL-Maßstab sogar nur 0,37 $\mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$. Da die maximale ADH₁-Aktivität zu 14,1 $\mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$ bestimmt wurde, heißt das, dass der Stofftransport oder die Cofaktor-Regenerierung limitierend wirkt. Für diesen Einsatz der Biokatalysatoren wäre also ein Prozess zur Herstellung des Biokatalysators mit höherem Sauerstoffeintrag möglich, bei dem die maximale Enzymaktivität geringer, die erreichte Biomassekonzentration aber größer ist.

9 Erweiterte Untersuchung der Eigenschaften ionischer Flüssigkeiten

Es wurden weitere Edukte und Produkte asymmetrischer Ketonreduktionen auf ihre Verteilungskoeffizienten zwischen ionischen Flüssigkeiten und Puffer hin untersucht und gemeinsam mit den früheren Ergebnissen vergleichend betrachtet, um daraus Vorhersagen für weitere Stoffsysteme treffen zu können. Darüber hinaus wurde die Biokompatibilität ionischer Flüssigkeiten gegenüber weiteren Mikroorganismen ermittelt und ebenfalls für alle untersuchten Mikroorganismen diskutiert.

9.1 Löslichkeiten und Verteilungskoeffizienten

Für die laut Merck Chemie Datenbank gut wasserlöslichen Stoffe 2,5-Hexandion und 2,5-Hexandiol wurden Verteilungskoeffizienten zwischen ionischen Flüssigkeiten und Puffer von $\log D = 1,1-1,3$ und $\log D = 0,8-1,0$ ermittelt, wie in Abbildung 9.1 dargestellt. Damit liegen sie ähnlich niedrig wie die Verteilungskoeffizienten von 4-Cl-ACE und 4-Cl-HBE. Dadurch ist wahrscheinlich kein sinnvoller Einsatz ionischer Flüssigkeiten als Eduktreservoir und *in situ*-Extraktionsmittel für die asymmetrische Reduktion von 2,5-Hexandion möglich.

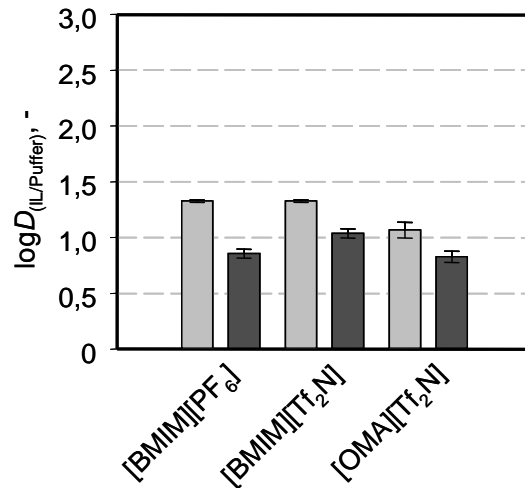


Abbildung 9.1 Verteilungskoeffizienten $\log D$ von 2,5-Hexandion \square und 2,5-Hexandiol \blacksquare zwischen verschiedenen ionischen Flüssigkeiten (IL) und Puffer.

Abbildung 9.2 zeigt, dass die Verteilungskoeffizienten von 2-Octanon und 2-Octanol zwischen ionischen Flüssigkeiten und Puffer $\log D = 2,3-2,9$ und $\log D = 1,7-2,3$ betragen. Diese Werte sind vergleichbar mit den Verteilungskoeffizienten von 4-Cl-AP und 1-4-Cl-PE, was 2-Octanon zu einem guten Kandidaten für eine asymmetrische Reduktion mit ganzen Zellen im zweiphasigen System ionische Flüssigkeit/Puffer macht.

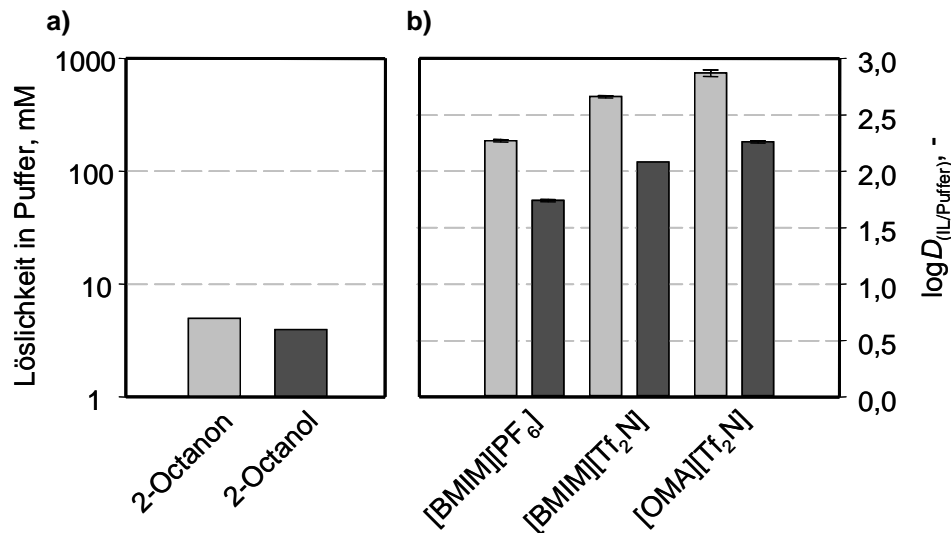


Abbildung 9.2 a) Löslichkeitsgrenzen von 2-Octanon und 2-Octanol in wässriger Phase (Puffer). b) Verteilungskoeffizienten $\log D$ von 2-Octanon \square und 2-Octanol \blacksquare zwischen verschiedenen ionischen Flüssigkeiten (IL) und Puffer.

Diskussion

Die Untersuchung der Löslichkeit beziehungsweise die Mischbarkeit von Ketonen und Alkoholen zeigt, dass ionische Flüssigkeiten sehr gute Lösungsmittel für diese Stoffklassen darstellen.

Die Verteilungskoeffizienten zwischen ionischen Flüssigkeiten und Puffer aller in dieser Arbeit untersuchten Edukte und Produkte sind in Abbildung 9.3 über dem $\log P$, also dem Verteilungskoeffizienten zwischen 1-Octanol und Wasser des jeweiligen Stoffes aufgetragen. In der Literatur wird oft ein linearer Zusammenhang zwischen beiden Werten angenommen (Huddleston *et al.* 2001, Wasserscheid und Welton 2003). Dies scheint sich hier nur bedingt zu bestätigen.

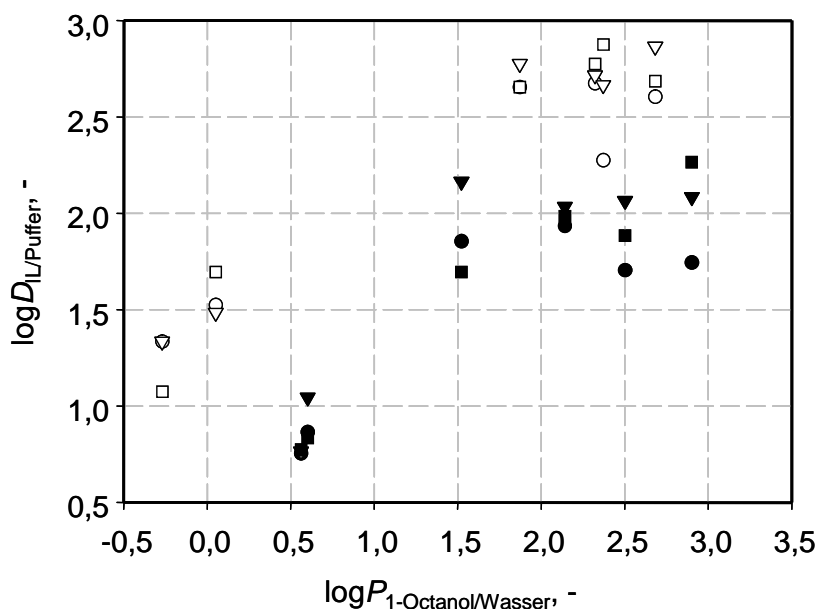


Abbildung 9.3 Auftragung der Verteilungskoeffizienten $\log D$ zwischen den ionischen Flüssigkeiten (IL) [BMIM][PF₆] ○, ●, [BMIM][Tf₂N] ▽, ▼ bzw. [OMA][Tf₂N] □, ■ und Puffer gegen die Verteilungskoeffizienten $\log P$ zwischen 1-Octanol und Wasser der untersuchten Ketone ○, ▽, □ und Alkohole ●, ▼, ■ (siehe auch Tabelle 14.26).

Für $\log P < 1,5-2$ wurden nur wenige Werte ermittelt. Dort könnte eine lineare Korrelation möglich sein. Darüber scheint eine weitere Erhöhung des $\log P$ jedoch keinen Einfluss auf den $\log D$ zu haben. Für Ketone werden generell höhere $\log D$ ermittelt als für die korrespondierenden Alkohole. Für $\log P$ gilt oft der umgekehrte Zusammenhang (Tabelle 14.26). Vermutlich findet die Hydroxylgruppe als Wasserstoffdonor für Wasserstoffbrücken in der ionischen Flüssigkeit im Gegensatz zum 1-Octanol keinen entsprechenden Akzeptor. Dadurch könnte die

zusätzliche Wasserstoffbrücke mit Wasser zu einer Verschiebung des Verteilungskoeffizienten in Richtung Puffer führen.

Allgemein lässt sich jedoch sagen, dass sich Stoffe mit $\log P < 1,0$ eher schlecht für eine Reaktionsführung und Extraktion mit ionischen Flüssigkeiten eignen. Dazu gehören auch tendenziell Mehrfachketone und -alkohole. Gut geeignet sind dagegen stark hydrophobe Stoffe, wie Einfachketone und -alkohole mit großen aliphatischen oder aromatischen Resten.

Die Unterschiede zwischen den untersuchten ionischen Flüssigkeiten sind weniger deutlich. Tendenziell ergeben sich für [BMIM][Tf₂N] höhere Verteilungskoeffizienten als für [BMIM][PF₆]. [OMA][Tf₂N] liefert zum Teil höhere, zum Teil niedrigere Werte. Somit kann mit den bisherigen Ergebnissen nicht auf eine Struktur-Eigenschafts-Beziehung der ionischen Flüssigkeiten gegenüber den Verteilungskoeffizienten geschlossen werden.

9.2 Biokompatibilität

Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse zur Biokompatibilität ionischer Flüssigkeiten auf andere, zur Ganzzell-Biokatalyse viel genutzte Mikroorganismen zu überprüfen, wurden *Saccharomyces cerevisiae* Wildtyp, *Escherichia coli* Wildtyp und rekombinante *Escherichia coli* untersucht.

Abbildung 9.4 zeigt, dass *Saccharomyces cerevisiae* Wildtyp nach 20 Stunden Inkubation unter Reaktionsbedingungen im rein wässrigen System zu fast 40 % geschädigt wird. Gegenüber organischen Lösungsmitteln sind die Zellen relativ robust. Ionische Flüssigkeiten sind ebenfalls nicht schädlich. [BMIM]PF₆ und [BMIM][Tf₂N], ähnlich wie in geringerem Maße *n*-Dekanol, führen darüber hinaus jedoch zu einem Schutz der Zellen vor Schädigung aufgrund der Reaktionsbedingungen bei der Biokatalyse.

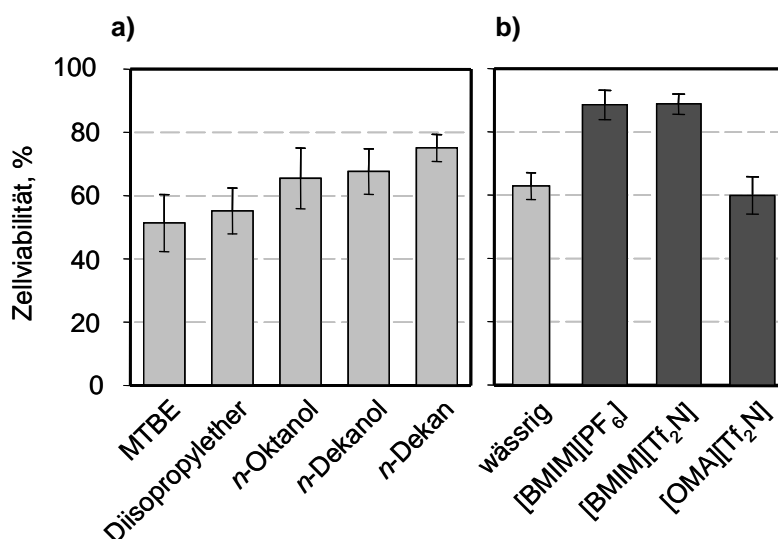


Abbildung 9.4 Prozentuale Viabilität von 20 g_{BTM} L⁻¹ *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 (Wildtyp) bestimmt mittels der Methylenblau-Färbemethode nach 20 Stunden Inkubation bei 27°C und 300 min⁻¹ mit: **a)** 20 % v/v organischen Lösungsmitteln, **b)** 20 % v/v ionischen Flüssigkeiten im Vergleich zum einphasig-wässrigen Ansatz.

Escherichia coli Wildtyp ist nach 5 Stunden unter Reaktionsbedingungen ebenfalls bereits im rein wässrigen System zu knapp 40 % geschädigt, wie Abbildung 9.5 zeigt. In Gegenwart organischer Lösungsmittel, mit Ausnahme von *n*-Dekanol, ist sogar weniger als 10 % Restviabilität messbar. Ionische Flüssigkeiten zeigen auch hier keine schädigenden Effekte, allerdings auch keine schützenden.

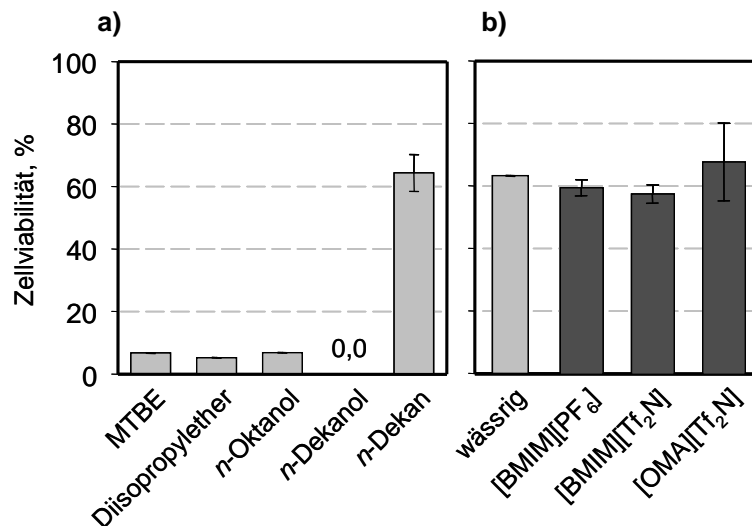


Abbildung 9.5 Prozentuale Viabilität von $20 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ *Escherichia coli* K12 DSM 498 (Wildtyp) bestimmt mittels des BacLight-Membranintegritätstests nach 5 Stunden Inkubation bei 27°C und 350 min^{-1} mit: **a)** 20 % v/v organischen Lösungsmitteln, **b)** 20 % v/v ionischen Flüssigkeiten im Vergleich zum einphasig-wässrigen Ansatz.

In Abbildung 9.6 ist zu erkennen, dass sich für die rekombinanten *Escherichia coli* DH5 α PFADH ein ähnliches Bild ergibt. Die organischen Lösungsmittel haben mit Ausnahme von *n*-Dekanol einen zerstörerischen Effekt, die ionischen Flüssigkeiten dagegen nicht. [BMIM][Tf₂N] reduziert jedoch die Zellviabilität nach 5 Stunden Inkubation um knapp 40 % gegenüber der rein wässrigen Referenz.

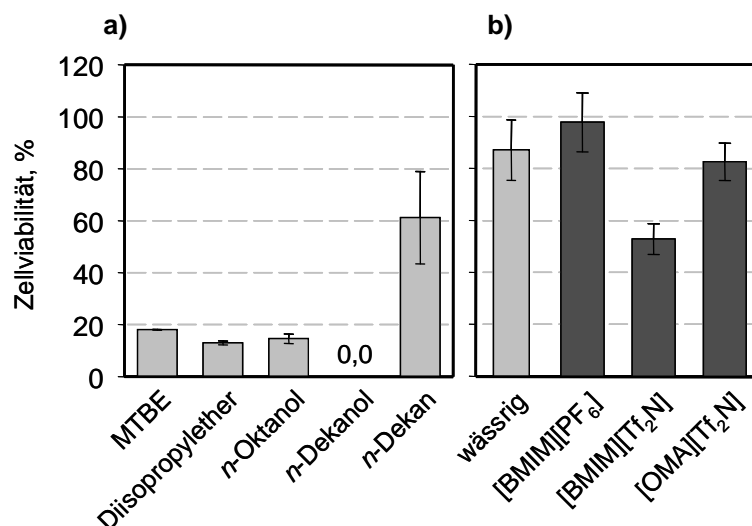


Abbildung 9.6 Prozentuale Viabilität von $20 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ *Escherichia coli* DH5 α PFADH bestimmt mittels des BacLight-Membranintegritätstests nach 5 Stunden Inkubation bei 20°C und 350 min^{-1} mit: **a)** 20 % v/v organischen Lösungsmitteln, **b)** 20 % v/v ionischen Flüssigkeiten im Vergleich zum einphasig-wässrigen Ansatz.

Diskussion

Die Untersuchungen zur Biokompatibilität ionischer Flüssigkeiten zeigen, dass [BMIM][PF₆], [BMIM][Tf₂N] und [OMA][Tf₂N] keinen schädigenden Einfluss auf *Lactobacillus kefir*, *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* haben. Eine Ausnahme macht [BMIM][Tf₂N] bei *Escherichia coli* DH5α PFADH, was nicht erklärt werden kann. Die Ursache für die gute Biokompatibilität der ionischen Flüssigkeiten liegt wahrscheinlich darin begründet, dass die in allen Zellarten vorhandene Lipiddoppelschicht der Plasmamembran unzugänglich für Ionen ist und die ionischen Flüssigkeiten damit im Gegensatz zu organischen Lösungsmitteln keine Veränderung der Membran hervorrufen.

Somit können ionische Flüssigkeiten als biokompatible Lösungsmittel sowohl für Gram-positive und Gram-negative Bakterien als auch für Hefen eingesetzt werden. In Systemen, in denen sie als Eduktreservoir und *in situ*-Extraktionsmittel verwendet werden, reduzieren sie die Toxizität von Edukten und/oder Produkten und führen dadurch zu intakteren Zellen im Reaktionsansatz. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für gute Ausbeuten, da nur intakte Zellen eine optimale Cofaktorregenerierung ohne Zugabe von externem Cofaktor ermöglichen. Bei Verwendung organischer Lösungsmittel wurde dagegen die Abnahme der intrazellulären Cofaktorkonzentration nachgewiesen und als Ursache für geringe Ausbeuten erkannt (Griffin *et al.* 2001). Nakamura *et al.* (2003) konnten ebenfalls zeigen, dass acetonetrocknete *Geotrichum candidum* Acetophenon erst bei Zugabe von Cofaktor und Cosubstrat reduzieren, wohingegen unbehandelte, also intakte Zellen keine Cofaktorzugabe benötigen.

Die Tatsache, dass verschiedene ionische Flüssigkeiten trotz gleicher Verteilungskoeffizienten die Toxizität von Edukt und Produkt unterschiedlich stark reduzieren, ist nicht ohne weitere Untersuchungen eindeutig erklärbar. Mögliche Ursachen dafür sind unterschiedliche Konzentrationen von Edukt und Produkt während der Reaktion aufgrund von verschiedenen Stofftransportraten oder aber ein unterschiedlicher gemeinsamer Einfluss von Edukt/Produkt und ionischer Flüssigkeit auf die Zellmembran.

10 Leitfaden zur Verwendung ionischer Flüssigkeiten in der Ganzzell-Biokatalyse

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit zur Ganzzell-Biokatalyse in zweiphasigen Systemen ionische Flüssigkeit/Wasser wurde ein Leitfaden für den sinnvollen Einsatz ionischer Flüssigkeiten und die dazugehörigen Untersuchungen entwickelt. Im Folgenden wird das Vorgehen an einem verallgemeinerten Szenario von der Idee bis zur Prozessentwicklung dargestellt:

Idee und Ziel: Herstellung eines Produkts mittels Ganzzell-Biokatalyse

Die Ganzzell-Biokatalyse verspricht einige Vorteile zur Herstellung von chiralen Intermediaten. Dazu gehören die günstige Gewinnung des Katalysators, die hohe Regio- und Stereoselektivität der enzymatisch katalysierten Reaktionen, die Möglichkeit einer einfachen Cofaktorregenerierung und die milden Reaktionsbedingungen. Voraussetzung ist, dass ein geeigneter, eventuell rekombinanter Mikroorganismus zur Verfügung steht, der die gewünschte Reaktion katalysiert und keine Nebenaktivitäten aufweist.

Problem: Geringe Löslichkeit und/oder Instabilität von Edukt/Produkt im wässrigen Medium und/oder Toxizität/Inhibierung der Mikroorganismen

Bei vielen industriell relevanten Reaktionen sind zum Beispiel Edukt oder Produkt schlecht wasserlöslich oder instabil in wässrigem Medium oder sie wirken toxisch oder inhibierend auf den Biokatalysator. Dadurch besteht ein Bedarf, eine Prozessführungsstrategie anzuwenden, die die effektiven Konzentrationen in der wässrigen Phase, also der Umgebung der Mikroorganismen, verringert, ohne jedoch die Effizienz des Gesamtprozesses, zum Beispiel charakterisiert durch die

erreichte Produktkonzentration zu beeinträchtigen. Dies ist einfach durch den Einsatz eines Zwei-Flüssigphasen-Systems realisierbar.

Erste Lösungsmöglichkeit unbrauchbar: Organische Lösungsmittel toxisch für den Biokatalysator

Für herkömmliche Zwei-Flüssigphasen-Systeme werden organische Lösungsmittel eingesetzt. Diese können so gewählt werden, dass sie Edukt und Produkt gut lösen, also als Eduktreservoir und *in situ*-Extraktionsmittel fungieren und somit die Konzentrationen in der wässrigen Phase verringern. Meistens haben die organischen Lösungsmittel jedoch selbst eine schädigende Wirkung auf die Mikroorganismen, vor allem durch ihre membranzerstörenden Eigenschaften.

Darüber hinaus ist die Verwendung organischer Lösungsmittel aus Gründen des Arbeits-, Umwelt- und Klimaschutzes in zunehmendem Maße unerwünscht. Der Einsatz ionischer Flüssigkeiten kann also zu Prozessverbesserungen führen.

Ionische Flüssigkeiten als Alternative zu organischen Lösungsmitteln:

Untersuchung der Biokompatibilität ionischer Flüssigkeiten

Zunächst müssen aus der großen Zahl möglicher, nicht mit Wasser mischbarer ionischer Flüssigkeiten diejenigen identifiziert werden, die für einen industriellen Einsatz in Frage kommen. Wichtige Kriterien dabei sind die Verfügbarkeit, die Kosten, die Viskosität, die Stabilität, die Eignung für produktabtrennende und aufarbeitende Methoden, die korrosiven Eigenschaften, eventuell die toxikologischen Werte und andere. Falls dazu noch keine Daten vorliegen, muss die Biokompatibilität der ionischen Flüssigkeiten bestimmt werden, um möglicherweise als zweite Phase in der Ganzzell-Biokatalyse eingesetzt werden zu können. Dazu werden die als Biokatalysator eingesetzten Zellen unter Reaktionsbedingungen inkubiert und die Viabilität der Zellen von Zwei-Phasen-Ansätzen mit ionischen Flüssigkeiten mit rein wässrigen Ansätzen verglichen. Werden die Zellen durch die Gegenwart ionischer Flüssigkeiten nicht geschädigt, qualifiziert sich die ionische Flüssigkeit für weitere Untersuchungen.

Lösungsmittleigenschaften ionischer Flüssigkeiten: Verteilungskoeffizienten von Edukt und Produkt zwischen ionischen Flüssigkeiten und Puffer

Anschließend müssen die ausgewählten ionischen Flüssigkeiten auf ihre Eigenschaften als Lösungsmittel hin untersucht werden. Hierzu zählt besonders die Löslichkeit/Mischbarkeit des Edukts und des Produkts sowie die Verteilungskoeffizienten $\log D$ der Stoffe zwischen der ionischen Flüssigkeit und dem verwendeten Puffer. Die Verteilungskoeffizienten sind entscheidend für die Reduzierung der wässrigen Konzentrationen von Edukt und Produkt und damit für die Verringerung der Toxizität oder Instabilität. Dafür sind Werte für $\log D$ von größer 2 wünschenswert, wie sie unter anderem für viele einfache Ketone und Alkohole mit hydrophober Seitenkette erreicht werden.

Der Verteilungskoeffizient spielt jedoch auch noch prozesstechnisch eine Rolle. Ist der $\log D$ für das Edukt sehr groß, steigt die Wahrscheinlichkeit für eine Stofftransportlimitierung, was natürlich noch abhängig von weiteren Faktoren ist, wie zum Beispiel der Phasengrenzfläche und dem Diffusionskoeffizienten. Als Richtwert kann ein $\log D \leq 3$ dienen. Außerdem bestimmt der $\log D$ für das Produkt die Effektivität der *in situ*-Extraktion und damit die Prozessausbeute und sollte dafür möglichst groß sein (≥ 2). Die Verteilungskoeffizienten von Edukt und Produkt sollten also idealerweise im Bereich $2 \leq \log D \leq 3$ liegen.

Prozessentwicklung: Optimierung der Prozessparameter

Als erster Schritt einer Prozessentwicklung muss die Fähigkeit der ausgewählten ionischen Flüssigkeiten untersucht werden, die Toxizität oder Instabilität des Edukts und des Produkts zu verringern oder aufzuheben. Die Erfahrungen zeigen, dass zum Beispiel für die Reduzierung der Toxizität eine Untersuchung der Biokompatibilität der ionischen Flüssigkeiten und die Ermittlung der Verteilungskoeffizienten alleine nicht hinreichend ist. So führen ionische Flüssigkeiten mit gleicher Biokompatibilität und Verteilungskoeffizienten zu unterschiedlichen Ergebnissen der Zellviabilität nach einer Umsetzung. Daraufhin wird die Zahl der in Betracht kommenden ionischen Flüssigkeiten weiter reduziert und die üblichen Optimierungsmethoden können zur Prozessentwicklung herangezogen werden.

Dabei muss beachtet werden, dass es aufgrund des Verteilungsgleichgewichts des Edukts zwischen beiden Phase sowie durch eine mögliche Stofftransportlimitierung zu einer kinetischen Limitierung der Reaktion kommen kann. In diesem Fall muss versucht werden, durch die Wahl der ionischen Flüssigkeit und des Leistungseintrags eine bessere Eduktverfügbarkeit zu erreichen.

11 Zusammenfassung und Ausblick

Enantiomerenreine Chemikalien können mit Hilfe von ganzen Zellen als Biokatalysatoren unter einfachen und umweltschonenden Bedingungen hergestellt werden. Die schlechte Wasserlöslichkeit und Instabilität von Edukten und Produkten sowie deren Toxizität für die eingesetzten Mikroorganismen verhindern allerdings oft eine ökonomische Prozessführung. Ziel dieser Arbeit war es, das Potenzial ionischer Flüssigkeiten zur Steigerung der Effizienz der Ganzzell-Biokatalyse anhand konkreter Beispiele abzuschätzen und allgemein gültige Leitlinien für deren Einsatz zu formulieren.

Zunächst konnte die Verfügbarkeit der Biokatalysatoren mit guter Qualität durch die Entwicklung von Zulaufprozessen gewährleistet werden. Für *Trigonopsis variabilis* wurde mit einem 2-stufigen Verfahren im 5 L-Maßstab mit $2,9 \mu\text{kat L}^{-1} \text{h}^{-1}$ eine gegenüber dem besten in der Literatur beschriebenen Prozess um 21 % gesteigerte Raum-Zeit-Ausbeute der D-Aminosäureoxidase-Aktivität erreicht, bei ähnlicher volumetrischer Enzymaktivität. Mit einem 4-stufigen Verfahren wurde dagegen eine Verbesserung der volumetrischen D-Aminosäureoxidase-Aktivität um 36 % auf $164 \mu\text{kat L}^{-1}$ erzielt, bei ähnlicher Raum-Zeit-Ausbeute wie in der Literatur.

Für *Lactobacillus kefir* wurde im 5 L-Maßstab eine volumetrische Alkoholdehydrogenase-Aktivität von $200 \mu\text{kat L}^{-1}$ erreicht, was einer Steigerung um 610 % im Vergleich zum einzigen publizierten Verfahren entspricht. Für die Raum-Zeit-Ausbeute bedeutet dies eine Erhöhung um 350 % auf $2,7 \mu\text{kat L}^{-1} \text{h}^{-1}$. Dieser Prozess wurde erfolgreich in den 150 L-Maßstab übertragen. Dabei konnte eine Steigerung der volumetrischen Alkoholdehydrogenase-Aktivität um 440 % und der Raum-Zeit-Ausbeute um 250 % im Vergleich zur Literatur erzielt werden. Darüber hinaus wurden die Kosten für die Komplexbestandteile des Mediums auf 11,4 % der Kosten für das in der Literatur beschriebene Medium reduziert.

Für den Einsatz ionischer Flüssigkeiten in der Ganzzell-Biokatalyse wurde die Racematspaltung von Aminosäuren mit *Trigonopsis variabilis* als erstes Modellsystem untersucht. Es stellte sich allerdings heraus, dass weder die Aminosäuren noch deren Oxidationsprodukte in den verwendeten ionischen Flüssigkeiten signifikant löslich sind, dass [BMIM][BF₄] nicht als Löslichkeitsvermittler eingesetzt werden kann und dass die ionischen Flüssigkeiten weder im einphasigen noch im zweiphasigen Ansatz zu einer Erhöhung der D-Aminosäureoxidase-Aktivität der Zellen führen. Dadurch ist für dieses Modellsystem keine Verbesserung durch den Einsatz ionischer Flüssigkeiten möglich.

Daraufhin wurden asymmetrische Ketonreduktionen mit Alkoholdehydrogenase-aktiven Mikroorganismen durchgeführt, wobei aufgrund der Toxizität der beteiligten Stoffe nur der zweiphasige Ansatz untersucht wurde. Es zeigte sich, dass Edukte und Produkte dieser Reaktionen sehr gut in den ionischen Flüssigkeiten [BMIM][PF₆], [BMIM][Tf₂N] und [OMA][Tf₂N] löslich sind, deren Verteilungskoeffizienten zwischen ionischen Flüssigkeiten und wässriger Phase aber unterschiedlich sind. Bei der Synthese von (S)-4-Chlor-3-hydroxybuttersäureethylester mit *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 und von (3R,5S)-6-Chlor-3,5-dihydroxyhexansäure-*tert*-butylester mit *Lactobacillus kefir* konnte die Ausbeute durch die Verwendung ionischer Flüssigkeiten zwar von 44 % auf 80 % beziehungsweise von 48 % auf 81 % gesteigert werden, ein Teil des gewonnenen Produkts blieb aber aufgrund der niedrigen Verteilungskoeffizienten in der wässrigen Phase zurück. Im Fall von (S)-4-Chlor-3-hydroxybuttersäureethylester reduzierte die ionische Flüssigkeit zwar die Toxizität des Edukts deutlich, eine weitere Verringerung wäre jedoch bei einem höheren Verteilungskoeffizienten wahrscheinlich. Damit konnte der Bereich der Verteilungskoeffizienten der Edukte und Produkte für einen effizienten Einsatz ionischer Flüssigkeiten auf $2 \leq \log D \leq 3$ eingegrenzt werden.

Des Weiteren stellte sich heraus, dass ionische Flüssigkeiten im Vergleich zu vielen organischen Lösungsmitteln keine schädigende Wirkung auf die untersuchten Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien sowie Hefen haben. Hohe Verteilungskoeffizienten vorausgesetzt, können sie dadurch die Toxizität von Edukten und Produkten in der Ganzzell-Biokatalyse herabsetzen, ohne selbst zu einer Zellschädigung zu führen. Dies konnte bei der Synthese von (R)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol klar demonstriert werden, wie in Abbildung 11.1a gezeigt. Nach der Reaktion liegen die Zellen zu circa 80 % intakt vor, im Vergleich zu weniger als 10 % im Falle des rein wässrigen Ansatzes oder eines zweiphasigen Ansatzes mit organischen Lösungsmitteln. Dies führt dazu, dass die Ausbeute auf 93 % und der

Enantiomerenüberschuss auf 99,7 % gesteigert wird, dargestellt in Abbildung 11.1b und c.

Die Zellen konnten nach diesem Prozess erneut als Biokatalysator verwendet werden. Beim dritten Einsatz wurde immer noch eine Ausbeute von 75,9 % erreicht. Damit wurde die gute Biokompatibilität der ionischen Flüssigkeit und ihre Fähigkeit, die toxischen Effekte von Edukt und Produkt zu reduzieren, erneut bewiesen.

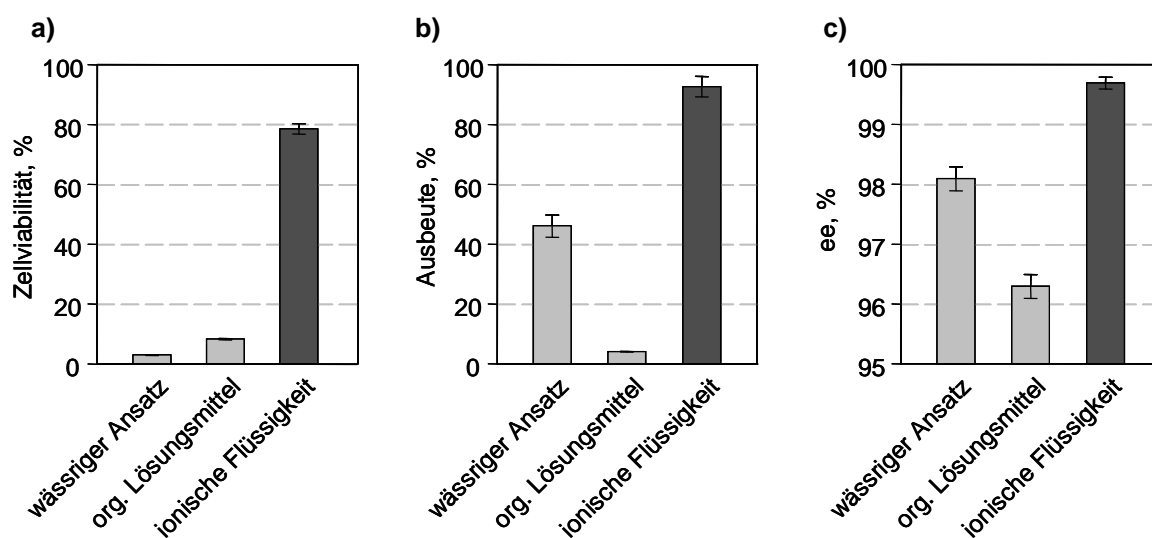


Abbildung 11.1 Asymmetrische Reduktion von 150 mM 4-Chloracetophenon zu (*R*)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol mit $50 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ *Lactobacillus kefir*. Vergleich unterschiedlicher Prozessführungen: rein wässriger Ansatz, zweiphasiger Ansatz mit 20 % v/v organischem Lösungsmittel (Methyl-*tert*-butylether) und zweiphasiger Ansatz mit 20 % v/v ionischer Flüssigkeit ([BMIM][Tf₂N]). **a)** Prozentuale Viabilität von *Lactobacillus kefir* nach der Reaktion. Der Ansatz mit Methyl-*tert*-butylether enthielt für diese Messung kein Edukt, wahrscheinlich liegt der Wert mit Edukt noch niedriger. **b)** Ausbeute an (*R*)-1-(4-Chlorphenyl)-ethanol. **c)** Enantiomerenüberschuss (ee) von (*R*)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol. Alle Konzentrationen sind auf das Volumen der wässrigen Phase bezogen.

Die asymmetrische Reduktion von 4-Chloracetophenon mit *Lactobacillus kefir* im zweiphasigen System ionische Flüssigkeit [BMIM][Tf₂N]/Wasser wurde erfolgreich in den 200 mL-Maßstab vergrößert. Nach Abschätzung des Stoffübergangs konnte gezeigt werden, dass die Reaktion stofftransportlimitiert ist und somit die Reaktionsgeschwindigkeit durch Erhöhung des Leistungseintrags gesteigert werden könnte, wie es bereits im kleinen Maßstab beobachtet wurde.

Damit gelang der Nachweis, dass der Einsatz ionischer Flüssigkeiten zu effizienteren Produktionsprozessen führen kann. Voraussetzungen dafür sind die Verfügbarkeit eines geeigneten Ganzzell-Biokatalysators, eine geringe Löslichkeit oder Instabilität der Edukte und Produkte in wässriger Phase und deren Toxizität auf die Mikroorganismen sowie geeignete Verteilungskoeffizienten und eine geringe Viskosität der ionischen Flüssigkeit.

Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Eignung ionischer Flüssigkeiten als Eduktreservoir und *in situ*-Extraktionsmittel in der Ganzzell-Biokatalyse demonstriert. Da ionische Flüssigkeiten aufgrund ihres hohen Preises jedoch als Investitionsgut angesehen werden müssen, wäre die Untersuchung verschiedener Methoden zur Produktisolierung aus der ionischen Flüssigkeit und die Ermittlung der erreichbaren Zykluszahlen von Bedeutung.

Zu den möglichen Methoden, das Produkt von der ionischen Flüssigkeit abzutrennen, gehören die (Vakuum-) Destillation, die Membranfiltration, die Pervaporation, die Perstraktion und die Extraktion mit überkritischen Fluiden. Dabei ist es wichtig, dass die ionische Flüssigkeit möglichst unverändert aus diesem Verfahrensschritt hervorgeht, um für einen Wiedereinsatz zur Verfügung zu stehen.

Darüber hinaus wäre eine experimentelle Bestätigung der zunächst am Beispiel der asymmetrischen Reduktion von 4-Chloracetophenon mit *Lactobacillus kefir* abgeschätzten Dispersionseigenschaften und des Stoffübergangs von Interesse. Hier ist vor allem die Bestimmung der Grenzflächenspannung zwischen den beiden Phasen unter Reaktionsbedingungen bedeutsam.

Des Weiteren wäre es lohnenswert, alternative Prozessstrategien wie zum Beispiel ein kontinuierliches Verfahren mit gekoppelter Produktabtrennung zu entwickeln, da durch die hohe Dichtedifferenz und das Ausbleiben einer Emulsionsbildung die Phasentrennung stark begünstigt ist. Hierdurch ließe sich zum einen die Raum-Zeit-Ausbeute stark erhöhen. Zum anderen könnten im Gegensatz zum Satz- oder Zulaufverfahren optimale Betriebspunkte langfristig aufrecht erhalten oder gegebenenfalls an abnehmende Biokatalysatoraktivitäten angepasst werden.

12 Literaturverzeichnis

Agranat I, Caner H, Caldwell A (2002): Putting chirality to work: The strategy of chiral switches. *Nature Rev Drug Disc* 1(10), 753-768.

Amidjojo M (2004): Reaktionstechnische Untersuchungen zur asymmetrischen Synthese von chiralen Alkoholen mit *Lactobacillus kefir*. *Dissertation an der Technischen Universität München*.

Amidjojo M, Weuster-Botz D (2005): Asymmetric synthesis of the chiral synthon ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate using *Lactobacillus kefir*. *Tetrahedron Asymm* 16, 899-901.

Anderson BA, Hansen MM, Harkness AR, Henry CL, Vicenzi JT, Zmijewski MJ (1995): Application of a practical biocatalytic reduction to an enantioselective synthesis of the 5H-2,3-Benzodiazepine LY300164. *J Am Chem Soc* 117(49), 12358-12359.

Axelsson L (1998): Lactic acid bacteria: Classification and physiology. Ed. Salminen S, von Wright A. Marcel Dekker Verlag, New York, Basel, Hong Kong 1-72.

Bast E (1999): Mikrobiologische Methoden. Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer, 293.

Beck G, Jendralla H, Kessler K (1995): Practical Large Scale Synthesis of tert-Butyl (3R,5S)-6-Hydroxy-3,5-O-isopropylidene-3,5-dihydroxyhexanoate: Essential Building Block for HMG-CoA Reductase Inhibitors. *Synthesis* 8, 1014-1018.

Bertau M (2002): Novel developments in biocatalytic organic chemistry. *Curr Org Chem* 6(11), 987-1014.

Bertau M, Jörg G (2004): Saccharides as efficacious solubilisers for highly lipophilic compounds in aqueous media. *Bioorg Med Chem* 12(11), 2973-2983.

- Blanchard LA**, Hancu D, Beckman EJ, Brennecke JF (1999): Green processing using ionic liquids and CO₂. *Nature* 399(6731), 28-29.
- Blanchard LA**, Gu ZY, Brennecke JF (2001): High-pressure phase behavior of ionic liquid/CO₂ systems. *J Phys Chem B* 105(12), 2437-2444.
- Bommarius AS**, Riebel BR (2004): Biocatalysis. Wiley-VCH, Weinheim, 1-14.
- Bradshaw CW**, Hummel W, Wong CH (1992): *Lactobacillus kefir* Alcohol Dehydrogenase: A Useful Catalyst for Synthesis. *J Org Chem* 57(5), 1532-1536.
- Brodelius P**, Nilsson K, Mosbach K (1981): Production of alpha-Keto Acids Part 1. Immobilized Cells of *Trigonopsis variabilis* Containing D-Amino Acid Oxidase. *Appl Biochem Biotechnol* 6, 293-308.
- Buque EM**, Chin-Joe I, Straathof AJJ, Jongejan JA, Heijnen JJ (2002): Immobilization affects the rate and enantioselectivity of 3-oxo ester reduction by baker's yeast. *Enzyme Microb Technol* 31(5), 656-664.
- Calabrese RV**, Chang TRK, Dang PT (1986): Drop breakup in turbulent stirred-tank contactors. *AIChE Journal* 32(4), 657-666.
- Carda-Broch S**, Berthod A, Armstrong DW (2003): Solvent properties of the 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ionic liquid. *Anal Bioanal Chem* 375(2), 191-199.
- Cull SG**, Holbrey JD, Vargas-Mora V, Seddon KR, Lye GJ (2000): Room-temperature ionic liquids as replacements for organic solvents in multiphase bioprocess operations. *Biotechnol Bioeng* 69(2), 227-233.
- DECHEMA** (2004): Weiße Biotechnologie: Chancen für Deutschland. *Positionspapier der DECHEMA e.V.*, Frankfurt, November 2004.
- Dörfler HD** (1994): Grenzflächen und Kolloidchemie. Wiley-VCH, Weinheim, 13-42.
- Engelking H** (2004a): Reaktionstechnische Untersuchungen zur asymmetrischen Reduktion von β -Ketoestern mit rekombinanten Hefen. *Dissertation an der Technischen Universität München*.
- Engelking H**, Pfaller R, Wich G, Weuster-Botz D (2004b): Stereoselective reduction of ethyl 4-chloro acetoacetate with recombinant *Pichia pastoris*. *Tetrahedron Asymmetry* 15(22), 3591-3593.
- EuropaBio** (2003): White Biotechnology: Gateway to a more sustainable future. EuropaBio, Lyon, April 2003.
- Faber K** (1997): Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook. Springer

Verlag, Berlin, 1-24.

Fernandes P, Cabral JMS, Pinheiro HM (1998): Influence of some operational parameters on the bioconversion of sitosterol with immobilized whole cells in organic medium. *J Mol Catal B Enz* 5(1-4), 307-310.

Festel G, Knöll J, Götz H, Zinke H (2004): Der Einfluss der Biotechnologie auf Produktionsverfahren in der Chemieindustrie. *Chem Ing Tech* 76(3), 307-312.

Fischer L, Gabler M, Horner R, Wagner F (1996): Microbial D-amino acid oxidases - (EC 1.4.3.3). *Ann NY Acad Sci* 799, 683-688.

Fischer L (1998): D-Amino Acid oxidases in Biotechnology. *Recent Res Develop Microbiol* 2, 295-317.

Food & Drug Administration (1992): FDA policy statement for the development of new stereoisomeric drugs. *Chirality* 4(5), 338-340.

Foodnews (2005): http://www.foodnews.ch/x-plainmefood/30_produkte/Bier_Rohstoffe_Hefe.html

Freemantle M (2003): BASF's smart ionic liquid. *Chem Eng News* 81(13), 9.

Gabler M, Fischer L (1999): Production of a new D-amino acid oxidase from the fungus *Fusarium oxysporum*. *Appl Environ Microbiol* 65(8), 3750-3753.

Gabler M, Hensel M, Fischer L (2000): Detection and substrate selectivity of new microbial D-amino acid oxidases. *Enzyme Microb Technol* 27(8), 605-611.

Green KD, Gill IS, Khan JA, Vulfson EN (1996): Microencapsulation of yeast cells and their use as a biocatalyst in organic solvents. *Biotechnol Bioeng* 49(5), 535-543.

Griffin DR, Gainer JL, Carta G (2001): Asymmetric ketone reduction with immobilized yeast in hexane: Biocatalyst deactivation and regeneration." *Biotechnol Prog* 17(2), 304-310.

Haberland J, Hummel W, Dausmann T, Liese A (2002): New continuous production process for enantiopure (2R,5R)-hexanediol. *Org Process Res Dev* 6(4), 458-462.

Hage A, Petra DGI, Field JA, Schipper D, Wijnberg JBPA, Kamer PCJ, Reek JNH, van Leeuwen PWNM, Wever R, Schoemaker HE (2001): Asymmetric reduction of ketones via whole cell bioconversions and transfer hydrogenation: complementary approaches. *Tetrahedron Asymm* 12, 1025-1034.

Hahn T, Botzenhart K (2001) Solvent-resistant microorganisms. *Handbook of solvents* Ed. Wypych G Toronto, New York: ChemTec Publishing, 2001. 865-871.

- Hellwich KH** (2002): Stereochemie Grundbegriffe. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Hildebrandt P**, Riermeier T, Altenbuchner J, Bornscheuer UT (2001): Efficient resolution of prostereogenic arylaliphatic ketones using a recombinant alcohol dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*. *Tetrahedron: Asymmetry* 12(8), 1207-1210.
- Hildebrandt P**, Musidowska A, Bornscheuer UT, Altenbuchner J (2002): Cloning, functional expression and biochemical characterization of a stereoselective alcohol dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens* DSM50106. *Appl Microbiol Biotechnol* 59(4-5), 483-487.
- Himeda Y**, Onozawa-Komatsuzaki N, Sugihara H, Arakawa H, Kasuga K (2003): Transfer hydrogenation of a variety of ketones catalyzed by rhodium complexes in aqueous solution and their application to asymmetric reduction using chiral Schiff base ligands. *J Mol Catal A Chem* 195(1-2), 95-100.
- Hörner R**, Wagner F, Fischer L (1996): Induction of the D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis*. *Appl Environ Microbiol* 62(6), 2106-2110.
- Howarth J**, James P, Dai JF (2001): Immobilized baker's yeast reduction of ketones in an ionic liquid, [bmim]PF₆ and water mix. *Tetrahedron Lett* 42(42), 7517-7519.
- Holtzauer M** (1997): Biochemische Labormethoden. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 191-203.
- Huber FM**, Vicenzi JT, Tietz AJ (1992): High Yielding Culture Conditions for the Biosynthesis of D-Amino Acid Oxidase by *Trigonopsis variabilis*. *Biotechnol Letters* 14(3), 195-200.
- Huddleston JG**, Visser AE, Reichert WM, Willauer HD, Broker GA, Rogers RD. (2001): Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation. *Green Chem* 3(4), 156-164.
- Huh JW**, Yokoigawa K, Esaki N, Soda K (1992): Total conversion of racemic pipercolic acid into the L-enantiomer by a combination of enantiospecific oxidation with D-amino-acid oxidase and reduction with sodium-borohydride. *Biosci Biotechnol Biochem* 56(12), 2081-2082.
- Hummel W** (1990): Reduction of acetophenone to R(+)-phenylethanol by a new alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus kefir*. *Appl Microbiol Biotechnol* 34(1), 15-19.

Hwang TS, Fu HM, Lin LL, Hsu WH (2000): High-level expression of *Trigonopsis variabilis* D-amino acid oxidase in *Escherichia coli* using lactose as inducer. *Biotechnol Letters* 22(8) 655-658.

Inoue A, Horikoshi K (1991): Estimation of Solvent-Tolerance of Bacteria by the Solvent Parameter LogP. *J Ferm Bioeng* 71(3) 194-196.

Isoai A, Kimura H, Reichert A, Schorgendorfer K, Nikaido K, Tohda H, Giga-Hama Y, Mutoh N, Kumagai H (2002): Production of D-amino acid oxidase (DAO) of *Trigonopsis variabilis* in *Schizosaccharomyces pombe* and the characterization of biocatalysts prepared with recombinant cells. *Biotechnol Bioeng* 80(1), 22-32.

Jastorff B, Stormann R, Ranke J, Molter K, Stock F, Oberheitmann B, Hoffmann W, Hoffmann J, Nuchter M, Ondruschka B, Filser J (2003): How hazardous are ionic liquids? Structure-activity relationships and biological testing as important elements for sustainability evaluation. *Green Chem* 5(2), 136-142.

Jörg G, Leppchen K, Dausmann T, Bertau M (2004): A novel convenient procedure for extractive work-up of whole-cell biotransformations using de-emulsifying hydrolases. *Biotechnol Bioeng* 87(4), 525-536.

Kaluzna WA, Matsuda T, Sewell AK, Stewart JD (2004): Systematic investigation of *Saccharomyces cerevisiae* enzymes catalyzing carbonyl reductions. *J Am Chem Soc* 126(40), 12827-12832.

Kandler O, Kunath P (1983): *Lactobacillus kefir sp. nov.*, a Component of the Microflora of Kefir. *System Appl Microbiol* 4(2), 286-294.

Kneule F (1986): Rühren. *Praxis der Verfahrenstechnik*, DECHEMA, Frankfurt

Kometani T, Yoshii H, Matsuno R (1996): Large-scale production of chiral alcohols with bakers' yeast. *J Mol Catal B Enzym* 1(2), 45-52.

Kröckel J, Kragl U (2003): Nanofiltration for the separation of nonvolatile products from solutions containing ionic liquids. *Chem Eng Technol* 26(11), 1166-1168.

Kujan P, Prell A, Safar H, Holler P, Plhacova K, Sobotka M (2001): D-amino-acid oxidase--an improved production of the enzyme by the yeast *Trigonopsis variabilis* in a laboratory fermentor. *Folia Microbiol (Praha)* 46(5), 427-431.

Laane C, Boeren S, Vos K, Veeger C (1987): Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic Solvents. *Biotechnol Bioeng* 30(1), 81-87.

Leon R, Fernandes P, Pinheiro HM, Cabral JMS (1998): Whole-cell biocatalysis in organic media. *Enzyme Microb Technol* 23(7-8), 483-500.

Liese A, Seelbach K, Wandrey C (2000): Industrial Biotransformations. Wiley-

VCH, Weinheim, 58-63, 98-171.

Lin L, Chien HR, Wang W, Hwang T, Fu H, Hsu W (2000): Expression of *Trigonopsis variabilis* D-amino acid oxidase gene in *Escherichia coli* and characterization of its inactive mutants. *Enzyme Microb Technol* 27, 482-491.

Lorraine K, King S, Greasham R, Chartrain M (1996): Asymmetric bioreduction of a ketosulfone to the corresponding trans-hydroxysulfone by the yeast *Rhodotorula rubra* MY 2169. *Enzyme Microb Technol* 19(4), 250-255.

Luo H, Yu HM, Li Q, Shen ZY (2004): Cloning and co-expression of D-amino acid oxidase and glutaryl-7-aminocephalosporanic acid acylase genes in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb Technol* 35(6-7), 514-518.

Lynen F (1969): Yeast fatty acid synthase. *Methods in Enzymology* 14, 17-33.

Matsuda T, Harada T, Nakamura K (2000): Alcohol dehydrogenase is active in supercritical carbon dioxide. *Chem Commun* 15, 1367-1368.

Matsumoto M, Isken S, De Bont JAM (2001): Organic solvents in microbial production processes. *Handbook of solvents* Ed. Wypych G Toronto, New York: ChemTec Publishing, 856-880.

Maugard T, Lamare S, Legoy MD (2001): Gas phase biotransformation reaction catalyzed by baker's yeast. *Biotechnol Bioeng* 73(2), 164-168.

McGovern PE, Zhang JH, Tang JG, Zhang ZQ, Hall GR, Moreau RA, Nunez A, Butrym ED, Richards MP, Wang CS, Cheng GS, Zhao ZJ, Wang CS (2004): Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(51), 17593-17598.

Montes FJ, Catalan J, Galan MA (1998): A metabolic model describing growth and substrate uptake of *Trigonopsis variabilis*. *Enzyme Microb Technol* 22(5), 329-334.

Müller MK (2000): D-Aminosäureoxidase aus *Trigonopsis variabilis* DSM 70714: Isolierung, Charakterisierung und biotechnologische Anwendung. *Dissertation an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig*.

Müller M (2005): Chemoenzymatic synthesis of building blocks for statin side chains. *Angew Chem Int Ed* 44, 3-362.

Nakamura K, Yamanaka R, Tohi K, Hamada H (2000): Cyanobacterium-catalyzed asymmetric reduction of ketones. *Tetrahedron Letters* 41(35), 6799-6802.

Nakamura K, Matsuda T, Harada T (2002): Chiral synthesis of secondary alcohols using *Geotrichum candidum*. *Chirality* 14(9) 703-708.

Nakamura K, Yamanaka R, Matsuda T, Harada T (2003): Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts. *Tetrahedron Asymmetry* 14(18), 2659-2681.

Ohkuma T, Koizumi M, Muniz K, Hilt G, Kabuto C, Noyori R (2002): *Trans*-RuH(η (1)-BH₄)(binap)(1,2-diamine): a catalyst for asymmetric hydrogenation of simple ketones under base-free conditions. *J Am Chem Soc* 124(23), 6508-6509.

Patel RN (2002): Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. *Enzyme Microb Technol* 31(6), 804-826.

Paul EL, Atiemo-Obeng VA, Kresta S (2004): Handbook of industrial mixing: Science and practice. Wiley Interscience, Hoboken, New Jersey, 639-754.

Prichanont S, Leak DJ, Stuckey DC (2000): The solubilisation of mycobacterium in a water in oil microemulsion for biotransformations: system selection and characterisation. *Colloids Surfaces A: Physicochem Eng Aspects* 166(1-3), 177-186.

Ranke J, Molter K, Stock F, Bottin-Weber U, Poczobutt J, Hoffmann J, Ondruschka B, Filser J, Jastorff B (2004): Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and WST-1 cell viability assays. *Ecotoxicol Env Savety* 58(3), 396-404.

Rautenstrauch V, Hoang-Cong X, Churlaud R, Abdur-Rashid K, Morris RH (2003): Hydrogenation versus transfer hydrogenation of ketones: Two established ruthenium systems catalyze both. *Chemistry-A European Journal* 9(20), 4954-4967.

Reid RC, Prausnitz JM, Poling BE (1988): The properties of gases and liquids. McGraw-Hill Book Company, Fourth Edition, 597-611.

Robertson DE, Steer BA (2004): Recent progress in biocatalyst discovery and optimization. *Curr Opinion Chem Biol* 8(2), 141-149.

Rogers RD, Seddon KR (2003): Ionic liquids - Solvents of the future? *Science* 302(5646), 792-793.

Sardessai YN, Bhosle S (2004): Industrial potential of organic solvent tolerant bacteria. *Biotechnol Prog* 20(3), 655-660.

Sasek V, Becker GE (1969): Effekt of different nitrogen sources on cellular form of *Trigonopsis variabilis*. *J Bacteriol* 99(3), 891-892.

Schäfer T, Rodrigues CM, Afonso CA, Crespo JG (2001): Selective recovery of solutes from ionic liquids by pervaporation--a novel approach for purification and

green processing. *Chem Commun* 17, 1622-1623.

Schlegel HG (1992): Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 17-88, 89-142.

Schmid A, Kollmer A, Mathys RG, Witholt B (1998): Developments toward large-scale bacterial bioprocesses in the presence of bulk amounts of organic solvents. *Extremophiles* 2(3), 249-256.

Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B (2001): Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409(6817), 258-268.

Schmitz G, Franke D, Stevens S, Takors R, Weuster-Botz D, Wandrey C (2000): Regioselective oxidation of terfenadine with *Cunninghamella blakesleeana*. *J Mol Catal B Enzyme* 10(1-3), 313-324.

Schöfer SH, Kaftzik N, Wasserscheid P, Kragl U (2001): Enzyme catalysis in ionic liquids: lipase catalysed kinetic resolution of 1-phenylethanol with improved enantioselectivity. *Chem Commun* 5, 425-426.

Schügerl K (1994): Solvent extraction in biotechnology. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 2-51.

Serizawa N, Nakagawa K, Haneishi T, Kamimura S, Naito A (1998): Enzymatic conversion of cephamycin C by D-amino-acid oxidase from *Trigonopsis variabilis*. *J Antibiotics* 33(6), 585-590.

Shentheshanmugan S, Nickerson WJ (1962): Transaminase and D-amino acid oxidase of *Trigonopsis variabilis*. *J Gen Microbiol* 27(3), 465-471.

Sherwood TK, Pigford RL, Wilke CR (1975): Mass transfer. McGraw-Hill chemical engineering series, 8-53.

Singh M, Sharma R, Banerjee UC (2002): Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnol Adv* 20(5-6), 341-359.

Singh P, Marwaha SS, Verma N (2001): Role of amino acids in production of D-amino acid oxidase. *J Microbiol* 39(3), 229-231.

Singleton P (1999): Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine. John Wiley Sons, New York, 1-35.

Smirnova SV, Torocheshnikova II, Formanovsky AA, Pletnev IV (2004): Solvent extraction of amino acids into a room temperature ionic liquid with dicyclohexano-18-crown-6. *Anal Bioanal Chem* 378(5), 1369-1375.

Song CE (2004): Enantioselective chemo- and bio-catalysis in ionic liquids. *Chem Commun* 9, 1033-1043.

Straathof AJJ, Panke S, Schmid A (2002): The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr Opin Biotech* 13(6), 548-556.

Swatloski RP, Holbrey JD, Memon SB, Caldwell GA, Caldwell KA, Rogers RD (2004): Using *Caenorhabditis elegans* to probe toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride based ionic liquids. *Chem Commun* 6, 668-669.

Sybesma WFH, Straathof AJJ, Jongejan JA, Pronk JT, Heijnen JJ (1998): Reductions of 3-oxo esters by baker's yeast: Current status. *Biocatal Biotransform* 16(2), 95-134.

Syrres (2004): <http://esc.syrres.com/interkow/interkow.exe>

Szwajcer E, Mosbach K (1985): Isolation and partial characterization of a D-amino-acid oxidase active against cephalosporin-c from the yeast *Trigonopsis variabilis*. *Biotechnol Letters* 7(1), 1-7.

Thottathil JK, Pendri Y, Li WS, Kronenthal DR (1994): Process for the preparation of 1,3-dioxane derivatives useful in the preparation of HMG-COA reductase inhibitors. Patent US5278313.

uppi (2005): <http://www002.upp.so-net.ne.jp/yamaguchi/NewFiles/treatment/Dentalsurveys/bacteria.html>

vbi (2005): http://staff.vbi.vt.edu/pathport/pathinfo/pathogens/E.coli_O157H7.html

Vollhardt KPC, Shore NE (2000): Organische Chemie. Wiley-VCH, Weinheim, 164.

Walker GM (1999): Yeast Physiology and Biotechnology. John Wiley & Sons, Chichester, England, 11-50.

Wasserscheid P (2001): Ionische Flüssigkeiten - inovative Lösungsmittel für die Zweiphasenkatalyse. *DECHEMA-Tätigkeitsbericht 2001*, DECHEMA, Frankfurt.

Wasserscheid P, Welton T (Editors) (2003): Ionic Liquids in Synthesis. Wiley-VCH, Weinheim, 7-173, 336-387.

Westgate S, Vaidya AM, Bell G, Halling PJ (1998): High specific activity of whole cells in an aqueous-organic two-phase membrane bioreactor. *Enzyme Microb Technol* 22(7), 575-577.

Weuster-Botz D, Stevens S, Hawrylenko A (2002): Parallel-operated stirred-columns for microbial process development. *Biochem Eng J* 11(1), 69-72.

Weuster-Botz D (2003): Bioverfahrenstechnik - Ingenieure auf dem Weg ins Jahrhundert der Biologie. *Chemie Ingenieur Technik* 75(10), 1515-1518.

Wills M, Hannedouche J (2002): New methodology for the asymmetric reduction

of ketones. *Curr Opin Drug Discov Dev* 5(6), 881-891.

Wolberg M, Hummel W, Wandrey C, Müller M (2000): Highly regio- and enantioselective reduction of 3,5-dioxocarboxylates. *Ang Chem Int Ed* 39(23), 4306-4308.

Wolberg M, Hummel W, Müller M (2001): Biocatalytic reduction of beta,delta-diketo esters: A highly stereoselective approach to all four stereoisomers of a chlorinated beta,delta-dihydroxy hexanoate. *Chem A Europ J* 7(21), 4562-4571.

Wolberg M, Kaluzna IA, Müller M, Stewart JD (2004): Regio and enantioselective reduction of *t*-butyl 6-chloro-3,5-dioxohexanoate with baker's yeast. *Tetrahedron Asymmetry* 15(18), 2825-2828.

Wypych G (Editor) (2001): Handbook of Solvents. ChemTec Publishing, Toronto, Canada, 856-880.

Yu J, Li DY, Zhang YJ, Yang S, Li RB, Yuan ZY (2002): High expression of *Trigonopsis variabilis* D-amino acid oxidase in *Pichia pastoris*. *J Mol Catal B Enzyme* 18(4-6), 291-297.

Zlokarnik M (1999): Rührtechnik: Theorie und Praxis. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 230-255.

13 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 13.1: Abkürzungen chemischer Formeln, Namen etc.

Abkürzung	Begriff
ADH	Alkoholdehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
AP	Acetophenon
ATP	Adenosintriphosphat
[BF ₄] ⁻	Tetrafluorborat
[BMIM] ⁺	1- <i>n</i> -Butyl-3-methylimidazolium
C	Kohlenstoff
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
4-Cl-ACE	4-Chloracetessigsäureethylester
4-Cl-AP	4-Chloracetophenon
6-Cl-3,5-DHHB	6-Chlor-3,5-dihydroxyhexansäure- <i>tert</i> -butylester
6-Cl-DOHB	6-Chlor-3,5-dioxohexansäure- <i>tert</i> -butylester
4-Cl-HBE	4-Chlor-3-hydroxybuttersäureethylester
6-Cl-5-HOHB	6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure- <i>tert</i> -butylester
4-Cl-PE, 1-4-Cl-PE	1-(4-Chlorphenyl)ethanol
CO	Kohlenmonoxid
CO ₂	Kohlendioxid
CSL	corn steep liquor

DAO	D-Aminosäureoxidase
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSM(Z)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (und Zellkulturen)
EBA	Benzoylessigsäureethylester
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
GC	Gaschromatographie
GDH	Glukosedehydrogenase
HCl	Salzsäure
HF	Flusssäure
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPE	<i>para</i> -Hydroxyphenylelessigsäure
HPLC	Hochdruck-Flüssigchromatographie
HPP	<i>para</i> -Hydroxyphenylpyruvat
HPPE	3-Hydroxy-3-phenylpropionsäureethylester
IL	ionische Flüssigkeit
KP _i -Puffer	Kaliumphosphat-Puffer
LB-ADH	<i>Lactobacillus brevis</i> -Aldkoholdehydrogenase
LB-Medium	Luria broth, Komplexmedium
LK-ADH	<i>Lactobacillus kefir</i> -Aldkoholdehydrogenase
MALDI	matrix assisted Laser desorption/ionization
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
NAD(P) ⁺	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid(phosphat) (oxidierte Form)
NAD(P)H	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid(phosphat) (reduzierte Form)
NH ₃	Ammoniak
NMR	nuclear magnetic resonance (Kernspinresonanz)
O ₂	molekularer Sauerstoff

[OcSO ₄] ⁻	Octylsulfat
[OMA] ⁺	Methyl-trioctylammonium
PF-ADH	<i>Pseudomonas fluorescens</i> -Aldkohldehydrogenase
[PF ₆] ⁻	Hexafluorophosphat
PFAP	2,3,4,5,6-Pentafluoroacetophenon
PFPE	1-(2,3,4,5,6-Pentafluorophenyl)ethanol
RT	Raumtemperatur
Ru-BINAP	Ruthenium-2,2'-Bis(diphenylphosphino)-1,1'-Bínaphthyl
[Tf ₂ N] ⁻	Bis(trifluoromethansulfon)imid
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
% v/v	Volumenprozent
wt	Wildtyp
% w/v	Gewichtspozent auf Volumen bezogen (1 % = 10 g L ⁻¹)
% w/w	Gewichtspozent
YNB	yeast nitrogen base

Tabelle 13.2: Prozessgrößen der Ganzzell-Biokatalyse und des mikrobiellen Wachstums

Abkürzung/Symbol	Einheit	Begriff
A	-	Absorption
b	m	Länge des Lichtweges
c	g L ⁻¹ oder mol L ⁻¹	Konzentration
de	%	Diastereomerenüberschuss
EA	μkat = μmol s ⁻¹	Enzymaktivität
ee	%	Enantiomerenüberschuss
f _x	g _{BTM} L ⁻¹ OD ⁻¹	Korrelationsfaktor
k _L a	s ⁻¹	volumetrischer Stoffübergangskoeffizient
K _S	mol L ⁻¹	Sättigungskonzentration
logD	-	Verteilungskoeffizient IL/Puffer

$\log P$	-	Verteilungskoeffizient <i>n</i> -Octanol/Wasser
<i>m</i>	g	Masse
\dot{m}	g h ⁻¹	Zudosierungsrate (Massestrom)
<i>M</i>	mol L ⁻¹ = <i>M</i>	Molarität
<i>n</i>	- oder mol	Zellzahl oder Stoffmenge
OD	-	optische Dichte
OTR	mol L ⁻¹ h ⁻¹ oder g L ⁻¹ h ⁻¹	Sauerstofftransferrate
OUR	mol L ⁻¹ h ⁻¹ oder g L ⁻¹ h ⁻¹	Sauerstoffaufnahme
PBK	mol g _{BTM} ⁻¹	Produktbildungskapazität
pO ₂	%	Sauerstoffpartialdruck
<i>q</i>	g g _{BTM} ⁻¹ h ⁻¹	Aufnahmerate
RZA _{EA}	μkat L ⁻¹ h ⁻¹	Raum-Zeit-Ausbeute der Enzymaktivität
RZA _{BTM}	g _{BTM} L ⁻¹ h ⁻¹	Raum-Zeit-Ausbeute der Biotrockenmasse
<i>t</i>	s	Zeit
<i>t_d</i>	s	Verdopplungszeit
<i>T</i>	s	Reaktionszeit oder Verweilzeit
<i>V</i>	L	Volumen
\dot{V}	L h ⁻¹	Volumenstrom
<i>v</i>	-	stöchiometrischer Faktor
<i>V_{mol}</i>	L mol ⁻¹	Molvolumen idealer Gase
<i>X_E</i>	%	Umsatz
<i>x</i>	%	Gasanteil in Luft oder Molenbruch
<i>Y_{X,S}</i>	g _{BTM} g ⁻¹	Ertragskoeffizient
ϵ	L mol ⁻¹ mm ⁻¹	molarer Extinktionskoeffizient
η_P	%	Ausbeute
μ	h ⁻¹	spezifische Wachstumsrate
σ_P	%	Selektivität

Tabelle 13.3: Indizes der Prozessgrößen der Ganzzell-Biokatalyse und des mikrobiellen Wachstums

Index	Begriff
0	Ausgangszustand
aus	austretende Komponente
BTM	Biotrockenmasse
E	Edukt
EA	Enzymaktivität
ein	eintretende Komponente
max	Maximalwert unter bestimmten Bedingungen
mol	auf ein Mol bezogen
P	Produkt
S	Substrat
X	Biomasse

Tabelle 13.4: Größen der Tropfenbildung und des Stofftransports

Abkürzung/Symbol	Einheit	Begriff
a	m^{-1}	spezifische Phasengrenzfläche
c	$g L^{-1}$ oder $mol L^{-1}$	Konzentration
c*	$g L^{-1}$ oder $mol L^{-1}$	Gleichgewichtskonzentration
D (logD)	-	Verteilungskoeffizient
d ₃₂	m	Sauterdurchmesser
D _{E,k}	$m^2 s^{-1}$	Diffusionskoeffizient
d _R	m	Rührerdurchmesser
D _R	m	Innendurchmesser des Rührkesselreaktors
ETR _{max}	$\mu kat L^{-1}$	Edukttransferrate
Fr	-	Froudezahl
g	$m s^{-1}$	Erdbeschleunigung
h	m	Einbauhöhe des Rührers vom Reaktorboden

H	m	Höhe des Rührkesselreaktors
MG	g mol^{-1}	Molekulargewicht
MV	L mol^{-1}	Molekularvolumen
n	-	Anzahl der Tropfen
N_R	s^{-1}	Rührerdrehzahl
P	$\text{cm}^3 \text{g}^{0,25} \text{mol}^{-1} \text{s}^{-0,5}$	Parachor
q_3	m^{-1}	Volumen-Verteilungsdichte
Q_3	-	Volumen-Verteilungssumme
Re	-	Reynoldszahl
Sc	-	Schmidzahl
Sh	-	Sherwoodzahl
V	L	Volumen
ν_i	-	Viskositätskennzahl
We	-	Weberzahl
β_E	m s^{-1}	Stoffübergangskoeffizient
η	$\text{N s m}^{-2} = \text{Pa s} = 1000 \text{ cP}$	dynamische Viskosität
δ_k	m	Grenzschichtdicke
ν	$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$	kinematische Viskosität
ρ	kg m^{-3}	Dichte
σ	$\text{N m}^{-1} = \text{kg s}^{-2}$	Grenzflächen-, Oberflächenspannung
φ	-	Phasenanteil
Φ	-	Assoziationsparameter

Tabelle 13.5: Indizes der Tropfenbildung und des Stofftransports

Index	Begriff
E	Edukt
d	disperse Phase
i	Fraktion i oder Komponente i

k	kontinuierliche Phase
LM	Lösungsmittel
max	Maximalwert unter bestimmten Bedingungen
P	Produkt
R	Rührer

Tabelle 13.6: Besonderheiten der verwendeten Einheiten

Einheit	Besonderheit
cm	In der Fachliteratur wird für die Bezeichnung einer Länge in den Einheiten des Diffusionskoeffizienten und des Parachor üblicherweise die Einheit Zentimeter anstelle von Meter verwendet.
g	In der biotechnologischen Fachliteratur wird für die Bezeichnung einer Masse üblicherweise die Einheit Gramm anstelle von Kilogramm verwendet.
h	In der biotechnologischen Fachliteratur wird für die Bezeichnung einer Zeit in den Einheiten von ETR, OUR, OTR, μ , q üblicherweise die Einheit Stunde anstelle von Sekunde verwendet.
L	In der biotechnologischen Fachliteratur wird die Einheit Liter mit großem L geschrieben, um Verwechslungen mit der Zahl 1 in manchen Schrifttypen zu vermeiden. Konsequenterweise wird entsprechend mL, μ L etc. geschrieben. Bei der Angabe von Konzentrationen und Volumina ist es üblich, Liter anstelle von Kubikmeter zu verwenden.
M	In der biotechnologischen Fachliteratur wird für die Bezeichnung einer Konzentration gleichwertig die Einheit M (Molarität) oder mol L^{-1} verwendet.
min	In der biotechnologischen Fachliteratur wird für die Bezeichnung einer Zeit gleichwertig die Einheit Minute oder Sekunde verwendet.
Units, μ kat	In der biotechnologischen Fachliteratur wird für die Bezeichnung einer Enzymaktivität häufig noch die veraltete Einheit Units verwendet. In dieser Arbeit wird die korrekte Einheit kat (katal) verwendet, aufgrund der geringen Zahlenwerte meistens in der Form μ kat.

14 Anhang

14.1 Geräte, Chemikalien, Kultivierungsmedien

14.1.1 Geräte

Tabelle 14.1: Allgemeine Laborgeräte

Analytische Waage Explorer 10 mg-210 g	Ohaus, Gießen
Analytische Waage Explorer 5 g-32 kg	Ohaus, Gießen
Blutzucker-Messgerät Accu-Chek mit Sensorstäbchen Accu-Chek Sensor Comfort	Roche Diagnostics, Mannheim
Einstrahlphotospektrometer Spectronic Genesys 20	Thermo Electron, Dreieich
Fluoreszenz-Mikrotiterplattenphotometer Fluostar Galaxy	BMG Labtechnologies, Offenburg
Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-2 LD	Martin Christ Gefriertrocknungs- anlagen, Osterode am Harz
Gasperlen 0,17-0,18 mm	B. Braun Biotech, Melsungen
Gasperlen 0,4-0,6 mm	B. Braun Biotech, Melsungen
Kühlbrutschrank KB 400	Binder, Tuttlingen
Kühlzentrifuge Biofuge Stratos	Kendro-Heraeus, Langenselbold
Mehrfachrührplatz Multipoint 15	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Mehrfachrührplatz Variomag Poly 15	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Mikrotiterplattenphotometer EL 808	Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall
pH-Elektrode BlueLine 14 pH	Schott, Mainz
pH-Meter CG 843	Schott, Mainz

Photospektrometer Genesys 20	Thermo Spectronic, Neuss
pO ₂ -Elektrode Microoptode Typ B2	PreSens, Regensburg
Reagenzglasschüttler Reax Top	Heidolph Instruments, Schwabach
Schüttelinkubator Multitron	Infors, Einsbach
Schwingarmmühle MM200	Retsch, Haan
Standzentrifuge Rotixa 50 RS	Hettich, Tuttlingen
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Mikro 20	Hettich, Tuttlingen
Trockenschrank E 28	Binder, Tuttlingen

Tabelle 14.2: Rührkesselreaktor Labfors

Labfors 7,5 L Klein-Fermenter-System (Infors, Einsbach)	5 L maximales Reaktionsvolumen Wassertemperierung über Glasdoppelmantel 3-fach-6-Blatscheibenrührer, mechanische Gleitringdichtung, Obenantrieb Schikanenkorb mit 4 Strömungsbrechern Begasungsrohr mit 11 Löchern (0,4 mm Durchmesser) Begasung über Massendurchflussmesser geregelt Reaktorgewicht über eine Waage erfassbar
Software Iris-NT Pro Version 4.11	Infors, Einsbach
pH-Elektrode HA405-DPA-SC-S8	Mettler-Toledo, Giessen
pO ₂ -Sensor InPro 6000	Mettler-Toledo, Giessen
Antischaum-Sonde Russel	Infors, Einsbach
Abgasanalytik EasyLine (O ₂ , CO ₂)	ABB, Frankfurt
Peristaltische Zulaufpumpe BVP Standard mit Pumpenkopf Masterflex Easy-Load MF 0313/738	Ismatech Laboratoriumstechnik, Wertheim-Mondfeld Pumpenkennlinie mit Marprene-Schlauch Innendurchmesser 1,6 mm, Wandstärke 1,6 mm (Watson-Marlow, Rommerskirchen) für <i>L. kefir</i> -Zulaufmedium (1174 g L ⁻¹): Zulauf [g h ⁻¹] = 12,56 % Pumpenleistung (R ² = 0,9994)
Zulaufmittel-Waage GC35EDE-S	Sartorius, Göttingen

Tabelle 14.3: Rührkesselreaktor Techfors

Techfors 200 L Fermenter-System (Infors, Einsbach)	Teil einer vollautomatischen 2-stufigen, in-situ sterilisierbaren Einheit 150 L maximales Reaktionsvolumen Wasser-/Dampfthermierung über Doppelmantel 3-fach-6-Blattscheibenrührer, mechanische Gleitringdichtung, Untenantrieb 4 separat aufgehängte Strömungsbrecher Begasungsring, Begasung über Massendurchflussmesser geregelt Reaktorgewicht über eine Wiegezeile erfassbar
Software Iris-NT Pro Version 4.11	Infors, Einsbach
pH-Elektrode HA405-DPA-SC-S8	Mettler-Toledo, Giessen
pO ₂ -Sensor InPro 6000	Mettler-Toledo, Giessen
Antischaum-Sonde Russel	Infors, Einsbach
Drucksensor PR-25HT/8931A	Keller Druckmesstechnik, Winterthur, Schweiz
Abgasanalytik EasyLine (O ₂ , CO ₂)	ABB, Frankfurt
Peristaltische Zulaufpumpe Ecoline VC	Ismatech Laboratoriumstechnik, Wertheim-Mondfeld Pumpenkennlinie mit Marprene-Schlauch Innendurchmesser 1,6 mm, Wandstärke 1,6 mm (Watson-Marlow, Rommerskirchen) für <i>L. kefir</i> - Zulaufmedium (1174 g L ⁻¹): Zulauf [g h ⁻¹] = 104,2 % Pumpenleistung (R ² = 0,9993)
Zulaufmittel-Waage GC35EDE-S	Sartorius, Göttingen
Mikrofiltrationseinheit mit Filtermodul UFP-500-E-65MSM	Schleicher & Schuell, Dassel in-situ-dampfsterilisierbar, 1 mm Innendurchmesser der Hohlfasern (2400 Stück), 4,2 m ² Membranfläche
Kreiskolbenpumpe JEC 225-025-08 für Mikrofiltrationseinheit	Flowtech Pumpen JEB, Hille

Tabelle 14.4: Hochdruck-Flüssigchromatograph und Trennsäulen

HPL-Chromatograph Serie 1100 bestehend aus Vakuumentgaser, quarternäre Pumpe, Probengeber, Software ChemStation Vers. A.08	Agilent, Waldbronn
Säulenofen S4110	Sykam, Eresing
UV-Vis Detektor SPD-6A	Shimadzu, Duisburg; standardmäßig Absorption 0,08
Trennsäule C18 GromSil 100 ODS-2 Fe	Grom, Herrenberg-Kayh Länge 25 cm, Innendurchmesser 4 mm, Partikelgröße 5 µm
Trennsäule Chiral 1	Macherey Nagel, Düren Länge 25 cm, Porengröße 12 nm, Partikelgröße 5 µm

Tabelle 14.5: Gaschromatograph, Trennsäulen und Gase

Gaschromatograph CP-3800	Varian, Darmstadt
Injektor 1079 PTV	temperaturprogrammierbar, standardmäßig 250°C
Splitregelung	elektronische Flusskontrolle (EFC), standardmäßig Split-Reduktion auf 5 vor 0,01 min und nach 0,5 min
FID-Detektor	standardmäßig 250°C, Brenngase Wasserstoff und Luft, Make-up-Gas Helium (= Trägergas)
Software Star Version 5.51	Varian, Darmstadt
Probengeber CombiPal	CTC Analytics, Zwingen, Schweiz
Trennsäule BGB-174	BGB Analytik, Schlossböckelheim Länge 30 m, Innendurchmesser 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm
Trennsäule CP-Sil 8 CB-MS	Varian, Darmstadt Länge 30 m, Innendurchmesser 0,32 mm, Filmdicke 1,0 µm
Trennsäule Lipodex E	Macherey Nagel, Düren Länge 25 m, Innendurchmesser 0,32 mm
Helium 99.999 % v/v	Air Liquide, Krefeld
Wasserstoff 99.999 % v/v	Air Liquide, Krefeld
Luft (gefiltert)	Druckluft-Hausleitung

14.1.2 mL-Reaktorsystem für die Ganzzell-Biokatalyse

Zunächst wurde das am besten geeignete Reaktorsystem für die Ganzzell-Biokatalyse im mL-Maßstab ermittelt. Dazu wurden Umsetzungen von D,L-Alanin mit *Trigonopsis variabilis* durchgeführt. Durch den Einsatz unterschiedlicher Mengen des Biokatalysators konnte die Sauerstofflimitierung und eine eventuell auftretende Katalysatorinhibierung untersucht werden.

Der theoretische Verlauf der Sauerstoffaufnahme ist linear ansteigend bis zur maximalen Sauerstofftransferrate. Die Steigung des linearen Abschnitts ist für alle Reaktionssysteme gleich, nämlich identisch zur eingesetzten Katalysatormenge; dies aber nur unter der Voraussetzung, dass der Katalysator nicht inhibiert, zerstört oder ausgetragen wird. Die maximale Sauerstofftransferrate ist für jedes System spezifisch, abhängig vom spezifischen Stoffübergangskoeffizienten für Sauerstoff k_{La} .

Ein Vergleich mit den eingesetzten Katalysatormengen zeigt, dass nur für den MTP-Schüttler und den Mehrfachrührplatz die komplette Enzymaktivität erhalten bleibt. Die maximale Sauerstofftransferate ist für den Mehrfachrührplatz am größten. Dieses System lässt sich auch eher als der MTP-Schüttler mit einem Rührkesselreaktor vergleichen, was eine spätere Maßstabsvergrößerung erleichtert. Ferner ist der Leistungseintrag so groß, dass mit 87 % Glycerin noch eine starke Verwirbelung zu erkennen ist. Deswegen wurde dieses Reaktionssystem für Biotransformationen im mL-Maßstab eingesetzt.

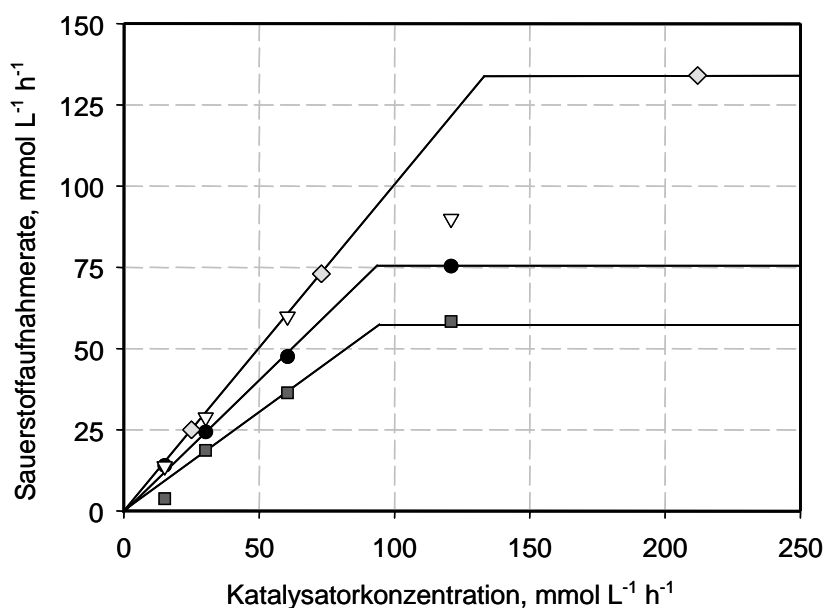


Abbildung 14.1 Errechnete Sauerstoffaufnahme rate (OUR) verschiedener Reaktorsysteme bei unterschiedlicher Katalysatormenge (*D*-Aminosäureoxidase-Aktivität) im Reaktionsansatz (50 mM *D,L*-Alanin). Thermomixer ●: 1,5 mL Reaktionsgefäß, 300 µL Reaktionsvolumen, 1400 min⁻¹ Schüttelfrequenz, 3 mm Exzentrizität; MTP-Schüttler ▽: Mikrotiterplatte mit 96 tiefen Reaktionsmulden mit quadratischem Querschnitt, 300 µL Reaktionsvolumen, 2000 min⁻¹ Schüttelfrequenz, 2 mm Exzentrizität. Rührblock ■: 10 mL-Spritze als Reaktionsgefäß, 2000 µL Reaktionsvolumen, 1400 min⁻¹ Drehzahl des magnetisch induktiv angetriebenen Magnetrührstäbchens, Mehrfachrührplatz ◇: 4 mL-Glasgefäße, 2800 µL Reaktionsvolumen, 2000 min⁻¹ Drehzahl des magnetisch angetriebenen kreuzförmigen Magnetrührstäbchens.

Tabelle 14.6: Einzelteile des mL-Reaktorsystems „Mehrfachrührplatz“

Mehrfachrührplatz Poly 15, 100-990 min ⁻¹ , 10 W, Bestellnummer 442-3133 (VWR)
Mehrfachrührplatz Multipoint 15, 80-2000 min ⁻¹ , 20 W, Bestellnummer 442-3226 (VWR)
Probengläschen, Glas, klar, Bestellnummer H306.1 (Roth)
Kreuzmagnetührstäbchen, Durchmesser 10 mm, Bestellnummer 442-0075 (VWR)

14.1.3 Chemikalien

Tabelle 14.7: Allgemeine Chemikalien

Chemikalie	Reinheitsgrad	Hersteller	Produktnummer
Acetophenon	> 98 %	Merck	800028
<i>p</i> -Aminobenzoat	> 99 %	Sigma	A-9878
di-Ammoniumhydrogencitrat	≥ 98 %	Merck	101155
Ammoniumhepta- molybdat*4H ₂ O	~82 % als MoO ₃	Merck	101182
Ammoniumsulfat	≥ 99,5 %	Merck	101217
Biotin	> 99 %	Fluka	14400
Borsäure	≥ 99,8 %	Merck	100165
Calciumsulfat*2H ₂ O	≥ 99 %	Roth	P741.1
Casein-Pepton	unb.	Merck	102239
Clerol FBA 265	unb.	Cognis	-
Clerol FBA 3107	unb.	Cognis	-
Corn Steep Liquor	unb.	Sigma	C-4648
<i>o</i> -Dianisidin*2HCl	unb.	Sigma	D-3252
EDTA	> 99 %	Sigma	E 5513
Eisen(II)sulfat*7H ₂ O	≥ 99,5 %	Merck	103965
Ethanol	> 99,8 %	Merck	100983
Folsäure	~98 %	Sigma	F-7876
D-Glukose*H ₂ O	unb.	Merck	108342

D-Glukose*H ₂ O (für 200 L-Kultivierung)	≥ 99,5 %	Roth	6780
Glycerin	~ 87 %	Merck	104091
Hefeextrakt (mikrobiol.)	unb.	Merck	111926
Hefeextrakt OHLY KAT	unb.	Deutsche Hefewerke	-
Horse Radish Peroxidase	unb.	Roche	128066
Isopropanol	> 99 %	Merck	818766
Kaliumcarbonat	≥ 99,5 %	Merck	104924
Kaliumcyanat	≥ 97 %	Fluka	60160
Kaliumdihydrogenphosphat	≥ 99 %	Roth	3907
di-Kaliumhydrogenphosphat	≥ 99 %	Roth	P749.2
Kupfer(II)sulfat*5H ₂ O	≥ 99 %	Merck	102790
Magnesiumsulfat*7 H ₂ O	≥ 99,5 %	Merck	105886
Malzextrakt	unb.	Merck	105391
NADP ⁺ (Natriumsalz)	unb.	Calbiochem	481971
Mangan(II)sulfat*H ₂ O	≥ 99 %	Merck	105941
Natriumacetat	> 99,5 %	Merck	116100
Natriumcitrat	≥ 99,5 %	Fluka	71497
Natriumchlorid	≥ 99 %	Roth	P029
Natriumhydroxid	≥ 98 %	Merck	106482
Natriumhydroxid (für 200 L-Kultivierung)	≥ 99 %	Roth	9356
Natriummolybdat	≥ 99,5 %	Merck	105621
Nikotinsäure	≥ 99,5 %	Merck	106811
D-Pantothenat	unb.	Sigma	P-2250
L-Rhamnose	≥ 99 %	Fluka	83650
Pyridin	≥ 99,8 %	Fluka	82702
Riboflavin	unb.	Sigma	R-4500
D-Saccharose	≥ 99,5 %	Roth	4621
Salzsäure	32 %	Merck	100319

Schwefelsäure	30 %	Merck	100731
Thiamin	> 99 %	Fluka	95160
Trifluoressigsäureanhydrid	> 99 %	Fluka	802605
Tris-HCl	≥ 99 %	Roth	9090
Triton X 100	unb.	Roth	3051
Tween 80	unb.	Merck	817061
Vitamin B12	~ 99 %	Sigma	V-2876
Wasserstoffperoxid	30 % w/v	Sigma	H1009
Yeast Nitrogen Base	unb.	Difco	239210
Zinksulfat*7H ₂ O	≥ 99,5 %	Merck	108883

Tabelle 14.8: Edukte und Produkte der Biokatalyse

Edukt/Produkt	Reinheitsgrad	Hersteller	Produktnummer
D,L-Alanin	≥ 99 %	Fluka	05150
D-Alanin	≥ 98 %	Sigma	A-7377
4-Cl-ACE	> 98 %	Merck	818571
4-Cl-AP	> 98 %	Merck	802605
(3R,5S)-6-Cl-3,5-DHHB	unb.	Jülich Fine Chemicals	-
(3S,5S)-6-Cl-3,5-DHHB	unb.	Jülich Fine Chemicals	-
6-Cl-DOHB	~80 %	Jülich Fine Chemicals	-
(R)-4-Cl-HBE	~ 96 %	Aldrich	460516
(S)-4-Cl-HBE	~ 96 %	Aldrich	460524
6-Cl-5-HOHB	unb.	Jülich Fine Chemicals	-
(R,S)-1-4-Cl-PE	> 97 %	Merck	814834
EBA	~ 93 %	Merck	801808
2,5-Hexandion	≥ 99 %	Fluka	00780
2,5-Hexandiol	99 %	Aldrich	H1,190-4
(2R,5R)-Hexandiol	≥ 99 %	Fluka	52792

HPA	unb.	Sigma	M-2625
HPP	≥ 98 %	Sigma	H-5005
(R)-HPPE	≥ 99 %	Fluka	56187
2-Octanon	≥ 98 %	Merck	820926
(R,S)-2-Octanol	> 97 %	Merck	820925
(R)-2-Octanol	99 %	Aldrich	147990
PFAP	97 %	Interchim	32258
(R,S)-PFPE	> 97 %	Fluka	76748
(S)-PFPE	unb.	Interchim	858330
D,L-Tyrosin	≥ 98 %	Sigma	T-3379
D-Tyrosin	≥ 98 %	Sigma	T-3254

Tabelle 14.9: Lösungsmittel

Lösungsmittel	Reinheitsgrad	Hersteller	Produktnummer
<i>n</i> -Butylacetat	> 99,5 %	Merck	109652
<i>n</i> -Decan	> 99 %	Merck	803405
1-Decanol	> 99 %	Merck	803463
Diisopropylether	> 99 %	Merck	100867
Ethylacetat	> 99,5 %	Merck	109623
<i>n</i> -Hexan	> 96 %	Merck	822280
Methy- <i>tert</i> -butylether	> 99,5 %	Merck	101849

Tabelle 14.10: Ionische Flüssigkeiten

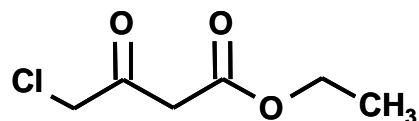
Ionische Flüssigkeit	Reinheitsgrad	Lotnummer	Produktnummer	Verunreinigungen (Angaben von Solvent Innovation)
[BMIM][PF ₆]	98 %	223	99,021-1	unb.
[BMIM][PF ₆]	98 %	521	99,021-1	21,8 ppm Fluorid, 428,3 ppm Chlorid, 174,5 ppm Bromid, 1318,6 ppm H ₂ O
[BMIM][Tf ₂ N]	98 %	291	99,100-1	227,4 ppm Chlorid, 427,7 ppm Bromid, 1401,2 ppm H ₂ O
[BMIM][Tf ₂ N]	98 %	474	99,100-1	181,7 ppm Chlorid, 2184,0 ppm H ₂ O
[OMA][Tf ₂ N]	98 %	326	99,105-1	unb.
[OMA][Tf ₂ N]	98 %	355	99,105-1	122,3 ppm Chlorid, 167,2 ppm Bromid, 1307,5 ppm H ₂ O
[OMA][Tf ₂ N]	98 %	440	99,105-1	308,2 Sulfat, 779,1 ppm H ₂ O
[BMIM][OcSO ₄]	98 %	303	99,110-1	83,7 ppm Fluorid, 37,7 ppm Chlorid, 4307,0 ppm Bromid, 5939,3 ppm H ₂ O
[BMIM][BF ₄]	98 %	289	99,020-1	68,3 ppm Chlorid, 1454,1 ppm Fluorid, 7519,0 ppm H ₂ O

Alle ionischen Flüssigkeiten wurden von Solvent Innovation, Köln, bezogen. Zur Herstellung und Reinigung ist folgendes bekannt:

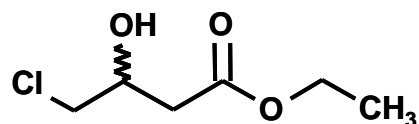
Die ILs mit [BF₄], [PF₆] und [Tf₂N]-Anionen werden durch Salzaustausch aus den entsprechenden Halogeniden oder im Falle vom [OMA][Tf₂N] aus dem Methylsulfat hergestellt. Die einzuführenden Anionen werden als Alkalisalz eingesetzt, z.B. das [Tf₂N] als Lithium-Salz. Da die Edukte alle wasserlöslich sind, das Produkt aber hydrophob ist, läßt sich dies durch mehrfaches Waschen mit Wasser von den Verunreinigungen befreien. [BMIM][OcSO₄] wird ähnlich hergestellt aus [BMIM][Cl] und Natriumoctylsulfat. Hier muß das Produkt mit CH₂Cl₂ aus Wasser extrahiert werden, da das Octylsulfat nicht hydrophob genug ist. Auch hier wird mehrmals mit Wasser gewaschen, typischerweise bis sich in der Wasserphase kein Chlorid mehr nachweisen läßt (Silbernitrat-Test).

14.1.4 Eigenschaften der Edukte und Produkte der Ketonreduktionen

4-Chloracetessigsäureethylester (4-Cl-ACE), CAS 638-07-3

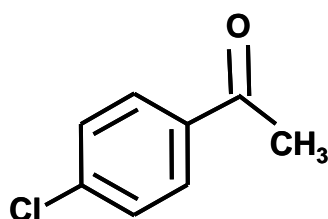


				Quelle
Molekulargewicht	MG	164,59	g mol ⁻¹	Merck
Dichte (20°C)	ρ	1,21	g cm ⁻³	Merck
Molekularvolumen	MV	136,0	cm ³ mol ⁻¹	aus MG und ρ
Schmelzpunkt	T _m	-8	°C	Merck
Siedepunkt	T _b	220	°C	Merck
Dampfdruck	P _v	0,1	hPa	Merck
Dynamische Viskosität (20°C)	η	4,72	mPa s	Amidjojo (2004)
Kinematische Viskosität (20°C)	ν	3,9 · 10 ⁻⁶	m ² s ⁻¹	Amidjojo (2004)
Oberflächenspannung (20°C)	σ	34,8	g s ²	Amidjojo (2004)

4-Chlor-3-hydroxybuttersäureethylester (4-Cl-HBE), CAS 90866-33-4 (*R*), 86728-85-0 (*S*)

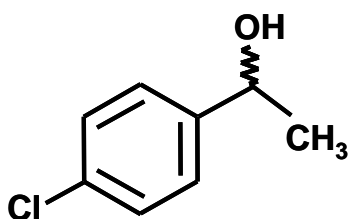
				Quelle
Molekulargewicht	MG	166,66	g mol ⁻¹	Sigma
Dichte (25°C)	ρ	1,19	g cm ⁻³	Sigma
Molekularvolumen	MV	140,1	cm ³ mol ⁻¹	aus MG und ρ
Siedepunkt	T _b	93-95	°C	Sigma

4-Chloracetophenon (4-Cl-AP), CAS 99-91-2

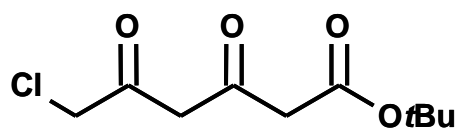


				Quelle
Molekulargewicht	MG	154,60	g mol^{-1}	Merck
Dichte (20°C)	ρ	1,19	g cm^{-3}	Merck
Molekularvolumen	MV	129,9	$\text{cm}^3 \text{ mol}^{-1}$	aus MG und ρ
Schmelzpunkt	T_m	18-20	°C	Merck
Siedepunkt	T_b	230-232	°C	Merck
Dampfdruck (90°C)	P_v	7	hPa	Merck
Dynamische Viskosität (20°C)	η	2,73	mPa s	Amidjojo (2004)
Kinematische Viskosität (20°C)	ν	$2,29 \cdot 10^{-6}$	$\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$	Amidjojo (2004)
Oberflächenspannung (20°C)	σ	14,5	g s^2	Amidjojo (2004)

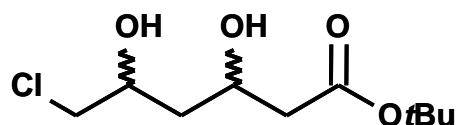
1-(4-Chlorphenyl)ethanol (4-Cl-PE), CAS 3391-10-4 (R,S), (R), (S)



				Quelle
Molekulargewicht	MG	156,61	g mol^{-1}	Merck
Dichte (20°C)	ρ	1,17	g cm^{-3}	Merck
Molekularvolumen	MV	133,9	$\text{cm}^3 \text{ mol}^{-1}$	aus MG und ρ
Siedepunkt	T_b	80-82	°C	Merck

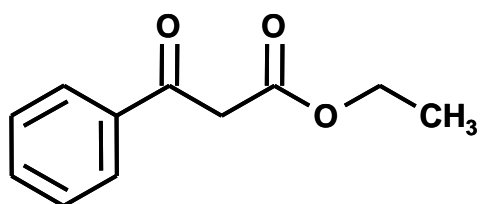
6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester (6-Cl-DOHB), (80 % Reinheit)

				Quelle
Molekulargewicht	MG	234,68	g mol ⁻¹	Amidjojo (2004)
Dichte (20°C)	ρ	1,157	g cm ⁻³	Amidjojo (2004)
Molekularvolumen	MV	202,7	cm ³ mol ⁻¹	Amidjojo (2004)
Siedepunkt	T _b	313	°C	Amidjojo (2004)
Dynamische Viskosität (20°C)	η	56,1	mPa s	Amidjojo (2004)
Kinematische Viskosität (20°C)	ν	2,3	m ² s ⁻¹	Amidjojo (2004)
Oberflächenspannung (30°C)	σ	24,5	g s ²	Amidjojo (2004)

6-Chlor-3,5-dihydroxyhexansäure-*tert*-butylester (6-Cl-DHHB)

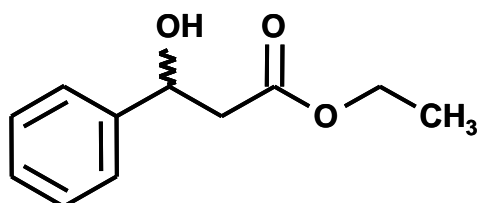
				Quelle
Molekulargewicht	MG	238,7	g mol ⁻¹	Amidjojo (2004)
Dichte (20°C)	ρ	1,17	g cm ⁻³	Amidjojo (2004)

Benzoylessigsäureethylester (EBA), CAS 94-02-0



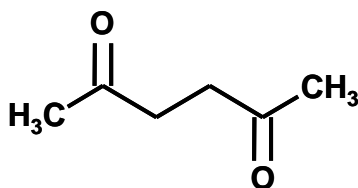
				Quelle
Molekulargewicht	MG	192,22	g mol ⁻¹	Merck
Dichte (25°C)	ρ	1,11	g cm ⁻³	Sigma
Molekularvolumen	MV	173,2	cm ³ mol ⁻¹	aus MG und ρ
Siedepunkt (Zersetzung)	T _b	265-270	°C	Merck
Dampfdruck (108°C)	P _v	1	hPa	Merck
Dynamische Viskosität (20°C)	η	8,07	mPa s	Engelking (2004)
Kinematische Viskosität (20°C)	ν	7,26 10 ⁻⁶	m ² s ⁻¹	Engelking (2004)

3-Hydroxy-3-phenylpropionsäureethylester (HPPE), CAS (R,S), 72656-47-4(R), 33401-74-0 (S)

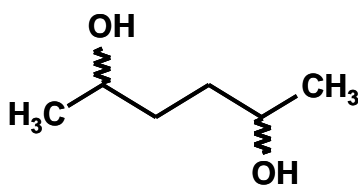


				Quelle
Molekulargewicht	MG	194,23	g mol ⁻¹	Sigma
Dichte (20°C)	ρ	1,119	g cm ⁻³	Engelking (2004)
Molekularvolumen	MV	173,6	cm ³ mol ⁻¹	aus MG und ρ

2,5-Hexandion, CAS 110-13-4

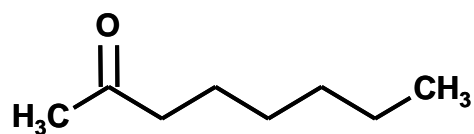


				Quelle
Molekulargewicht	MG	114,15	g mol ⁻¹	Merck
Dichte (20°C)	ρ	0,974	g cm ⁻³	Merck
Molekularvolumen	MV	117,2	cm ³ mol ⁻¹	aus MG und ρ
Schmelzpunkt	T _m	-5,4	°C	Merck
Siedepunkt	T _b	192,2	°C	Merck
Dampfdruck	P _v	0,6	hPa	Merck

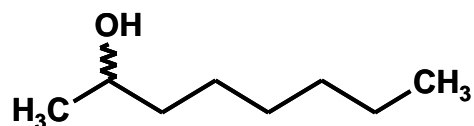
2,5-Hexandiol, CAS 2935-44-6 (*R,S*), 17299-07-9 (*2R,5R*), 34338-96-0 (*2S,5S*)

				Quelle
Molekulargewicht	MG	118,17	g mol ⁻¹	Sigma
Dichte (25°C)	ρ	0,961	g cm ⁻³	Sigma
Molekularvolumen	MV	123,0	cm ³ mol ⁻¹	aus MG und ρ
Schmelzpunkt	T _m	50-54	°C	Sigma
Siedepunkt	T _b	212-218	°C	Sigma

2-Octanon, CAS 111-13-7

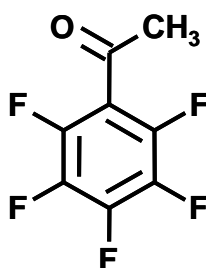


				Quelle
Molekulargewicht	MG	128,22	g mol ⁻¹	Merck
Dichte (20°C)	ρ	0,82	g cm ⁻³	Merck
Molekularvolumen	MV	156,4	cm ³ mol ⁻¹	aus MG und ρ
Schmelzpunkt	T _m	-16	°C	Merck
Siedepunkt	T _b	172-173	°C	Merck

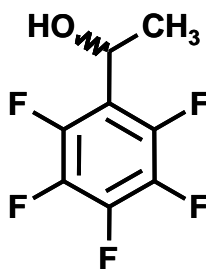
2-Octanol, CAS 123-96-6 (*R,S*), 5978-70-1 (*R*), 6169-06-8 (*S*)

				Quelle
Molekulargewicht	MG	130,23	g mol ⁻¹	Merck
Dichte (20°C)	ρ	0,82	g cm ⁻³	Merck
Molekularvolumen	MV	158,8	cm ³ mol ⁻¹	aus MG und ρ
Schmelzpunkt	T _m	-39	°C	Merck
Siedepunkt	T _b	179	°C	Merck
Dampfdruck (20°C)	P _v	0,25	hPa	Merck

2,3,4,5,6-Pentafluoroacetophenon, CAS 652-29-9



				Quelle
Molekulargewicht	MG	210,10	g mol ⁻¹	Sigma
Dichte (25°C)	ρ	1,476	g cm ⁻³	Sigma
Molekularvolumen	MV	142,3	cm ³ mol ⁻¹	aus MG und ρ
Siedepunkt	T _b	130-131	°C	Sigma

1-(2,3,4,5,6-Pentafluorophenyl)ethanol (PFPE), CAS 830-50-2 (*R,S*), 104371-21-3 (*R*), 104371-20-2 (*S*)

				Quelle
Molekulargewicht	MG	212,12	g mol ⁻¹	Sigma
Schmelzpunkt	T _m	32-43	°C	Sigma
Siedepunkt	T _b	80-82	°C	Sigma

14.1.5 Kultivierungsmedien

Glukose und Kaliumphosphat-Puffer wurden generell separat und getrennt von den restlichen Medienbestandteilen autoklaviert. Die Autoklavierung erfolgte für 20 min bei 121 °C. Instabile Medienbestandteile wurden durch einen 0,2 µm-Sterilfilter direkt in das autoklavierte Medium zugegeben.

Tabelle 14.11: *Trigonopsis variabilis* Komplexmedium

Komponente	Konzentration
Glukose*H ₂ O	20 g L ⁻¹
Malzextrakt	20 g L ⁻¹
Casein-Pepton	10 g L ⁻¹
Hefeextrakt (mikrobiol.)	5,0 g L ⁻¹

Glukose*H₂O wurde in einer 200 g L⁻¹-Stammlösung autoklaviert. Die Komplexbestandteile wurden in 90 % des Endvolumens gelöst, auf pH 6,8 eingestellt, autoklaviert und steril mit der Glukoselösung vereinigt.

Tabelle 14.12: *Trigonopsis variabilis* Minimalmedium

Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
Glukose*H ₂ O	20 g L ⁻¹	ZnSO ₄ *7H ₂ O	40 mg L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	4,0 g L ⁻¹	FeSO ₄ *7H ₂ O	25 mg L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,0 g L ⁻¹	CaSO ₄ *2H ₂ O	20 mg L ⁻¹
MgSO ₄ *7H ₂ O	1,0 g L ⁻¹	CuSO ₄ *5H ₂ O	1,0 mg L ⁻¹
NaCl	50 mg L ⁻¹	Thiamin	100 µg L ⁻¹
MnSO ₄ *H ₂ O	40 mg L ⁻¹	Biotin	20 µg L ⁻¹

Glukose*H₂O wurde in einer 200 g L⁻¹-Stammlösung autoklaviert. KH₂PO₄ wurde nach Einstellung auf pH 6,0 als 40 g L⁻¹-Stammlösung autoklaviert. Die Salze (außer KH₂PO₄) wurden in einer 10-fach konzentrierten Stammlösung autoklaviert. Anschließend wurden diese Bestandteile steril vereinigt und die Vitamine als

2000-fache Stammlösung steril hinzu filtriert. Zur Induktion der DAO-Expression wurde 100-fach konzentrierte (66 g L^{-1}), auf pH 6,0 eingestellte und steril filtrierte *N*-Carbamoyl-D,L-Alanin-Lösung hinzu gegeben. Zum Schluss wurde das Medium mit sterilem VE-Wasser aufgefüllt.

Tabelle 14.13: *Trigonopsis variabilis* Zulaufmedium 2-stufiger Prozess

Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
Glukose*H ₂ O	800 g L ⁻¹	FeSO ₄ *7H ₂ O	25 mg L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	25,0 g L ⁻¹	CaSO ₄ *2H ₂ O	20 mg L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	100,0 g L ⁻¹	CuSO ₄ *5H ₂ O	1,0 mg L ⁻¹
MgSO ₄ *7H ₂ O	1,0 g L ⁻¹	Riboflavin	400 µg L ⁻¹
NaCl	50 mg L ⁻¹	Thiamin	100 µg L ⁻¹
H ₃ BO ₃	50 mg L ⁻¹	Biotin	20 µg L ⁻¹
MnSO ₄ *H ₂ O	40 mg L ⁻¹	<i>N</i> -Carbamoyl-	660 mg L ⁻¹
ZnSO ₄ *7H ₂ O	40 mg L ⁻¹	D,L-Alanin	

Glukose*H₂O wurde in einer 880 g L^{-1} -Lösung autoklaviert. (NH₄)₂SO₄ wurde trocken autoklaviert. KH₂PO₄, alle anderen Salze und *N*-Carbamoyl-D,L-Alanin wurde als 10-fach konzentrierte Lösung hergestellt, auf pH 6,0 gebracht und steril filtriert. Die Vitamine wurden in einer 2000-fachen Konzentration gelöst und steril filtriert. Anschließend wurden alle Bestandteile steril vereinigt.

Tabelle 14.14: *Trigonopsis variabilis* Zulaufmedium 4-stufiger Prozess

Komponente	Konzentration
Glukose*H ₂ O	800 g L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g L ⁻¹

Glukose*H₂O wurde in einer 800 g L^{-1} -Lösung autoklaviert. (NH₄)₂SO₄ wurde trocken autoklaviert. Anschließend wurden beide Bestandteile steril vereinigt. *N*-Carbamoyl-D,L-Alanin wurde als 100-fach konzentrierte Lösung (50 mL, 66 g L^{-1}) hergestellt, steril filtriert und zur Induktion in den Reaktor gepumpt.

Tabelle 14.15: *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 (wt) Komplexmedium

Komponente	Konzentration
Glukose*H ₂ O	12,5 g L ⁻¹
Yeast Nitrogen Base	3,35 g L ⁻¹

Glukose*H₂O wurde in einer 13,9 g L⁻¹-Lösung autoklaviert. Anschließend wurde Yeast Nitrogen Base (YNB) als 10-fach konzentrierte Lösung steril zuzufiltriert. Das Medium wurde vor Verwendung frisch hergestellt.

Tabelle 14.16: *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 Komplexmedium (CSL-Medium)

Komponente	Konzentration
Glukose*H ₂ O	20 g L ⁻¹
Casein-Pepton	20 g L ⁻¹
Corn Steep Liquor	2,0 % v/v
Hefeextrakt (mikrobiol.)	10 g L ⁻¹

Glukose*H₂O wurde in einer 200 g L⁻¹-Lösung autoklaviert. Die Komplexbestandteile als 1,1-fach konzentrierte Lösung autoklaviert. Anschließend wurden die beiden Bestandteile steril vereinigt.

Tabelle 14.17: *Escherichia coli* K12 Komplexmedium (LB-Medium)

Komponente	Konzentration
Glukose*H ₂ O	6,0 g L ⁻¹
Hefeextrakt (mikrobiol.)	10 g L ⁻¹
NaCl	5,0 g L ⁻¹
Casein-Pepton	5,0 g L ⁻¹

Glukose*H₂O wurde in einer 200 g L⁻¹-Lösung autoklaviert. Die restlichen Komponenten wurden in 1,1-fach konzentrierter Lösung autoklaviert. Anschließend wurden die beiden Bestandteile steril vereinigt.

Tabelle 14.18: *Escherichia coli* DH5α Komplexmedium (LB-Amp-Medium)

Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
Glukose*H ₂ O	6,0 g L ⁻¹	Casein-Pepton	5,0 g L ⁻¹
Hefeextrakt (mikrobiol.)	10 g L ⁻¹	Ampicillin	100 mg L ⁻¹
NaCl	5,0 g L ⁻¹	L-Rhamnose* H ₂ O	2,0 g L ⁻¹

Glukose*H₂O wurde in einer 200 g L⁻¹-Lösung autoklaviert. Die restlichen Bestandteile wurden in 1,1-fach konzentrierter Lösung autoklaviert. Anschließend wurden die beiden Bestandteile steril vereinigt. Ampicillin wurde als 100-fach konzentrierte Lösung steril filtriert und zugegeben. Zur Induktion der ADH-Expression wurde L-Rhamnose*H₂O-Lösung in 100-facher Konzentration steril filtriert und zum Medium gegeben. Die ADH-Aktivität der Zellen ist höher, wenn keine Glukose im Medium ist und die L-Rhamnose bei OD₆₀₀ = 0,5 zugegeben wird (siehe 0).

Tabelle 14.19: *Lactobacillus kefir* Komplexmedium (modifiziertes MRS-Medium)

Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
Glukose*H ₂ O	22 g L ⁻¹	K ₂ HPO ₄	2,0 g L ⁻¹
Hefeextrakt OHLY KAT	25 g L ⁻¹	Tween 80	1,0 g L ⁻¹
Natriumacetat	5,0 g L ⁻¹	MgSO ₄ *7H ₂ O	200 mg L ⁻¹
di-Ammonium-hydrogencitrat	5,0 g L ⁻¹	MnSO ₄ *H ₂ O	50 mg L ⁻¹

Glukose*H₂O wurde in einer 200 g L⁻¹-Lösung autoklaviert. Die restlichen Bestandteile wurden in 1,1-fach konzentrierter Lösung hergestellt, auf pH 6,0 eingestellt und autoklaviert. Anschließend wurden beide Bestandteile steril vereinigt. Als Anfangsmedium für einen Zulaufprozess enthielt das Medium nur 8,0 g L⁻¹ Hefeextrakt OHLY KAT.

Tabelle 14.20: *Lactobacillus kefir* Zulaufmedium

Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
Glukose*H ₂ O	440 g L ⁻¹	K ₂ HPO ₄	5,0 g L ⁻¹
Hefeextrakt OHLY KAT	160 g L ⁻¹	MgSO ₄ *7H ₂ O	500 mg L ⁻¹
di-Ammonium- hydrogencitrat	5,0 g L ⁻¹	MnSO ₄ *H ₂ O	125 mg L ⁻¹

Glukose*H₂O wurde in einer 880 g L⁻¹-Lösung autoklaviert. Die restlichen Komponenten wurden in 2-facher Konzentration autoklaviert. Anschließend wurden die beiden Bestandteile steril vereinigt.

Tabelle 14.21: *Fusarium oxysporum* Komplexmedium

Komponente	Konzentration
Glukose*H ₂ O	20 g L ⁻¹
Malzextrakt	20 g L ⁻¹
Casein-Pepton	10 g L ⁻¹
Hefeextrakt (mikrobiol)	5,0 g L ⁻¹

Glukose*H₂O wurde in einer 200 g L⁻¹-Stammlösung autoklaviert. Die Komplexbestandteile wurden in 90 % des Endvolumens gelöst, auf pH 6,8 eingestellt, autoklaviert und steril mit der Glukoselösung vereinigt.

Tabelle 14.22: *Fusarium oxysporum* Minimalmedium

Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
Glukose*H ₂ O	20 g L ⁻¹	CaSO ₄ *2H ₂ O	40 mg L ⁻¹
D,L-Alanin	7,0 g L ⁻¹	NaMoO ₄	40 mg L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	4,0 g L ⁻¹	MnSO ₄ *H ₂ O	40 mg L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,0 g L ⁻¹	ZnSO ₄ *7H ₂ O	40 mg L ⁻¹
MgSO ₄ *7H ₂ O	1,0 g L ⁻¹	FeSO ₄ *7H ₂ O	25 mg L ⁻¹
H ₃ BO ₃	50 mg L ⁻¹	Thiamine*HCl	100 µg L ⁻¹
CuSO ₄ *5H ₂ O	45 mg L ⁻¹	Biotin	20 µg L ⁻¹
NaCl	40 mg L ⁻¹	evtl. weitere Zusätze	

Glukose*H₂O wurde in einer 200 g L⁻¹-Stammlösung autoklaviert. KH₂PO₄ wurde nach Einstellung auf pH 6,0 als 40 g L⁻¹-Stammlösung autoklaviert. Die Salze (außer KH₂PO₄) wurden in einer 10-fach konzentrierten Stammlösung autoklaviert. Anschließend wurden diese Bestandteile steril vereinigt und die Vitamine als 2000-fache Stammlösung steril hinzu filtriert. Zum Schluss wurde das Medium mit sterilem VE-Wasser aufgefüllt.

Tabelle 14.23: *Fusarium oxysporum* Minimalmedium-Zusätze

Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
CaCl	500 mg L ⁻¹	Riboflavin	40 µg L ⁻¹
Nikotinsäure	400 µg L ⁻¹	Ca-Pantothenat	40 µg L ⁻¹
p-Aminobenzoat	50 µg L ⁻¹	Folsäure	20 µg L ⁻¹
Vitamin B12	45 µg L ⁻¹		

Die Lösung wurde in 2000-facher Konzentration steril filtriert und steril zum Medium zugegeben.

14.1.6 Bestimmung der DAO-Aktivität mittels Optode

Zur Messung des Sauerstoff-Partialdrucks im mL-Maßstab wurde eine pO₂-Optode und das fluorometrische Meßsystem Microx TX (Presens, Regensburg) verwendet. Für den Test wurden 980 µL Substratlösung (z.B. 2 g L⁻¹ D-Alanin in Kaliumphosphat-Puffer 0,1 M, pH 8,0) in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß im Thermomixer (0 min⁻¹, 30°C) vorgelegt. Dann wurde die Optode bis knapp über dem Gefäßboden eingetaucht. Sobald ein stabiler Messwert vorlag, wurden 20 µL Probe (Zellsuspension oder Zellextrakt; Blindwert: 20 µL Puffer) zugegeben und mit der Pipette gründlich durchmischt.

Aus der Abnahme des Sauerstoff-Partialdrucks konnte die Aktivität nach Gleichung 14.1 berechnet werden:

Gleichung 14.1:
$$EA_x = 10 \cdot \frac{(q_{O_2} - q_{O_2, \text{Blind}}) \cdot c_{O_2}^* \cdot V_R}{V_x \cdot c_x}$$

mit	EA _x	spezifische Enzymaktivität [µkat g _{BTM} ⁻¹]
	q _{O₂}	Sauerstoff-Verbrauchsrate [% pO ₂ s ⁻¹]
	c _{O₂} [*]	Sauerstoff-Sättigungskonzentration [µmol L ⁻¹]
	V _R	Reaktionsvolumen [µL]
	V _x	Probenvolumen [µL]
	c _x	Zellkonzentration im Probenvolumen [g _{BTM} L ⁻¹]

Die langsame Aufsättigung nach Begasung einer Pufferlösung mit Stickstoff zeigte, dass diese bei der Berechnung des Sauerstoffverbrauchs vernachlässigt werden konnte.

14.2 Racematspaltung von Aminosäuren mit *Fusarium oxysporum*

14.2.1 *Fusarium oxysporum* (wt)

Der filamentöse Pilz *Fusarium oxysporum* gehört zur Familie der Hypocreaceae. Die Zellen besitzen eine DAO-Aktivität.

14.2.2 Stamm und Stammhaltung

Fusarium oxysporum DSM 12646 wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH als Aktivkultur erworben. Zum Anlegen einer Zellbank erfolgte daraus durch Impfenabstrich eine Schüttelkolben-Kultivierung in Komplexmedium (Tabelle 14.21). Gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase wurden 500 μL Zellsuspension zu 500 μL steriler Glycerinlösung (60 % v/v) in sterile 1,5 mL Reaktionsgefäße gegeben. Die Gefäße wurden bei -80°C gelagert.

14.2.3 Kultivierung im Schüttelkolben

Die Kultivierung von *Fusarium oxysporum* erfolgte analog zur Kultivierung von *Trigonopsis variabilis*.

14.2.4 Kultivierung von *Fusarium oxysporum* in Suspension

In Komplexmedium wächst *Fusarium oxysporum* in großen Aggregaten (Abbildung 14.2a und b). Das verhindert eine effiziente Prozessführung durch Stofftransportlimitierung in den Aggregaten. Es gelang, ein Minimalmedium zu entwickeln, in dem der Pilz in kleinen Aggregaten fast in Suspension wächst (Abbildung 14.2c und d).

In dieser Suspensionskultur werden im Satzverfahren $6 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ erreicht., mit einer DAO-Aktivität der Zellen von $8 \mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$.

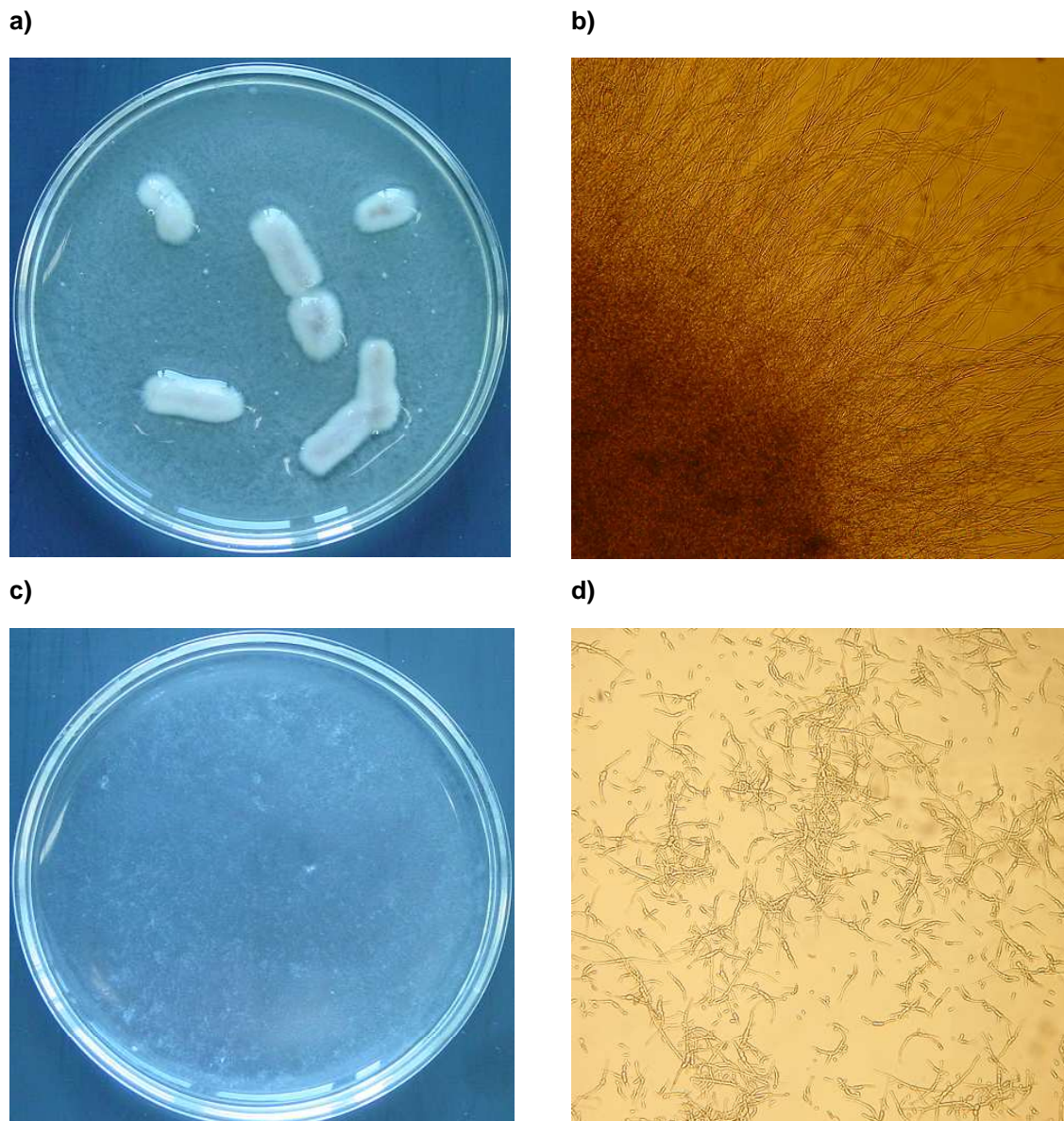


Abbildung 14.2 Morphologie von *Fusarium oxysporum* bei Schüttelkolben-Kultivierungen in Komplexmedium **a)** makroskopisch, **b)** mikroskopisch (100-fach vergrößert) und in Minimalmedium **c)** makroskopisch, **d)** mikroskopisch (100-fach vergrößert).

14.2.5 Steigerung der DAO-Aktivität durch Ergänzung des Mediums mit Vitaminen

Durch Zugabe weiterer Bestandteile, vor allem Vitamine wird eine spezifische DAO-Aktivität von $12 \mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$ erzielt. Das entspricht einer Steigerung von 344 % gegenüber Gabler *et al.* (2000).

14.3 Herstellung von *Escherichia coli* DH5 α PFADH mit ADH-Aktivität und asymmetrische Synthese von (S)-PFPE

14.3.1 Variation der Induktion

Escherichia coli DH5 α PFADH exprimiert die transgene ADH aus *Pseudomonas fluorescens* (PF-ADH) unter einem Rhamnose-induzierbaren Promotor. Daher wurden verschiedene Strategien der Induktion auf die Biomasseausbeute und ADH-Aktivität hin untersucht. Abbildung 14.3 zeigt, dass eine Zugabe von Glukose zum Medium die Biomasseausbeute reduziert. Die Ursache dafür ist wahrscheinlich eine Produktion von Acetat, das inhibierend auf das Wachstum der Zellen wirkt. Ohne Glukose wird eine Biotrockenmassekonzentration von etwa 3,7 g_{BTM} L⁻¹ erreicht.

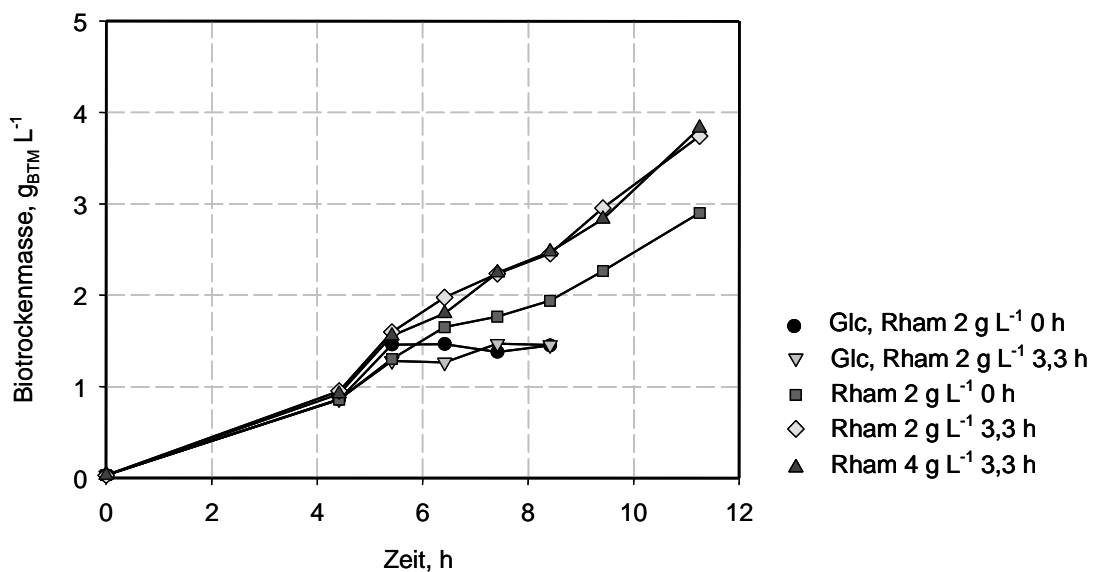


Abbildung 14.3 Verlauf der Biotrockenmassekonzentration von *Escherichia coli* DH5 α PFADH in LB-Medium mit verschiedenen Glukose und Rhamnosekonzentrationen. Glc: 6 g L⁻¹ Glukose von Beginn an im Medium. Rham: Rhamnose von Beginn an im Medium (0 h) oder nach 3,3 h zugegeben in verschiedenen Konzentrationen.

Die spezifische ADH-Aktivität der Zellen ist in Abbildung 14.4 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Aktivität allgemein sehr niedrig ist. Die maximale ADH-Aktivität wird in Medium ohne Glukose bei Zugabe von 2 g L⁻¹ Rhamnose nach

3,3 Stunden (bei $OD_{600} = 0,5$) mit $0,35 \mu\text{kat g}_{\text{BTM}}^{-1}$ erzielt. Somit wird zum Beispiel mit *Lactobacillus kefir* Wildtyp eine 40 mal höhere ADH-Aktivität erreicht.

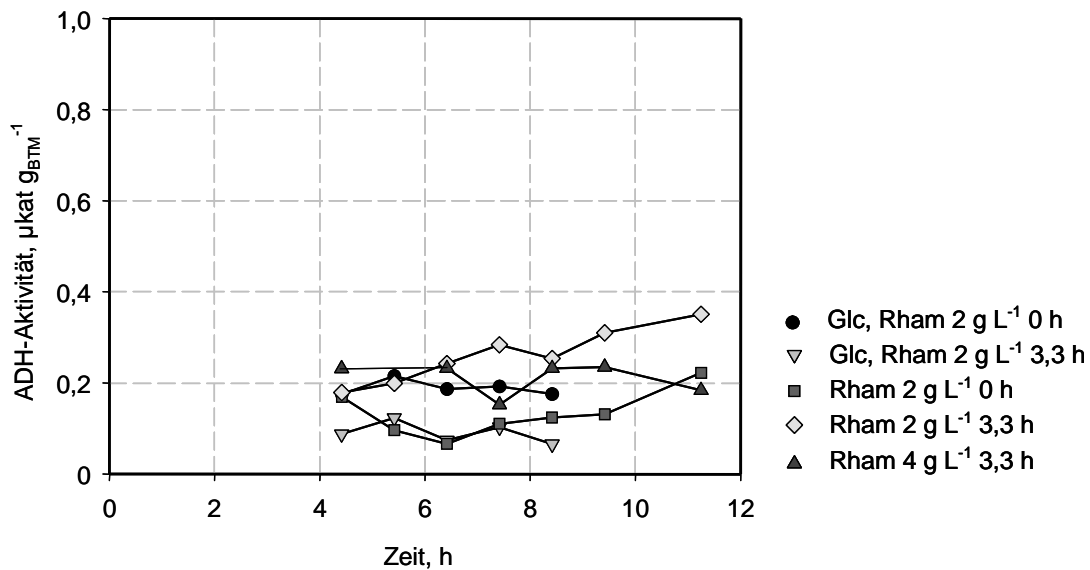


Abbildung 14.4 Verlauf der Alkoholdehydrogenase (ADH)-Aktivität von *Escherichia coli* DH5 α PFADH in LB-Medium mit verschiedenen Glukose und Rhamnosekonzentrationen. Glc: 6 g L^{-1} Glukose von Beginn an im Medium. Rham: Rhamnose von Beginn an im Medium (0 h) oder nach 3,3 h zugegeben in verschiedenen Konzentrationen.

14.3.2 Asymmetrische Synthese von (S)-PFAP im zweiphasigen System ionische Flüssigkeit/Puffer

Es wurden Umsetzungen mit $20 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ *Escherichia coli* DH5 α PFADH und 25 mM PFAP in der wässrigen Phase durchgeführt. Dabei wurde (S)-PFPE mit sehr hohem Enantiomerenüberschuss von 99,4 % gebildet, allerdings nur mit einer Ausbeute von 3 % nach 20 %. Mit ionischen Flüssigkeiten wurden in einem ersten Versuch keine Verbesserungen erzielt.

14.4 Eigenschaften ionischer Flüssigkeiten

14.4.1 Biokompatibilität ionischer Flüssigkeiten

Es wurde versucht, die Biokompatibilität ionischer Flüssigkeiten neben dem Test mit Farbstoffen auch über das Wachstum der Zellen in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten zu bestimmen. In Abbildung 14.5 sind die Wachstumskurven von *Lactobacillus kefir* dargestellt. Aufgrund möglicherweise auftretender Veränderungen in der Sauerstoffzufuhr durch die Anwesenheit ionischer Flüssigkeiten und das Mitreißen von Zellen während der Sedimentation der ionischen Flüssigkeiten vor der Messung der optischen Dichte ist dieser Test aber nicht aussagekräftig.

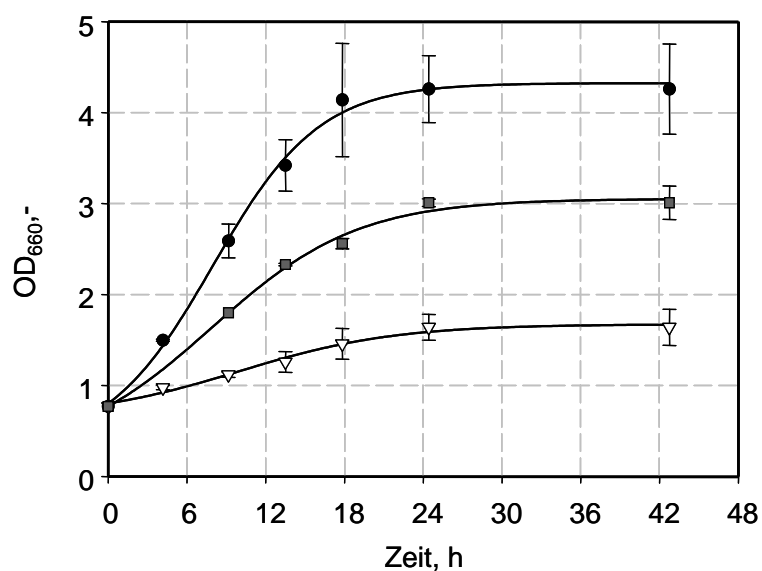


Abbildung 14.5 Optische Dichte (OD₆₆₀) von *Lactobacillus kefir* während einer Satzkultivierung in modifiziertem MRS-Medium in 4 mL-Reaktionsgefäßen im rein wässrigen Ansatz ●, mit 5 % v/v [BMIM][PF₆] ▽ oder 5 % v/v [BMIM][Tf₂N] ■. Die Linien dienen nur als visuelle Hilfen.

14.4.2 Stoffdaten ionischer Flüssigkeiten

Tabelle 14.24: Stoffdaten ionischer Flüssigkeiten. Quellen: ^a Solvent Innovation; ^b Merck & Co, ^c Huddleston et al. 2001

ionische Flüssigkeit	Molekulargewicht g mol ⁻¹	Dichte g mL ⁻¹	Schmelzpunkt °C	Zersetzungstemperatur °C	dynamische Viskosität mPa s	kinematische Viskosität mm ² s ⁻¹
[BMIM][PF ₆] 174501-64-5 CAS	284,2	1,37 ^a (20°C) 1,37 ^b (20°C)	16 ^a 12 ^b	> 300°C ^b	287,5 ^a (20°C) 385,0 ^b (20°C)	210,5 ^a (20°C) 281,0 ^b (20°C)
[BMIM][Tf ₂ N]	419,37	1,44 ^b (20°C)	(<25°C)		60,12 ^b (20°C) 27 ^c (25°C, H ₂ O gesättigt)	41,75 ^b (20°C)
[OMA][Tf ₂ N]	648,85	1,11 ^a (20°C) 1,11 ^b (20°C)	-75°C ^b -50°C ^b	> 340°C ^b	4665 ^a (20°C) 897,4 ^b (20°C)	4218 ^a (20°C) 808,5 ^b (20°C)
[BMIM][OcSO ₄]	348,5	1,05 ^a (20°C)	35-40 ^a		512,7 ^a (25°C)	487,2 ^a (25°C)
[BMIM][BF ₄] 174501-65-6 CAS	226,0	1,2 ^a (20°C) 1,21 ^b (20°C)	-75°C ^a -71°C ^b	> 300°C ^b	119,2 ^a (25°C) 145,2 ^b (20°C)	99,0 ^a (25°C) 120 ^b (20°C)

Huddleston *et al.* (2001) ermittelten zusätzlich die dynamischen Viskositäten von Wasser gesättigtem [BMIM][PF₆] zu 397 mPa s (trocken: 450 mPa s) und [BMIM][Tf₂N] zu 27 mPa s (trocken: 69 mPa s). In der gleichen Veröffentlichungen werden für die Oberflächenspannungen folgende Werte angegeben: [BMIM][BF₄]: trocken 46,6 mN m⁻¹; [BMIM][PF₆]: trocken 48,8 mN m⁻¹, Wasser gesättigt 49,8 mN m⁻¹; [BMIM][Tf₂N]: trocken 37,5 mN m⁻¹, Wasser gesättigt 36,8 mN m⁻¹ (Wasser 72,5 mN m⁻¹).

14.4.3 Mischbarkeit ionischer Flüssigkeiten mit Wasser und organischen Lösungsmitteln

Tabelle 14.25: Mischbarkeit ionischer Flüssigkeiten mit Wasser und organischen Lösungsmitteln

nicht mischbar
 teilweise mischbar
 komplett mischbar

Lösungsmittel	[BMIM][PF ₆]	[BMIM][Tf ₂ N]	[OMA][Tf ₂ N]	[BMIM][OcSO ₄]	[BMIM][BF ₄]
	φ ionische Flüssigkeit				φ ionische Flüssigkeit
	0,1 0,33 0,67 0,9 0,2 0,5 0,8	0,1 0,33 0,67 0,9 0,2 0,5 0,8	0,1 0,33 0,67 0,9 0,2 0,5 0,8	0,1 0,33 0,67 0,9 0,2 0,5 0,8	0,1 0,33 0,67 0,9 0,2 0,5 0,8
Wasser	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■
Ethylacetat	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■
Toluol	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■
Acetonitril	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■
n-Hexan	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■
1-Octanol	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■
di-Ethylether	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■
MTBE	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■
Chloroform	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■
DMSO	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■

14.4.4 Löslichkeiten und Verteilungskoeffizienten von Ketonen und Alkoholen

Tabelle 14.26 Löslichkeiten verschiedener ADH-Edukte und -Produkte in Puffer und deren Verteilungskoeffizienten $\log D$ zwischen verschiedenen ionischen Flüssigkeiten und Puffer. ^{a)} Amidjojo 2004; ^{b)} Engelking 2004a; ^{c)} Merck Chemie Datenbank; ^{d)} LogKow (Syrres 2004), n.b. nicht bestimmt/nicht bekannt.

	Löslichkeit Puffer	$\log P^d$	[BMIM][PF ₆] $\log D_{IL/Puffer}$	[BMIM][Tf ₂ N] $\log D_{IL/Puffer}$	[OMA][Tf ₂ N] $\log D_{IL/Puffer}$
4-CI-AP	~ 6 mM	2,32	2,67 (+/- 0,17)	2,71 (+/- 0,10)	2,77 (+/- 0,17)
1-4-CI-PE	~ 25 mM	2,14	1,93 (+/- 0,08)	2,03 (+/- 0,09)	1,98 (+/- 0,12)
6-CI-DOHB	~ 0,6 mM ^{a)}	n.b.	1,92 (+/- 0,08)	2,03 (+/- 0,04)	1,82 (+/- 0,02)
6-CI-DHHB	~ 29 mM ^{a)}	n.b.	n.b.	1,21 (+/- 0,03)	n.b.
PFAP	~ 2 mM	2,68	2,60 (+/- 0,00)	2,86 (+/- 0,01)	2,68 (+/- 0,02)
PFPE	~ 15 mM	2,50	1,70 (+/- 0,00)	2,06 (+/- 0,00)	1,88 (+/- 0,00)
4-CI-ACE	~ 286 mM ^{b)}	0,05	1,52 (+/- 0,02)	1,48 (+/- 0,02)	1,69 (+/- 0,06)
4-CI-HBE	~ 759 mM ^{b)}	0,56	0,75 (+/- 0,02)	0,76 (+/- 0,03)	0,77 (+/- 0,05)
EBA	~ 14 mM ^{b)}	1,87	2,65 (+/- 0,07)	2,77 (+/- 0,03)	2,65 (+/- 0,11)
HPPE	~ 65 mM ^{b)}	1,52	1,85 (+/- 0,05)	2,16 (+/- 0,01)	1,69 (+/- 0,07)
2-Oktanon	~ 5 mM	2,37	2,27 (+/- 0,01)	2,66 (+/- 0,01)	2,87 (+/- 0,03)
2-Octanol	~ 4 mM	2,90	1,74 (+/- 0,01)	2,08 (+/- 0,00)	2,26 (+/- 0,01)
2,5-Hexandion	löslich ^{c)}	-0,27	1,33 (+/- 0,01)	1,33 (+/- 0,01)	1,07 (+/- 0,07)
2,5-Hexandiol	n.b.	0,62	0,86 (+/- 0,04)	1,04 (+/- 0,04)	0,83 (+/- 0,05)

Tabelle 14.27 Verteilungskoeffizienten $\log D$ verschiedener ADH-Edukte und -Produkte zwischen verschiedenen ionischen Flüssigkeiten und *n*-Hexan.

	[BMIM][PF ₆] $\log D_{\text{L}/n\text{-Hexan}}$	[BMIM][Tf ₂ N] $\log D_{\text{L}/n\text{-Hexan}}$	[OMA][Tf ₂ N] $\log D_{\text{L}/n\text{-Hexan}}$
4-CI-AP	0,53 (+/- 0,00)	0,67(+/- 0,00)	0,72 (+/- 0,02)
1-4-CI-PE	0,89 (+/- 0,080)	1,12 (+/- 0,09)	0,99 (+/- 0,03)
6-CI-DOHB	1,07 (+/- 0,02)	116 (+/- 0,04)	1,37 (+/- 0,06)
PFAP	0,57 (+/- 0,05)	0,85 (+/- 0,01)	0,70 (+/- 0,02)
PFPE	1,70 (+/- 0,00)	1,79 (+/- 0,00)	1,72 (+/- 0,00)
4-CI-ACE	1,40 (+/- 0,16)	1,20 (+/- 0,05)	0,99 (+/- 0,11)
4-CI-HBE	1,31 (+/- 0,06)	1,36 (+/- 0,04)	1,01 (+/- 0,11)
EBA	2,45 (+/- 0,05)	2,44 (+/- 0,05)	2,51 (+/- 0,01)
HPPE	1,35 (+/- 0,02)	1,36 (+/- 0,02)	1,36 (+/- 0,03)
2-Okтанон	-0,06 (+/- 0,15)	-0,17 (+/- 0,14)	0,39 (+/- 0,14)
2-Octanol	-0,51 (+/- 0,29)	-0,04(+/- 0,10)	0,30 (+/- 0,14)

