

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

**Reaktionstechnische Untersuchungen zur asymmetrischen
Synthese von chiralen Alkoholen mit *Lactobacillus kefir***

Dipl.-Ing. Maya Hapsari Amidjojo

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. Klaus Strohmeier
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz
2. Univ.-Prof. Dr.-rer. nat. Michael Müller,
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Die Dissertation wurde am 22.09.2004 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 02.12.2004
angenommen.

„Das Leben wie es sich uns darstellt, ist von der Asymmetrie des Universums und den sich daraus ergebenden Konsequenzen bestimmt“

(Louis Pasteur, 1848)

„White biotechnology is the integrated application of natural and engineering sciences for the technological use of living organisms, cells, parts thereof and molecular analogues for the production of goods and services“

(European Federation of Biotechnology, Bruxelles 2003)

“Industrial Biotechnology – also known as white biotechnology – is the application of modern biotechnology for the industrial production of chemical substances and bio-energy, using living cells and their enzymes, resulting in inherently clean processes“

(Belgian Royal Academy of Science, Bruxelles 2003)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz, der dieses Forschungsprojekt mit der interessanten Themenstellung ermöglicht hat. Darüber hinaus möchte ich ihm für die Betreuung und die Diskussionsbereitschaft während der gesamten Arbeitszeit am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik danken.

Mein weiterer Dank geht an meine Projektpartner am Forschungszentrum Jülich und des Instituts für Enzymtechnologie der Universität Düsseldorf. Prof. Dr. Christian Wandrey als Projektleiter. Prof. Dr. Michael Müller und Dr. Michael Wolberg für die Bereitstellung der Edukte und hilfreiche Tipps bei der Analytik. Dr. Ralf Takors und Michel Brik-Ternbach für die nette Zusammenarbeit. Dr. Werner Hummel und Andrea Weckbecker für die Hintergrundinformationen zu den Biokatalysatoren.

Dr. Thomas Dausmann und Ralf Feldmann von Jülich Fine Chemicals möchte ich für die Bereitstellung des Edukts, sowie für die informativen Gespräche zum *Lactobacillus kefir* danken.

Der Deutschen Bundesstiftung Umwelt danke ich für die Ermöglichung und Finanzierung des Projektes.

Ein großes Dankeschön geht an meine Studenten, die mich tatkräftig bei der Forschung und der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben und mit denen die Arbeit immer sehr amüsant gewesen ist. An meine Diplomanden: Pia Lindberg, Alessandro Nowak, Simon Mehler und Florian Hang. An meine Semestranten: Matthias Klauke, Jörg Laupitz, Ross Jones, Bernd Schwaiger und Hannes Link. Nicht zu vergessen Bertrand Sandjong, Sarah Fendt und Benjamin Le Page, die mich in Rahmen von Forschungspraktika unterstützt haben.

Der Werkstattbesetzung, Herrn Karl-Heinz Zacher und Norbert Werth, möchte ich insbesondere für die Hilfe bei technischen Problemen und für die angenehme Zusammenarbeit danken. Georg Kojro von der elektrischen Werkstatt für die Unterstützung bei elektronischen und Multimedia-Problemen.

Ein besonderer Dank gilt Irma Einsle, der guten Seele des Lehrstuhls, ohne die Vieles organisatorisch nicht so reibungsfrei ablaufen würde.

Herrn Prof. Dr.-Ing. Stichlmair und Danuta Styrnik vom Lehrstuhl für Fluidverfahrenstechnik danke ich für die Möglichkeit der Mitbenutzung des Labors und der Geräte, Nick Poth für die immer sehr interessanten Fachgespräche.

Den Kollegen am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik danke ich für die interessanten Diskussionsrunden und die stets lustige Arbeitsatmosphäre. An Dr. Ezequiel Franco-Lara und nochmals Hannes Link gilt hier der besondere Dank für die modell-basierte Unterstützung.

Meinen beiden Kollegen Holger Pfründer und Armin Tiemeyer gilt für die tapfere und penible Korrektur meiner Arbeit mein besonderer Dank. Armin Tiemeyer natürlich auch für die aufheiternden Einlagen bei den vielen Schreib-Nachtschichten und -Wochenenden und für den Optimismus mit dem er mich immer anstecken konnte.

Selbstverständlich meiner Familie, meinen Eltern und meinem kleinen Bruder, für die Unterstützung aus weiter Ferne in all den Jahren.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Problemstellung und Zielsetzung	3
3	Theoretischer Hintergrund.....	5
3.1	HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren	5
3.1.1	Wirkungsweise von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren	5
3.1.2	Konvergente Synthese von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren	7
3.2	Herstellung von 6-Cl-(3R,5S)-Dihydroxyhexansäure-tert-Butylester ..	9
3.2.1	Chemische Syntheseroute.....	9
3.2.2	Chemo-enzymatische Syntheserouten	10
3.2.3	Synthese über die Ganzzellbiotransformation mit <i>Lactobacillus kefir</i> . 13	
3.3	6-Cl-3,5-Dioxohexansäure-tert-Butylester	14
3.3.1	Herstellung von 6-Cl-3,5-Dioxohexansäure-tert-Butylester	14
3.3.2	Untersuchungen zur Stabilität von 6-Cl-3,5-Dioxohexansäure-tert-Butylester	16
3.4	Herstellung von 4-Cl-3-(S)-Hydroxybutanoat-Ethylester.....	18
3.4.1	Herstellung von 3-(S)-Hydroxybuttersäureester mit Hefen.....	19
3.4.2	Herstellung von 4-Cl-3-(S)-Hydroxybutanoat-Ethylester mit <i>Lactobacillus</i> oder deren Enzymen.....	21
3.5	Herstellung von 1-(R)-(4-Cl-Phenyl)-Ethanol.....	22
3.6	Biokatalytische asymmetrische Synthese chiraler Alkohole	23
3.6.1	Synthese chiraler Alkohole und Hydroxysäureester mittels Alkoholdehydrogenasen.....	23
3.6.2	Vergleich der Ganzzellbiotransformation gegenüber Umsetzungen mit isolierten Enzymen	24
3.6.3	Cofaktor-Regenerierung	25
3.6.4	Veränderung der Membranpermeabilität bei Ganzzellbiotransformationen	26
3.6.5	Charakterisierung von Ganzzellbiotransformationen.....	28
3.7	Methoden zur Ganzzellbiotransformation schlecht wasserlöslicher Edukte.....	32
3.7.1	Organisch-wässrige Zwei-Phasen-Systeme	32
3.7.2	Membranbioreaktoren	33
3.7.3	Einsatz von Löslichkeitsvermittlern.....	33
3.7.4	Einsatz von Mikroemulsionen.....	34
3.7.5	Einsatz von Cyclodextrinen als Löslichkeitsvermittler	34
3.7.6	Reaktivextraktion mit Hilfe von Adsorbentien.....	34
3.7.7	Einsatz von reversen Mizellen, Verkapselung oder Immobilisierung der Biokatalysatoren	35

3.8	Charakterisierung von Dispersionen.....	35
3.8.1	Tropfenbildung in gerührten Systemen	36
3.8.2	Methoden zur Tropfengrößenbestimmung	41
3.8.3	Berechnung des Stofftransportes	44
3.9	Biologische Grundlagen zu <i>Lactobacillus kefir</i>.....	48
3.9.1	Zentralstoffwechsel der Milchsäurebakterien.....	48
3.9.2	Wachstum von Milchsäurebakterien	50
3.9.3	Allgemeine Charakterisierung des Wachstums von Mikroorganismen	51
3.9.4	Glukose-Transportmechanismen von Milchsäurebakterien	52
3.9.5	Phenylethanol-Alkoholdehydrogenase aus <i>Lactobacillus kefir</i>	53
4	Material und Methoden	55
4.1	Bestimmung der physikochemischen Stoffdaten	55
4.1.1	Dichtebestimmung.....	55
4.1.2	Bestimmung der Oberflächenspannung und Grenzflächenspannung .	55
4.1.3	Bestimmung der kinematischen Viskosität.....	56
4.1.4	Bestimmung der Löslichkeit in wässrigen Systemen.....	56
4.1.5	Mittels ACD/I-Lab kalkulierte Stoffdaten	56
4.2	Analytik.....	57
4.2.1	Bestimmung und Einstellung des pH.....	57
4.2.2	Bestimmung der optischen Dichte und der Biotrockenmassekonzentration	57
4.2.3	Analyse der Metabolite mittels HPLC.....	57
4.2.4	Glukose-Bestimmung mittels AccuCheck.....	58
4.2.5	Analyse der Metabolite mittels Enzymkits.....	58
4.2.6	Wasserstoffperoxid-Nachweis	59
4.2.7	Bestimmung der Enzymaktivität	59
4.2.8	Bestimmung der Membranintegrität	60
4.2.9	Probenextraktion für die gaschromatographische Analytik	60
4.2.10	Gaschromatographische Analytik für DOHTB, HOHB und DHHB	61
4.2.11	Gaschromatographische Analytik für 4-Cl-ACE und CHBE	62
4.2.12	Gaschromatographische Analytik für 4-Cl-AP und 1-4-Cl-PE.....	63
4.3	Herstellung der Pufferlösungen für die Biotransformationen	64
4.4	Verwendeter Biokatalysator und Präparation der Zellen für die Biotransformation.....	64
4.5	Herstellung von <i>Lactobacillus kefir</i>.....	65
4.5.1	Verwendeter Stamm und Herstellung der Glycerin-Zellstammlösungen.	65
4.5.2	Modifiziertes Wachstumsmedium	65
4.5.3	Parameterstudien zur Kultivierung von <i>Lactobacillus kefir</i>	66
4.5.4	Herstellung der ersten Vorkultur für die 150 L-Kultivierung (Schüttelkolben)	66

4.5.5	Herstellung der zweiten Vorkultur für die 150 L-Kultivierung (5 L-Maßstab).....	67
4.5.6	Kultivierung im 150 L Maßstab	68
4.5.7	Zellernte	70
4.6	Beschreibung der Reaktionssysteme für die Biotransformationen.....	70
4.6.1	Reaktionssystem im 400 µL-Maßstab.....	70
4.6.2	Gerührtes System im 25-250 mL-Maßstab	71
4.6.3	Gerührte Blasensäule (250 mL-Maßstab)	72
4.7	Ermittlung der kinetischen Daten der Biotransformation	73
4.8	Modellbasierte Ermittlung eines Zudosierungsprofils mittels genetischem Algorithmus	75
4.9	Untersuchungen zur Tropfengrößenbestimmung.....	76
4.9.1	Beschreibung des 2 L-Laborrührkesselreaktors	76
4.9.2	In-line Tropfengrößenbestimmung mittels 3-D-ORM	78
4.9.3	Off-line Tropfengrößenbestimmung	79
5	Ergebnisse und Diskussion.....	80
5.1	Herstellung von <i>Lactobacillus kefir</i> Zellen für die asymmetrische Reduktion	80
5.1.1	Parameterstudien zur Kultivierung von <i>Lactobacillus kefir</i>	80
5.1.2	Produktion von <i>Lactobacillus kefir</i> im 150 L-Maßstab	85
5.2	Asymmetrische Synthese von 1-(R)-(4-Cl-Phenyl)-Ethanol.....	87
5.2.1	Untersuchungen zur Stabilität der Alkoholdehydrogenase LK-ADH ₁ ..	87
5.2.2	Untersuchungen zum Cosubstrat	89
5.2.3	Inhibierung durch 1-(R)-(4-Cl-Phenyl)-Ethanol	92
5.2.4	Untersuchungen zum Einfluss von Löslichkeitsvermittlern und organischen Lösungsmitteln	96
5.2.5	Einsatz von Isopropanol als zweites Cosubstrat.....	99
5.2.6	Einfluss der 4-Cl-Acetophenon-Ausgangskonzentration auf die Umsetzung	102
5.2.7	Einfluss des Leistungseintrags und der Prozesszeit auf den Enantiomerenüberschuss	104
5.2.8	Asymmetrische Synthese von 1-(R)-(4-Cl-Phenyl)-Ethanol im 200 mL-Maßstab	105
5.2.9	Beurteilung der Biotransformation zur 1-(R)-(4-Cl-Phenyl)-Ethanol-Synthese.....	109
5.3	Asymmetrische Synthese von 6-Cl-(3R,5S)-Dihydroxyhexansäure-tert-Butylester	112
5.3.1	Untersuchungen zur Stabilität der Alkoholdehydrogenasen	113
5.3.2	Ermittlung geeigneter Reaktionsbedingungen	114
5.3.3	Untersuchungen zur spezifischen Produktbildungskapazität.....	120
5.3.4	Untersuchungen des Sauerstoffeinflusses auf die Nebenproduktbildung	121

5.3.5	Vergleich der Zusammensetzung verschiedener Edukt-Chargen	125
5.3.6	Untersuchungen zur Ermittlung eines geeigneten Edukt-Zudosierungsprofils	126
5.3.7	Modellgestützte Ermittlung der kinetischen Daten	131
5.3.8	Entwicklung eines DOHTB-Zudosierungsprofils und Implementierung im 50 mL-Maßstab.....	135
5.3.9	Beurteilung der Biotransformation zur 6-Cl-(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-Dihydroxyhexansäure-tert-Butylester-Synthese	141
5.4	Asymmetrische Synthese von Ethyl-4-Cl-3-(<i>S</i>)-Hydroxybuttersäure-Ethylester	144
5.4.1	Untersuchung zum Einfluss von Isopropanol auf die Umsetzung	144
5.4.2	Asymmetrische Synthese von Ethyl-4-Cl-3-(<i>S</i>)-Hydroxybuttersäure-Ethylester im 200 mL-Maßstab	147
5.4.3	Beurteilung der Biotransformation zur Ethyl-4-Cl-3-(<i>S</i>)-Hydroxybuttersäure-Ethylester-Synthese	148
5.5	Verfahrenstechnische Untersuchungen zur mikrodispersiven Eduktbereitstellung.....	151
5.5.1	Modellgestützte Ermittlung des Sauterdurchmessers und der Stoffaustauschfläche in Abhängigkeit vom Leistungseintrag	151
5.5.2	Modellgestützte Abschätzung der Edukt-Transportrate	155
5.5.3	Parameterstudien zum Einfluss des Leistungseintrags und des Phasenanteils auf die Edukt-Transportrate	156
5.5.4	Experimentelle Untersuchungen zum Einfluss des Leistungseintrags auf den Sauterdurchmesser von 4-Cl-Acetophenon.....	159
5.5.5	Experimentelle Untersuchungen zum Einfluss des Phasenanteils auf den Sauterdurchmesser von 4-Cl-Acetophenon.....	161
5.5.6	Experimentelle Untersuchungen zum Einfluss von Isopropanol als Cosolvenz auf den Sauterdurchmesser von 4-Cl-Acetophenon.....	162
5.5.7	Experimentelle Untersuchungen zur Tropfenbildung in Anwesenheit von <i>L. kefir</i>	163
5.5.8	Vergleich der geschätzten maximalen Edukt-Transportraten und der Produktbildungsraten der asymmetrischen Reduktionen.....	168
6	Zusammenfassung und Ausblick	172
7	Literaturverzeichnis.....	176
	Abkürzungsverzeichnis.....	189
	Anhang.....	196

1 Einleitung

Zu Beginn des 19. Jahrhunderts wurde die Chiralität bestimmter chemischer Moleküle entdeckt. Eine Forderung nach enantiomerenreinen Wirkstoffen ist jedoch erst seit 1961 gegeben. Dieses wurde durch den Wirkstoff Thalidomid ausgelöst, welcher seit Anfang 1950 von der Firma Chemie Grünenthal in Racematform als das Beruhigungsmittel Contergan[®] vermarktet wurde. Eine Häufung von Missbildungen bei Neugeborenen führte 1961 zu der Erkenntnis, dass nur das (*R*)-Enantiomer für diese beruhigende Wirkung verantwortlich ist, das (*S*)-Enantiomer jedoch eine embryotoxische und teratogene Wirkung aufweist [Agranat et al., 2002]. Durch diesen Vorfall wurde das öffentliche Interesse an der Bedeutung der Chiralität biologisch aktiver Substanzen geweckt.

Die Wirkungsweise der chiralen Substanzen auf biologische Systeme ist durch die Natur der Enzyme bedingt. Diese sind selber aus chiralen Bausteinen, den Aminosäuren, aufgebaut und besitzen somit die Fähigkeit zur stereoselektiven Unterscheidung von Molekülen. Entscheidende physiologische Prozesse im menschlichen Körper sind dabei homochiral. Während sich die Enantiomere in manchen Fällen in ihrer Wirkungsweise nicht voneinander unterscheiden, so sind viele Beispiele gegeben, wo ein Enantiomer pharmakologisch aktiv ist, während das entgegengesetzte Enantiomer keine Wirkung zeigt oder im schlimmsten Fall eine schädliche Wirkung hat.

Im Fall einer entgegengesetzten Wirkung der Enantiomere von chiralen Molekülen ist die Notwendigkeit des Einsatzes der nicht toxischen enantiomerenreinen Stereoisomere zwingend. Des Weiteren ist bei Racematen, bei denen nur eines der Enantiomere biologische Aktivität aufweist, durch den Einsatz eines enantiomerenreinen Arzneimittels die exakte Wirkdosis besser zu bestimmen [Böhm, 2002].

Aufgrund dieser Situation wurden die Richtlinien zur Arzneimittelherstellung von der US Food and Drug Administration (FDA) angepasst. Die Einführung von enantiomerenreinen Arzneimitteln, welche früher als Racemat vermarktet wurden, wird seither gefördert [FDA, 1992]. Seitdem kann für enantiomerenreine Wirkstoffe eine jährliche Steigerung von über 13% im Weltmarkt verzeichnet werden. Von den im Jahr 2000 neu eingeführten Arzneimitteln waren 76% enantiomerenrein, wogegen der Anteil im Jahr 1991 nur 21% betrug [Agranat et al., 2002]. Der Gesamtverkauf enantiomerenreiner Arzneimittel erreichte 2000 einen Wert von 132 Mrd. US\$, 2001 einen Wert von 147 Mrd. US\$ und wird auf 200 Mrd. US\$ im Jahr 2008 geschätzt [Stinson, 2001; Economist, 2002]. Die Bedarfsteigerung der enantiomerenreinen Arzneimittel ist in Abb. 1-1 zu erkennen. Während der Markt für die nicht enantiomerenreinen Wirkstoffe jedes Jahr um 7-8% gestiegen ist, war bei den enantiomerenreinen Wirkstoffen ein jährliches Wachstum von 15-16% zu verzeichnen [Bommarius und Riebel, 2004]. Im Jahr 2001 beträgt der Anteil bereits 36% des Gesamtweltmarkts.

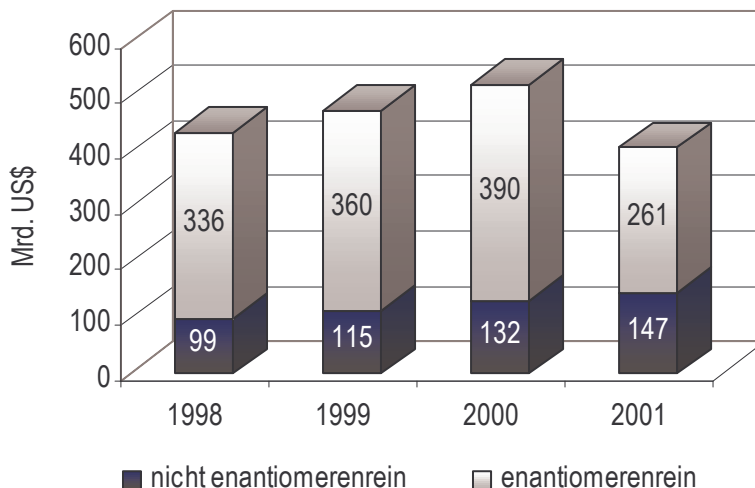


Abb. 1-1 Wachstum des Bedarfs für enantiomerenreine Arzneimittel [Bommarius und Riebel, 2004; Economist, 2002]

Hierbei stellt die Gruppe der chiralen Synthone für die Arzneimittelherstellung (auch als „Advanced Pharmaceutical Intermediates“ bekannt) einen weiteren interessanten Markt dar [Bommarius und Riebel, 2004]. Diese sind chirale, kurzkettenige Bausteine für die Herstellung von komplexeren biologisch aktiven Wirkstoffen. Laut einer aktuellen Analyse der Unternehmensberatung Frost & Sullivan wird das Umsatzvolumen im Gesamtmarkt für Chiraltechnologie von 7.74 Mrd. US\$ im Jahr 2003 auf 14.94 Mrd. US\$ im Jahr 2009 anwachsen [Frost & Sullivan: <http://chemicals.frost.de>]. Wichtige chirale Bausteine sind hierbei chirale Alkohole. Diese kommen zum Beispiel bei der Synthese der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine) zum Einsatz. Diese sind die Wirkstoffgruppe der Cholesterin- und Lipidsenker, welche mit einem Jahresumsatz von 21.7 Mrd. US\$ im Jahr 2002 zu den umsatzstärksten Arzneimitteln gehören [IMS, 2004].

Bei der Synthese enantiomerenreiner Wirkstoffe können biotechnologische Prozesse einen Vorteil gegenüber der reinen chemischen Synthese vorweisen. Als Biotransformationen sind hierbei chemische Umwandlungen definiert, welche mit Hilfe von Mikroorganismen oder deren Enzyme katalysiert werden [Schlee und Kleber, 1991]. Diese haben in den letzten Jahren als Zwischenschritte in der asymmetrischen chemischen Synthese zunehmend an Bedeutung gewonnen. Grund dafür ist die Fähigkeit der Enzyme zur regio- und stereospezifischen Umsetzung der Komponenten, bei gleichzeitigen milden Reaktionsbedingungen (Umgebungstemperatur, Umgebungsdruck, wässriges Milieu, keine extremen pH-Werte), welche dem physiologischen Milieu der Mikroorganismen und deren Enzyme entsprechen. Im Gegensatz dazu werden bei den chemischen asymmetrischen Katalysen oftmals extreme, umweltunverträgliche Bedingungen benötigt, welches z.B. den Einsatz von Schwermetallkatalysatoren wie den Ruthenium-Komplex BINAP-Ru(II), den Einsatz toxischer organischer Lösungsmittel wie Dichlormethan, extreme Temperaturen und hohe Drücke umfasst [Ohkuma et al, 1994; Blaser et al., 2002].

2 Problemstellung und Zielsetzung

Chirale Alkohole sind bedeutende Bausteine bei der Synthese von Arzneimitteln, Aromastoffen und Agrochemikalien. Ein effektiver Weg für die Biosynthese von chiralen Alkoholen ist die asymmetrische Reduktion von prochiralen Ketonen über die Ganzzellbiokatalyse.

Ein oftmals auftretendes Problem ist hierbei die geringe Löslichkeit der prochiralen Ketone in Wasser. Dieses kann in geringen Umsetzungsgeschwindigkeiten durch limitierende Edukt-Konzentrationen und/oder durch eine Stofftransportlimitierung resultieren. Um dieses Problem zu umgehen, wird in vielen Fällen auf eine zweite organische Lösungsmittelphase als Eduktspeicher zurückgegriffen. Probleme beim Einsatz dieser Lösungsmittel, welche in einem hohen Volumenanteil verwendet werden, ist häufig deren Toxizität, Explosivität und Umweltschädlichkeit. Ein Ansatz um die Verwendung der organischen Lösungsmittel zu umgehen, ist die Zudosierung der Edukte als reine Phase in das wässrige Reaktionssystem. Um eine Stofftransportlimitierung zu verhindern, muss hierbei die Bereitstellung einer ausreichend hohen Stoffaustauschfläche gewährleistet sein. Dieses kann durch die Herstellung sehr feiner Edukt-Tropfen im gerührten Reaktionssystem erfolgen.

Eine andere Problematik bei diesen Biotransformationen ist oftmals die Toxizität der Edukte und/oder Produkte auf die Biokatalysatoren. Zusätzlich können diese inhibierende Effekte auf die Biokatalysatoren ausüben. Dieses resultiert sowohl in geringen Ausbeuten, als auch in geringen Umsetzungskapazitäten des Biokatalysators. Der Lösungsansatz für diese Problematik ist die Entwicklung einer geeigneten Zudosierungsstrategie für das Edukt. Hierfür ist eine reaktionstechnische Charakterisierung des Prozesses notwendig.

Auf dieser Problematik basierend lassen sich die Zielsetzungen der Arbeit wie folgt definieren:

- Bereitstellung der Edukte als reine Phase mit genügend hoher Stoffaustauschfläche im Reaktionssystem, um Stofftransportlimitierungen zu verhindern.
- Identifikation der Reaktionskinetiken ausgewählter asymmetrischer Synthesen.
- Modellgestützte Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Erzielung hoher Produkt-Konzentrationen, Ausbeuten, spezifische Umsetzungskapazitäten der Biokatalysatoren, Raum-Zeit-Ausbeuten und Enantiomerenüberschüsse.

Diese soll anhand von 3 ausgewählten asymmetrischen Reduktionen von prochiralen Ketonen zu ihren korrespondierenden chiralen Alkoholen untersucht werden. Als Biokatalysator wurde das Milchsäurebakterium *Lactobacillus kefir* verwendet, welches Alkoholdehydrogenasen mit hohen Aktivitäten für diese Reduktionsreaktionen besitzt. Darüber hinaus kann die Regenerierung des für die Alkoholdehydrogenasen notwendigen Cofaktors NADPH durch den Einsatz von *L. kefir* ganzen Zellen intrazellulär erfolgen.

Die zu untersuchenden asymmetrischen Reduktionen sind wie folgt:

- Synthese von 1-(*R*)-(4-Chlorphenyl)-Ethanol aus dem Keton 4-Cl-Acetophenon.
- Synthese von 6-Cl-(3*R*,5*S*)-Dihydroxyhexansäure-*tert*-Butylester aus der Diketosäure 6-Cl-3,5-Dioxohexansäure-*tert*-Butylester.
- Synthese von 4-Cl-3-(*S*)-Hydroxybuttersäure-Ethylester aus der Ketosäure Ethyl-4-Cl-Acetoacetat.

Der Schwerpunkt liegt bei der 6-Cl-(3*R*,5*S*)-Dihydroxyhexansäure-*tert*-Butylester-Synthese. 6-Cl-(3*R*,5*S*)-Dihydroxyhexansäure-*tert*-Butylester und 4-Cl-3-(*S*)-Hydroxybuttersäure-Ethylester sind beide essentielle Bausteine zur Herstellung von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren. Hierbei stellt die direkte Synthese des 6-Cl-(3*R*,5*S*)-Dihydroxyhexansäure-*tert*-Butylesters mit der Ganzzellbiokatalyse einen neuartigen Ansatz dar. Die mikrobielle Herstellung von 4-Cl-3-(*S*)-Hydroxybuttersäure-Ethylester ist dagegen für Hefe-Systeme gut erforscht, bringt jedoch oftmals das Problem einer geringen Stereoselektivität mit sich.

Es ist folgende Vorgehensweise geplant:

- Herstellung des Biokatalysators *L. kefir* mit ausreichend hohen Aktivitäten der für die Reduktionen benötigten Alkoholdehydrogenasen.
- Reaktionstechnische Untersuchungen zu den ausgewählten asymmetrischen Reduktionen.
- Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen und experimentelle Verifizierung.
- Ermittlung der mittleren Tropfendurchmesser der Edukte in Abhängigkeit unterschiedlicher Einflussparameter, um die Edukt-Transportraten abschätzen zu können.

3 Theoretischer Hintergrund

3.1 HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren

3.1.1 Wirkungsweise von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren

HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, auch als Statine bekannt, blockieren die *De-novo* Cholesterin-Synthese in der Leber, indem sie das dafür notwendige Schlüsselenzym 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) in seiner Wirkung hemmen. Dieses Enzym katalysiert die Umsetzung von HMG-CoA zu Mevalonat, ein früher und geschwindigkeitslimitierender Schritt in der Cholesterin-Biosynthese. Die 3,5-Dihydroxyheptansäure-Seitenkette der Statine bindet dabei reversibel und kompetitiv zum eigentlichen Substrat HMG-CoA an die aktive Bindungsstelle der HMG-CoA-Reduktase (siehe Abb. 3.1-1 und Abb. 3.1-2). Es wurde bewiesen, dass hierbei die absolute Stereochemie der 3,5-Dihydroxysäure (3*R*,5*S*) essentiell für die Strukturaktivität der Statine ist [Endo und Hasumi, 1993; Deisenhofer und Istvan, 2001].

Bei manchen Statinen (den so genannten *Prodrugs*), wie zum Beispiel Simvastatin liegt die HMG-CoA-ähnliche Seitenkette als β -Hydroxy-Lacton vor, welches dann *in vivo* in die aktive Hydroxysäure-Form hydrolysiert wird [Deisenhofer und Istvan, 2001].

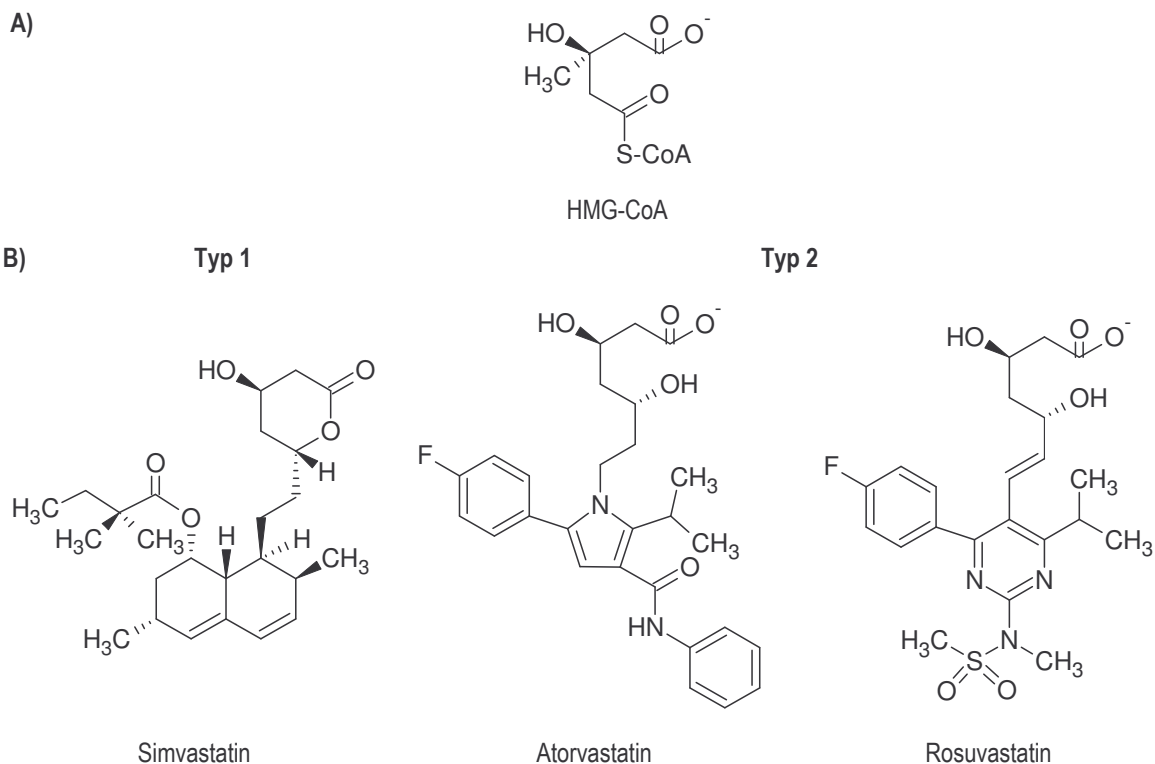


Abb. 3.1-1 Strukturformeln des eigentlichen Substrats HMG-CoA (A) und einigen Beispielen von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (B), unterteilt in Typ 1 Statine und Typ 2 Statine

partialsynthetische Veränderung von Lovastatin synthetisiert wird. [Manzoni und Rollini, 2002]

Sämtliche Vertreter der Typ 2 Statine werden hingegen vollsynthetisch hergestellt. Im Gegensatz zu den natürlichen Statinen, die allesamt eine sehr ähnliche chemische Struktur der hydrophoben Seitenkette, ein Hydroxy-Hexahydro-Naphtalen-Ringsystem, besitzen (siehe Abb. 3.1-1), unterscheiden sich die hydrophoben Seitengruppen der vollsynthetischen Statine stark voneinander. Diese sind größer als bei den Statinen der Gruppe 1, weswegen sie mehr Wechselwirkungen mit der aktiven Seite des Enzyms eingehen können. Dadurch ist eine niedrigere Dosierung dieser vollsynthetischen Präparate möglich [Deisenhofer und Istvan, 2001; Stark, 2003].

Atorvastatin (Handelsname Lipitor®, Fa. Pfizer) und Simvastatin (Zocor®, Fa. Merck) sind dabei die Marktführer auf dem Statin-Markt. Zu den Neuentwicklungen bei den Statinen gehört Rosuvastatin (Fa. Astra-Zeneca), das seit August 2003 auf dem Markt ist. In der Phase III der klinischen Prüfung befindet sich der Wirkstoff Pitavastatin der Fa. Kowa Co., Japan [Asstech, 2003; IMS Health, 2004; Stark 2003].

3.1.2 Konvergente Synthese von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren

Bei der ursprünglich von Warner Lambert entwickelten linearen chemischen Synthese von Atorvastatin [Roth, 1987] wird nach 9 Synthesestufen (unter anderem einer stereokontrollierten Boranreduktion) Atorvastatin Calcium gewonnen. Mit Hilfe einer konvergenten Synthesestrategie mit Einsatz eines chiralen Acetonid-Derivats des (3*R*,5*S*)-Dihydroxyhexansäureesters (Acetonid-DHHB) konnte Warner-Lambert die Synthese vereinfachen (siehe Abb. 3.1-3) [Lin und Schweiss, 1997; Kleemann und Engel, 1999].

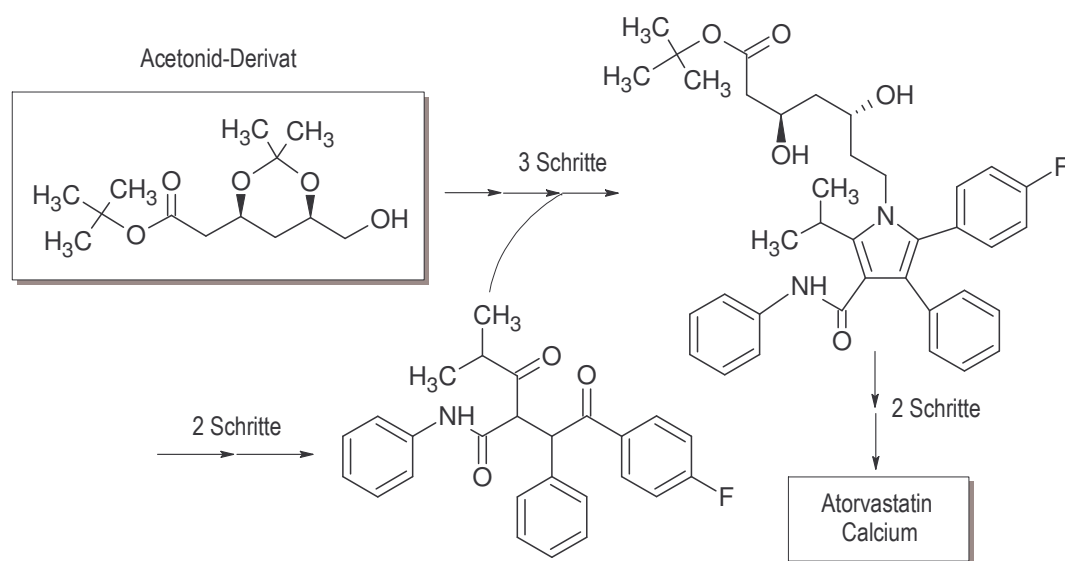


Abb. 3.1-3 Konvergente Synthesestrategie zur Herstellung von Atorvastatin nach Warner-Lambert mit Einsatz eines Acetonid-Derivat des (3*R*,5*S*)-Dihydroxyhexansäure-*tert*-Butylesters [Lin und Schweiss, 1997; Kleemann und Engel, 1999]

Tabelle 3.1-2 Übersicht der bekannten chemischen Syntheseverfahren zur Herstellung der Acetonid-Derivate der (3*R*,5*S*)-Dihydroxyhexansäureester [Inoue et al., 2002]

Ausgangsverbindung	Zwischenstufe(n)	Quelle
3-Hydroxy-Gamma-Butyrolacton	3,5-Dihydroxyhexansäureester	Japanese Kokai Publikation Hei-4-173767
3,4-Dihydroxybutyronitril Acetonid	3,5-Dihydroxyhexansäureester	Japanese Kokai Publikation Hei-2-262537
4-Cl-Acetoacetat-Acidester	Benzyloxy-Derivat, Reduktion und Kettenverlängerung	Japanese Kokai Publikation Hei-6-65226
4-Cl-3-(<i>S</i>)-Hydroxybuttersäureester	Kettenverlängerung und Reduktion	Thottathil et al., 1994
3-(<i>S</i>)-Hydroxybuttersäureester	Hydroxyoxohexansäureester	Inoue et al., 2002

3.2 Herstellung von 6-Cl-(3*R*,5*S*)-Dihydroxyhexansäure-*tert*-Butylester

Wie in Kapitel 3.1 beschrieben stellen die (3*R*,5*S*)-Dihydroxyhexansäureester eine essentielle chirale Zwischenstufe in der Synthese der Statin-Seitenkette dar. Die Bereitstellung von chiralen (3*R*,5*S*)-Dihydroxyhexansäureester-Derivaten würde daher in einer weiteren Vereinfachung der Gesamtsynthese resultieren.

In den folgenden Kapiteln werden bereits bekannte chemische bzw. chemoenzymatische Syntheserouten zur Herstellung von 6-Cl-(3*R*,5*S*)-Dihydroxyhexansäure-*tert*-Butylester vorgestellt, sowie ein neuartiges Verfahren zur biokatalytischen Herstellung des chiralen Bausteines gezeigt.

3.2.1 Chemische Syntheseroute

Bei einer industriell im Pilotmaßstab durchgeführten Synthese dient Ethyl-4-Cl-Acetoacetat als Ausgangsverbindung (siehe Abb. 3.2-1). Die Schlüsselreaktion dieser Synthese ist die enantioselektive Hydrierung der Ketogruppe am C3 des β -Ketoesters Ethyl-4-Benzyloxyacetoacetat. Diese erfolgt in Gegenwart des Schwermetall-Katalysators Ru-BINAP bei 100°C und 4 bar. Nach einer Hochvakuumdestillation wird bei -40°C und einem hohen Basenüberschuss ein C-C-Verknüpfungsschritt durchgeführt. Die darauf folgende asymmetrische Reduktion der Ketogruppe am C3 erfolgt bei -60°C unter Verwendung von großen Mengen an Boran als Katalysator. Die Ausbeute dieser technischen Synthese beträgt 64 % mit einem Enantiomerenüberschuss (ee) von 96 % [Beck et al., 1995]. Durch einen zusätzlichen Kristallisationsschritt wird die unzureichende optische Reinheit des Produktes auf die für Pharmawirkstoffe notwendige Reinheit von über 99 % gesteigert.

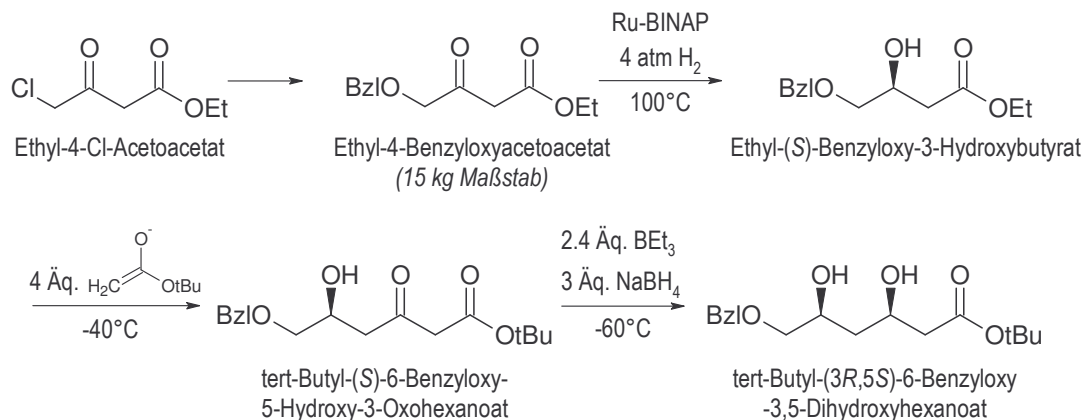


Abb. 3.2-1 Beispiel der technischen Synthese eines (3R,5S)-Dihydroxyhexansäure-tert-Butylester nach Beck et al. (1995)

3.2.2 Chemo-enzymatische Syntheserouten

Bei der oben beschriebenen chemischen Syntheseroute ist für die asymmetrischen Reduktionsschritte sowohl der Einsatz des Schwermetallkatalysators Ru-BINAP, wie auch großer Mengen des giftigen und umweltbelastenden Borans notwendig. Diese Vorgehensweise ist exemplarisch für asymmetrische Hydrierungen im technischen Maßstab mit Hilfe von chemischen Katalysatoren.

Als attraktive Alternative bei asymmetrischen Reduktionsreaktionen bietet sich die von Natur aus stereoselektive asymmetrische Biokatalyse an. Die biokatalytische Synthese bis zur (3R,5S)-DHHB-Vorstufe, dem 6-Cl-5-(S)-Hydroxy-3-Oxohexansäure-tert-Butylester (5-(S)-HOHB), war in den letzten Jahren Schwerpunkt vieler Forschungsarbeiten. Diese Schlüsselreaktion der chemo-enzymatischen-Synthese ist im hohen Maße regio- und enantioselektiv. Des Weiteren kann die enzymatische Reduktionsreaktion bei weitaus sanfteren Bedingungen bezüglich Temperatur und Druck durchgeführt werden. So kann durch Einsatz des enzymatischen Reduktionsschrittes sowohl die chemische chirale Katalyse bei 4 atm und 100°C, als auch der Kettenverlängerungsschritt bei -40°C umgangen werden.

Die Herstellung von (3R,5S)-DHHB aus dieser Vorstufe erfolgt dann über einen einzigen weiteren chemischen diastereoselektiven Reduktionsschritt mit Hilfe von Natriumborhydrid und Diethylmethoxyboran (siehe letzter Schritt Abb. 3.2-1). Durch den biokatalytischen Syntheseschritt wird dabei eine konkurrenzfähige, weniger umweltbelastende und verkürzte Alternative zur chemisch-technischen Synthese etabliert.

Als Ausgangsedukt für die Biotransformationen zur Synthese des 5-(S)-HOHB dient das 6-Cl-3,5-Dioxohexansäure-tert-Butylester (DOHTB) (siehe Kapitel 3.3). Hier ist anzumerken, dass bei den chemischen enantioselektiven Hydrierreaktionen die Gruppe der β,δ -Diketoester problematische Edukte sind. Verschiedene Ansätze mit chiralen Ruthenium-basierten Katalysatoren resultierten alle in einem Produktgemisch der *anti*- und *syn*-Konfiguration der Diastereomere (siehe Abb. 3.2-2) [Saito et al., 1993; Shao

et al., 1993; Blandin et al., 1999]. Die enzymatische Reduktion weist daher bezüglich der Synthese eines definierten chiralen Intermediats einen deutlichen Vorteil auf.

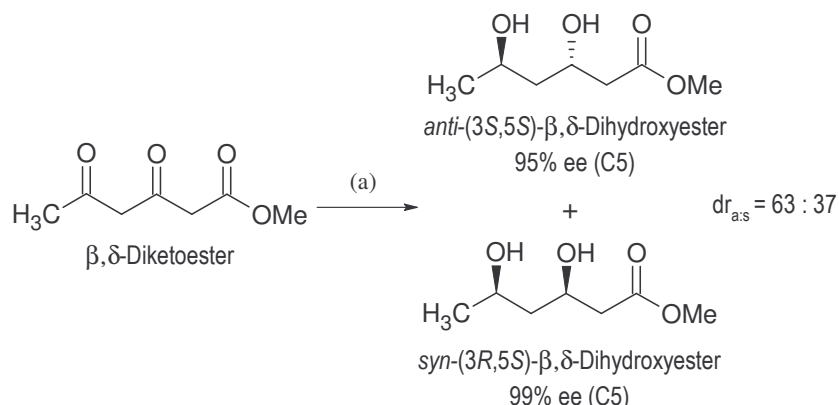


Abb. 3.2-2 Beispiel der enantioselectiven Hydrierung eines β,δ -Diketoesters mit chiralen Rutheniumkatalysatoren nach dem Verfahren der Takasago International Corp. [Saito et al., 1993]: (a) Katalysator: $\{\text{Ru}[(+)\text{-T-BINAP}]\}(\text{BF}_4)_2$

Herstellung von 6-Cl-5-(S)-Hydroxy-3-Oxohexansäure-*tert*-Butylester mit *Lactobacillus* Alkoholdehydrogenasen

Bei den Biotransformationen zur Synthese des 5-(*S*)-HOHB haben Alkoholdehydrogenasen (ADH) aus *Lactobacillus kefir* (LK-ADH) bzw. *Lactobacillus brevis* (LB-ADH) eine hohe Aktivität, sowie eine hohe Regio- und Stereoselektivität bei der Katalyse des enzymatischen Reduktionsschritts am C5 des DOHTB vorgewiesen (vgl. Kapitel 3.9.4). Als Biokatalysator sind dabei sowohl Enzymextrakt der LK-ADH bzw. LB-ADH, als auch ganze Zellen einsetzbar.

Bei dem von Wolberg et al. (2001) entwickeltem Ansatz wurde das Enzymrohextrakt der überexprimierten LB-ADH aus dem rekombinanten *Escherichia coli*-Stamm HB101+ (reclB-ADH) für die asymmetrische Reduktion zum 5-(*S*)-HOHB eingesetzt (siehe Abb. 3.2-3).

Die Cofaktor-Regenerierung wurde substratgekoppelt mit externer NADP^+ -Zugabe und Isopropanol als Cosubstrat durchgeführt. Die Dosierung des Edukts DOHTB erfolgte linear. Die erzielte Ausbeute der Umsetzung lag bei 84 % mit einem ee > 99.5 % (40000 U reclB-ADH, 34 mM DOHTB-Endkonzentration, 0.3 mM NADP^+ , 0.5 M Isopropanol-Endkonzentration). Es wird angenommen, dass hier der Isopropanol-Überschuss die treibende Kraft für die Umsetzung ist [Wolberg et al., 2000]. Nach dem darauf folgenden diastereoselektiven Reduktionsschritt konnte ein quantitativer Umsatz des (3*R*,5*S*)-DHHB mit einem Diastereomerenüberschuss (de) von 93 % erreicht werden. Eine Verbesserung des de auf einen Wert > 99 % wurde nach einem anschließenden Kristallisationsschritt erreicht.

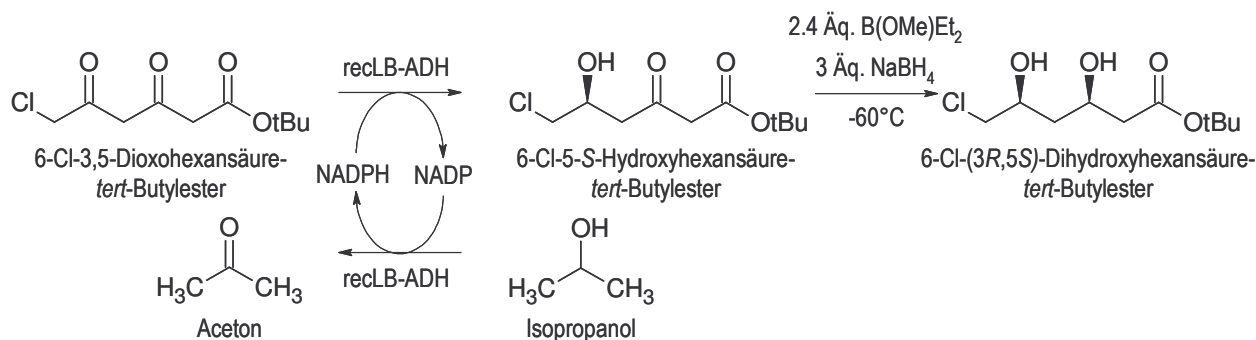


Abb. 3.2-3 *Synthese von 6-Chlor-(3R,5S)-Dihydroxyhexans\u00e4ure-tert-Butylester \u00fcber die enzymatische Reduktion von 6-Chlor-3,5-Dioxyhexans\u00e4ure-tert-Butylester mittels recLB-ADH, gefolgt von einer chemischen asymmetrischen Reduktion des 6-Chlor-5-(S)-Hydroxy-3-Oxyhexans\u00e4ure-tert-Butylester*

Ein Biotransformationsansatz in einem Hybrid Reaktor [Vilella, 2003] wurde ebenfalls mit recLB-ADH durchgef\u00fchrt. Das Kernst\u00fcck ist hierbei ein Membranreaktor, in dem die enzymatische Reduktion des DOHTB stattfindet. Durch die im Prozess integrierte Entfernung des bei der Cofaktor-Regenerierung gebildeten Acetons konnte die Produktbildung des 5-(S)-HOHB von der Nebenproduktbildung entkoppelt und somit eine thermodynamische Limitierung des Systems umgangen werden. Nach 21 h Prozesszeit wurde eine 5-(S)-HOHB-Konzentration von 152 mM erreicht, welches einer Ausbeute von 75 % entspricht (88 % Umsatz und 85 % Selektivit\u00e4t, bei 1800 U recLB-ADH, 210 mM DOHTB in Methyl-tert-Butylester, 0.1 mM NADP⁺, 300 mM Isopropanol).

Herstellung von 6-Chlor-5-(R)-Hydroxy-3-Oxyhexans\u00e4ure-tert-Butylester mit B\u00e4ckerhefe

Die B\u00e4ckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* geh\u00f6rt zu den mit Abstand meist genutzten Mikroorganismen f\u00fcr die asymmetrische Reduktion von prochiralen Ketonen [Faber, 1997]. Grund daf\u00fcr ist neben ihrer kosteng\u00fcnstigen Herstellung und ihrer guten Verf\u00fcgbarkeit das breite Spektrum an Alkoholdehydrogenasen und Carbonylreduktasen mit der F\u00e4higkeit eine breite Palette an Substraten umzusetzen [Sato und Fujisawa, 1989; Sybesma et al., 1998; Bertau und B\u00fcrli, 2000]. Das breite Spektrum an Alkoholdehydrogenasen und anderen Carbonylreduktasen stellt jedoch gleichzeitig ein Problem bei den stereoselektiven Biotransformationen dar, da durch die vielen Konkurrenzreaktionen der Enzyme entgegengesetzter Stereospezifit\u00e4t der Enantiomeren\u00fcberschuss in Mitleidenschaft gezogen wird [Shieh et al, 1985; Kula und Kragl, 2000]. Von den im Jahr 1998 bekannten 3-Oxoester-Reduktasen aus B\u00e4ckerhefe waren 4 Enzyme (S)-spezifisch, 3 Enzyme dagegen setzen die 3-Oxoester in ihre (R)-Alkohole um [Sybesma et al., 1998].

Bei der Reduktion des DOHTB mit ganzen Zellen von B\u00e4ckerhefe wurde f\u00fcr das 5-(R)-HOHB nach 26 h bei einem Umsatz von 52 % lediglich ein ee von 41 % erreicht (12 g ml⁻¹ Frischhefe, 20 mM DOHTB, 200 g L⁻¹ Saccharose als Cosubstrat). Die Regioselektivit\u00e4t der Umsetzung war jedoch sehr hoch, welches auf die Anwesenheit

des Chlor-Substituenten zurückzuführen ist [Wolberg, 2001]. Bei anderen Ansätzen zur stereoselektiven Reduktion mittels Bäckerhefe wurden Enantiomerenüberschüsse zwischen 6-67 % erreicht [Uko et al., 1991].

Durch eine kontinuierliche DOHTB-Zudosierung konnte der Enantiomerenüberschuss bei einer Umsetzung mit lyophilisierter Bäckerhefe auf 94 %, bei einer Ausbeute von 59 %, erhöht werden. Über den Einsatz eines Adsorberharzes als feste zweite Phase im Reaktionssystem kann des Weiteren sowohl eine bessere Kontrolle der Edukt-Konzentration, als auch eine bessere Produktisolierung erzielt werden. Bei einer Umsetzung mit lyophilisierter Bäckerhefe konnte die Ausbeute durch den Einsatz des Adsorberharzes XAD-7 auf 90 % bei gleich bleibendem Enantiomerenüberschuss verbessert werden (10 g mmol⁻¹ Trockenhefe, 20 mM DOHTB auf XAD-7). Nach Extraktion des Adsorberharzes mit anschließendem Chromatographieschritt lag die Ausbeute bei 50 %. Diese vereinfachte Aufarbeitung bei Einsatz des Adsorberharzes weist gegenüber dem organisch-wässrigen Zweiphasensystem (Ausbeuten zwischen 21-34 %) einen signifikanten Vorteil auf [Wolberg, 2001].

3.2.3 Synthese über die Ganzzellbiotransformation mit *Lactobacillus kefir*

Lactobacillus spec. wurde bisher nur begrenzt zur Ganzzellbiotransformation von prochiralen Ketonen eingesetzt. Aragozzini et al. (1992) untersuchten die Fähigkeit verschiedener *Lactobacillus*-Stämme zur enantioselektiven Reduktion von β -Ketoestern (siehe auch Kapitel 3.4-2).

Bei dem Einsatz von *Lactobacillus kefir* ganzen Zellen zur Biotransformation des DOHTB wird gleich die Dihydroxyhexansäure (3*R*,5*S*)-DHHB als Produkt gewonnen. Nach der regioselektiven Reduktion der C5-Ketogruppe, findet an der C3-Ketogruppe des gebildeten Hydroxyketoesters eine weitere Reduktion statt. Der Einsatz von *Lactobacillus kefir* als Ganzzellbiokatalysator würde daher den letzten chemischen Syntheseschritt bei der chemo-enzymatischen (3*R*,5*S*)-DHHB-Synthese (siehe Abb. 3.2-3) ersetzen und somit den Einsatz der Boran-Verbindungen gänzlich vermeiden.

Bei einem Ansatz von Wolberg (2001) wurden im 10 mL-Maßstab 60 g L⁻¹ Feuchtzellmasse von *L. kefir* eingesetzt. Als Cosubstrat für die zellinterne Cofaktor-Regenerierung diente Glukose. Es fand keine zusätzliche Cofaktor-Zugabe statt (siehe Abb. 3.2-4). Die Ausgangskonzentration des Edukts DOHTB betrug 25 mM. Nach einer Prozessdauer von 12.5 h konnte das Endprodukt (3*R*,5*S*)-DHHB mit hoher Enantio- und Diastereoselektivität gebildet werden. Bei einer Ausbeute des (3*R*,5*S*)-DHHB von 34 % betrug der ee 99.4 % (C5), während das Mengenverhältnis der *syn* zu *anti*-Form der Diastereomere $dr_{s:a}$ bei 135:1 lag (Citrat-Phosphat-Puffer, 125 mM / 250 mM, mit 1 mM MgCl₂, pH 5.5, 22°C).

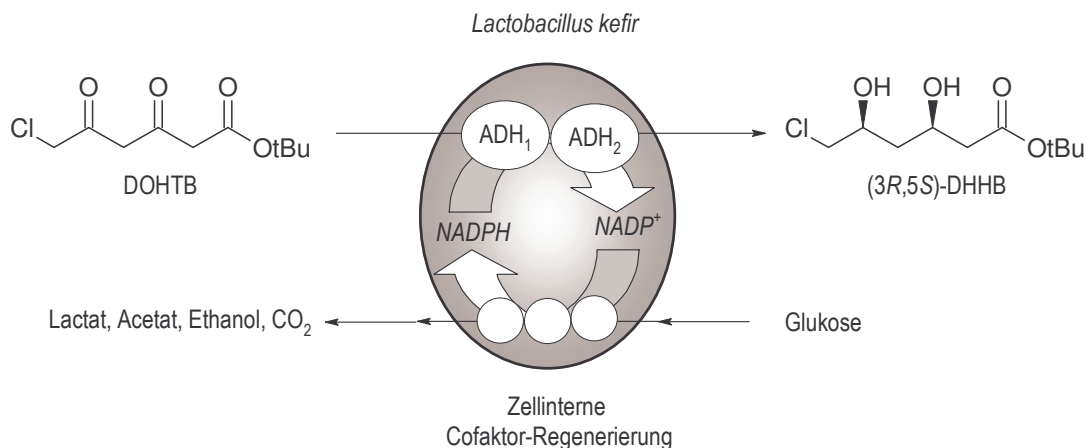


Abb. 3.2-4 Syntheseweg von 6-Cl-(3R,5S)-Dihydroxyhexansäure-tert-Butylester über die Ganzzellbiotransformation mit *Lactobacillus kefir*

Da der chlorierte 5-(S)-Hydroxy-3-Oxohexansäure-tert-Butylester von der recLB-ADH hinsichtlich der Ketogruppe am C3 nicht reduziert werden kann, lässt sich daraus schließen, dass der zweite Reduktionsschritt des Hydroxyketons bei der Ganzzellbiotransformation mit *L. kefir* durch eine andere (R)-selektive Alkoholdehydrogenase katalysiert werden muss [Wolberg, 2001]. Im Gegensatz zu den Biotransformationsansätzen mit Bäckerhefe können mit *L. kefir* jedoch für beide Reduktionsstufen sehr hohe Enantiomerenüberschüsse erreicht werden.

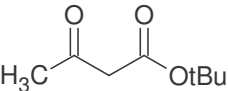
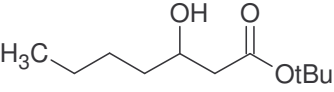
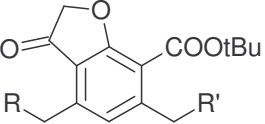
3.3 6-Cl-3,5-Dioxohexansäure-tert-Butylester

3.3.1 Herstellung von 6-Cl-3,5-Dioxohexansäure-tert-Butylester

Wie aus den Kapiteln 3.2.2 und 3.2.3 deutlich wird, ist 6-Cl-3,5-Dioxohexansäure-tert-Butylester eine essentielle Ausgangsverbindung sowohl für den chemo-enzymatischen Ansatz, als auch für den Ganzzellbiotransformationsansatz zur Herstellung des 6-Cl-(3R,5S)-Dihydroxyhexansäure-tert-Butylesters. Des Weiteren spielt DOHTB auch als eine der Ausgangsverbindungen für die konvergente Synthese anderer pharmazeutisch aktiver Moleküle wie das Cytotoxin Callystatin A [Vicario et al., 2002] und das Polyketid Tarchonanthuslactone [Enders und Steinbusch, 2003] eine Schlüsselrolle.

Zu Beginn der Forschungsarbeit waren β - δ -Diketoester nicht kommerziell erhältlich. Die Synthese des in der Doktorarbeit eingesetzten 6-Cl-3,5-Dioxohexansäure-tert-Butylesters wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Michael Wolberg am Forschungszentrum Jülich entwickelt [Wolberg et al., 2000; Wolberg, 2001]. Hierbei handelt es sich um eine neue Verbindung, die bis dato nicht in der Literatur beschrieben war.

Tabelle 3.3-1 Übersicht der bekannten Nebenprodukte aus der 6-Cl-3,5-Dioxohexansäure-tert-Butylester-Synthese

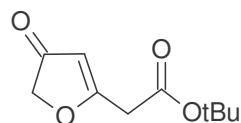
Verbindung	Stufe	Ursprung
1 	DOHTB-Synthese	Reste des Ausgangsedukts der Synthese
2 	DOHTB-Synthese	Reaktion des Eduktrestes 1 mit überschüssigem BuLi aus der Synthese
3  R = Cl, R' = COOtBu R = COOtBu, R' = Cl	DOHTB-Synthese	Beim Einsatz höherer Bisenolat-Konzentrationen

3.3.2 Untersuchungen zur Stabilität von 6-Cl-3,5-Dioxohexansäure-tert-Butylester

Die Instabilität der β -Polyketoverbindungen sind aufgrund ihrer alternierenden elektrophilen und nucleophilen Zentren gegeben. Für den DOHTB sind folgende Zerfallsreaktionen bekannt [Wolberg, 2001]:

- Intramolekulare Alkylierung durch Abspaltung von HCl in gepufferten wässrigen Lösungen mit einem pH > 5.5 unter Bildung eines Furanon-Zyklisierungsprodukts *tert*-Butyl-(4-Oxo-4,5-Dihydrofuran-2-yl)-Acetat (ODFA). Diese Reaktion ist autokatalytisch, was bedeutet, dass sie durch bereits gebildete Zyklisierungsprodukte beschleunigt wird (siehe Abb. 3.3-2 A).
- Zyklisierung des 3,5-Dioxohexansäureesters bei sauren pH (< pH 3-4) unter Bildung eines Lacton-Derivats (siehe Abb. 3.3-2 B).

A)



B)

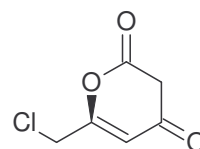


Abb. 3.3-2 Übersicht der Zerfallsprodukte von 6-Cl-3,5-Dioxohexansäure-tert-Butylester: A) Furanon-Zyklisierungsprodukt, B) Lactonisierungsprodukt

Eine intermolekulare Selbstkondensation (Aromatisierung) der 6-Cl-3,5-Dioxohexansäureester-Derivate wie zum Beispiel des Methyl- und Ethylesters in gepufferten wässrigen Lösungen findet bei DOHTB bedingt durch die sperrige *tert*-Butylgruppe und das ebenfalls sperrige Chlor dagegen nicht statt (siehe Abb. 3.3-3).

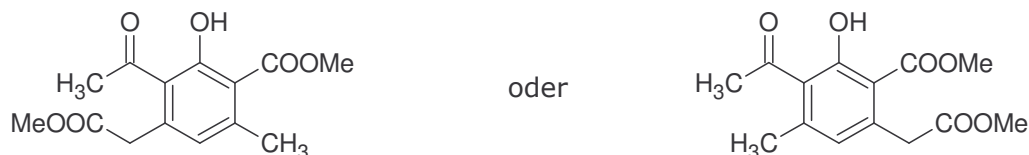


Abb. 3.3-3 Intermolekulares Selbstkondensationsprodukt bei 3,5-Dioxyhexansäureestern am Beispiel des Methylester-Derivats

Für die Prozessoptimierung der stereoselektiven Reduktion des DOHTB mit Ganzzellbiokatalysatoren ist nur die Zerfallsreaktion in das Furanon-Derivat von Bedeutung. Diese Reaktion konkurriert mit der biokatalytischen Reduktion des DOHTB und verringert daher die Prozessausbeute. Die Reaktion zum Lacton-Derivat findet dagegen bei für die Ganzzellbiotransformation irrelevanten Bedingungen statt. Im folgenden Abschnitt wird daher der Wissensstand zum Zerfall in das Furanon-Derivat näher geschildert.

Zerfall zum Furanon-Derivat

Der Zerfall des DOHTB zum Furanon-Derivat ODFA ist wie bereits oben erwähnt zum einen eine Funktion des pH des wässrigen Systems. Im Rahmen der Dissertation von Villela [Villela, 2003] wurde des Weiteren der Einfluss des Puffersystems und der Temperatur auf die Zerfallskinetik untersucht.

Einfluss des pH auf den Zerfall

In den Arbeit von Wolberg zeigte sich, dass sich die Zyklisierung durch eine Verringerung des pH von 6.5 (Natriumphosphat-Puffer) auf 5.5 (Phosphat-Citrat-Puffer) reduzieren lässt. Während bei pH 6.5 nach 12 h ein vollständiger Zerfall zu verzeichnen war, konnte bei pH 5.5 nach der gleichen Zeit ein Rest-DOHTB-Gehalt von 16 % gemessen werden [Wolberg, 2001].

Villela untersuchte den pH-Einfluss in Triethylamin-Puffer (150 mM) und konnte den selben Effekt feststellen, dass die ODFA-Bildungsrate mit steigendem pH zunimmt. Die Zerfallsreaktion folgt einer Kinetik erster Ordnung mit:

$$[\text{DOHTB}]_t = [\text{DOHTB}]_0 \cdot e^{-k_{d,F} \cdot t} \quad (1)$$

mit:

$k_{d,F}$ = Geschwindigkeitskonstante des DOHTB-Zerfalls in das Furanon-Derivat [h^{-1}]

$[\text{DOHTB}]_t$ = DOHTB-Konzentration zum Zeitpunkt t [mM]

$[\text{DOHTB}]_0$ = DOHTB-Ausgangskonzentration [mM]

Während bei pH 7.0 die Geschwindigkeitskonstante k_F 0.029 h^{-1} betrug, stieg diese für pH 8.0 bereits auf 0.15 h^{-1} und verdoppelte sich nochmals für pH 8.5 auf 0.31 h^{-1} [Villela, 2003].

Einfluss der Puffersubstanz

Bei einem Vergleich zwischen einem Phosphat-Puffer und dem Triethylamin-Puffer zeigte sich (150 mM, pH 7.0), dass die Zerfallsreaktion im Phosphat-Puffer langsamer war. Während k_F im Phosphat-Puffer 0.014 h^{-1} betrug, war der Wert für den Triethylamin-Puffer mit 0.029 h^{-1} doppelt so hoch [Vilella, 2003].

Einfluss der Temperatur

Der Temperatureinfluss wurde für einen Bereich zwischen 15°C bis 50°C untersucht. Es zeigte sich, dass die Zerfallsrate mit zunehmender Temperatur anstieg. Der Anstieg kann über die Arrhenius-Gleichung beschrieben werden, wobei die Aktivierungsenergie als 96 kJ mol^{-1} bestimmt wurde [Vilella, 2003]:

$$\ln k_F = \ln A - \frac{E_A}{R \cdot T} \quad (2)$$

mit:

- A = Arrhenius-Konstante (charakteristisch für die jeweilige Reaktion, für diese Reaktion bestimmt mit -0.3 h^{-1})
- E_a = Aktivierungsenergie [kJ mol^{-1}]
- R = ideale Gaskonstante $8.3144 \text{ [J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}]$
- T = Temperatur [K]

3.4 Herstellung von 4-Cl-3-(S)-Hydroxybutanoat-Ethylester

Optisch aktive C3- und C4-Moleküle sind wichtige Intermediate für die Herstellung von Pharmawirkstoffen und Feinchemikalien [Shimizu und Kataoka, 1999]. In der konvergenten Statin-Synthese dienen chirale 4-Cl-3-(S)-Hydroxybutanoat-Derivate in der Regel als Vorstufe bei der Herstellung der 6-Cl-(3R,5S)-Dihydroxyhexansäureester, wie zum Beispiel in der in Kapitel 3.1.2 beschriebenen konvergenten Synthese von Atorvastatin (siehe Abb. 3.1-4) [Thottathil, 1994]. Ein weiteres Beispiel ist 4-Cl-3-(S)-Hydroxybuttersäure-Methylester, welcher als chiraler Baustein in der Fluvastatin-Synthese von Bristol-Myers Squibb im 750 L Maßstab eingesetzt wird (siehe Abb. 3.4-1) [Liese et al., 2000; Patel, 2002]. Neben der Statin-Synthese finden sie auch Anwendung in der Herstellung anderer Pharmawirkstoffe, wie z.B. der β -Lactam-Antibiotika Carbapenem und Carumonam, des Cytostatika Bausteins Daunosamin, und des chemotherapeutischen Benzothiazepin [Oguni und Ohkawa, 1988; Bertau und Bürli, 2000].

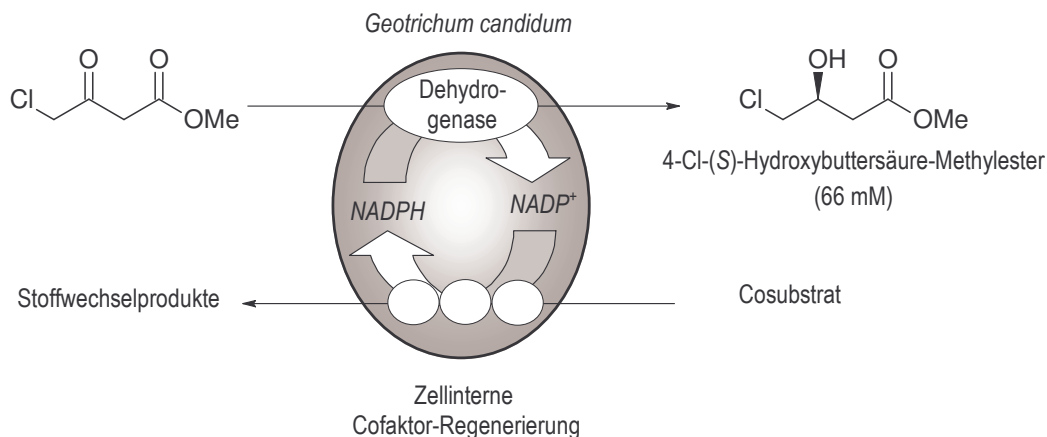


Abb. 3.4-1 Synthese 4-Cl-3-(S)-Hydroxybuttersäure-Methylester mit *Geotrichum candidum* ganzen Zellen und zellinterner Cofaktor-Regenerierung [Sybesma, 1998].

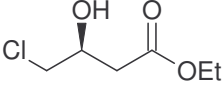
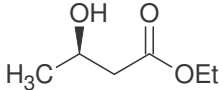
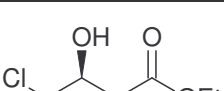
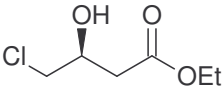
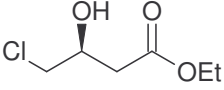
Die chemische asymmetrische Reduktion zur Herstellung von 4-Cl-3-(S)-Hydroxybuttersäure-Ethylester (S-CHBE) erfolgt mit Hilfe eines chiralen Ru-BINAP-Katalysators. Obwohl die Synthese leicht durchzuführen ist und Ausbeuten von 98 % erreicht werden können, ist der erreichbare ee mit 97 % nicht ausreichend. Des Weiteren werden in diesem Prozess hohe Wasserstoffdrücke von 100 atm benötigt [Kitamura et al., 1988].

Die mikrobielle bzw. enzymatische Herstellung aus prochiralen Ketonen als interessante Alternative ist für S-CHBE bereits gut erforscht, wobei Hefen in vielen Fällen als Biokatalysator eingesetzt werden. Als Ausgangsverbindung wird hierbei das prochirale Keton Ethyl-4-Cl-Acetoacetat (4-Cl-ACE) reduziert. Das Edukt, welches leicht und kostengünstig herzustellen ist, trägt hierbei zur Wirtschaftlichkeit des Prozesses bei [Yasohara et al., 1999; Bertau und Bürli, 2000]. In den folgenden Kapiteln werden verschiedene bekannte biotechnologische Ansätze zur S-CHBE-Synthese aus 4-Cl-ACE im Speziellen und der Synthese von 3-(S)-Hydroxybuttersäureestern im Allgemeinen mit verschiedenen Mikroorganismen bzw. Enzymsystemen vorgestellt.

3.4.1 Herstellung von 3-(S)-Hydroxybuttersäureester mit Hefen

Wie bereits in Kapitel 3.2.2 erwähnt besitzen Bäckerhefen ein breites Spektrum an verschiedenen Alkoholdehydrogenasen und Carbonylreduktasen, wobei viele dieser Enzyme 3-Ketoester als Substrat umsetzen können. Neben der Bäckerhefe wurden jedoch viele andere Hefen auf ihre Umsetzungskapazität zur Herstellung von 3-(S)-Hydroxybuttersäureester erforscht. In Tabelle 3.4-1 sind einige Syntheseprozesse mit Hefe-Systemen exemplarisch dargestellt.

Tabelle 3.4-1 Exemplarische 3-(S)-Hydroxybuttersäureester-Synthesen mittels Hefen

Katalysator	Produkt	Cofaktor-Regenerierung	Ausbeute / ee	Quelle
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		n.b.	50 % / 57 %	Shieh et al., 1985
		Zellintern	69 % / 85 %	Seebach et al., 1985
		Zellintern	67 % / 99.3 %	Kometani et al., 1993
<i>Candida magnoliae</i>		NADPH-Regenerierung über Glukose-DH, NADP ⁺ -Zugabe	100 % / 96.6 %	Shimizu und Kataoka, 1999
			75 % / 99 %	Yasohara et al., 1999
Rekombinante <i>Escherichia coli</i>		NADPH-Regenerierung über Glukose-DH, NADP ⁺ -Zugabe	85 % / 100 % ¹	Kizaki et al., 2001

n.b. = nicht bekannt

Durch eine langsame Zudosierung des in wässriger Lösung instabilen 4-Cl-ACE können höhere Ausbeuten erzielt werden [Kometani et al., 1993]. Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz eines organisch-wässrigen Zwei-Phasen-Systems [Shimizu und Kataoka, 1999; Yasohara et al., 1999; Kizaki et al., 2001] oder die Verwendung eines Adsorberharzes für eine langsame Freisetzung des Edukts [Jer und Jia, 2003]. Durch das Einstellen einer geringen Eduktkonzentration in der wässrigen Phase kann dabei gleichzeitig der ee verbessert werden. Dieses ist der Fall, wenn (S)- und (R)-spezifische Enzyme mit unterschiedlichen Michaelis-Menten-Konstanten (K_m -Konstanten) um das Edukt konkurrieren [Sybesma et al., 1998].

In Tabelle 3.4-2 sind die 3-Ketoester-Reduktasen in Bäckerhefen mit ihren jeweiligen K_m -Konstanten dargestellt [Sybesma et al., 1998].

Tabelle 3.4-2 Übersicht der 3-Ketoreduktasen in Bäckerhefe [Sybesma et al., 1998]

Enzym	Stereoselektivität	K_m [mM]
Methyl-Glyoxal-Reduktase bzw. Ketopantoyl-Lacton-Reduktase	R	n.b.
(R)-Diacetyl-Reduktase	R	0.59 – 1.00
Fettsäure-Synthase-Komplex	R	1.82 – 4.52
Acetoacetyl-CoA-Reduktase	S	0.15 - 0.22
Aldose-Reduktase bzw. Aldo-Keto-Reduktase	S	0.13
(S)-Diacetyl-Reduktase	S	1.00

¹ Die Angaben der Enantiomerenüberschüsse von 100 % wurden aus der Literatur übernommen. Es wird angenommen, dass in diesen Fällen ein ee oberhalb der Nachweisgrenze der Analysemerhode gemeint ist.

Es wird angenommen, dass hauptsächlich die Enzyme des Fettsäure-Synthase-Komplexes für die Konkurrenzreaktionen zu den 3-(*R*)-Hydroxyestern in Bäckerhefe verantwortlich sind [Stewart, 2001]. Es wird deutlich, dass die K_m -Konstanten der (*R*)-spezifischen Enzyme mit Werten bis zu 4.52 mM bei dem Fettsäure-Synthase-Komplex höher als bei den (*S*)-spezifischen Enzyme sind. Liegen hohe Eduktkonzentrationen vor, arbeiten beide Enzymgruppen mit ihren maximalen Aktivitäten, welches zu einem hohen Anteil des unerwünschten (*R*)-Nebenprodukts führen würde.

Ein anderer Ansatz zur Verbesserung des Enantiomerenüberschusses ist die Hitzebehandlung der Zellen oder der Einsatz acetongetrockneter Zellen mit dem Ziel, die Enzyme mit unerwünschter Stereoselektivität zu inaktivieren [Yasohara et al., 1999; Patel et al., 2002]. Sowohl bei *Geotrichum candidum*, als auch bei *Candida magnoliae* konnten durch dieses Verfahren der Enantiomerenüberschuss um 3 % verbessert werden. Bei *Candida magnoliae* konnte jedoch zusätzlich beobachtet werden, dass die Ausbeute der hitzebehandelten Zellen abnahm.

Zum Erzielen einer weiteren Verbesserung wurde ein rekombinanter *Escherichia coli* hergestellt, welcher das Carbonyl-Reduktase-Gen aus *Candida magnoliae* und ein Glukose-Dehydrogenase-Gen aus *Bacillus megaterium* coexprimierte. Bereits im wässrigen Ein-Phasen-System konnte dadurch eine Verbesserung der Produktbildung bezüglich des Zwei-Phasen-Prozesses mit *Candida magnoliae* erreicht werden (1.25 M zu 680 mM (*S*)-CHBE). Werden die rekombinanten Zellen in einem Zwei-Phasen-System eingesetzt, so kann die erreichte (*S*)-CHBE-Konzentration nochmals auf 2.58 M verdoppelt werden [Kizaki et al., 2001]. Gleichzeitig konnte durch den Einsatz der überexprimierenden rekombinanten Zellen der Enantiomerenüberschuss auf 100 % verbessert werden.

3.4.2 Herstellung von 4-Cl-3-(*S*)-Hydroxybutanoat-Ethylester mit *Lactobacillus* oder deren Enzymen

Bereits bei der Ganzzellbiotransformation zur Herstellung von 6-Cl-(3*R*,5*S*)-Dihydroxyhexansäure-*tert*-Butylester hat sich *L. kefir* als effektiver Biokatalysator mit hohem Enantiomerenüberschuss erwiesen (siehe Kapitel 3.2.4). Auch für die enantioselektive Reduktion von 3-Ketoestern ist ihr Einsatz als Biokatalysator sowohl in Hinsicht auf die Ausbeute, als auch bezüglich des Enantiomerenüberschusses viel versprechend. Bislang sind hier jedoch nur wenige Forschungsarbeiten mit *Lactobacillus* species durchgeführt worden.

Die Gruppe um Aragozzini untersuchte die Fähigkeit 8 verschiedener *Lactobacillus*-Stämme zur asymmetrischen Reduktion von 4-Cl-ACE zu (*S*)-CHBE. Für die Parameteruntersuchung wurden 15 mM des Edukts 4-Cl-ACE vorgelegt. Fünf der untersuchten Stämme bildeten das (*S*)-CHBE, wobei nur bei *L. kefir* DSM 20587 eine Ausbeute von 100 % erreicht wurde, bei einem ee von 100 % [Aragozzini et al., 1992]. Dieser hohe Enantiomerenüberschuss weist darauf hin, dass *L. kefir* eine Alkoholdehydrogenase mit einer hohen Stereospezifität und Aktivität besitzen muss. Bei der Umsetzung von 4-Cl-ACE mit der isolierten reCLB-ADH (siehe auch Kapitel

3.2.2) weist diese eine hohe Substrataktivität von 3.26 U mL^{-1} auf (gleich $182 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) [Hummel und Riebel, 2000]. Der Enantiomerenüberschuss wurde hier nicht bestimmt.

3.5 Herstellung von 1-(*R*)-(4-Cl-Phenyl)-Ethanol

Die Herstellung von chiralen Phenylethanol-Derivaten über die konventionellen Methoden hat sich als problematisch erwiesen. Wie schon bei DHHB und CHBE der Fall, kann auch 1-(*R*)-(4-Cl-Phenyl)-Ethanol (1-(*R*)-4-Cl-PE) über eine mikrobielle enantioselektive Reduktion eines prochiralen Ketons mittels Dehydrogenasen synthetisiert werden (siehe Abb. 3.5-1). Die vielen kommerziell verfügbaren Dehydrogenasen, wie die Hefe-ADH, die Pferdeleber-ADH und die ADH aus *Thermoanaerobium brockii*, bilden bei der Reduktion jedoch die (*S*)-Form des Alkohols. Soll das (*R*)-Enantiomer gebildet werden, so kann dieses zum Beispiel über eine Modifikation der Alkyl-Gruppen des Edukts erreicht werden [Zhou et al., 1983; Sato und Fujisawa, 1990; Aragozzini et al., 1986].

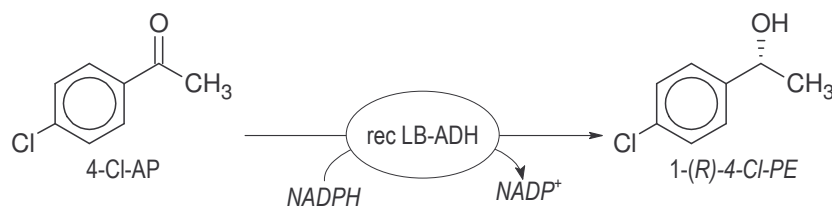


Abb. 3.5-1 Synthese 1-(*R*)-(4-Cl-Phenyl)-Ethanol aus 4-Cl-Acetophenon mit recLB-ADH

Aus *Lactobacillus brevis* (DSM 20054) und *Lactobacillus kefir* (DSM 20587) wurden NADP(H)-abhängige ADHs identifiziert und isoliert, die im Gegensatz zu den meisten bekannten Enzymen die prochiralen Ketone in ihre korrespondierenden (*R*)-Alkohole umsetzen. Des Weiteren besitzen diese beiden *Lactobacillus*-ADHs den weiteren Vorteil, Edukte mit sperrigen Seitenketten umsetzen zu können [Hummel, 1990; Bradshaw et al., 1992; Kula und Hummel, 1993; Hummel und Riebel, 2000].

Die ADHs aus beiden Stämmen ähneln sich sowohl in ihrer Struktur, als auch in vielen biochemischen Eigenschaften. Der Hauptunterschied liegt dabei in der höheren Temperaturstabilität der LB-ADH; die Denaturierungstemperatur liegt bei ihr um 20°C höher als bei der LK-ADH [Riebel, 1997]. Ein weiterer Schritt war die Überexpression der LB-ADH in einem rekombinanten *E. coli* HB 101+ zur Gewinnung der recLB-ADH (siehe auch Kapitel 3.2.2) [Hummel und Riebel, 2000].

In Tabelle 3.5-1 sind die bekannten Daten zur Synthese von 1-(*R*)-(4-Cl-Phenyl)-Ethanol mit *Lactobacillus*-ADHs dargestellt. Die relative Aktivität ist hier auf die jeweilige Umsetzung von Acetophenon bezogen. Es ist anzumerken, dass die in Tabelle 3.5-1 präsentierten Daten im Rahmen einer Parameteruntersuchung zur Bestimmung des Substratspektrums der *Lactobacillus*-ADH gewonnen wurden (1 mL-

Maßstab). Über diesen Maßstab hinaus sind keine Umsetzungen zur Herstellung von 1-(*R*)-4-Cl-PE bekannt.

Tabelle 3.5-1 Reduktionsreaktionen zur Synthese von 1-(*R*)-(4-Cl-Phenyl)-Ethanol aus 4-Cl-Acetophenon mittels *Lactobacillus*-ADHs

Enzym		4-Cl-AP [mM]	NADPH [mM]	K _m [mM]	Relative Aktivität [%]	Quelle
LK-ADH	Enzymrohextrakt	10	0.1	0.39	94	Hummel, 1990
recLB-ADH	Aufgereinigtes Enzym	10	0.19	6.63	203	Hummel und Riebel, 2000

3.6 Biokatalytische asymmetrische Synthese chiraler Alkohole

3.6.1 Synthese chiraler Alkohole und Hydroxysäureester mittels Alkoholdehydrogenasen

Die Gruppe der chiralen Alkohole bzw. Hydroxysäureester gehört zu den wichtigsten Vertretern der chiralen Synthese zur Synthese von Pharmawirkstoffen, Agrochemikalien und Aromastoffen. Da ihre Herstellung über die klassische chemische Synthese problematisch ist, hat sich der Einsatz der Oxidoreduktasen, insbesondere der Dehydrogenasen, für ihre Synthese aus prochiralen Ketonen etabliert [Stewart, 2001]. Diese katalysieren eine reversible Reaktion, in der die Cofaktoren NAD(P)⁺ bzw. NAD(P)H als Akzeptor bzw. Donor für das Wasserstoffatom und die Elektronen dienen. Die Reaktion ist im hohen Maße stereospezifisch und wird von den Enzymeigenschaften sowie von der sterischen Struktur des Edukts bestimmt (Prelog-Regel, siehe Abb. 3.6-1).

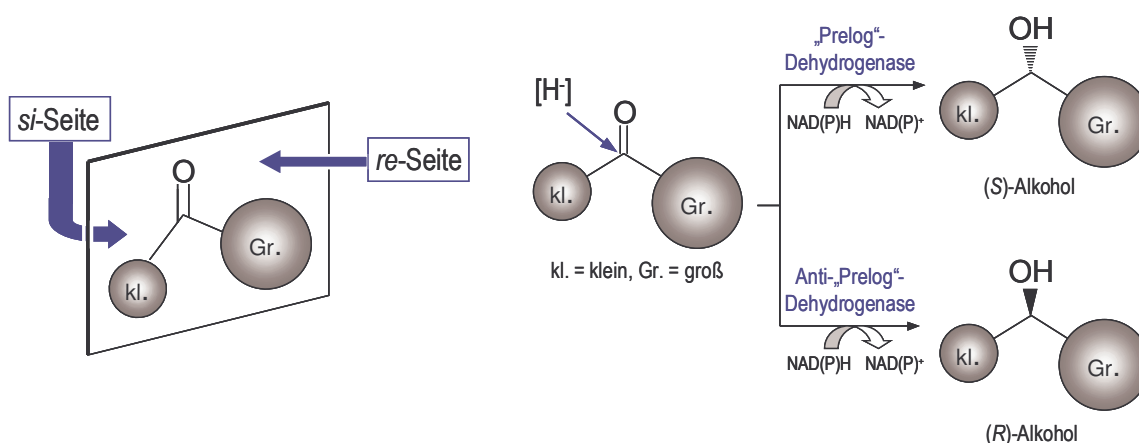


Abb. 3.6-1 Asymmetrische Reduktion von prochiralen Ketonen mittels Dehydrogenasen nach der Prelog-Regel oder anti-Prelog-Regel [aus Faber, 1997; Kula und Kragl, 2000]

Die meisten Dehydrogenasen stellen das Hydrid nach der Prelog-Regel von der *re*-Seite der Ketogruppe, unter Bildung des (*S*)-Alkohols, zur Verfügung. Wenige

Dehydrogenasen greifen dagegen von der *si*-Seite an, so dass hier das (*R*)-Alkohol gebildet wird [Faber, 1997; Kula und Kragl, 2000]. Einige Vertreter beider Gruppen sind in Tabelle 3.6-1 dargestellt.

Tabelle 3.6-1 Beispiele bekannter Alkoholdehydrogenasen für die asymmetrische Reduktion zur Synthese von chiralen Alkoholen bzw. Hydroxysäureester [Peters, 1998]

Hydrogen Transfer	Dehydrogenase aus	Enantioselektivität	Coenzym	Kommerzielle Verfügbarkeit
<i>si</i> -Seite	<i>Pseudomonas sp.</i>	(<i>R</i>)	NAD(H)	-
	<i>Lactobacillus kefir</i>		NADP(H)	-
	<i>Mucor javanicus</i>		NADP(H)	-
<i>re</i> -Seite	Hefe	(<i>S</i>)	NAD(H)	+
	Pferdeleber		NAD(H)	+
	<i>Thermoanaerobium brockii</i>		NADP(H)	+
	<i>Candida parasitopsis</i>		NAD(H)	-
	<i>Rhodococcus erythropolis</i>		NAD(H)	-
	<i>Curvularia falcata</i>		NADP(H)	-

3.6.2 Vergleich der Ganzzellbiotransformation gegenüber Umsetzungen mit isolierten Enzymen

In Tabelle 3.6-2 werden für einen ersten Vergleich die Vorteile und Nachteile der Ganzzell- und der enzymatischen Biotransformation gegenübergestellt.

Tabelle 3.6-2 Vorteile und Nachteile der Ganzzellbiotransformation und der enzymatischen Biotransformation [Peters, 1998]

Kriterium		Ganze Zellen	Enzymatisch
Katalysatoren	Verfügbarkeit	gut	oftmals begrenzt
	Preis	gering-mittel	mittel-hoch (wegen Aufreinigung)
	Reproduzierbarkeit	variabel	hoch
Reaktion	Konkurrenzreaktionen	ja	nein
	Enantiomerenreinheit der Produkte	mittel-hoch	hoch
	Nebenprodukte	oft	gering bis gar nicht
	Produktivität / Ausbeute	gering	mittel-hoch
Cofaktoren	Cofaktor-Regenerierung	zellintern	gekoppelt
Substratbereitstellung	Permeabilität / Stofftransport	limitierend	nicht limitierend

Die Hauptvorteile der Ganzzellbiotransformation gegenüber der enzymatischen Ansätze liegt dabei im relativ geringeren Preis für die Katalysatoren und in der Umgehung eines externen Cofaktor-Regenerierungssystems. Des Weiteren sind Zellen auch in der Lage mehrere Schritte einer Transformation zu katalysieren. Die Vorteile der enzymatischen Biotransformation liegt in ihrer hohen Definierbarkeit, bedingt durch den Einsatz isolierter Enzyme. Auch ist durch die Verwendung reiner Enzyme ein hoher Enantiomerenüberschuss garantiert. In Ganzzellbiotransformationen kann dieser dagegen durch den Pool an Isoenzymen verringert werden.

3.6.3 Cofaktor-Regenerierung

Charakteristisch für Alkoholdehydrogenasen ist, dass sie Cofaktoren für ihre katalytische Wirkung benötigen. Die meisten für die Synthese von chiralen Alkoholen und Hydroxysäureestern bekannten Alkoholdehydrogenasen sind NAD(H)- bzw. NADP(H)-abhängig. Diese Cofaktoren sind nicht enzymgebunden, sondern liegen gelöst vor [Hummel, 1999]. Bei dem Einsatz von isolierten Enzymen für die Biotransformation müssen die Cofaktoren daher zur Verfügung gestellt werden. Eine stöchiometrische Zugabe der kostenintensiven Cofaktoren ist jedoch, insbesondere für die Produktion im industriellen Maßstab, aus wirtschaftlichen Gründen nicht machbar. Für die Applikation eines Prozesses, muss also parallel ein Cofaktor-Regenerierungssystem zur Verfügung gestellt werden. Dadurch wird der jeweilige Cofaktor nur noch in katalytischen Mengen benötigt.

Für NADH-abhängige Reduktionen sind verschiedene Cofaktor-Regenerierungssysteme etabliert worden, wie zum Beispiel das Formiat/Formiat-Dehydrogenase-System, bei dem die Bereitstellung der Formiat-Dehydrogenase (FDH) aus *Candida boidinii* bereits im technischen Maßstab realisiert werden kann [Hummel und Kula, 1989; Weuster-Botz et al., 1994]. Die Anwendung NADP(H)-abhängiger Dehydrogenasen ist dagegen komplizierter. Zwar wurden für die NADPH-Regenerierung die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus *Leuconostoc mesenteroides* [Wong und Whitesides, 1981], sowie die Glukose-Dehydrogenase aus *Bacillus cereus* [Wong und Drueckhammer, 1985] untersucht, eine Etablierung dieser Regenerierungssysteme im großtechnischen Ansatz ist jedoch nicht etabliert. Ein alternativer Lösungsansatz war die Veränderung der Cofaktor-Spezifität des Regenerierungsenzyms FDH aus *Pseudomonas* sp., damit dieses auch NADP(H) akzeptiert [Tishkov et al., 1999]. Dieser Ansatz muss jedoch erst industriell etabliert werden.

Ein weiteres Problem bei den enzymkatalysierten Reduktionen besteht in der Instabilität der Cofaktoren. Die reduzierten Formen der Cofaktoren sind unter alkalischen Bedingungen stabil, wogegen die oxidierten Cofaktoren unter sauren Bedingungen stabil sind. Die Halbwertszeit für NADH und NADPH in 100 mM Phosphat-Puffer (pH 7, 25°C) liegen bei 27 h und 13 h [Wong und Whitesides, 1981]. Es ist für die Prozessführung also wichtig, für den pH-Bereich einen Kompromiss für die eingesetzten Cofaktoren und das reduzierende Enzym zu finden.

Diese Probleme können durch den Einsatz von ganzen Zellen als Biokatalysator umgangen werden. Hier findet die Cofaktor-Regenerierung des internen Cofaktor-Vorrats über den zelleigenen Metabolismus statt. So findet die Regenerierung bei Bäckerhefe zum Beispiel über den Hexose Monophosphat-Weg, die Glykolyse und den Citronensäurezyklus unter Verwertung von Glukose, Ethanol oder Acetat statt [Sybesma et al., 1998]. Die Cofaktor-Regenerierung bei der Reduktion von 2,5-Hexandion zu (2*R*,5*R*)-Hexandiol mittels ruhenden *L. kefir*-Zellen wurde über die Verstoffwechselung von Glukose durchgeführt [Haberland et al., 2002]. Hierbei ist bei *L. kefir* bzw. *L. brevis* zusätzlich noch die Möglichkeit der substratgekoppelten NADPH-Regenerierung gegeben, wobei sowohl die Reduktion, als auch die Cofaktor-Regenerierung über die zelleigene LK- bzw. LB-ADH katalysiert wird (siehe Abb. 3.6-2) [Stillger et al., 2002].

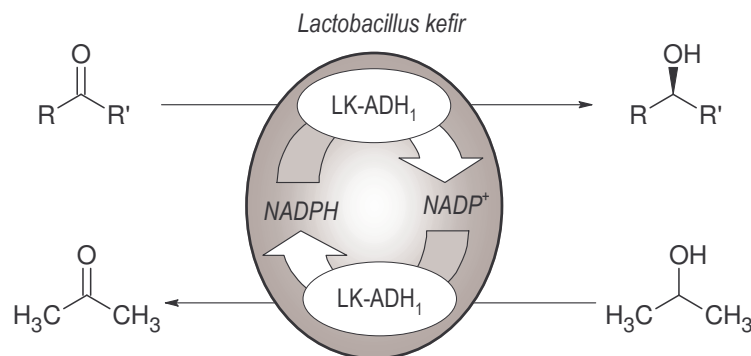


Abb. 3.6-2 Substratgekoppelte Cofaktor-Regenerierung in *L. kefir* mit Isopropanol als Cosubstrat

Ein Vorteil bei der substratgekoppelten Cofaktor-Regenerierung ist hierbei die Möglichkeit, höhere Ausbeuten des Reduktionsprozesses durch Verschiebung des thermodynamischen Gleichgewichtes zu erreichen. Für die Regenerierung gilt die Gleichung:

$$K_{\text{GW}} = \frac{[\text{Produkt}] \cdot [\text{Aceton}]}{[\text{Substrat}] \cdot [\text{Isopropanol}]} \quad (3)$$

Aus Gleichung 3 ist ersichtlich, dass die Gleichgewichtsverschiebung entweder über den Einsatz hoher Konzentrationen des Cosubstrats Isopropanol oder über die Abtrennung des dabei gebildeten Acetons erzielt werden kann [Stillger et al, 2002].

3.6.4 Veränderung der Membranpermeabilität bei Ganzzellbiotransformationen

Die Edukte der Ganzzellbiotransformation zur Synthese chiraler Alkohole, sowie auch die Alkohole, üben oftmals eine toxische Wirkung auf die Zellen aus. Als Grund dieser toxischen Wirkung werden die Veränderungen in der Membranpermeabilität der Zellen betrachtet. Es konnte beobachtet werden, dass die Lösungsmitteltoleranz Gram-negativer Bakterien aufgrund ihrer äußeren Membranstruktur höher ist als bei Gram-positiven Bakterien. Diese äußere Membran enthält bei Gram-negativen Bakterien

wichtige Strukturproteine, Lipoproteine und Lipopolysaccharide [Inoue und Horikoshi, 1991].

Zur Beschreibung der Biokompatibilität organischer Lösungsmittel wurde der Parameter $\log P_{o/w}$ eingeführt. Dieser ist definiert als der Logarithmus des Verhältnisses der Löslichkeit einer Komponente in *n*-Octanol zu deren Löslichkeit in Wasser. Je hydrophober eine Verbindung, desto größer ist ihr $\log P_{o/w}$ [Leon et al., 1998]. Der kritische $\log P_{o/w}$ ist Mikroorganismen spezifisch. Allgemein gilt jedoch, dass die Toxizität einer Verbindung umso höher ist, je kleiner der $\log P_{o/w}$, d.h. je hydrophiler die Verbindung ist.

Der Mechanismus der Toxizität ist noch nicht ausreichend charakterisiert, es wird jedoch im Allgemeinen angenommen, dass die Moleküle mit den Membranlipiden interagieren und somit die Membranfluidität verändern. Hydrophile Moleküle besitzen hierbei eine höhere Membranlöslichkeit, was der Grund für ihre höhere Toxizität ist. Bei stark hydrophoben Molekülen ist die Membranlöslichkeit sehr gering. Zusätzlich verhindert der Transportwiderstand durch die hydrophilen Phospholipid-Kopfgruppen die Akkumulation dieser Moleküle (siehe Abb. 3.6-3) [Sikkema et al., 1994].

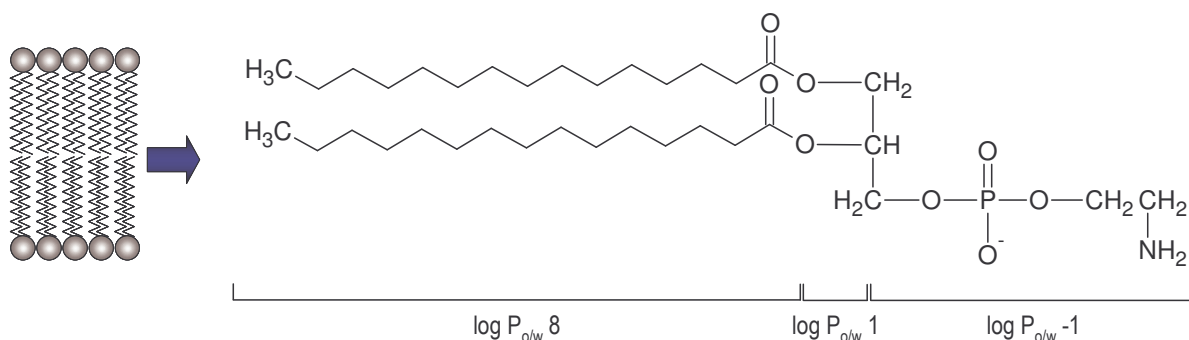


Abb. 3.6-3 Prädiktion zur Position hydrophober Moleküle in der Phospholipid Doppelschicht Membran in Abhängigkeit ihres $\log P_{o/w}$ [aus Sikkema et al., 1994]

Es wird zwischen der molekularen Toxizität durch gelöste toxische Moleküle und der Phasen-Toxizität, bei auftreten einer zweiten Phase, unterschieden. Das Auftreten einer zweiten Phase ist jedoch nicht zwingend für die Toxizität. Spezifisch für die Verbindung existiert eine kritische Konzentration in der Zellmembran, bei der ein vollständiger Verlust der Biokatalysator-Aktivität das Resultat ist. Diese Konzentration korreliert zur Konzentration der toxischen Verbindung in der wässrigen Phase [Osborne et al., 1990]. Der Verteilungskoeffizient K für eine Komponente i ist dabei wie folgt definiert [Zhao und DeLancey, 1999]:

$$K = \frac{c_i(\text{intrazellulär})}{c_i(\text{extrazellulär})} \quad (4)$$

Durch die Veränderung der Membranfluidität können folgende Effekte auftreten [Sikkema et al, 1994; Leon et al., 1998; Isken und de Bont, 1998]:

- Inaktivierung wichtiger Membranfunktionen: die Zellmembran dient als Barriere der Zelle zu ihrer Umgebung. Die Veränderung der Permeabilität kann zu einem Verlust an für die Biotransformation benötigten Cofaktoren, ATP, Effektor-Molekülen/-Ionen und sogar zellinterner Enzyme führen. Zusätzlich ist es möglich, dass durch eine Veränderung der Membranpermeabilität der physiologische zellinterne pH nicht mehr gehalten werden kann und somit die Enzymfunktionalität reduziert wird.
- Inaktivierung oder Denaturierung membrangebundener Proteine: dieses können sowohl Transportproteine, als auch an der Biotransformation beteiligte Enzyme sein.
- Störung von Transportmechanismen durch die Membran aufgrund des Verlustes des Transmembrangradienten der Protonen und Ionen (protonenmotorische Kraft), welches eine Auswirkung auf den Energiehaushalt der Zelle hat.
- Lyse der Zellen bei hohen Konzentrationen der toxischen Verbindung.

Die Bestimmung der Membranintegrität kann dabei über mehrere Methoden erfolgen, wie zum Beispiel über die Quantifizierung der Aufnahme oder der Freisetzung von Farbstoffen [Helander und Mattila-Sandholm, 2000]. Eine weitere Methode ist der Einsatz von geladenen Polymeren. Der Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit den Grad der Porosität über den Einsatz unterschiedlich großer Polymere zu erfassen [Boivin et al., 1998;

3.6.5 Charakterisierung von Ganzzellbiotransformationen

Charakterisierung des Prozesses

Der Umsatz einer Biotransformation [%] ist als umgesetzte Menge des Edukts bezogen auf die eingesetzte Eduktausgangskonzentration definiert:

$$\text{Umsatz} = \frac{[\text{Edukt}]_{t=0} - [\text{Edukt}]_{t=t}}{[\text{Edukt}]_{t=0}} \cdot 100 \quad (5)$$

Die Ausbeute [%] ist dagegen als die Menge an gebildetem Produkt bezogen auf die eingesetzte Eduktausgangskonzentration definiert:

$$\text{Ausbeute} = \frac{[\text{Pr odukt}]_{t=t} - [\text{Pr odukt}]_{t=0}}{[\text{Edukt}]_{t=0}} \cdot 100 \quad (6)$$

Im Fall einer einstufigen Biotransformation ohne Nebenreaktionen (wie zum Beispiel Zerfall des Edukts oder die Umsetzung des Edukts durch andere Enzyme) ist der Umsatz gleich der Ausbeute.

Die Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) [$\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$] wird auf den Anfangszeitpunkt der Umsetzung bezogen und wird somit wie folgt berechnet:

$$\text{RZA} = \frac{[\text{Pr odukt}]_{t=t} - [\text{Pr odukt}]_{t=0}}{t} \quad (7)$$

Die Produktbildungsrate [$\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$] zwischen zwei Messpunkten ist wie folgt definiert:

$$v = \frac{d[\text{Pr odukt}]}{dt} = \frac{[\text{Pr odukt}]_{t=t+1} - [\text{Pr odukt}]_t}{t_{(t+1)} - t} \quad (8)$$

Diese lässt sich als Funktion der Eduktkonzentration über eine Sättigungskinetik nach Michaelis-Menten nach folgender Gleichung beschreiben. Die Michaelis-Menten-Konstante K_m [mol L^{-1}] ist dabei die Eduktkonzentration, bei der die Produktbildungsrate v , 50 % der maximalen Produktbildungsrate v_{\max} beträgt (siehe Abb. 3.6-4).

$$v = v_{\max} \cdot \frac{[\text{Edukt}]}{K_m + [\text{Edukt}]} \quad (9)$$

Liegt eine unkompetitive Inhibierung durch das Edukt vor, so kann die Produktbildungsrate über folgende Kinetik beschrieben werden, wobei K_i [mol L^{-1}] die Edukt-Inhibierungskonstante ist:

$$v = v_{\max} \cdot \frac{[\text{Edukt}]}{K_m + [\text{Edukt}] + [\text{Edukt}]^2 / K_i} \quad (10)$$

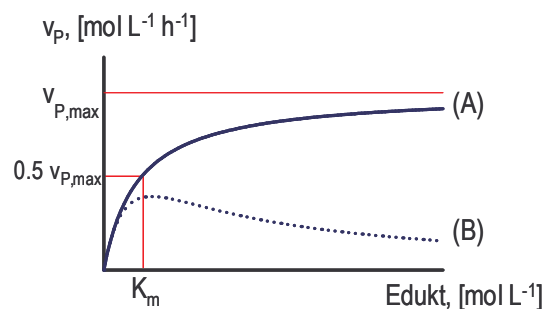


Abb. 3.6-4 Darstellung der Produktbildungsrate als Funktion der Edukt-Konzentration: (A) Michaelis-Menten-Kinetik, (B) Eduktinhibierung

Charakterisierung des Biokatalysators

Bei Ganzzellbiotransformationen mit toxischen bzw. inhibierenden Edukten und/oder Produkten ist die spezifische Produktbildungskapazität $[P]/c_x$ [mmol g^{-1}] ein Maß für die Wertschöpfung des Biokatalysators. Im Fall der Biotransformation mit ruhenden

Zellen, bei der kein Zellwachstum vorliegt, wird hierbei die Ausgangskonzentration der Zellen $c_{x,0}$ [g L^{-1}] zur Berechnung eingesetzt:

$$\frac{[P]}{c_x} = \frac{[\text{Produkt}]_{t=\text{Ende}}}{c_{x,0}} \quad (11)$$

Als weitere Charakterisierung kann die Halbwertszeit des Biokatalysators herangezogen werden. Die Halbwertszeit $t_{1/2}$ gibt die Zeit an, nach der der Biokatalysator über die Hälfte der Anfangsaktivität verfügt [Bommarius und Riebel, 2004]:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_1} \quad (12)$$

Die Deaktivierungskonstante k_1 [h^{-1}] wird aus der Produktbildungsrate v_i der Komponente i berechnet, für den Fall, dass die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit auf eine Inaktivierung des Biokatalysators zurückzuführen ist. Liegt eine Reaktion erster Ordnung vor, lässt sich die Zeitabhängigkeit der Produktbildungsrate [$\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$] wie folgt berechnen:

$$v(t) = v_0 \cdot e^{-k_1 \cdot t} \quad (13)$$

wobei v_0 die Anfangsgeschwindigkeit ist. Aus der halb-logarithmischen Auftragung der Produktbildungsrate über der Zeit kann die Deaktivierungskonstante k_1 ermittelt werden (siehe Abb. 3.6-5).

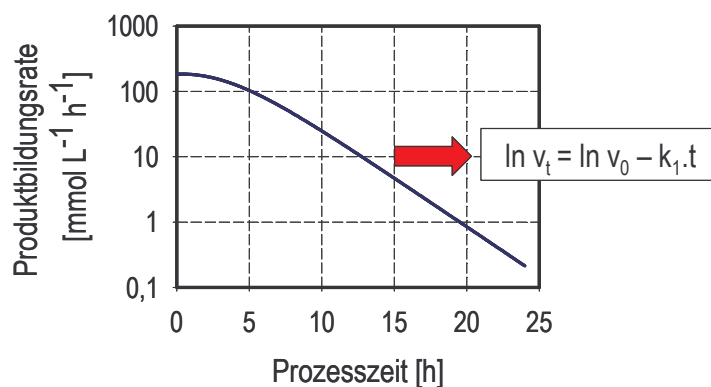


Abb. 3.6-5 Ermittlung der Geschwindigkeitskonstante der Biotransformation aus dem zeitlichen Verlauf der Produktbildungsrate

Für das katalysierende Enzym kann mittels Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität [U g^{-1}] aus dem Zellextrakt eine Aussage über die zeitliche Stabilität des Enzyms getroffen werden. Als 1 Unit (U) ist dabei die Menge an benötigtem Enzym zur Umsetzung von 1 μmol Edukt pro Minute definiert.

Charakterisierung der Enantioselektivität

Bei der Synthese von chiralen Alkoholen ist die Enantioselektivität der Umsetzung eine sehr wichtige Größe, um den Prozess zu beurteilen. Paare von Molekülen, die sich zueinander spiegelbildlich verhalten, werden als Enantiomere bezeichnet. Das Maß für die Enantioselektivität einer Biotransformation ist bei Betrachtung eines einzigen chiralen Zentrums in der Verbindung der Enantiomerenüberschuss [%] (siehe Abb. 3.6-6):

$$ee = \frac{[\text{Enantiomer}_1] - [\text{Enantiomer}_2]}{[\text{Enantiomer}_1] + [\text{Enantiomer}_2]} \cdot 100 \quad (14)$$

Sind in einer Verbindung mehrere chirale Zentren vorhanden wird zwischen dem Enantiomerenüberschuss und dem Diastereomerenüberschuss unterschieden. Da an jedem chiralen Zentrum die Konfiguration entweder *R* oder *S* sein kann, ist eine Vielzahl von 2^n Stereoisomeren möglich (*n* ist hierbei die Anzahl der chiralen Zentren). Diastereomere sind dabei Stereoisomere, die sich nicht wie Bild und Spiegelbild verhalten und sich deswegen im Gegensatz zu den Enantiomeren chemisch und physisch voneinander unterscheiden.

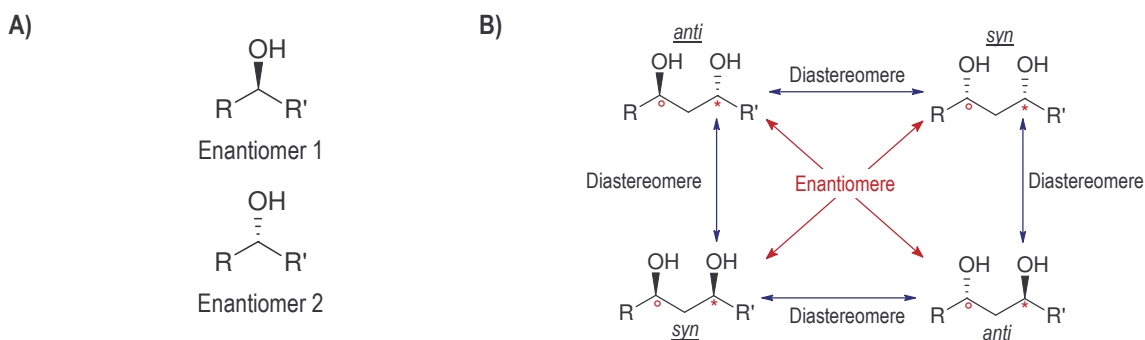


Abb. 3.6-6 Charakterisierung der Enantioselektivität bei: A) einem chiralen Zentrum, B) mehreren chiralen Zentren

Der Enantiomerenüberschuss kann in diesem Fall immer nur für ein chirales Zentrum bestimmt werden. Für ein Diastereomerenpaar kann der Diastereomerenüberschuss [%] wie folgt bestimmt werden:

$$de = \frac{[\text{Diastereomer}_1] - [\text{Diastereomer}_2]}{[\text{Diastereomer}_1] + [\text{Diastereomer}_2]} \cdot 100 \quad (15)$$

Eine weitere Nomenklatur zur Beschreibung der Stereoselektivität ist das Mengenverhältnis der *syn*- zu *anti*-Form der Enantiomere $dr_{s;a}$, welches Diastereomerenverhältnis genannt und wie folgt definiert wird:

$$dr_{s;a} = [\text{syn} - \text{Diastereomer}] : [\text{anti} - \text{Diastereomer}] \quad (16)$$

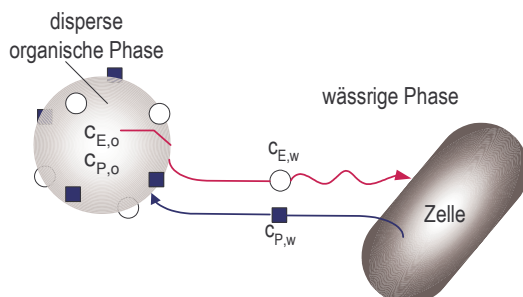
3.7 Methoden zur Ganzzellbiotransformation schlecht wasserlöslicher Edukte

Ein Problem bei der Synthese chiraler Alkohole und Hydroxysäureester stellt die schlechte Wasserlöslichkeit der prochiralen Ketone und die daraus resultierende geringe Bioverfügbarkeit dar. Des Weiteren wirken die Edukte und Produkte dieser Reduktionen oftmals toxisch auf die Zellen. Um für diese Biotransformationen hohe Produktivitäten und Raum-Zeit-Ausbeuten zu erzielen, wurden von der prozesstechnischen Seite verschiedene Ansätze entwickelt, die in diesem Kapitel erläutert werden (siehe Abb. 3.7-1 bis Abb. 3.7-3, mit: $c_{E,o}$ bzw. $c_{E,w}$ = Eduktkonzentration in der organischen Phase bzw. wässrigen Phase, $c_{P,o}$ bzw. $c_{P,w}$ = Produktkonzentration in der organischen Phase bzw. wässrigen Phase).

3.7.1 Organisch-wässrige Zwei-Phasen-Systeme

In organisch-wässrigen Zwei-Phasen-Systemen wird eine mit Wasser nicht mischbare organische Phase in der wässrigen kontinuierlichen Phase dispergiert (siehe Abb. 3.7-1). Die organische Phase dient dabei als Speicher für das Edukt, welches nach einem thermodynamischen Gleichgewicht zwischen beiden Phasen langsam in die wässrige Phase abgegeben wird. Gleichzeitig dient sie als Speicher für das gebildete Produkt. Durch die Eduktbereitstellung aus der organischen Phase kann gewährleistet werden, dass keine Stofftransportlimitierung für das Edukt vorliegt. Des Weiteren werden durch eine kontrollierte Eduktfreisetzung und die daraus resultierende geringe gelöste Konzentration an Edukt, sowie an Produkt, toxische bzw. inhibierende Effekte auf die Biokatalysatoren minimiert. Dieses kann durch die Auswahl einer organischen Phase mit einem geeigneten Verteilungskoeffizienten für Edukt und Produkt erreicht werden [Deziel et al., 1999]. Organisch-wässrige Zwei-Phasen-Systeme werden zum Beispiel in der Biotransformation von Hydrocortison-Derivaten mittels *Arthrobacter simplex* eingesetzt, bei denen eine sehr geringe Eduktlöslichkeit von $10^{-1} - 10^{-2}$ mM vorliegt [Fernandes et al., 1995]. Ein anderes Beispiel ist die Oxidation von Styren zu chiralem (S)-Styren-Oxid mittels rekombinanten *E. coli* mit Hilfe eines Zwei-Phasen-Zulauf-Prozesses [Panke et al., 2000].

Organisch-wässriges 2-Phasen-System



Membranreaktor

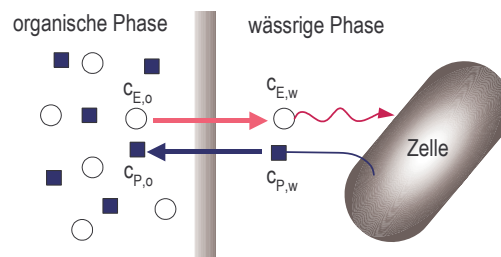


Abb. 3.7-1 Methoden zur Biotransformation schlecht wasserlöslicher Edukte: organisch-wässrige Zwei-Phasen-Systeme und Membranbioreaktor.

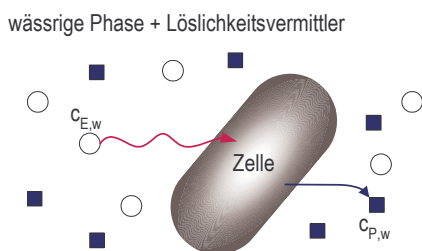
3.7.2 Membranbioreaktoren

Bei dem Einsatz organisch-wässriger Zwei-Phasen-Systeme muss ein organisches Lösungsmittel gefunden werden, welches eine hohe Biokompatibilität für die eingesetzten Biokatalysatoren aufweist. Diese Problematik kann durch den Einsatz von Membranbioreaktoren umgangen werden. Hier ist die organische Phase zusätzlich durch eine selektive Membran von der wässrigen Phase mit den Biokatalysatoren getrennt (siehe Abb. 3.7-1). Das in der organischen Phase gelöste Edukt diffundiert dabei kontrolliert durch die Membran. Gleichzeitig ist eine kontinuierliche Produktabtrennung in die organische Phase möglich. Es kann also auch hier eine ausreichende Eduktversorgung bei gleichzeitiger Minimierung von toxischen bzw. inhibierenden Konzentrationen für Edukt und Produkt gewährleistet werden [Prazeres und Cabral, 1994; Westgate et al., 1998].

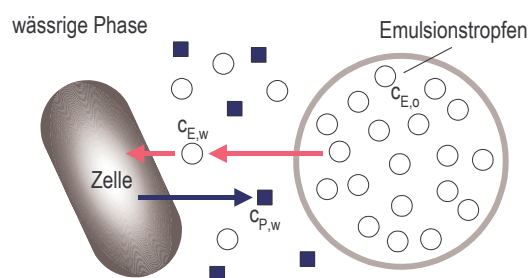
3.7.3 Einsatz von Löslichkeitsvermittlern

Ein weiterer Ansatz um das Problem der geringen Eduktlöslichkeit zu umgehen ist die Erhöhung der gelösten Eduktkonzentration in der wässrigen Phase durch den Einsatz von Löslichkeitsvermittlern (siehe Abb. 3.7-2).

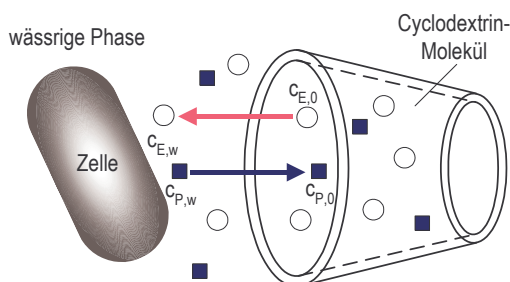
Löslichkeitsvermittler



Organisch-wässrige Mikroemulsionen



Cyclodextrine



Reaktivextraktion

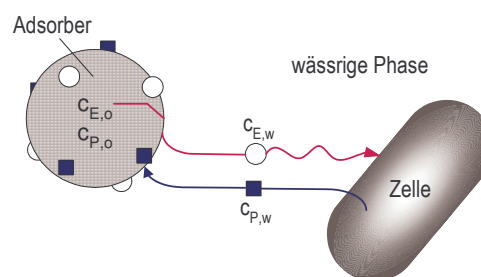


Abb. 3.7-2 Methoden zur Biotransformation schlecht wasserlöslicher Edukte: Reaktivextraktion an Adsorberharze, Einsatz von Löslichkeitsvermittlern, Einsatz von Cyclodextrinen als Löslichkeitsmittler, Bildung von Mikroemulsionen

Als Löslichkeitsvermittler können sowohl gut wasserlösliche Alkohole, als auch oberflächenaktive Substanzen wie Tenside und Detergentien eingesetzt werden. Diese wirken durch eine Verringerung der Grenzflächenspannung zwischen der wässrigen Phase und den Edukt- bzw. Produktropfen. Ein Nachteil ist hier oftmals die Toxizität

der Löslichkeitsvermittler gegenüber den Biokatalysatoren, wobei im Fall der wasserlöslichen Alkohole der $\log P_{o/w}$ noch geringer ist als bei den nicht mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmitteln [Inoue und Horikoshi, 1991]. Ein Beispiel hierfür ist die asymmetrische Reduktion eines Ketosulfons zum korrespondierenden *trans*-Hydroxysulfon mit *Rhodotorula rubra* ganzen Zellen. Als Löslichkeitsvermittler wurden Ethanol, Methanol und Dimethylsulfoxid in verschiedenen Konzentrationen untersucht [Lorraine et al., 1996].

3.7.4 Einsatz von Mikroemulsionen

Bei einer ternären Mischung einer wässrigen Phase, einer organischen Phase und oberflächenaktiven Substanzen bilden sich Mikroemulsionen (siehe Abb. 3.7-2). Organisch-wässrige Mikroemulsionen bilden sich, wenn die wässrige Phase die kontinuierliche Phase darstellt. Die oberflächenaktiven Substanzen mit ihren hydrophilen Köpfen und hydrophoben Resten umschließen in diesem Fall die organische Phase mit dem gelösten Edukt und grenzen diese als Mikroemulsionstropfen von der wässrigen Phase ab. Werden Tenside als oberflächenaktive Substanzen eingesetzt, werden die Emulsionstropfen auch als Mizell bezeichnet. Bei dem Einsatz von Phospholipiden werden statt dessen Liposome gebildet, bei denen die Emulsionstropfen von einer oder mehreren Lipid-Doppelschichten umschlossen sind. Ein Anwendungsbeispiel ist die Biotransformation von in Liposomen bereitgestelltem Hydrocortison in Prednisolon mit *Arthrobacter simplex* Zellen [Goetschel und Bar, 1991].

3.7.5 Einsatz von Cyclodextrinen als Löslichkeitsvermittler

Ein anderer Ansatz, die Eduktverfügbarkeit in der wässrigen Phase zu erhöhen, bei gleichzeitigem Schutz der Zellen, ist der Einsatz von Cyclodextrin-Molekülen als Edukt-Speicher (siehe Abb. 3.7-2). Cyclodextrine sind torusförmige zyklische Malto-Oligosaccharide aus 6-8 Glukose-Einheiten. Durch die Anordnung der Moleküle wird bei Cyclodextrin-Molekülen eine apolare Kavität gebildet, die als Speicher für hydrophobe Substanzen dienen kann. Die Hydroxy-Gruppen der Cyclodextrine sind dagegen zur Molekülaußenseite gerichtet, was Grund für ihre gute Löslichkeit in Wasser ist [Zelinski und Kula, 1997]. So wurden methylierte Cyclodextrine zum Beispiel als Speichermoleküle bei der Oxidation von Cholesterin zu Cholest-4-en-3-on durch *Rhodococcus erythropolis* eingesetzt [Jadoun und Bar, 1993].

3.7.6 Reaktivextraktion mit Hilfe von Adsorbentien

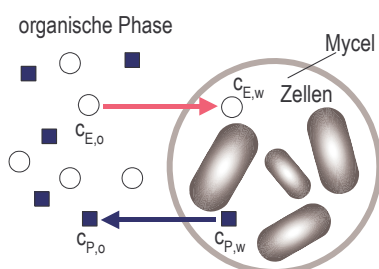
Bei der Reaktivextraktion dienen Adsorbentien als Speicher für die Eduktbereitstellung und für das gebildete Produkt (siehe Abb. 3.7-2). Als Adsorbentien stehen dabei makroporöse Polymere mit verschiedenen Adsorptionseigenschaften für die Zielmoleküle zur Verfügung. Ein Beispiel ist die in Kapitel 3.2.2 bereits geschilderte Reduktion von 6-Cl-3,5-Dioxohexansäure-*tert*-Butylester mit lyophilisierter Bäckerhefe, bei der das

mittelpolare Adsorbens Amberlite XAD-7 als Eduktspeicher eingesetzt wurde [Wolberg, 2001].

3.7.7 Einsatz von reversen Mizellen, Verkapselung oder Immobilisierung der Biokatalysatoren

Eine bessere Stabilität der Zellen kann über ihren Einschluss in reverse Mizellen (wässrig-organische Mikroemulsionen) oder Kapseln, sowie durch eine Immobilisierung der Zellen erreicht werden (siehe Abb. 3.7-3). Dadurch kann die Umsetzung in einer organischen Phase durchgeführt werden, in der eine gute Löslichkeit für Edukt und Produkt gewährleistet werden kann. Der Einschluss bzw. die Immobilisierung der Zellen schützt diese dabei vor den toxischen Effekten der organischen Phase. Bei der Reduktion von 1-Phenyl-1,2-Propandion mit mikroverkapselter Bäckerhefe wurden die semipermeablen Polyamid-Mikrokapseln über eine Grenzflächenpolymerisation hergestellt [Green et al., 1996]. Für die asymmetrische Synthese von (S)-3-Hydroxybuttersäure-Ethylester wurde ein Ansatz mit in Calcium Alginat verkapselten Bäckerhefezellen untersucht [Buque et al., 2002]. Auf Celite immobilisierte *Mycobacterium sp.* wurden für die selektive Seitenkettenspaltung von β -Sitosterol verwendet [Fernandes et al., 1998].

Reverse Mizellen



Verkapselung/Immobilisierung der Zellen

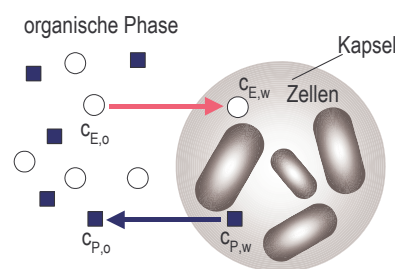


Abb. 3.7-3 Methoden zur Biotransformation schlecht wasserlöslicher Edukte: Einschluss der Zellen in wässrig/organische Mizellen und Verkapselung bzw. Immobilisierung der Zellen

3.8 Charakterisierung von Dispersionen

Ein Gemisch aus mindestens zwei nicht miteinander mischbaren Flüssigkeiten wird als Dispersion definiert. Dabei wird ein Stoff als disperse Phase in dem anderen Stoff, der die kontinuierliche Phase bzw. Hauptphase darstellt, verteilt. Beide Phasen sind deutlich voneinander getrennt und lassen sich über physikalische Verfahren, wie zum Beispiel Zentrifugation oder Phasenseparation, voneinander trennen.

Bei Biotransformationen, bei denen das Edukt als disperse Phase vorliegt, sind die Tropfengröße sowie die Tropfengrößenverteilung maßgebend für den Stofftransport des Edukts zu den Biokatalysatoren und somit für die Reaktionsrate, wenn nicht die Eduktaufnahme oder die enzymatische Reaktion limitierend ist. In diesem Kapitel wird

zum einen die Theorie zur Tropfenbildung in gerührten Systemen für flüssig/flüssig-Dispersionen sowie die Kalkulation des Stoffüberganges der Edukt-Tropfen behandelt. Über diese Berechnungen soll die Prädiktion sowohl der Tropfengröße, als auch des Stoffüberganges für ein bestimmtes Rührsystem, bestimmte Stoffsysteme und Prozessbedingungen ermöglicht werden.

3.8.1 Tropfenbildung in gerührten Systemen

Definition des mittleren Sauterdurchmessers

Der dynamische Gleichgewichtszustand beim Dispergieren setzt sich aus der Interaktion von Tropfenzerteilung durch die Rührerschkräfte und Tropfenkoaleszens zusammen. Die Tropfengrößenverteilung der Dispersion wird in der Regel über den mittleren Sauterdurchmesser d_{32} charakterisiert, der wie folgt definiert ist:

$$d_{32} = \frac{\sum_{i=1}^m n_i \cdot d_i^3}{\sum_{i=1}^m n_i \cdot d_i^2} \quad (17)$$

m ist dabei die Anzahl der Tropfenfraktionen in der Tropfengrößenverteilung, n_i und d_i sind jeweils die Anzahl und der Durchmesser der Tropfen in der Fraktion i [Paul et al., 2004].

Die auf das Volumen V der dispersen Phase bezogene Phasengrenzfläche a lässt sich über folgende Beziehung aus dem Sauterdurchmesser berechnen (ϕ_V ist gleich dem Volumenanteil der dispersen Phase):

$$a \equiv \frac{A}{V} = \frac{\sum_{i=1}^m \pi \cdot d_i^2}{\sum_{i=1}^m (\pi \cdot d_i^3 / 6)} = \frac{6 \cdot \phi_V}{d_{32}} \quad (18)$$

Der mittlere Durchmesser d_n ist dagegen wie folgt definiert:

$$d_n = \frac{\sum_{i=1}^m n_i \cdot d_i}{\sum_{i=1}^m n_i} \quad (19)$$

Bei d_{10} bedeutet es, dass 10 % des Gesamtvolumens der Tropfen kleiner sind als d_{10} , d_{50} ist so definiert, dass 50 % des Gesamtvolumens der Tropfen kleiner sind als d_{50} und d_{90} als der Tropfendurchmesser, bei dem 90 % des Gesamtvolumens kleiner sind. In der Praxis sind sich d_{32} und d_{50} meistens ähnlich und werden beide zur Berechnung des Stofftransportes eingesetzt [Paul et al., 2004].

Die Tropfengrößenverteilung kann als Anzahlverteilung $f_n(d_i)$ oder Volumenverteilung $f_V(d_i)$ dargestellt werden, mit:

$$f_n(d_i) = \frac{n_i}{\sum_{j=1}^m n_j} \quad \text{und} \quad f_v(d_i) = \frac{n_i \cdot d_i^3}{\sum_{j=1}^m n_j \cdot d_j^3} \quad (20)$$

Dabei kann die Tropfengrößenverteilung entweder als Verteilungssumme $Q_x(d)$ oder als Verteilungsdichte $q_x(d)$ dargestellt werden [Zlokarnik, 1999]. Die Verteilungsdichte beschreibt den Mengenanteil der Tropfen, welcher in ein bestimmtes Tropfengrößenintervall Δd fällt:

$$q_x(d) = \frac{n_i \cdot d_i^x}{\Delta d \sum_{i=1}^m n_i \cdot d_i^x} \quad (21)$$

Die Verteilungssumme gibt den Mengenanteil der Tropfen an, welche kleiner als eine bestimmte Tropfengröße d_n sind:

$$Q_x(d) = \frac{\sum d \leq d_n}{\sum d} \quad (22)$$

Berechnung des Sauterdurchmessers in Abhängigkeit der Prozessparameter

Der mittlere Sauterdurchmesser d_{32} ist von verschiedenen Eigenschaften der dispersen und der kontinuierlichen Phase, sowie der Rührcharakteristika des gerührten Systems abhängig (Index d – Stoffwerte der dispersen Phase, Index k – Stoffwerte der kontinuierlichen Phase):

$$d_{32} = f(d_R, \rho_d, \rho_k, \eta_d, \eta_k, \sigma, \varphi_V, g, \Delta\rho, N) \quad (23)$$

mit

d_R	=	Rührerdurchmesser [m]
ρ	=	Dichte [kg m^{-3}]
η	=	Dynamische Viskosität [mPa s]
σ	=	Grenzflächenspannung [mN m^{-1}]
φ_V	=	Phasenanteil der dispersen Phase (= $V_{\text{dispers}}/V_{\text{gesamt}}$) [-]
g	=	Gravitationskonstante [9.8 m s^{-2}]
$\Delta\rho$	=	Dichtedifferenz der dispersen und der kontinuierlichen Phase [kg m^{-3}]
N	=	Drehzahl des gerührten Systems [min^{-1}]

Hierbei wird angenommen, dass die Geometrie des gerührten Systems, wie der Rührertyp, das Verhältnis des Reaktordurchmessers zum Rührerdurchmesser D_R/d_R , das Verhältnis der Reaktorhöhe zum Rührerdurchmesser H/d_R , sowie das Verhältnis der Einbauhöhe des Rührers zum Rührerdurchmesser h/d_R konstant sind [Zlokarnik, 1999].

Berechnung des Sauterdurchmessers für turbulente Strömungsbedingungen und einen geringen Phasenanteil φ_V

Die Koaleszens- und Dispersionsvorgänge werden vom Phasenanteil der dispersen Phase beeinflusst. Zum Beispiel nehmen die Koaleszensvorgänge mit zunehmendem Phasenanteil zu. Aus dem Grund werden Flüssig-Flüssig-Systeme nach dem Phasenanteil der dispersen Phase φ_V kategorisiert [Paul et al., 2004]:

- Verdünnte Dispersionen: $\varphi_V < 0.01$, die Dispergierung ist nur von den hydrodynamischen Eigenschaften abhängig, Koaleszenzeffekte können vernachlässigt werden.
- Leichtkonzentrierte Dispersion: $\varphi_V < 0.2$, Koaleszenzeffekte haben einen Einfluss auf das Verhalten der Dispersion, eine Prädiktion der Tropfengröße und Tropfengrößenverteilung ist jedoch möglich, da die disperse Phase das Strömungsverhalten der kontinuierlichen Phase nicht beeinflusst. Somit können Einphasen-Strömungsmodelle zur Beschreibung der mechanischen Kräfte, die zur Tropfenverformung und Koaleszens führen verwendet werden.
- Hochkonzentrierte Dispersion: $\varphi_V > 0.2$, große Einwirkung von Koaleszenzeffekten, eine Kalkulation der Tropfengröße und Tropfengrößenverteilung ist schwierig.

Für verdünnte Dispersionen mit $\varphi_V < 0.01$ ist also hauptsächlich der Tropfenzerfall für die Gleichgewichts-Tropfengrößenverteilung verantwortlich. Dieser wird in turbulenten Systemen durch die Turbulenzwirbel hervorgerufen. Ein mechanistisches Modell zur Beschreibung der maximalen Tropfengröße in turbulenten Strömungen wurde von Kolmogorov vorgeschlagen. Nach Kolmogorov wird d_{32} durch die Turbulenzwirbel im Mikrobereich bestimmt. Die entstehenden Tropfen sind klein im Vergleich zu den Turbulenzen im Makrobereich, jedoch groß im Vergleich zu den Mikrowirbeln. Dieser Kolmogorov-Turbulenzwirbel l ist dabei wie folgt definiert:

$$l = \left(\frac{\nu_k}{\varepsilon} \right)^{1/4} \quad (24)$$

mit ν_k gleich der kinematischen Viskosität der kontinuierlichen Phase [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$] und ε gleich der Energiedissipationsdichte [$\text{m}^2 \text{s}^{-3}$]. Die Energiedissipationsdichte ist dabei die lokale Rate der Dissipation der turbulenten kinetischen Energie pro Masseneinheit [Kolmogorov, 1958].

Die Scherkraft der kontinuierlichen Phase τ_k [N m^{-2}], die auf den Tropfen wirkt, wird nach Kolmogorov wie folgt beschrieben [Paul et al., 2004]:

$$\tau_k \approx \rho_k \cdot \varepsilon^{2/3} \cdot d^{2/3} \quad (25)$$

Der Scherkraft, welche den Tropfenzerfall bedingt, wirken die kohäsiven Kräfte der Oberflächenspannung und der Viskosität entgegen. Die Oberflächenspannungskraft τ_o ist beschrieben als:

$$\tau_o \approx \frac{\sigma}{d} \quad (26)$$

und die Viskositätskraft innerhalb des Tropfens τ_d nach Hinze (1955) als:

$$\tau_d \approx \eta_d \cdot \frac{(\tau_k / \rho_d)^{1/2}}{d} \quad (27)$$

Der maximale Tropfendurchmesser d_{\max} ist definiert als der Durchmesser oberhalb dessen die Scherkräfte ausreichend sind, um einen Tropfenzerfall hervorzurufen und unterhalb dessen der Tropfen noch durch die Oberflächen- und inneren Viskositätskräfte stabilisiert wird:

$$\tau_k = \tau_o + \tau_d \quad (28)$$

Basierend auf Kolmogorov's Konzept der lokalen Isotropie, wurde eine semiempirische Gleichung zur Vorhersage des mittleren Tropfendurchmessers entwickelt [Chen und Middlemann, 1967]. Für disperse Phasen mit niedriger Viskosität ist τ_d vernachlässigbar. Werden die Gleichungen 25, 26 und 27 in Gleichung 28 eingesetzt, kann der maximale Tropfendurchmesser wie folgt beschrieben werden:

$$d_{\max} = C_1 \cdot \left(\frac{\sigma}{\rho_k} \right)^{3/5} \cdot \varepsilon_{\max}^{-2/5} \quad (29)$$

Die Korrelationskonstante C_1 muss empirisch bestimmt werden und ist sowohl von der Reaktorgeometrie, als auch vom Rührertyp abhängig. Der maximale stabile Durchmesser wird hierbei von der maximalen Energiedissipationsdichte bestimmt und nicht vom Durchschnittswert, so dass in Gleichung 29 ε_{\max} für ε eingesetzt wird.

Für einen konstanten Leistungseintrag ($Re > 10^4$) ist $\varepsilon_{\max} \sim N^3 d_R^2$. Experimentelle Ergebnisse konnten zeigen, dass d_{\max} proportional zu d_{32} ist. Die Abhängigkeit in Gleichung 29 kann somit wie folgt umgestellt werden:

$$\frac{d_{32}}{d_R} = C_2 \cdot We^{-3/5} \quad (30)$$

Chen und Middlemann untersuchten hierbei für einen Rührkesselreaktor mit Rushton-Turbine eine Reihe von verschiedenen flüssig/flüssig-Dispersionen. Der Korrelationsfaktor konnte mit $C_2 = 0.053$ am besten angepasst werden.

Die Weber-Zahl gibt dabei das Verhältnis der disruptiven Trägheitskraft zur kohäsiven Oberflächenkraft an:

$$We = \frac{\rho_k \cdot N^2 \cdot d_R^3}{\sigma} \quad (31)$$

Soll der Phasenanteil mit berücksichtigt werden, so kann Gleichung 30 wie folgt erweitert werden [Mersmann und Grossmann, 1980]:

$$\frac{d_{32}}{d_R} = C_2 \cdot We^{-3/5} (1 + C_3 \cdot \varphi_V) \quad (32)$$

Der Term $(1 + C_3 \cdot \varphi_V)$ berücksichtigt dabei die Turbulenzdämpfung durch die disperse Phase mit einem geringen Phasenanteil. Für C_3 kann dabei der Näherungswert von 3 angegeben werden [Doulah, 1975].

Liegen viskose disperse Phasen vor, kann der Term τ_d dagegen nicht vernachlässigt werden. Der Lösungsansatz von Chen und Middlemann wurde von Calabrese et al. (1986a,b) und Wang und Calabrese (1986) für verdünnte Lösungen viskoser Tropfen in Rührkesselreaktoren mit Rushton-Turbinen erweitert. Es wurde festgestellt, dass die erweiterte mechanistischen Korrelation für Viskositäten $\eta_d \leq 0.5 \text{ Pa s}$ ihre Gültigkeit besaßen:

$$\frac{d_{32}}{d_R} = 0.053 \cdot We^{-3/5} (1 + 0.92 V_i^{0.84})^{3/5} \quad (33)$$

Die Viskositätskennzahl V_i entspricht dem Verhältnis der Viskositätskraft zur Oberflächenkraft, die den Tropfen stabilisieren:

$$V_i = \left(\frac{\rho_k}{\rho_d} \right)^{1/2} \cdot \frac{\eta_d \cdot N \cdot d_R}{\sigma} \quad (34)$$

Charakterisierung des Leistungseintrags

Zur Charakterisierung des Strömungsregimes im Rührkesselreaktor wird die Reynolds-Zahl Re verwendet:

$$Re = \frac{d_R^2 \cdot N \cdot \rho_k}{\eta_k} \quad (35)$$

mit ρ_k und η_k gleich der Dichte [kg m^{-3}] bzw. der dynamischen Viskosität [Pa s] der kontinuierlichen Phase. Laminare Strömungsbedingungen herrschen bei $0 \leq Re \leq 10$, Übergangsströmung bei $10 \leq Re \leq 10^4$ und vollständig ausgebildete turbulente Strömung bei $Re > 10^4$ (Rührkesselreaktoren ohne Strömungsbrecher) [Paul et al., 2004]. Hierbei ist zu beachten, dass es bei der Energiedissipationsdichte der turbulenten Strömung im Rührkesselreaktor große lokale Unterschiede geben kann. So

ist zum Beispiel die Energiedissipationsdichte an den Rührerblättern oftmals 40 mal höher als der Durchschnittswert für den gesamten Rührkessel.

Der für eine bestimmte Tropfengröße benötigte Leistungseintrag $[N \cdot m \cdot s^{-1}]$ lässt sich wie folgt ermitteln:

$$P = Ne \cdot \rho_k \cdot N^3 \cdot d_R^5 \quad (36)$$

Die Leistungskennzahl Ne ist dabei eine Funktion der Gasdurchsatzzahl Q , der Reynoldszahl Re und der Froudezahl Fr , mit:

$$Q = \frac{\varphi_G}{N \cdot d_R^3} \quad (37)$$

$$Fr = \frac{N^2 \cdot d_R}{g} \quad (38)$$

(φ_G ist der Phasenanteil der Gasphase).

In Abb. 3.8-1 ist als Beispiel die Abhängigkeit der Tropfengröße vom lokalen Leistungseintrag für verschiedene Dispergiersysteme dargestellt.

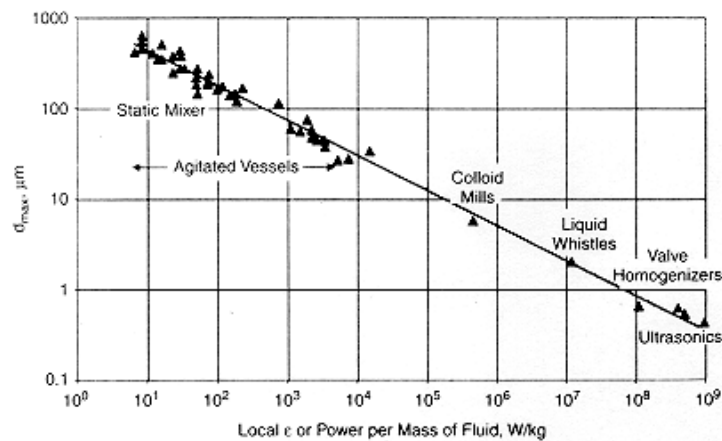


Abb. 3.8-1 Abhängigkeit der Tropfengröße vom lokalen Leistungseintrag für verschiedene Dispergierungssysteme [aus Davies, 1987]

3.8.2 Methoden zur Tropfengrößenbestimmung

Im folgenden Kapitel werden die etablierten Methoden zur Tropfengrößenbestimmung vorgestellt. Die meisten Methoden beruhen auf einem optischen Messprinzip. Diese können jedoch nur unter der Voraussetzung verwendet werden, dass sich der Brechungsindex der dispersen Phase signifikant von der kontinuierlichen Phase unterscheidet. Des Weiteren kann bei den Messmethoden zwischen *off-line* und *on-line* Methoden unterschieden werden. Der größte Teil der Analysen sind dabei so

konzipiert, dass sie nur *off-line* durchgeführt werden können. Die Nachteile bei den *off-line* Messmethoden ist in vielen Fällen die Instabilität der Tropfen, so dass keine akkuraten Tropfengrößenverteilungen bestimmt werden können. Eine Möglichkeit wäre eine Grenzflächenpolykondensation zur Stabilisierung der Tropfenoberfläche, um die Tropfen anschließend mit den vorhandenen Messmethoden zu analysieren [Zlokarnik, 1999]. Vor allem für die zeitliche Verfolgung der Tropfengrößenverteilung ist jedoch eine *in-situ* Analytik im Reaktionsgefäß von besonderem Vorteil.

Mikrografische Analyse

Die einfachste Methode ist die fotografische Analyse von Mikroskopaufnahmen, jedoch nur unter der Voraussetzung, dass die Stabilität der Tropfen in der Probe gegeben ist [Paul et al., 2004]. Für eine *in-situ* Messung der Dispersion im Reaktionsgefäß können Video-Sonden eingesetzt werden, die an CCD-Kameras gekoppelt sind. Die Lichtversorgung erfolgt über Lichtfaser, die um die Sonde angeordnet sind [Ritter und Kraume, 2000]. Die Bildanalyse der Momentaufnahmen bzw. Proben kann über geeignete Programme mit integrierten Bildverarbeitungs-Algorithmen automatisiert erfolgen, woraus die Information über die Tropfengröße und Tropfengrößenverteilung gewonnen wird.

Röntgenmikroskopie

Eine andere Möglichkeit zur direkten Abbildung der Tropfen in der wässrigen Dispersion ist mit der Röntgenmikroskopie gegeben. Das Messprinzip beruht darauf, dass Röntgenstrahlen mit Wellenlängen zwischen 2.34 und 4.38 nm von Wasser schwach, von anorganischen und organischen Materialien jedoch stark absorbiert werden [Lagaly et al., 1997].

Lichtabsorptionstechniken

Bei diesen Methoden wird anhand des Absorptionsgrades des eingestrahlten Lichtes der mittlere Streuquerschnitt der Tropfen und daraus der mittlere Tropfendurchmesser bestimmt. Voraussetzung hierfür ist, dass die einzelnen Tropfen unabhängig voneinander streuen, was bedeutet, dass die Dispersionen immer hinreichend verdünnt sein müssen [Lagaly et al., 1997].

Lichtstreuungsmethoden

Bei den statischen Lichtstreuungsmethoden wird das durch die Tropfen in einer durchstrahlten Messzelle gestreute Licht in einem großen Winkelbereich detektiert. Nach der Mie-Theorie oder nach der Fraunhofer-Näherung kann aus der Intensitätsverteilung des Streulichtes in Abhängigkeit vom Streuwinkel eine Umrechnung in eine Tropfengrößenverteilung erfolgen. Dabei beugen große Tropfen den Laserstrahl nur mit einem kleinen Winkel, bei kleinen Tropfen muss dagegen das Lichtspektrum in größeren Winkeln erfasst werden. Die statischen Lichtstreuungsmethoden kommen hauptsächlich im Bereich zwischen 20 nm und 2 mm zum Einsatz, wobei sie im Bereich oberhalb 1 μm als Laserbeugungsanalyse bezeichnet wird. Eine hinreichende Verdünnung der Dispersion ist hierbei Voraussetzung für die Anwendung [Kierkels et al., 1994; Lagaly et al., 1997].

Bei den dynamischen Methoden ermöglicht die Erfassung der Rückstreuung aus der Messzelle dagegen die Messung von höher konzentrierten Dispersionen. Das auf einen Photoverstärker fallende Streulicht wird mit Hilfe der schnellen Fourier-Transformation zu einem Frequenz-Spektrum verarbeitet, welches wiederum als Basis zur Berechnung der Tropfengrößenverteilung dient. Der erfasste Messbereich wird dabei auf 3 nm bis 6 μm verfeinert.

Phasendoppler-Anemometrie

Die Phasendoppleranemometrie ist eine Erweiterung der Laserdoppleranemometrie. Die Laserdoppleranemometrie wird zur Größenbestimmung von beweglichen Tropfen eingesetzt. Trifft der Laserstrahl einen sich bewegenden Tropfen, so enthält das durch den Tropfen reflektierte Licht neu entstandene Frequenzen durch den Dopplerverschiebung. Das reflektierte Licht ruhender Teile wird in seiner Frequenz dagegen nicht verändert. Die Streulichtfrequenz wird dann mittels Photodetektoren aufgenommen und die Tropfengeschwindigkeit über den entstehenden Photostrom erfasst [Paul et al., 2004].

Bei der Phasendoppleranemometrie werden zwei parallele Laserteilstrahlen in ein Messvolumen fokussiert. Das gebildete Streulicht wird von zwei Photodetektoren aufgefangen, die in einem bestimmten Messwinkel angeordnet sind. Zur Bestimmung der Tropfengröße wird die Phasendifferenz des gestreuten Lichtes zwischen diesen beiden Messwinkeln bestimmt. Die Messwinkel der Detektoren werden dabei so gewählt, dass die Rückstreuung dominiert. In dem Fall besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Tropfendurchmesser und Phasendifferenz der beiden Dopplersignale. Die Tropfengeschwindigkeit wird analog zur Laserdoppleranemometrie erfasst [Zhou und Kresta, 1998].

Dreidimensionale optische Laserrückreflexionsmessung

Die 3-dimensionale optische Rückreflexionsmessung (3-D-ORM) stellt eine Möglichkeit zur *in-line* Messung in Dispersionen dar. Bei der 3-D-ORM wird das Licht einer Laserdiode über einen Lichtwellenleiter und eine rotierende Optik, bestehend aus einer Koppellinse und einer fokussierenden Linse, in den Messraum eingeleitet (siehe Abb. 3.8-2). Durch die rotierende Optik wird eine dreidimensionale Fokussierung in einem engen Messraum unmittelbar nach dem Fenster ermöglicht.

Wechselwirkt der Laserstrahl mit einem Tropfen, so wird das dadurch rückreflektierte Licht über denselben Strahlenleiter auf einen Fotodetektor geleitet. Als Primärdaten dienen dabei die Werte der Dauer der Rückreflexion, die als Bogensehnenlänge erfasst wird. Für kleine sphärische Partikel und Tropfen kann die Bogensehnenlänge als Äquivalent für den Tropfendurchmesser verwendet werden. Durch zur Bewegungsgeschwindigkeit der Tropfen sehr hohe Abtastgeschwindigkeit des Lasers kann dabei die Geschwindigkeit des Tropfens vernachlässigt werden.

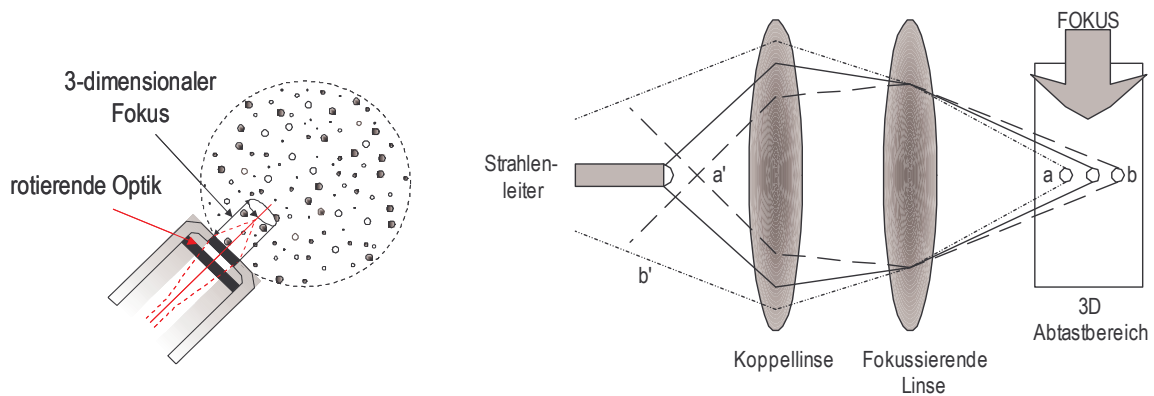


Abb. 3.8-2 Messprinzip der 3-dimensionalen optischen Rückreflexionsmessung [aus der Präsentation der Fa. MTS-Messtechnik]

Die Messung in hochkonzentrierten Dispersionen (bis zu 60 % v/v) wird durch ein geometrisches Selektionsverfahren ermöglicht (siehe Schema in Abb. 3.8-2). Erfolgt eine Wechselwirkung des eingestrahlt Lichtes in der aktiven Fokusposition, so wird das Licht auf exakt dem gleichen Weg zurück in die optische Faser geleitet. Erfolgt die Wechselwirkung des Tropfens jedoch außerhalb des Fokuspunktes, zum Beispiel in den Punkten a oder b, so geht das rückreflektierte Licht an der optischen Faser vorbei und wird somit nicht nachgewiesen (durch die unterbrochenen Linien dargestellt) [Braun und Schwartz, 1999].

3.8.3 Berechnung des Stofftransportes

Die Stoffübergangsrate für das Edukt in die wässrige Phase wird als Edukt-Transportrate (ETR) beschrieben. Für den Fall, dass das Edukt als reiner Stoff in der wässrigen Phase bereitgestellt wird, ist der Stofftransportwiderstand nur auf der wässrigen Seite gegeben (siehe Abb. 3.8-3).

An der Phasengrenzfläche stellt sich ein Gleichgewicht zwischen der Konzentration der reinen Eduktphase $c_{E,0}$ und der Edukt-Sättigungskonzentration in der wässrigen Phase c_{E}^* ein. Die treibende Kraft für den Stofftransport ist der Konzentrationsgradient zwischen dieser Sättigungskonzentration und der Konzentration des Edukts in der wässrigen Phase $c_{E,w\infty}$.

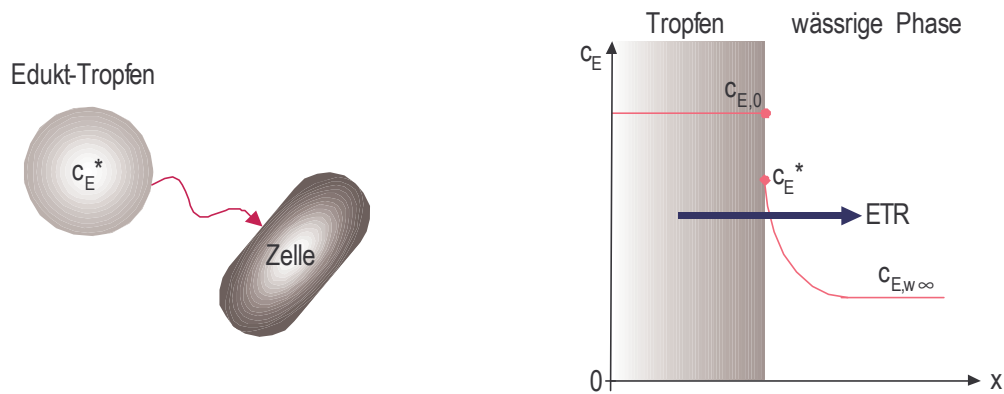


Abb. 3.8-3 Schema des Edukttransports aus den Edukt-Tropfen in die wässrige Phase

Der Stoffübergang lässt sich hierbei durch folgende Gleichung beschreiben:

$$ETR = \beta \cdot a \cdot (c_E^* - c_{E,w\infty}) \quad (39)$$

mit:

ETR	=	Edukt-Transportrate [mmol L ⁻¹ s ⁻¹]
β_i	=	Stoffübergangskoeffizient [m s ⁻¹]
a	=	auf das Volumen der dispersen Phase bezogene Phasengrenzfläche [m ⁻¹]
c_E^*	=	Gleichgewichtskonzentration des Edukts an der Phasengrenzfläche, entspricht der Sättigungskonzentration in der wässrigen Phase [mmol L ⁻¹]
$c_{E,w\infty}$	=	gelöste Eduktkonzentration in der wässrigen Phase [mmol L ⁻¹]

Bei der Berechnung der Edukt-Transportrate wird angenommen, dass sich die Edukt-Tropfen mit der gleichen Geschwindigkeit wie die sie umgebende kontinuierliche Phase bewegen. Des Weiteren werden hierbei weder Effekte durch Tropfenzerfall, noch die Koaleszenzeffekte berücksichtigt [Skelland und Kanel, 1992].

Die Edukt-Verbrauchsrate (EUR) [mmol L⁻¹ h⁻¹] ist wie folgt definiert:

$$EUR = \frac{[\text{Edukt}]_{t=t} - [\text{Edukt}]_{t=t+1}}{t_{t=t+1} - t_{t=t}} \quad (40)$$

Hierbei kann bei Biotransformationen zwischen zwei Fällen unterschieden werden [Collins und Daugulis, 1996]:

- Reaktionskontrollierte Biotransformation: die Umsetzungsgeschwindigkeit des Edukts durch die Biokatalysatoren (Edukt-Verbrauchsrate, EUR) limitiert die makrokinetische Reaktionsgeschwindigkeit v_i und kann nicht durch eine Verbesserung des Stofftransportes erhöht werden.
- Transportkontrollierte Biotransformation: der Stofftransport des Edukts in die wässrige Phase ist der geschwindigkeitslimitierende Schritt.

Charakterisierung des Stofftransports durch die Phasengrenzfläche

Der Stofftransport zwischen zwei fluiden Phasen wird über die Sherwoodzahl charakterisiert, die wie folgt definiert ist [Kollmer et al., 1999]:

$$\text{Sh} = \frac{\beta \cdot d_{32}}{D} \quad (41)$$

(mit D gleich dem Diffusionskoeffizienten für das Flüssig-Flüssig-System [$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$]).

Für nicht koaleszierende Systeme kann folgende Korrelation nach Garner verwendet werden:

$$\text{Sh} = 2 + 0.95 \cdot \text{Re}^{0.5} \cdot \text{Sc}^{0.25} \quad (42)$$

Die Tropfen-Reynoldszahl ist hierbei wie folgt definiert, wobei in der Formel der Tropfendurchmesser d_{32} eingesetzt wird:

$$\text{Re} = \frac{v \cdot d_{32} \cdot \rho_k}{\eta_k} \quad (43)$$

Die Schmidzahl wird wie folgt berechnet:

$$\text{Sc} = \frac{\eta_k}{\rho_k \cdot D} \quad (44)$$

Als v [m s^{-1}] wird die relative Geschwindigkeit zwischen den Tropfen und der kontinuierlichen Phase bezeichnet. Für turbulente Strömungen im Rührkesselreaktor kann für v die Turbulenzintensität v' eingesetzt werden [Mersmann und Grossmann, 1980]:

$$v'^2 = C_4 \cdot \left(\frac{P/V}{\rho_k} \cdot d_{\max} \right)^{0.6} \quad (45)$$

P/V [Watt m^{-3}] ist hierbei der volumenbezogene Leistungseintrag, wobei P wie in Gleichung 36 definiert ist. Die Proportionalitätskonstante zwischen d_{\max} und d_{32} ist vom verwendeten Reaktortyp und der Geometrie abhängig. Von Calabrese et al. [1986a,b] wurde für einen Rührkesselreaktor mit einem 6-Blatt-Scheibenrührer ein Korrelationswert von 1.79 ermittelt. Der Parameter C_4 wurde von Kollmer et al. [1999] experimentell bestimmt und beträgt 0.058.

Berechnung des Diffusionskoeffizienten

Der Diffusionskoeffizient D_{AB} [$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$] der dispersen Phase A in die kontinuierliche Phase B lässt sich mit den in Tabelle 3.8-1 zusammengefassten Modellen berechnen. Die Größenordnung für nicht viskose Fluide bei Raumtemperatur liegt hierbei bei $0.5\text{-}2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [Sherwood et al., 1975]. Für Tropfen mit einem Durchmesser kleiner als 1-2 mm können die Korrelationen für feste Partikel verwendet werden, unter der Annahme, dass keine inneren Zirkulationen in den Tropfen existieren. Der Transport innerhalb der Tropfen ist daher nur diffusiv.

Tabelle 3.8-1 Modelle zur Berechnung des Diffusionskoeffizienten in flüssig-flüssig Dispersionen

Modell		Quelle
Wilke & Chang	$D_{A,B} = 7.4 \cdot 10^{-8} \cdot \left[(\Phi_B \cdot MG_B)^{1/2} \cdot \frac{T}{\eta_B \cdot V_A^{0.6}} \right]$	Sherwood et al., 1975 Reid et al., 1988
Othmer & Thakar	$D_{A,B} = 14 \cdot 10^{-5} \cdot \eta_B^{-1.1} \cdot V_A^{-0.6}$	Sherwood et al., 1975
Reddy & Doraiswamy	$D_{A,B} = k_{RS} \cdot \frac{T}{\eta_B} \cdot \frac{MG_B^{1/2}}{(V_A \cdot V_B)^{1/3}}$ mit: $k_{RS} = 8.5 \cdot 10^{-8}$, für $\frac{V_B}{V_A} > 1.5$ $k_{RS} = 10^{-7}$, für $\frac{V_B}{V_A} < 1.5$	Sherwood et al., 1975
Tyn & Calus	$D_{A,B} = 8.93 \cdot 10^{-8} \cdot \left(\frac{V_A}{V_B^2} \right)^{1/6} \cdot \left(\frac{P_B}{P_A} \right)^{0.6} \cdot \frac{T}{\eta_B}$ mit: $P = V \cdot \sigma^{0.25}$	Reid et al., 1988
Hayduk & Minhas	$D_{A,B} = 1.25 \cdot 10^{-8} \cdot (V_A^{-0.19} - 0.292) \cdot T^{1.52} \cdot \eta_B \left(\frac{10.2}{V_A} - 0.791 \right)$	Reid et al., 1988

mit:

- Φ_B = Assoziationskoeffizient der kontinuierlichen Phase
- T = Temperatur [K]
- η_B = dynamische Viskosität der kontinuierlichen Phase [cPoise]
- V_A bzw. V_B = Molares Volumen der dispersen Phase bzw. der kontinuierlichen Phase [cm³ mol⁻¹]
- P_A bzw. P_B = Parachor der dispersen Phase bzw. der kontinuierlichen Phase
- σ_A bzw. σ_B = Oberflächenspannung der dispersen Phase bzw. der kontinuierlichen Phase [dyn cm⁻¹]

3.9 Biologische Grundlagen zu *Lactobacillus kefir*

3.9.1 Zentralstoffwechsel der Milchsäurebakterien

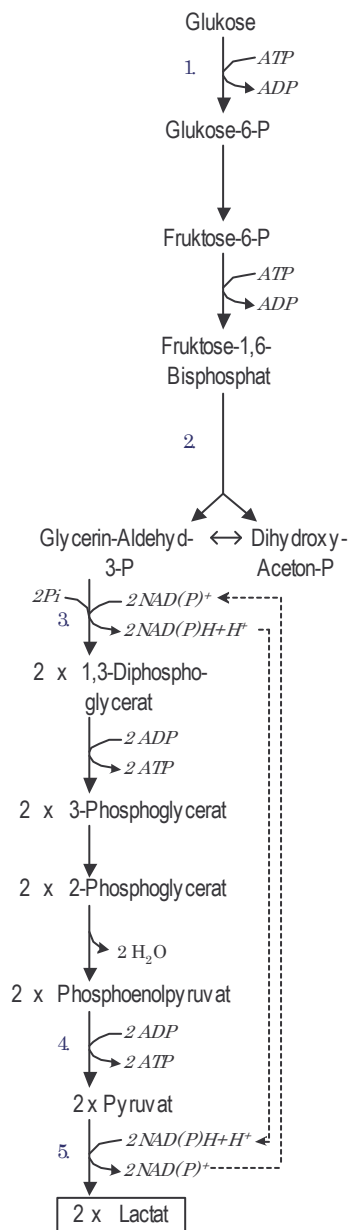
Lactobacillus kefir gehört zur Gruppe der Gram-positiven Milchsäurebakterien. Milchsäurebakterien sind nicht sporenbildend, nicht atmend, nicht beweglich, fakultativ anaerob bzw. mikroaerophil. Sie sind chemoorganotroph und benötigen nährstoffreiche, komplexe Medien für ihr Wachstum, da ihre Kapazität, für sie essentielle Aminosäuren aus anorganischen Stickstoffquellen zu synthetisieren sehr begrenzt ist. Des Weiteren sind Milchsäurebakterien katalase- und cytochromnegativ und besitzen deswegen nicht die Fähigkeit Wasserstoffperoxid und O_2 abzubauen [Holt et al., 1994; Axelsson, 1998].

Bei Milchsäurebakterien wird zwischen dem homofermentativen und dem heterofermentativen Zentralstoffwechsel unterschieden (siehe Abb. 3.9-1). Bei der homofermentativen Gärung wird Glukose über die Glykolyse unter Bildung von Lactat als einziges Endprodukt verstoffwechselt. Heterofermentative Milchsäurebakterien, zu denen *Lactobacillus kefir* gehört [Kandler und Kunath, 1983], besitzen einige Enzyme der Glykolyse dagegen nicht und bauen Glukose über den 6-Phosphoglukonat-/Phosphoketolase-Weg ab, wobei zusätzlich zu Lactat, Ethanol, Acetat und CO_2 gebildet werden können. Da Milchsäurebakterien keine Elektronentransportkette besitzen, beruht die ATP-Gewinnung ausschließlich auf der Substrat-Phosphorylierung [Axelsson, 1998].

Andere Hexosen, wie zum Beispiel Mannose, Galaktose und Fruktose, können ebenfalls als Kohlenstoffquelle von vielen Milchsäurebakterien verstoffwechselt werden. Diese treten als Glukose-6-Phosphat oder Fruktose-6-P, nach einer Isomerisierung und/oder Phosphorylierung, in den zentralen Stoffwechsel ein. Werden Pentosen eingesetzt, so werden diese zu Ribulose-5-Phosphat bzw. Xylulose-5-Phosphat phosphoryliert, die über den unteren Teil des 6-Phosphoglukonat-/Phosphoketolase-Weges verstoffwechselt werden können. Anzumerken ist, dass in dem Fall manche homofermentative Milchsäurebakterien in der Lage sind auf den 6-Phosphoglukonat-/Phosphoketolase-Weg umzuschalten [Axelsson, 1998].

In Anwesenheit von O_2 wird der Metabolismus der Milchsäurebakterien verändert, welches in einer anderen Endproduktzusammensetzung resultiert als es bei einer anaeroben Glukose-Verstoffwechslung. In diesem Fall werden ausgehend von Pyruvat das energiereichere Intermediat Acetyl-Phosphat gebildet, welches unter Spaltung von Adenosin Triphosphat (ATP) weiter in Acetat anstelle von Lactat umgewandelt wird. Dadurch kann zusätzlich 1 mol ATP mehr pro Molekül Glukose gewonnen werden (siehe Abb. 3.9-2 Weg A). Eine weitere Möglichkeit für die Zellen mehr energiereiches ATP zu gewinnen ist die Verstoffwechslung des Acetyl-CoA bzw. des Acetyl-Phosphats zu Acetat an Stelle des Ethanol (siehe Weg C). Es ist bekannt, dass manche *Lactobacillus brevis*-Stämme Glukose nur unter aeroben Bedingungen metabolisieren können. Der Grund dafür sind die fehlenden Enzyme des Ethanol-Zweiges, so dass ein absoluter Bedarf eines externen Elektronenakzeptors wie O_2 besteht [Axelsson, 1998].

A)



B)

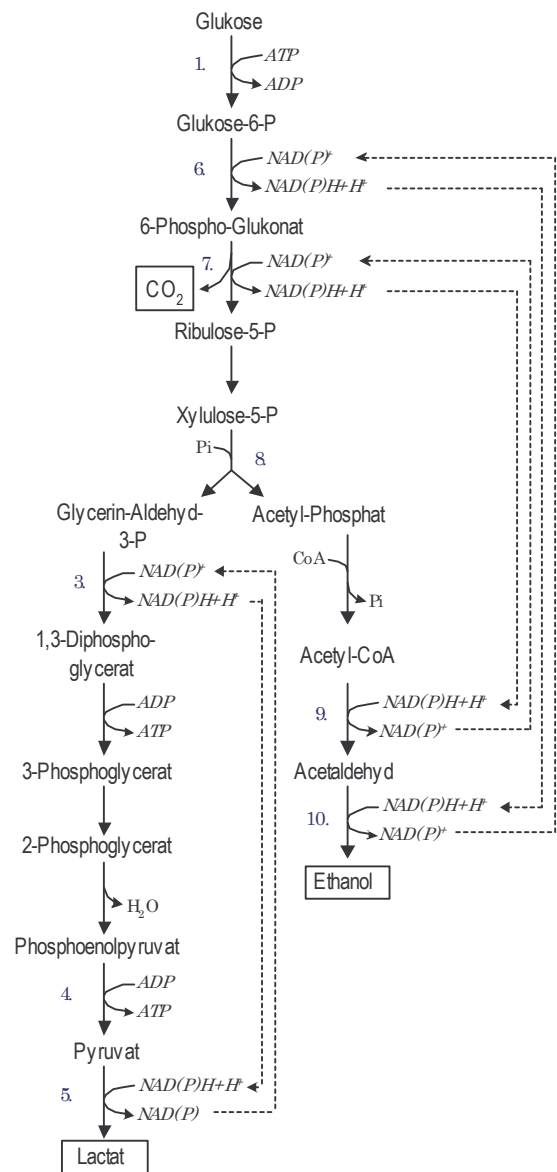


Abb. 3.9-1 Zentralstoffwechselwege für Glukose bei Milchsäurebakterien: A) homofermentative Milchsäuregärung, B) heterofermentative Milchsäuregärung. Gekennzeichnete Enzyme: 1. Glukokinase, 2. Fruktose-1,6-Diphosphat Aldolase, 3. Glycerid-Aldehyd-3-P Dehydrogenase, 4. Pyruvat Kinase, 5. Lactat Dehydrogenase, 6. Glukose-6-P Dehydrogenase, 7. 6-Phosphoglukonat Dehydrogenase, 8. Phosphoketolase, 9. Acetaldehyd Dehydrogenase, 10. Alkohol Dehydrogenase [aus Axelsson, 1998]

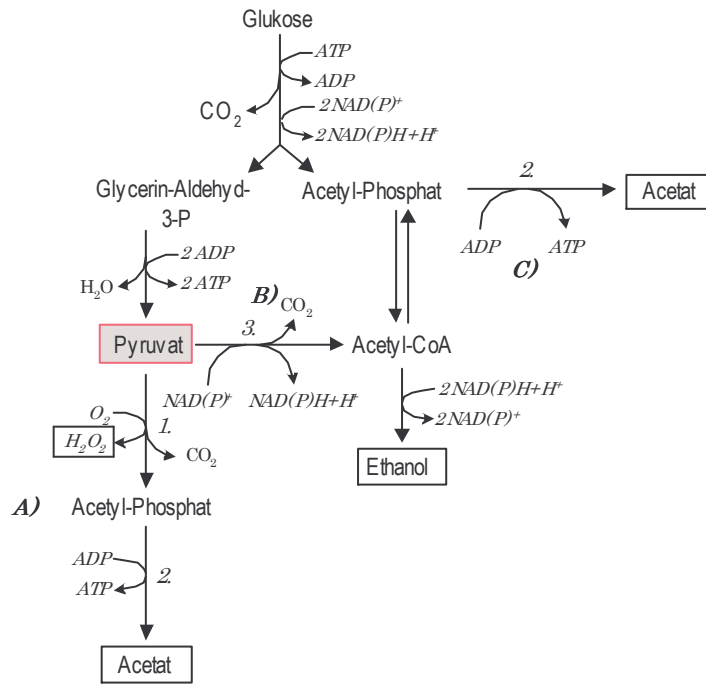


Abb. 3.9-2 Mögliche Wege des Pyruvatmetabolismus: A) Metabolisierung zum Acetat über Acetyl-Phosphat unter aeroben Bedingungen (Enzyme 1.+2.), B) Metabolisierung zum Acetyl-Phosphat unter Bildung von NAD(P)H (Enzym 3.), C) Konkurrenz zur Ethanol-Bildung (Enzyme 3.+2.). Gekennzeichnete Enzyme: 1. Pyruvat Dehydrogenase, 2. Acetat Kinase, 3. Pyruvat Oxidase [aus Axelsson, 1998]

Des Weiteren ist Abb. 3.9-2 zu entnehmen, dass durch die Metabolisierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA (nach dem Weg B) mehr Reduktionsäquivalente (NAD(P)H) für die Zelle gewonnen werden können.

3.9.2 Wachstum von Milchsäurebakterien

Wie bereits erwähnt beruht die Gewinnung von ATP bei Milchsäurebakterien ausschließlich auf der Substrat-Phosphorylierung. Um hohe Wachstumsraten erreichen zu können ist daher eine effektive Kohlenstoffverstoffwechslung unabdingbar. Von der verstoffwechsellten Glukose fließt jedoch nur ein geringer Teil in die Produktion von Biotrockenmasse. Novak und Loubiere (2000) konnten für *Lactococcus lactis* zeigen, dass nur 5 % der verstoffwechsellten Glukose in die Produktion von Zellmasse floss. Der größte Teil des Kohlenstoffes wurde unter Bildung von ATP abgebaut, welches für die anabolischen Prozesse in der Zelle verwendet wurde. Werden mehr Aminosäuren im Wachstumsmedium bereitgestellt, so kann ein größerer Anteil der Glukose für die Produktion von Zellmasse eingesetzt werden. Die Zusammensetzung des Wachstumsmediums ist somit ein entscheidender Faktor bei den Stoffwechselgleichgewichten.

3.9.3 Allgemeine Charakterisierung des Wachstums von Mikroorganismen

Die Wachstumsrate μ [h^{-1}] ergibt sich aus dem Verhältnis der gebildeten Biomasse zur Reaktionszeit bezogen auf die Biomasse. Zur Berechnung der Wachstumsrate nach dem zentralen Differenzenverfahren werden die Messwerte aus der Biotrockenmassebestimmung (c_x) zeitlich nahe aneinander liegender Messungen und das berechnete Reaktionsvolumen V_R herangezogen:

$$\mu = \frac{1}{V_R \cdot c_x} \cdot \left. \frac{d(V_R \cdot c_x)}{dt} \right|_t = \frac{1}{V_R \cdot c_x} \Big|_t \cdot \frac{(V_R \cdot c_x) \Big|_{t+1}}{t \Big|_{t-1}} \quad (46)$$

Die maximale spezifische Wachstumsrate μ_{\max} [h^{-1}] ergibt sich bei unlimitiertem Wachstum in der exponentiellen Wachstumsphase aus der Steigung der logarithmischen Auftragung (vgl. Gleichung 46):

$$c_x = c_{x0} \cdot e^{\mu \cdot t} \quad (47)$$

$$\ln c_x = \ln c_{x0} + \mu \cdot t \quad (48)$$

Der Ertragskoeffizient $Y_{x,s}$ [g/g] ist definiert als das Verhältnis der gebildeten Biotrockenmasse c_x [g L^{-1}] zum Verbrauch des für das Wachstum verantwortlichen Substrats c_s [g L^{-1}]:

$$Y_{x,s} \Big|_t = \frac{c_x \Big|_{t+1}}{c_s \Big|_{t-1}} \quad (49)$$

Ist das Wachstum vom Sauerstoff abhängig, wird der Sauerstoffeintrag in das System über die Sauerstofftransportrate (OTR) beschrieben. Diese kann der Sauerstoffaufnahme rate (OUR) durch die Mikroorganismen gleichgesetzt werden, wenn angenommen wird, dass die Änderung der Gleichgewichtskonzentration des Sauerstoffs an der Phasengrenzfläche $c_{O_2}^*$ gleich 0 ist:

$$\frac{dc_{O_2}^*}{dt} = \text{OTR} - \text{OUR} = 0 \quad (50)$$

Die Sauerstoffaufnahme rate kann aus den Daten der Abgasanalytik und dem Volumenstrom der Begasung berechnet werden. Der Berechnung liegt eine Massenbilanz des Inertgasanteils der Gasströme zugrunde, da der Inertgasmassenstrom über die Prozesslaufzeit konstant ist. Die Inertgasanteile können aus den gemessenen Anteilen an Kohlendioxid (x_{CO_2}) und Sauerstoff (x_{O_2}) der ein- und ausströmenden Luft berechnet werden. Die OUR [$\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$] ergibt sich aus der Menge des verbrauchten Sauerstoffes pro Zeit bezogen auf das Reaktionsvolumen als:

$$\text{OUR} = \dot{V}_{\text{ein}} \left(x_{\text{O}_2, \text{ein}} - \frac{\dot{V}_{\text{aus}}}{\dot{V}_{\text{ein}}} \cdot x_{\text{O}_2, \text{aus}} \right) \cdot \frac{1}{V_R} \cdot 22.414 \quad (51)$$

Der Umrechnungsfaktor $22,414 \text{ L mol}^{-1}$ entspricht hierbei dem Molvolumen eines idealen Gases unter Standardbedingungen.

3.9.4 Glukose-Transportmechanismen von Milchsäurebakterien

Für den Transport der Zuckermoleküle in die Zelle sind zwei Transportmechanismen bekannt. Zum einen ein Permease-System, welches ein aktiver Transportmechanismus ist, und zum anderen ein Phosphotransferase-System (PTS), welches ein Gruppen-Translokationssystem ist [Nielsen und Viladsen, 1994; Axelsson, 1998].

Das Permease System ist ein über einen Protonengradienten angetriebenes System, bei dem Glukose über einen Protonen-Symport über die Membran transportiert wird. Die intrazelluläre Glukose wird dann phosphoryliert und kann weiter in den Zentralstoffwechsel fließen. Dieser Transportmechanismus wurde zum Beispiel bei *Lactobacillus brevis* beobachtet [Saier et al., 1996].

Bei dem Phosphotransferase-System wird Glukose über die Mannose-Phosphotransferase in die Zelle transportiert und simultan phosphoryliert. Diese Mannose-Phosphotransferase ist dem Protein aus dem Zuckertransportsystem von *Escherichia coli* sehr ähnlich. Durch die beiden unterschiedlichen Molekül-Arten auf der Außenseite (Zucker) und auf der Innenseite (Zucker-Phosphat) wird kein Konzentrationsgradient benötigt. Die Energie für diesen Prozess stammt von der energiereichen Phosphat-Bindung des Phosphoenolpyruvats (PEP), welches über eine Kette von Protein-Transportern an das Glukose-Molekül transportiert wird (siehe Abb. 3.9-3) [Axelsson, 1998; Chaillou et al., 1999].

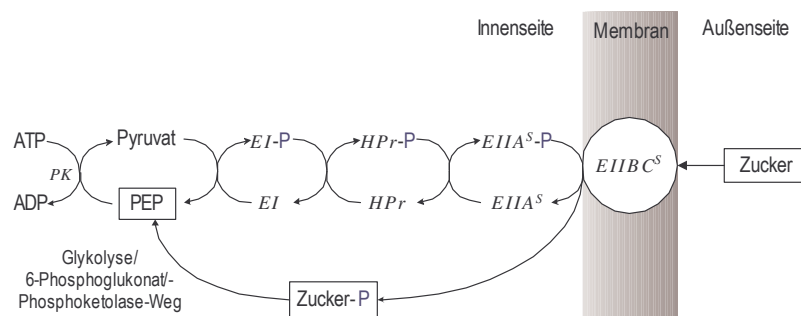
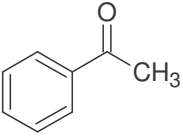
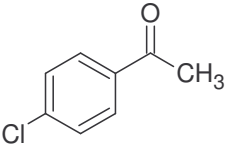
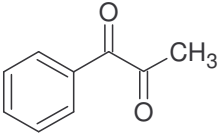
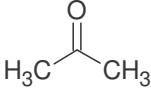
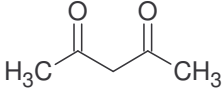
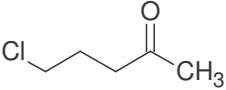
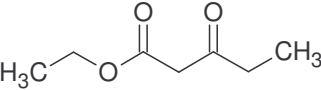


Abb. 3.9-3 Zucker-Transport über das Phosphotransferase-System (Transport-Proteine EI und HPr: nicht zuckerspezifisch, Transport-Protein EIIC^A und das Translokator-Protein EIIBC^S: zuckerspezifisch [aus Axelsson, 1998])

3.9.5 Phenylethanol-Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus kefir*

Die Phenylethanol-Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* DSM 20587 (LK-ADH₁) wurde im Rahmen einer Suche nach Dehydrogenasen mit der Fähigkeit, prochirale Ketone mit sperrigen Seitenketten umzusetzen, welches zyklische, aromatische, sililierte und aliphatische Ketone und Ketoester mit langen Seitenketten umfasst, entdeckt (siehe Tabelle 3.9-1).

Tabelle 3.9-1 Eduktspektrum der LK-ADH [Hummel, 1990; Bradshaw et al., 1992]

Edukt	K _m [mM]	rel. Aktivität [%] (bzgl. Acetophenon)
Reduktionsreaktionen		
 Acetophenon	0.6	100
 4-Cl-Acetophenon	0.39	94
 1-Phenyl-1,2-Propandion	n.b.	301
 Aceton	37.9	96
 2,4-Pentandion	n.b.	1123
 5-Cl-2-Pentanon	n.b.	1031
 Ethylpropionylacetat	n.b.	257
Oxidationsreaktionen		
NADP ⁺	0.19	17
Isopropanol	0.12	18

Die besten Aktivitäten werden erreicht, wenn die kleine Seitenkette des Ketons eine Methylgruppe ist [Hummel, 1990]. Anders als die meisten bekannten Dehydrogenasen reduziert die LK-ADH die prochiralen Ketone nach der anti-Prelog-Regel, welches bedeutet, dass sie das Hydrid-Atom von der *si*-Seite unter Bildung des (*R*)-Alkohols anbaut [Bradshaw et al., 1992]. Als Cofaktor bei den Reduktionsreaktionen wird NADPH benötigt. Bei dem Einsatz von Enzymen zur Biotransformation ist eine Zugabe von Mg^{2+} Ionen notwendig, um einer Deaktivierung des Enzyms vorzubeugen. Das pH-Optimum der LK-ADH₁ liegt für Reduktionsreaktionen bei pH 7.0 und für Oxidationsreaktionen bei pH 8.0. Das Temperaturoptimum für die Umsetzungen liegt zwischen 25-30°C [Kula und Hummel, 1993].

Die Wichtigkeit der Reproduzierbarkeit der Anzuchtbedingungen für die Zellkultivierung zur Produktion von Enzymen ist bekannt. Bei der Bildung der LK-ADH₁ wurde festgestellt, dass die Enzymbildung während der exponentiellen Wachstumsphase beginnt [Hummel, 1990; Kula und Hummel, 1993]. Die besten Aktivitäten wurden bei dem Einsatz von Glukose als Kohlenstoffquelle erreicht [Hummel, 1997].

4 Material und Methoden

4.1 Bestimmung der physikochemischen Stoffdaten

4.1.1 Dichtebestimmung

Die Dichte der Edukte wurden mit dem tragbaren Dichtemessgerät DMA 35n (Fa. Anton Paar) ermittelt, welches nach dem Schwingrohrprinzip funktioniert. Vor der Messung wurden die Edukte im Wasserbad auf eine definierte Temperatur temperiert, die mit Hilfe eines Thermometers überprüft wurde. Die Messergebnisse des Gerätes sind zusätzlich temperaturkompensiert. Die Messzelle wird über eine Pipettenpumpe befüllt. Für die Dichtebestimmung werden pro Messung ~ 2 mL Flüssigkeit benötigt. Der Messbereich des Gerätes liegt zwischen 0 bis 1.999 g cm^{-3} ($\pm 0.001 \text{ g cm}^{-3}$).

4.1.2 Bestimmung der Oberflächenspannung und Grenzflächenspannung

Zur Bestimmung der Oberflächenspannung sowie der Grenzflächenspannung wurde das digitale Tensiometer K10T der Fa. Krüss verwendet. Die Temperierung der Messzelle erfolgt über ein angeschlossenes Wasserbad. Die zu messenden Stoffsysteme werden zusätzlich für mindestens 1h vortemperiert.

Die Bestimmung der Oberflächenspannung erfolgt mittels der Wilhelmy Platten-Methode. Vor jeder Messung werden Platin-Platte und Messgefäß in einer Bunsen-Brenner Flamme ausgeglüht. Die Oberflächenspannung der reinen Flüssigkeitsphase wird in $[\text{mN m}^{-1}]$ vom Gerät angegeben.

Für die Bestimmung der Grenzflächenspannung zwischen zwei Flüssigkeiten werden diese für 1h mit Hilfe eines Magnetrührers vermischt und zur Einstellung eines Phasengleichgewichtes für 24h bei einer definierten Temperatur inkubiert. Die Messung der Grenzflächenspannung erfolgt mit der Du Nüoy Ring-Methode. Für die Messung ist es wichtig, dass sich die beiden Phasen auch in der Messzelle nicht vermischen. Dafür werden mit Hilfe einer feinen Kanüle die untere Phase des inkubierten Systems entnommen und in die Messzelle gefüllt. Diese wird dann vorsichtig mit der oberen Phase aus dem inkubierten System beschichtet. Nach dieser Vorgehensweise kann der Ring für die Messung an die Phasengrenzfläche bewegt werden. Zur Messwertkorrektur wird folgende Formel verwendet:

$$F = 0.725 + [0.4036 \cdot 10^{-3} \cdot \left(\frac{\sigma^*}{\Delta\rho} \right) + 0.0128]^{0.5} \quad (52)$$

Dabei ist F der Korrekturfaktor, $\Delta\rho$ die Dichtedifferenz der beiden Flüssigkeiten und σ^* der angezeigte Messwert in $[\text{mN m}^{-1}]$. Mit dem Korrekturfaktor und dem Messwert lässt sich nun die tatsächliche Grenzflächenspannung ermitteln:

$$\sigma = \sigma^* \cdot F \quad (53)$$

Zur Bestimmung der Grenzflächenspannung aus den Oberflächenspannungen beider die Grenzfläche bildenden Flüssigkeiten $\sigma_{0,1}$ und $\sigma_{0,2}$ wird folgende halbempirische Näherung von Fowkes verwendet:

$$\sigma = \sigma_{0,1} + \sigma_{0,2} - 2 \cdot (\sigma_{0,1}^d \cdot \sigma_{0,2}^d)^{1/2} \quad (54)$$

$\sigma_{0,1}^d$ und $\sigma_{0,2}^d$ sind die Dispersionskräfte entlang bzw. in der Grenzphase. Im Fall von Kohlenwasserstoffen kann angenähert für $\sigma_{0,1}^d = \sigma_{0,1}$ gesetzt werden [Dörfler, 1994].

4.1.3 Bestimmung der kinematischen Viskosität

Die kinematische Viskosität wurde mit Hilfe des automatisierten ViscoSystem AVS 310 und eines Ubbelohde Kapillarviskosimeters (Kapillare Nr. Ic) der Fa. Schott ermittelt. Mit Hilfe einer integrierten Lichtschranke wird die Durchflusszeit der Flüssigkeit t [s] in einer definierten Kapillare gemessen. Die Auswahl der Kapillare erfolgt nach dem zu messenden Viskositätsbereich. In einem Thermostaten wird die Flüssigkeit auf eine definierte Temperatur temperiert. Die kinematische Viskosität ν [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$] wird wie folgt berechnet:

$$\nu = K_F \cdot (t - H_C) \quad (55)$$

Für die verwendete Kapillare beträgt der Umrechnungsfaktor $K_F = 0.03064 \text{ m}^2 \text{ s}^{-2}$. Die Hagenbach-Couette Korrektur H_C ist für die jeweiligen Kapillaren von der Durchflusszeit abhängig und werden vom Hersteller angegeben.

Die Berechnung der dynamischen Viskosität [Pa s] erfolgt über die Multiplikation der kinematischen Viskosität mit der Dichte.

4.1.4 Bestimmung der Löslichkeit in wässrigen Systemen

Die maximale Löslichkeit einer Substanz in Wasser bzw. wässrigen Puffersystemen wurde mittels Gaschromatographie bestimmt. Dafür wurde die Substanz in einem Volumenverhältnis von 1:1 mit Wasser bzw. dem Puffer für 1 h mit Hilfe eines Magnetrührers vermischt und zur Einstellung eines Phasengleichgewichtes für 24 h bei einer definierten Temperatur inkubiert. Nach 24 h wurde die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert und die Probe für die gaschromatographische Analytik vorbereitet (siehe Kapitel 4.2.9).

4.1.5 Mittels ACD/I-Lab kalkulierte Stoffdaten

Folgende Stoffdaten wurden mittels der *on-line* Kalkulationssoftware ACD/Labs Online (I-Lab) über www.acdlabs.com der Fa. Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Labs) kalkuliert, wenn sie nicht experimentell bestimmt werden konnten: die

Löslichkeit in Wasser, der $\log P_{o/w}$, die Oberflächenspannung, der Parachor, das Molare Volumen und die Siedetemperatur.

4.2 Analytik

4.2.1 Bestimmung und Einstellung des pH

Die Bestimmung des pH der Pufferlösungen und der Wachstumsmedien erfolgte mit Hilfe des pH-Messgeräts Typ CG 843 der Fa. Schott. Die Kalibrierung der pH-Elektrode erfolgt über eine Zweipunktkalibrierung mit Standardlösungen des pH 4.00 und 7.00. Zur Einstellung des pH wurden 10 %-ige HCl bzw. 10 M NaOH verwendet.

4.2.2 Bestimmung der optischen Dichte und der Biotrockenmassekonzentration

Die optische Dichte der Zellsuspensionen (OD_{660}) wurde mittels eines Einstrahlphotospektrometers bei einer Wellenlänge von 660 nm bestimmt. Die Proben wurden mit dem jeweiligen Biotransformationspuffer bzw. Wachstumsmedium soweit verdünnt, dass sie in den Linearitätsbereich des Photometers fallen (OD_{660} 0.1-0.4).

Die Biotrockenmassekonzentration (c_x) wird entweder über die Korrelation mit der OD_{660} berechnet oder gravimetrisch bestimmt. Zur Korrelation der OD_{660} mit der Biotrockenmassekonzentration wurde eine gravimetrische Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) für Proben bekannter OD_{660} durchgeführt.

Für die gravimetrischen Bestimmung der BTM werden definierte Probenvolumina in vorgetrocknete (80°C) und gewogene Reaktionsgefäße gegeben. Das Zellpellet wird nach dem Zentrifugationsschritt (Tischzentrifuge: 1 mL Probevolumen, 5 min bei 13000 min^{-1} , Standzentrifuge: 10 mL Probevolumen, 30 min bei 4500 min^{-1}) mindestens einmal mit physiologischer Kochsalzlösung (0.9 % NaCl) gewaschen, um Salz- und Medienrückstände zu entfernen. Nach dem Waschschrift wird der Überstand verworfen und das Pellet bei 80°C für mindestens 24 h getrocknet.

Für *Lactobacillus kefir* ergibt sich folgende Korrelation:

$$c_x [\text{g L}^{-1}] = OD_{660} \cdot 0.45 \quad (56)$$

4.2.3 Analyse der Metabolite mittels HPLC

Die High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)-Analytik wird eingesetzt, um die Konzentration der Metabolite Glukose, Lactat, Acetat, Ethanol, Isopropanol und Aceton zu bestimmen. Die Spezifikation der verwendeten Anlage ist in Anlage I aufgeführt.

Zur Probenvorbereitung werden von 1 mL Probe zuerst die Zellen mittels Zentrifugation abgetrennt (Tischzentrifuge, 4°C, 5 min, 13000 min^{-1}). Im Anschluss werden die Proben über einen Spritzenvorsatzfilter (0.2 μm Porendurchmesser) in

2 mL Rollrandflaschen zur Messung gegeben. In Tabelle 4.2-1 sind die Geräteeinstellungen der verwendeten Methode aufgelistet:

Tabelle 4.2-1 *HPLC-Methode zur Bestimmung der Metabolit-Konzentrationen*

Laufmittel	5 mM H ₂ SO ₄
Injektionsvolumen	10 µL
Flussrate	0.7 mL min ⁻¹
Säule	Aminex 87H
Ofentemperatur	50°C
UV-Vis-Detektor	190 nm, Absorption 0.08
RI-Detektor	Range x4

Die Kalibrierung erfolgt über Standards mit definierten Konzentrationen für die einzelnen Komponenten. Unter Verwendung der oben beschriebenen Methode werden die Komponenten zu folgenden Retentionszeiten detektiert: Glukose $t_R = 7.78$ min, Lactat $t_R = 10.89$ min, Acetat $t_R = 12.88$ min, Aceton $t_R = 18.71$ min, Ethanol $t_R = 18.95$ min und Isopropanol $t_R = 20.80$ min (Die Retentionszeiten gelten für den RI-Detektor, für den nachgeschalteten UV-Vis-Detektor sind die Retentionszeiten dementsprechend verzögert).

4.2.4 Glukose-Bestimmung mittels AccuCheck

Zur Glukosemessung wurde zusätzlich das Messgerät AccuCheck® der Fa. Roche verwendet. Probenlösungen werden entsprechend des Messbereichs des Gerätes (1 - 6 g L⁻¹) mit Umsetzungspuffer (Biotransformationen) bzw. Zellaufschlusspuffer (Biokatalysator-Herstellung) verdünnt. Zur Messung ist ein Probenvolumen von ca. 10 µL notwendig. Eine Kalibrierung des Gerätes ist nicht notwendig.

4.2.5 Analyse der Metabolite mittels Enzymkits

Zur Überprüfung der mittels HPLC bzw. AccuCheck® ermittelten Konzentrationen wurden für Glukose, Lactat, Acetat und Ethanol bestimmte Proben mittels den enzymatischen BioAnalysis® Tests von Boehringer Mannheim verifiziert, die in Tabelle 4.2-2 aufgelistet sind.

Für die Messung wurden die Zellen per Zentrifugation abgetrennt (Tischzentrifuge, 4°C, 5 min, 13000 min⁻¹) und der Überstand dem linearen Messbereich der enzymatischen Tests entsprechend verdünnt. Die Messungen wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Tests wurden dafür auf 200 µL Messvolumen runterskaliert (siehe Anhang A-III). Die Kalibrierungen erfolgten nach den Vorschriften der jeweiligen Tests.

Tabelle 4.2-2 *Verwendete enzymatische Testkits der Fa. Boehringer Mannheim*

Test Name	Produkt-Nr. (bei r-biopharm)
D-Glukose	10716251035
L-Milchsäure	10139084035
Essigsäure	10148261035
Ethanol	10176290035

4.2.6 Wasserstoffperoxid-Nachweis

Zum Nachweis und halbquantitativen Bestimmung der Wasserstoffperoxid-Bildung wurden Peroxid-Merckoquant[®]-Analysenstäbchen der Fa. VWR (Merck) mit den Messbereichen 0.5-2-5-10-25 mg L⁻¹ H₂O₂ und 1-3-10-30-100 mg L⁻¹ H₂O₂ verwendet.

4.2.7 Bestimmung der Enzymaktivität

Für den Zellaufschluss und die Enzymaktivitätsbestimmung wird ein KPi-Puffer (0.1 M, pH 7.5) mit 2 mM MgCl₂ eingesetzt. Zum Zellaufschluss werden die Zellen zuerst per Zentrifugation abgetrennt und das Zellpellet in diesem Puffer resuspendiert, so dass eine Konzentration von ungefähr 3 g L⁻¹ BTM erreicht wird. Die akkurate c_x der resuspendierten Proben wird über die OD₆₆₀-Bestimmung ermittelt. Von dieser Suspension werden 500 µL auf die gleiche Menge an Glasperlen (0.18-0.2 mm Durchmesser) in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß gegeben. Der Zellaufschluss wird mit einer Schwingmühle bei einer Schwingfrequenz von 30 s⁻¹ für 6 Minuten durchgeführt.

Für die Aktivitätsbestimmung werden Glasperlen und Zelltrümmer per Zentrifugation abgetrennt (Tischzentrifuge, 4°C, 5 min, 13000 min⁻¹). Der Überstand wird soweit mit Puffer verdünnt, dass bei der späteren Aktivitätsbestimmung eine lineare Abnahme der Absorption erhalten wird. Bis zur Messung der Enzymaktivität müssen die Proben immer auf Eis zwischengelagert werden.

Lactobacillus kefir ADH₁ (Phenylethanol-ADH)

Die Bestimmung der Enzymaktivität der LK-ADH₁ erfolgt in der Mikrotiterplatte nach folgendem Schema:

	Blindwert	Enzymaktivitäts-Probe
NADPH (6.4 g L ⁻¹)	20 µL	20 µL
KPi-Puffer (0.1 mM, pH 7.5)	160 µL	140 µL
Acetophenon (50 mM)	20 µL	20 µL
Probe	---	20 µL

Lactobacillus kefir ADH₂

Die Bestimmung der Enzymaktivität der LK-ADH₂ erfolgt nach dem gleichen Schema. Als Edukt für die Aktivitätsbestimmung wird statt Acetophenon das Hydroxyketon 4-Hydroxy-4-Methyl-2-Pentanon mit einer Stammlösungskonzentration von 50 mM verwendet.

Nach Vermischen der Probe wird die Abnahme der Absorption für 5 Minuten bei 340 nm verfolgt. Die volumetrische Enzymaktivität [U L⁻¹] berechnet sich nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz wie folgt:

$$E_A = \frac{\Delta c_{\text{NADPH}}}{\Delta t} = \frac{\Delta A \cdot V_R}{\Delta t \cdot \epsilon_{\text{NADPH}} \cdot b \cdot v_P} \quad (57)$$

mit:

- $\Delta A/\Delta t$ = Änderung der Absorption über die Zeit [min⁻¹]
- ϵ_{NADPH} = molarer Extinktionskoeffizient für NADPH = 630 [L mol⁻¹ mm⁻¹]
- b = Länge des Lichtweges (für eine Kavität einer 96 Well Mikrotiterplatte = 0.53 cm)
- V_R = Gesamtvolumen des Tests = 200 μL
- v_P = Probenvolumen im Test = 20 μL

4.2.8 Bestimmung der Membranintegrität

Zur Bestimmung der Membranintegrität wurde der Bacterial Viability Kit LIVE/DEAD® BacLight™ L7012 der Fa. Molecular Probes verwendet. Für die Bestimmung werden die Zellsuspensionen mit physiologischer Kochsalzlösung auf eine OD₆₆₀ von 0.06 eingestellt. Die Herstellung der Standards zur Erstellung der Kalibrierkurve erfolgt anders als in der Vorschrift ebenfalls in physiologischer Kochsalzlösung. Die Bestimmung erfolgt über eine Fluoreszenzmessung in der Mikrotiterplatte. Dafür werden 100 μL der zu untersuchenden Probe mit 100 μL des Farbstoffgemisches aus dem Kit (SYTO®9 und Propidium-Iodid) in die Mikrotiterplatte gegeben und für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Erfassung der Fluoreszenz erfolgt mittels dem FLUOstar Galaxy Photometer der Fa. BMG Labtechnologies bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und Emissionswellenlängen von 520 nm (SYTO®9, grün) und 620 nm (Propidium-Iodid, rot). Aus dem Verhältnis der beiden Emissionen kann über die Kalibriergerade eine Aussage über die Membranintegrität getroffen werden.

4.2.9 Probenextraktion für die gaschromatographische Analytik

Die Erfassung der Konzentrationen der Edukte und Produkte erfolgt über die gaschromatographische Analytik. Dafür müssen diese aus der wässrigen Probe über einen Extraktionsschritt in eine Lösungsmittelphase (Ethylacetat) überführt werden.

Für eine quantitative Extraktion, die an den Zellen adsorbierte Edukt- bzw. Produktanteile erfasst, werden die Zellen simultan aufgeschlossen. Dazu werden zu 400 μL Biotransformationsprobe 500 μL Glasperlen und 800 μL Ethylacetat mit internem Standard gegeben (1.5 mL Reaktionsgefäße). Die Extraktion der Probe erfolgt für 15 Minuten im Thermomixer der Fa. Eppendorf bei einer Schüttelfrequenz von 1400 min^{-1} . Der Schritt von der Probenahme zur Extraktion muss schnell erfolgen, um eine fortschreitende Umsetzung des Edukts zu unterbinden.

Nach Abtrennung der Glasperlen und Zelltrümmer mittels Zentrifugation (Tischzentrifuge, 5 min, 13000 min^{-1}) kann die Ethylacetat-Phase nach Bedarf für die GC-Analytik verdünnt werden. Für chirale Messungen muss das für die Verdünnung verwendete Ethylacetat aufgrund der Wasserempfindlichkeit der Säulen mit Kaliumcarbonat getrocknet werden.

4.2.10 Gaschromatographische Analytik für DOHTB, HOHB und DHHB

Die Kalibrierungen für alle Komponenten erfolgte über die Signalfläche mit Acetophenon als internem Standard. Alle Messungen wurden mit dem Gaschromatograph CP-3800 der Fa. Varian durchgeführt. Die Spezifikationen der Probengeber und der Gaschromatographen, der verwendeten Trennsäulen, sowie die Retentionszeiten für die einzelnen Analysen sind dem Anhang A-V zu entnehmen.

Die Quantifizierung der Konzentrationen für 6-Cl-3,5-Dioxohexansäure-*tert*-Butylester, 6-Cl-5-Hydroxy-3-Oxohexansäure-*tert*-Butylester, 6-Cl-Dihydroxyhexansäure-*tert*-Butylester erfolgt über eine achirale Analytik mittels folgender Methode:

Trennsäule	:	CP-Sil 8CB-MS Chrompack
Probenvolumen	:	1 μL
Füllgeschwindigkeit	:	1.2 $\mu\text{L s}^{-1}$
Injektortemperatur	:	250°C
Säulenströmung	:	3 mL min^{-1}
Splitverhältnis	Start	: 5
	0.01 min	: 20
	0.5 min	: 5
Ofentemperatur	Start	: 100°C
	Gradient	: 5°C min^{-1} auf 160°C
	Ende	: 160°C, für 23 Minuten halten
Detektortemperatur	:	250°C (Range x12)

Die Bestimmung des Diastereomerenüberschusses des *syn*-6-Cl-(3*R*,5*S*)-Dihydroxyhexansäure-*tert*-Butylester zum *anti*-6-Cl-(3*S*,5*S*)-Dihydroxyhexansäure-*tert*-Butylester wurde mittels einer anderen GC-Analytik durchgeführt. Dazu ist jedoch eine Derivatisierung der Proben vor der GC-Analytik notwendig. Die 1:5 verdünnten

GC-Probe wurden dafür mit 60 μL Trifluoressigsäureanhydrid versetzt und die verschlossenen Probenflasche für 10 Minuten bei 40°C inkubiert. Anschließend wurden 30 μL Pyridin zur Neutralisation der Probe hinzugefügt und die Probe für weitere 5 Minuten bei 40°C inkubiert. Die vorbereiteten Standards wurden mit der gleichen Methode derivatisiert, jedoch nur mit 6 μL Trifluoressigsäureanhydrid und 3 μL Pyridin. Die GC-Analytik erfolgt mit folgenden Unterschieden zur oben geschilderten Methode:

Trennsäule		: BGB-174
Vorsäule		: deaktiviert (BPX5), 1 m Länge
Säulenströmung		: 1.5 mL min ⁻¹
Splitverhältnis	Start	: 5
	0.01 min	: 40
	0.5 min	: 5
Ofentemperatur	Start	: 130°C, für 15 Minuten halten
	Gradient	: 10°C min ⁻¹ auf 160°C
	Ende	: 160°C für 10 Minuten halten

4.2.11 Gaschromatographische Analytik für 4-Cl-ACE und CHBE

Die Erfassung der Konzentrationen von Ethyl-4-Cl-Acetoacetat und 4-Cl-3-Hydroxybuttersäure-Ethylester erfolgt mittels folgender achiralen Analytik:

Trennsäule		: CP-Sil 8CB-MS Chrompack
Probenvolumen		: 1 μL
Füllgeschwindigkeit		: 5 $\mu\text{L s}^{-1}$
Injektortemperatur		: 250°C
Säulenströmung		: 4 mL min ⁻¹
Splitverhältnis	Start	: 5
	0.01 min	: 35
	0.2 min	: 5
Ofentemperatur	Start	: 80°C
	Gradient	: 5°C min ⁻¹ auf 135°C
	Ende	: 135°C, für 1 Minute halten
Detektortemperatur		: 250°C (Range x12)

Die Bestimmung des Enantiomerenüberschusses für CHBE erfolgt mit einer chiralen Trennsäule mittels folgender Methodik:

Trennsäule		: Chiraldex-GTA
Probenvolumen		: 1 μL
Injektortemperatur		: 250°C
Säulenströmung	Start	: 8 psi, für 12 min halten
	Gradient	: 10 psi min^{-1} auf 100 psi, 8 Minuten halten
Splitverhältnis		: 100
Ofentemperatur	Start	: 80°C, für 1 Minute halten
	Gradient 1	: 15°C min^{-1} auf 150°C, für 5 Minuten halten
	Gradient 2	: 2°C min^{-1} auf 121°C
	Gradient 3	: 15°C min^{-1} auf 150°C, für 17 Minuten halten
Detektortemperatur		: 250°C

4.2.12 Gaschromatographische Analytik für 4-Cl-AP und 1-4-Cl-PE

Die Konzentrationsbestimmung sowie die Trennung der Produktenantiomere für 1-4-Cl-PE wird mittels einer chiralen GC-Analytik durchgeführt:

Trennsäule		: BGB-174
Vorsäule		: deaktiviert (BPX5), 1 m Länge
Probenvolumen		: 1 μL
Füllgeschwindigkeit		: 5 $\mu\text{L s}^{-1}$
Injektortemperatur		: 250°C
Säulenströmung		: 9 mL min^{-1}
Splitverhältnis	Start	: 5
	0.01 min	: 40
	0.2 min	: 5
Ofentemperatur	Start	: 75°C
	Gradient	: 2.5°C min^{-1} auf 150°C
	Ende	: 150°C, für 1 Minute halten
Detektortemperatur		: 250°C (Range x12)

4.3 Herstellung der Pufferlösungen für die Biotransformationen

Für die Biotransformationen, die Bestimmung der Oberflächen- bzw. Grenzflächenspannung und die Bestimmung der maximalen Löslichkeit wurden Kalium-Phosphat-Puffer (KPi-Puffer) und Citrat-Phosphat-Puffer verwendet. Die Herstellung des KPi-Puffers berechnet sich wie folgt [Holtzhauer, 1997]:

$$g_{\text{K}_2\text{HPO}_4} = \text{MG}_{\text{K}_2\text{HPO}_4} \cdot M \cdot x \qquad g_{\text{KH}_2\text{PO}_4} = \text{MG}_{\text{KH}_2\text{PO}_4} \cdot M \cdot (1 - x) \qquad (58)$$

mit:

- MG = Molekulargewicht des jeweiligen Phosphatsalzes [g mol⁻¹]
- M = Molarität des gewünschten Puffers [mol L⁻¹]
- x = Molenbruch bei der entsprechenden Puffermolarität [-], aus Holtzhauer (1997) zu entnehmen

Zur Herstellung des Citrat-Phosphat-Puffers einer definierten Molarität wurden Zitronensäuremonohydrat und Dinatriumhydrogenphosphatlösungen dieser Molarität hergestellt. Über das Mengenverhältnis der beiden Pufferkomponenten zueinander kann der pH eingestellt werden (siehe Anhang A-III).

Des Weiteren wurde allen Umsetzungspuffern 5 mM MgCl₂ zur Erhaltung der LK-ADH-Aktivität beigefügt.

4.4 Verwendeter Biokatalysator und Präparation der Zellen für die Biotransformation

Als Biokatalysator wird *Lactobacillus kefir* DSMZ 20587 verwendet. Für die Biotransformationen wurden sowohl kommerziell erworbene Zellen, als auch selbst hergestellte Zellen eingesetzt. Die eigene Zellherstellung ist in Kapitel 4.5 beschrieben. Die Lagerung der Zellen erfolgt bei -20°C.

Für die Biotransformationen werden die Zellen einmal mit KPi-Puffer (0.2 M, pH 6.5) gewaschen. Dafür werden sie langsam bei Raumtemperatur aufgetaut und in mindestens dem gleichen Volumen an KPi-Puffer resuspendiert. Nach Abtrennung der Zellen mittels Zentrifugation (15 Minuten bei 4500 min⁻¹ und 4°C) kann das Zellpellet in dem entsprechenden Umsetzungspuffer für die Biotransformationen resuspendiert und auf die gewollte c_x eingestellt werden. Nach der im Kapitel 4.2.7 beschriebenen Methode besitzen die kommerziell erworbenen Zellen eine LK-ADH-Aktivität von 700-750 U g⁻¹ BTM.

4.5 Herstellung von *Lactobacillus kefir*

4.5.1 Verwendeter Stamm und Herstellung der Glycerin-Zellstammlösungen

Der verwendete Stamm *Lactobacillus kefir* DSMZ 20587 wurde von der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen. Die erste Kultivierung der lyophilisierten Zellen für die Stammhaltung erfolgte nach dem Protokoll der DSMZ mit einem modifizierten MRS-Medium, dessen Zusammensetzung Tabelle 4.5-1 zu entnehmen ist.

Dafür wurden die lyophilisierten Zellen nach Vorschrift in 1 mL des modifizierten MRS-Mediums resuspendiert und 150 µL zum Animpfen von 75 mL Medium (im 250 mL Schüttelkolben ohne Schikanen) verwendet. Die Kulturen wurde für 5 Tage bei 30°C und 150 min⁻¹ (5 cm Exzentrizität) inkubiert. Zum Animpfen der zweiten Generation wurde die Kultur auf eine OD₆₆₀ von 8.8 aufkonzentriert. Für die zweite Generation wurden 75 mL Medium (250 mL Schüttelkolben) mit 5 % v/v der aufkonzentrierten Zellen beimpft. Aus den Zellen der zweiten Generation werden nach 24 h Inkubationszeit Glycerin-Stammlösungen mit 30 % v/v Glycerin hergestellt. Dafür wurden die Suspensionen aufkonzentriert, so dass die Glycerin-Stammlösungen eine OD₆₆₀ von 10 besitzen. Die Aufbewahrung der Glycerin-Stammlösungen erfolgt bei -80°C.

Die Herstellung neuer Glycerin-Stammlösungen erfolgte nach dem gleichen Schema über zwei Schüttelkolbengenerationen aus den Glycerin-Stammlösungen der DSMZ-Zellen wie folgt:

Vorkulturstufe	Animpfvolumen	Kultivierungsdauer	OD ₆₆₀ (nach 24 h)
1. Vorkultur	2 % v/v Glycerin-Stammlösung	22 h	5-6
2. Vorkultur	5 % v/v Vorkultur 1	17 h	5-6
Glycerin-Stammlösung	2. Vorkultur auf OD ₆₆₀ = 15 aufkonzentriert, Zugabe von 30 % v/v Glycerin, End-OD ₆₆₀ = 10		

4.5.2 Modifiziertes Wachstumsmedium

Für die Herstellung des Biokatalysators wurde ein modifiziertes MRS-Medium verwendet, welches sich wie in Tabelle 4.5-1 beschrieben zusammensetzt. Der pH des Mediums wurde vor dem Autoklavieren auf pH 6.0 eingestellt. Glukose wurde getrennt sterilisiert und vor der Kultivierung steril zum restlichen Medium gegeben.

Tabelle 4.5-1 Zusammensetzung des modifizierten MRS-Mediums

Komponente	Konzentration [g L ⁻¹]
Hefeextrakt OHLY-KAT	25
Natriumacetat	5
di-Kaliumhydrogenphosphat	2
di-Ammoniumhydrogencitrat	2
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2
MnSO ₄ *H ₂ O	0,05
Glukose	20

4.5.3 Parameterstudien zur Kultivierung von *Lactobacillus kefir*

Schüttelkolben

Die Parameterstudien zum Einfluss der Nährstoffzusammensetzung und der Glukose-Konzentration wurden in 250 mL Schüttelkolben ohne Schikanen durchgeführt. Das Füllvolumen betrug 75 mL. Die Ansätze wurden mit der Glycerin-Stammlösung und einem Inokulationsvolumen von 5 % v/v angeimpft. Die Kultivierung der Ansätze wurde für 50 h bei 30°C im Schüttelinkubator der Fa. Infors durchgeführt. Die Schüttelfrequenz betrug dabei 150 min⁻¹.

Gerührtes Reaktionssystem mit pH-Regelung

Die Parameterstudien zum Einfluss des pH wurden in gerührten Reaktionssystemen mit Möglichkeit zur pH-Regelung durchgeführt (zur genaueren Beschreibung des Systems siehe Kapitel 4.6.2). Die Untersuchungen wurden in gerührten 250 mL Reaktoren mit einem Füllvolumen von 50 mL durchgeführt. Die Versuchsreihe wurde nicht begast. Über eine Kanüle im Kolbenhals wurde lediglich die Möglichkeit zur Sauerstoff-Diffusion gewahrt.

Die Ansätze wurden mit der Glycerin-Stammlösung und einem Inokulationsvolumen von 2 % v/v angeimpft. Die Kultivierung der Ansätze wurde für 40 h bei 30°C und einer Rührdrehzahl von 200 min⁻¹ durchgeführt.

4.5.4 Herstellung der ersten Vorkultur für die 150 L-Kultivierung (Schüttelkolben)

Die erste Vorkultur für die Kultivierung im 150 L Maßstab wurde in 1000 mL Schüttelkolben ohne Schikanen mit einem Füllvolumen von 300 mL hergestellt. Das Animpfvolumen betrug 2 % v/v aus den Glycerin-Stammlösungen. Die Inkubation der Kolben fand für 24 h bei 30°C und 150 min⁻¹ statt, so dass eine finale OD₆₆₀ von 5-6 erreicht wurde.

4.5.5 Herstellung der zweiten Vorkultur für die 150 L-Kultivierung (5 L-Maßstab)

Die Herstellung der zweiten Vorkultur fand im 5 L-Maßstab im 7.5 L Laborreaktor Labfors® der Fa. INFORS statt. Die Spezifikation des Reaktors sieht wie folgt aus (zu den Details der zum Reaktionssystem dazugehörigen Komponenten siehe Anhang A-VI):

Maximales Arbeitsvolumen	: 5 L
Datenerfassung und Parametereinstellung	: Safe-DDC Einheit (mit digitaler MSR-Technik)
Temperierung	: Wassertemperierung über Glasdoppelmantel
Rührorgan	: 3-fach 6-Blattscheibenrührer mit Obenantrieb (mechanische Gleitringdichtung)
Strömungsbrecher	: Schikanenkorb mit 4 Strömungsbrechern
Begasung	: Begasungsrohr, Regelung über einen Massendurchflussmesser
Möglichkeiten der Messung	: Temperatur, pO ₂ und pH über die Konsole : CO ₂ und O ₂ über einen Abgasanalysator : Reaktorgewicht über eine externe Waage : Externe Waage für eine Zudosierungsoption
Möglichkeiten der Regelung	: Temperatur, pO ₂ und pH : Ansteuerung einer externen Pumpe : Zugabe von Antischaummittel
Datenerfassungssoftware	: Fermentations-Software Iris NT PRO Balance, Version 4.11

Der Aufbau der Anlage ist in Abb. 4.5-1 dargestellt.

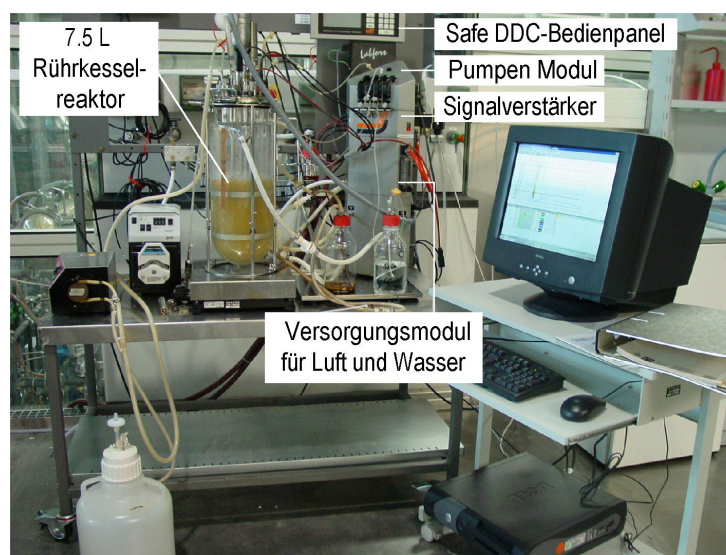


Abb. 4.5-1 Versuchsaufbau zur Herstellung der zweiten Vorkultur im 5 L-Maßstab im Laborreaktor Labfors® (Fa. Infors)

Für die zweite Vorkultur wurden 4.75 L modifiziertes MRS-Medium mit 250 mL der ersten Vorkultur angeimpft, so dass eine anfängliche OD_{660} von 0.25-0.3 erreicht wurde (Animpfvolumen von 5 % v/v). Nach dem Animpfen wurde der pH mit 10 M NaOH auf einen pH von 6.0 eingestellt. Die Kultivierung findet für 24 h bei 30°C, einer Rührerdrehzahl von 200 min^{-1} , einer Begasungsrate von 2 NL min^{-1} statt (dieses entspricht einer Begasungsrate von 0.4 vvm). Nach 24 h wurde eine OD_{660} von 6-7 erreicht.

4.5.6 Kultivierung im 150 L Maßstab

Die Kultivierung des Biokatalysators *Lactobacillus kefir* wurde im 200 L *in-situ* sterilisierbaren Fermentersystem Techfors® T200 der Fa. Infors durchgeführt (siehe Abb. 4.5-2).

Die Spezifikation des Reaktors sieht wie folgt aus (zu den Details der zum Reaktionssystem dazugehörigen Komponenten siehe Anhang A-VII):

Maximales Arbeitsvolumen	: 150 L
Datenerfassung und Parametereinstellung	: Safe-DDC Einheit (mit digitaler MSR-Technik)
Temperierung	: Temperierung über Doppelwand (mit Wasser bzw. Dampf)
Rührorgan	: 3-fach 6-Blattscheibenrührer mit Untenantrieb (mechanische Gleitringdichtung)
Strömungsbrecher	: 4 separate Strömungsbrecher
Begasung	: Begasungsring am Reaktorboden, Regelung über einen Massendurchflussmesser
Möglichkeiten der Messung	: Temperatur, pO_2 , pH und Druck über die Konsole : CO_2 und O_2 über einen Abgasanalysator : Reaktorgewicht über integrierte Wiegezelle : Externe Waage für eine Zudosierungsoption und ein Titrationsmittel
Möglichkeiten der Regelung	: Temperatur, pO_2 und pH : Ansteuerung einer externen Pumpe : Zugabe von Antischaummittel
Datenerfassungssoftware	: Fermentations-Software Iris NT PRO Balance, Version 4.11

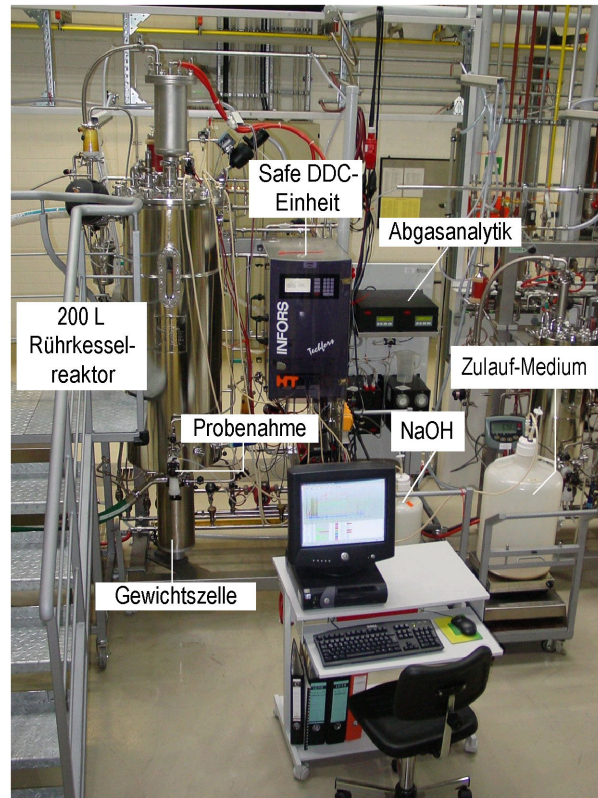


Abb. 4.5-2 Versuchsaufbau zur Kultivierung von *Lactobacillus kefir* im 150 L-Maßstab (Fermentersystem Techfors®, Fa. Infors)

Das Ausgangsvolumen der Kultivierung betrug 88,2 L, welches mit 4.6 L der zweiten Vorkultur inokuliert wurde (Animpfvolumen von 5 % v/v). Um den osmotischen Stress durch das in der späteren Phase der Kultivierung zudosierte Hefeextrakt zu reduzieren, wurden für die Satz-Phase nur 8 g L^{-1} Hefeextrakt im Medium vorgelegt (siehe Tabelle 4.5-1 zum Vergleich).

Die Zellkultivierung wurde in einem dreistufigen Zulaufverfahren mit einer Dauer von 72 h durchgeführt. Während der gesamten Kultivierung wurde die Temperatur auf 30°C und der pH auf 6.0 geregelt. Zur Erfassung des Wachstums wurden OD_{660} , BTM (gravimetrisch) und die Glukose-Konzentration (mittels AccuCheck) verfolgt. Des Weiteren wurden Proben zur Erfassung der Enzymaktivität der LK-ADH₁ genommen.

Die erste Satz-Phase wurde mit einer Rührerdrehzahl 50 min^{-1} (6.25 % der maximalen Leistung) und einer Begasungsrate von 20 NL min^{-1} (0.2 vvm) gestartet. Diese statische Rührerdrehzahleinstellung wurde beibehalten bis der pO_2 auf 0 % Sättigung gesunken ist. Die Begasungsrate wurde während des gesamten Prozesses beibehalten. Ist der pO_2 auf 0 % gesunken wurde die zweite Satz-Phase eingeleitet, bei dem der pO_2 über eine Rührerdrehzahlregelung auf einen Wert zwischen 0-3 % gehalten wird. Die Zulauf-Phase wird eingeleitet wenn eine Glukose-Konzentration $< 5 \text{ g L}^{-1}$ erreicht wird. Die Zusammensetzung des Zulaufmediums ist in Tabelle 4.5-2 dargestellt. Die Zulaufgeschwindigkeit wurde dem Wachstum der Zellen angepasst, so dass nach einer gewissen Zeit ein lineares Wachstum erreicht wurde (c_x -Zunahme zwischen 0.1 und $0.6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Die Kennlinie der verwendeten peristaltischen Pumpe ist Anhang A-VII zu entnehmen.

Des Weiteren wurde während der gesamten Kultivierung der Sauerstoffeintrag (OTR) [$\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$] über die gemessenen O_2 -Konzentrationswerte im Abgas überwacht. Der Grenzwert von $8 \text{ mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ soll während der gesamten Kultivierung nicht überschritten werden. Wurde dieser überschritten, so wurde die Rührerdrehzahl reduziert.

Tabelle 4.5-2 *Zusammensetzung des Zulaufmediums*

Komponente	Konzentration [g L^{-1}]
Hefeextrakt OHLY-KAT	163.5
di-Kaliumhydrogenphosphat	5
di-Ammoniumhydrogencitrat	5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.125
Glukose	400

4.5.7 Zellernte

Die Ernte der Zellen erfolgte über eine externe, sterilisierbare Filtrationseinheit, die im *by-pass* zum Reaktor angeordnet ist. Die Filtrationseinheit besteht aus einer Druckkapsel und einem Hohlfaserfilter mit einer Porengröße von 500 kDa (siehe Anhang A-VII). Das Retentat wird mittels einer Kreiskolbenpumpe im Kreislauf gepumpt, während das Filtrat über die Außenseite der Filterkapsel abgezogen wird. Die Aufkonzentrierung der Zellen wurde drucküberwacht mit einem Druck von 0.6 bar durchgeführt, wobei der Druckaufbau über die Pumpe erfolgt. Nach einer Pumpdauer von 2 h konnte das Reaktionsvolumen von 150 L auf 10 L eingengt werden.

Zu einer weiteren Aufkonzentrierung der Zellen wurden diese in 50 mL Zentrifugenbehälter für 30 Minuten bei 4500 min^{-1} (4°C) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Für die weitere Verwendung wird das gewonnene Zellpellet bei -20°C gelagert.

4.6 Beschreibung der Reaktionssysteme für die Biotransformationen

4.6.1 Reaktionssystem im 400 μL -Maßstab

Parameteruntersuchungen für Ansätze im Satz-Verfahren bei denen keine pH-Regelung bzw. zusätzliche Begasung notwendig ist wurden in einem temperierbaren, geschütteltem System durchgeführt (Thermomixer comfort, Fa. Eppendorf). Sowohl Temperatur, als auch Schüttelfrequenz sind variabel einstellbar (siehe Abb. 4.6-1).



Abb. 4.6-1 *Abbildung des geschüttelten Reaktionssystems im 400 μ L-Maßstab*

Die Untersuchungen finden dabei in 1.5 – 2 mL Reaktionsgefäßen statt. Das Arbeitsvolumen beträgt 400 μ L. Eine Aufarbeitung der Ansätze für die gaschromatographische Analytik kann somit in den gleichen Reaktionsgefäßen stattfinden.

4.6.2 *Gerührtes System im 25-250 mL-Maßstab*

Parameteruntersuchungen, bei denen eine pH-Regelung bzw. eine zusätzliche Begasung notwendig ist, oder eine Edukt-Zudosierung durchgeführt wurde, können in den in Abb. 4.6-2 abgebildeten Reaktionsgefäßen durchgeführt werden (Arbeitsvolumen 25 mL bzw. 50-250 mL). Die Reaktionsgefäße sind mit einem Stutzen für eine pH-Elektrode, sowie zwei weiteren Stutzen für die Zudosierung von Titrationsmittel und/oder Edukt, zur Begasung bzw. zur Probenahme versehen. Durch die geschlossene Konzipierung der Reaktionsgefäße ist es möglich, die Umsetzungen ohne einen hohen Verdunstungsverlust durchzuführen bzw. die Ansätze bei Bedarf mit N_2 zu überlagern. Die Durchmischung der Reaktionsansätze wird über Magnetrührer (mehrstelliger Magnetrührer mit 15 Rührplätzen) gewährleistet.

Die Temperierung der Ansätze erfolgt über einen Inkubationsschrank der Fa. Infors (PROFORS-System) (siehe Abb. 4.6-2). Über das fedbatch-pro Fermentationssystem ist die Möglichkeit einer 16-fach parallelen *on-line* pH-Kontrolle bzw. -Regelung gegeben. Die Zugabe der Titrationsmittel kann über zwei Dosierstrecken realisiert werden. Für die pH-Regelung wurde 5 M NaOH verwendet, welche über die Dosierstrecke 2 zugegeben wurde. Das PROFORS-System ermöglicht des Weiteren eine individuelle Begasung von 16 parallelen Reaktionsansätzen über 16 angebrachte Durchflussmesser. Bestand der Bedarf einer N_2 -Überlagerung bei den Biotransformationsansätzen, so wurden die Ansätze über eine Kanüle mit 5-10 NL h^{-1} N_2 begast (Vordruck: 1.2 bar Überdruck). Bei den Untersuchungen zum Einfluss von Sauerstoff auf die Enzymaktivitäten wurde die Begasung mit Luft durchgeführt. Durch die Erweiterung des pH-Verstärkers um einen pO_2 -Kanal ist die Möglichkeit der *on-line* pO_2 -Kontrolle für ein Reaktionsgefäß gegeben.

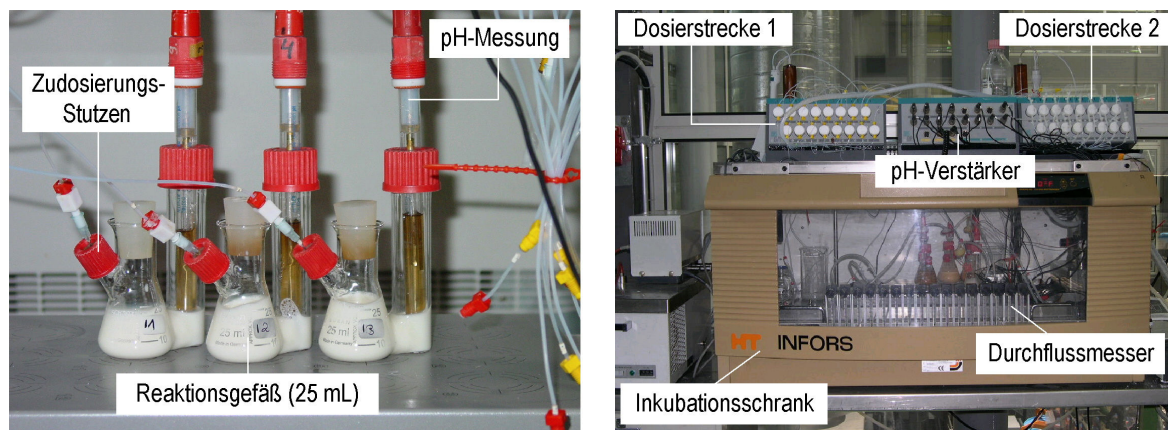


Abb. 4.6-2 *Abbildung des gerührten Reaktionssystems im 25-100 mL-Maßstab (links) und der Profors-Anlage mit dem fedbatch-pro Fermentationssystem (rechts)*

Bei Biotransformationen mit Edukt-Zulauf wurde die Edukt-Zudosierung mittels einer peristaltischen Pumpe durchgeführt. Als Pumpenschlauch wurde dabei ein lösungsmittelbeständiger Schlauch aus Tygon verwendet. Weitere Spezifikationen der Anlage, sowie der verwendeten Komponenten ist dem Anhang A-VIII zu entnehmen.

4.6.3 Gerührte Blasensäule (250 mL-Maßstab)

Für Parameteruntersuchungen mit definiertem Leistungseintrag wurde eine gerührte Blasensäule (Fa. Infors) verwendet (siehe Abb. 4.6-3). Die Durchmischung des Reaktionssystems erfolgt über ein Set von 6-Blatt-Scheibenrührern mit Magnetantrieb (Höhe x Breite der Rührerblätter: 8 mm x 8 mm). An der Rührerwelle sind des Weiteren 3 Strömungsbrecher mit einer Breite von 15 mm integriert.

Das maximale Arbeitsvolumen der Säule beträgt 300 mL. Die Messungen des Leistungseintrags sowie die Biotransformationen wurden mit einem Füllvolumen von 200 mL durchgeführt (siehe Anhang A-IX). An Stelle der Begasung über eine am Boden angebrachte Sinterplatte, erfolgte diese bei Bedarf über eine Kopfraumbegasung (analog Kapitel 4.6.2). Statt der Sinterplatte wurde eine Edelmetallscheibe am Reaktorboden eingebaut.

Die Temperierung der Ansätze erfolgte über die Inkubation des gesamten Systems in Inkubatoren der Fa. Infors.

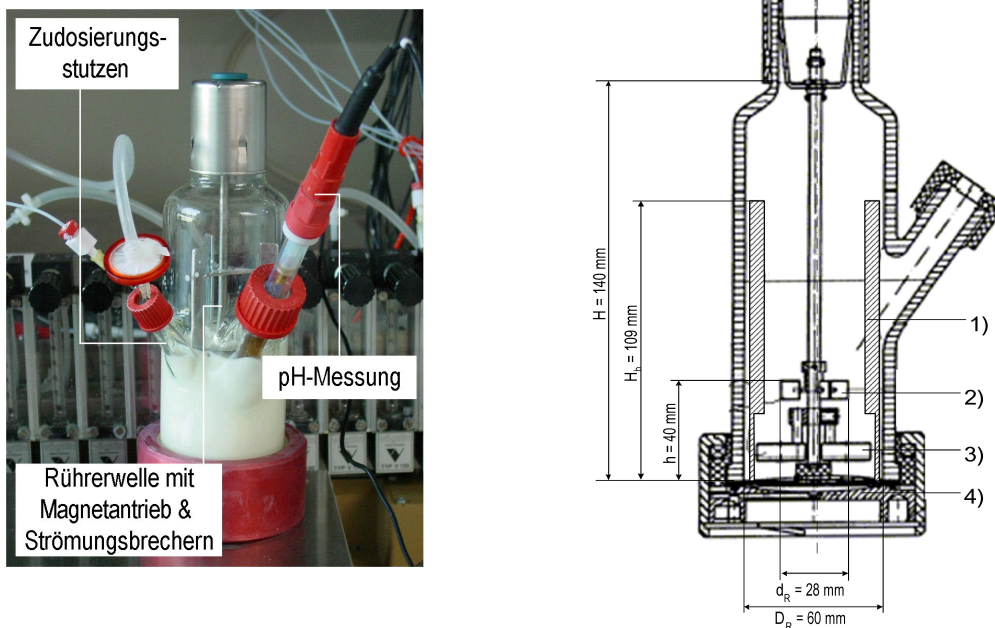


Abb. 4.6-3 Abbildung der gerührten Blasensäule: 1) integrierte Strömungsbrecher, 2) 6-Blatt-Scheibenrührer, 3) Magnete für den Magnetantrieb, 4) Edelstahlplatte

4.7 Ermittlung der kinetischen Daten der Biotransformation

Für die Parameteridentifikation wurde ein auf MATLAB[®]-Simulink[®] basierendes Programm verwendet (SiSy), welches am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München entwickelt wurde. Hierbei können über eine graphische Benutzeroberfläche die experimentell ermittelten Umsetzungsdaten eingegeben und eine Parameteridentifikation durchgeführt werden.

Das gesamte Prozessmodell setzt sich aus einem Reaktormodell mit der differentiellen Massenbilanz und einem formalkinetischen Modell der einzelnen Reaktionen zusammen.

Zur Parameteridentifikation wird eine Zielfunktion definiert, welche die Modellergebnisse mit den experimentellen Daten vergleicht. Zur Bewertung der Güte der identifizierten Parameter wird die Fehlerquadratsumme (FQS) bestimmt. Dafür wird für jede Komponente die Abweichung des Vektors zu den einzelnen Messpunkten berechnet und zur Fehlerquadratsumme aufsummiert. Als Normierung wird die Fehlerquadratsumme durch die Varianz der Messwerte dividiert, um somit eine Überbewertung ungenauer Messwerte zu verhindern. Aus der Summe der Fehlerquadratsummen aller Komponenten wird letztendlich ein Wert generiert, welcher die Güte des Modells widerspiegelt und den es zu minimieren gilt.

Die Minimierung der Fehlerquadratsumme erfolgt dabei über numerische Optimierungsmethoden. Hierbei wird zuerst der genetische Algorithmus zur globalen Parameteroptimierung verwendet, gefolgt von der Nelder-Mead-Simplex-Methode zur lokalen Parameteroptimierung [Chipperfield et al., 1994; Weuster-Botz, 2000].

Als weitere Größe zur Bewertung der Anpassungsgüte der Modelle wurden das Bestimmtheitsmaß (B) verwendet [Weihs et al., 1999]. Das Bestimmtheitsmaß setzt die Fehlerquadratsumme des Modells zur Standardabweichung der Zielgröße in Beziehung.

In Abb. 4.7-1 ist die Vorgehensweise der modellbasierten Parameteridentifikation und Validierung schematisch dargestellt.

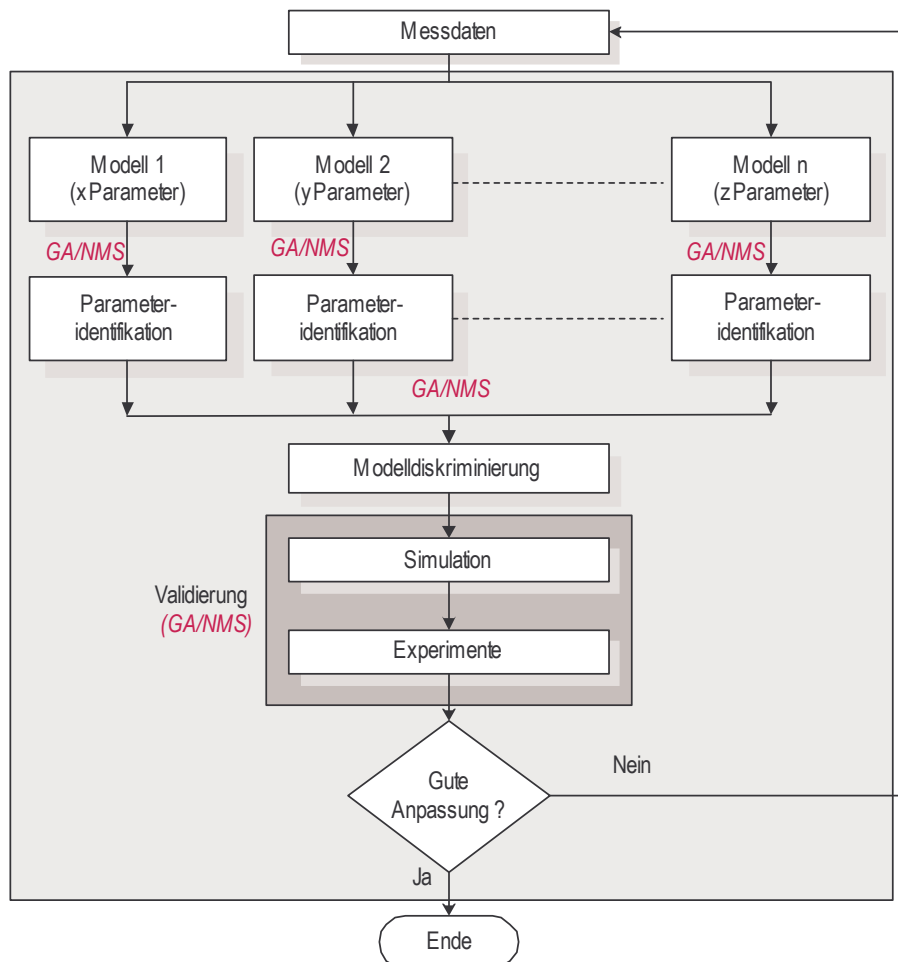


Abb. 4.7-1 Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Identifikation der kinetischen Parameter (GA = genetischer Algorithmus, NMS = Nelder-Mead-Simplex-Methode)

Die Einstellungsparameter des verwendeten genetischen Algorithmus sind in Tabelle 4.7-1 dargestellt.

Tabelle 4.7-1 *Einstellungsparameter des verwendeten genetischen Algorithmus zur Parameteridentifikation*

Variationsbereiche	$V_{HOHB,max}$, $K_{m,HOHB}$: 0 - 1000
	k_d ,	: 0 - 10
	$V_{DHHB,max}$, $K_{m,DHHB}$: 0 - 50
	$K_{i,DHHB}$: 0 - 200
Binärzeichenkettenlänge		: 20
Populationsgröße		: 50
Cross-over		: Multipoint
Cross-over-Wahrscheinlichkeit		: 0.8
Mutationswahrscheinlichkeit		: 0.02
Präzision		: 20
Abbruchkriterium		: Generationsanzahl (50)

4.8 Modellbasierte Ermittlung eines Zudosierungsprofils mittels genetischem Algorithmus

Zur Ermittlung eines geeigneten Edukt-Zudosierungsprofils wurde ein auf dem genetischen Algorithmus basierendes Optimierungsverfahren verwendet. Durch den genetischen Algorithmus wurden mehrere nicht lineare Zudosierungsprofile $F(t)$ generiert (siehe Abb. 4.8-1). Hierbei ist eine Angabe des Zudosierungszeitraums notwendig. Es wurden zwei Optimierungsläufe mit den Zudosierungszeiträumen von 24 h und 10 h durchgeführt. Diese Zeiträume wurden in 10 gleiche Abschnitte mit jeweils konstanter Zudosierungsrate $F_1(t)$ bis $F_{10}(t)$ aufgeteilt.

Basierend auf den ermittelten kinetischen Daten wurde eine Simulation der generierten Zudosierungsprofile durchgeführt. Als Zielgröße diente hierbei die Maximierung der Produkt-Konzentration.

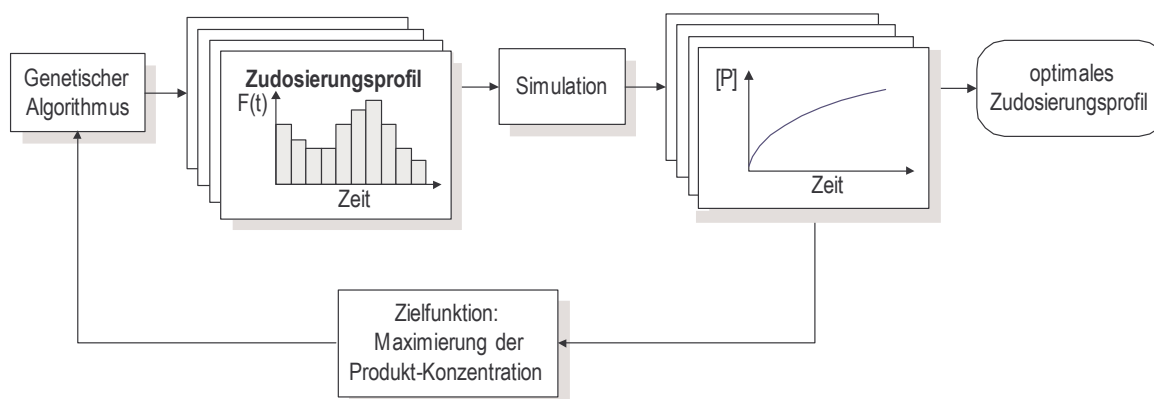


Abb. 4.8-1 *Schematische Darstellung zur Ermittlung eines geeigneten Edukt-Zudosierungsprofils mittels genetischen Algorithmus*

Die Einstellungsparameter des verwendeten genetischen Algorithmus sind in Tabelle 4.8-1 dargestellt.

Tabelle 4.8-1 *Einstellungsparameter des verwendeten genetischen Algorithmus zur Parameteridentifikation*

Variationsbereich	$F_1(t)$ bis $F_{10}(t)$: 0 – 45 mmol L ⁻¹ h ⁻¹
Binärzeichenkettenlänge		: 20
Populationsgröße		: 50
Cross-over		: Multipoint
Cross-over-Wahrscheinlichkeit		: 0.8
Mutationswahrscheinlichkeit		: 0.02
Präzision		: 20
Abbruchskriterium		: Generationsanzahl (50)

4.9 Untersuchungen zur Tropfengrößenbestimmung

Die verfahrenstechnischen Untersuchungen zur Tropfengrößenbestimmung wurden für 4-Cl-AP durchgeführt. Die Untersuchungen fanden im Laborrührkesselreaktor KLF 2000 der Fa. Bioengineering statt. Zur *in-line* Tropfengrößenbestimmung wurde die 3-D-ORM-Sonde verwendet. Für die Untersuchungen wurde der Reaktor auf die optimale Temperatur für die Biotransformation von 4-Cl-AP mit *Lactobacillus kefir* temperiert (30°C). Als kontinuierliche Phase wurde dabei der KPi-Umsetzungspuffer (0.2 M, pH 6.5) eingesetzt. Das Arbeitsvolumen bei den Untersuchungen betrug 1.7 L.

Für die Tropfengrößenbestimmung zellhaltiger Systeme wurde zusätzlich eine *off-line* Mikroskop-Bildanalyse durchgeführt. Zusätzlich zum Versuch im Rührkesselreaktor mit paralleler *in-line* und *off-line* Tropfengrößenbestimmung, wurden Messungen in der in Kapitel 4.6.3 beschriebenen gerührten Blasensäule durchgeführt. Das Arbeitsvolumen betrug hierbei 200 mL.

4.9.1 Beschreibung des 2 L-Laborrührkesselreaktors

Bei dem Laborrührkesselreaktor KLF 2000 handelt es sich um einen *in-situ* sterilisierbaren Reaktor. Die Messsonden für pH, pO₂ und zur Tropfengrößenbestimmung werden in den DN19-Stutzen im Reaktordeckel angebracht (erweiterter Deckel mit einer Höhe von 73 mm). Im Reaktordeckel sind des Weiteren DN12 Sterildurchführungen für die Zudosierung(en) versehen. Im Boden befinden sich 4 DN12 Sterildurchführungen für die Temperatursonde, den Heizstab, den Kühlfinger und die Probenahmeinheit. Die Spezifikation des Reaktors sieht wie folgt aus (weitere Spezifikationen sind dem Anhang A-X zu entnehmen):

Maximales Arbeitsvolumen	: 2 L
Datenerfassung und Parametereinstellung	: Modulare Mess- und Regeleinheiten
Temperierung	: Kombination aus elektrischem Heizstab und Kühlfinger mit Magnetventil
Rührorgan	: 3-fach 6-Blattscheibenrührer mit Untenantrieb (mechanische Gleitringdichtung), 180 W Motorleistung, max. Drehzahl 1700 bei 1.75 L
Strömungsbrecher	: Schikanenkorb mit 4 Strömungsbrechern (Höhe 280 mm, Breite 9.85 mm)
Begasung	: Begasungsring am Reaktorboden, Regelung über einen Durchflussmesser
Möglichkeiten der Messung	: Regeleinheiten für Temperatur, pO ₂ , pH und Rührerdrehzahl : CO ₂ und O ₂ über einen Abgasanalysator
Möglichkeiten der Regelung	: Temperatur, pO ₂ und pH über die Regeleinheiten
Möglichkeiten der Steuerung	: Zugabe von Antischaummittel über eine Regeleinheit : Ansteuerung der Rührerdrehzahl über Labview : Ansteuerung einer externen Zulaufpumpe über Labview
Datenerfassungssoftware	: Labview-basiert [Simmonet, 2003]

Die Abmessungen des Reaktors sind Abb. 4.9-1 zu entnehmen.

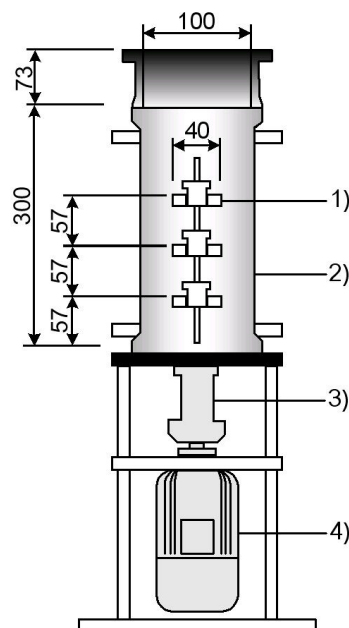


Abb. 4.9-1 *Abbildung des Laborrührkesselreaktors KLF 2000 (Fa .Bioengineering): 1) 6-Blatt-Scheibenrührer (bxh = 11x8 mm), 2) Glaszylinder, 3) Lagerung, 4) Motor (Abbildung ohne Strömungsbrecher, die Einheit der Reaktorabmessungen ist mm)*

4.9.2 In-line Tropfengrößenbestimmung mittels 3-D-ORM

Die verwendete 3-D-ORM-Sonde der Fa. MTS Düsseldorf (Typ 6xx, Seriennummer. 0201281) besitzt einen Messbereich von 10-1000 μm . Das Messfenster des Sensors (Messkopf IP 68) ist aus Saphirglas hergestellt, alle anderen medienberührende Teile aus Edelstahl (VA 1.4571). Die Sonde kann bis zu Prozessdrücken von 6 bar und Temperaturen bis 125°C eingesetzt werden. Die Datenerfassung erfolgt über eine modulare ½ 19" Auswerteeinheit (IP 44), welche eine Auflösung der Messwerte in 1024 digitalen Kanälen ermöglicht.

Über die Messsoftware WinOrm 3.4 erfolgt die Signalauswertung in definierten Messintervallen. Um statistisch aussagekräftige Resultate zu erzielen sind pro Messintervall mindestens 4000 Messereignisse erforderlich. Das Messintervall für die Untersuchungen wurde mit 60 sec ausgewählt. Für jede Abtastzeit wird die Partikelgrößenverteilung, sowie der d_{10} , d_{50} und d_{90} aufgenommen.

Für die verwendete Sonde muss der Messbereich in der Software auf 50-1200 μm eingestellt werden. Die Längenangabe arch cord length (acl) ist für kugelförmige Tropfen bis zu 100 μm identisch mit dem tatsächlichen Durchmesser in μm (mündliche Information der Fa. MTS). Für die durchgeführten Messungen ist daher keine Kalibrierung bezüglich der Partikelgröße notwendig.

Die Positionierung der Sonde im Rührkesselreaktor KLF 2000, sowie die Abmessungen der Sonde sind Abb. 4.9-2 zu entnehmen. Die Sonde wird über einen DN19-Stutzen im Reaktor befestigt. Bei einem Füllvolumen von 1.7 L beträgt die Füllhöhe im Reaktor 26 cm (Reaktor komplett bestückt). Beim Einsatz des erweiterten Reaktordeckels beträgt die Eintauchtiefe der Sonde dabei 4.5 cm. Somit beträgt die Entfernung der Sonde vom obersten 6-Blatt-Scheibenrührer 4.4 cm.

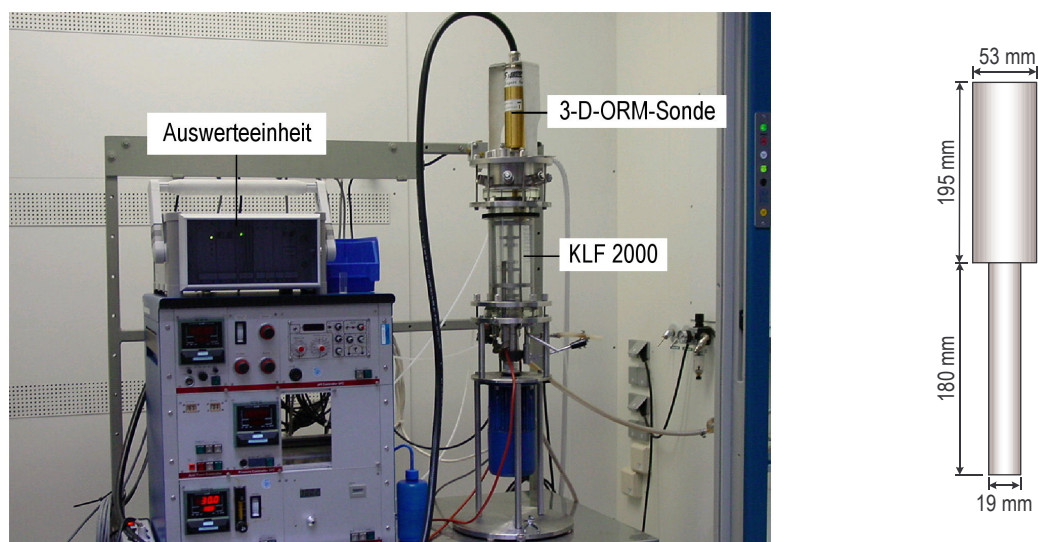


Abb. 4.9-2 On-line Tropfengrößenbestimmung im Rührkesselreaktor: Positionierung der 3-D-ORM-Sonde im Rührkesselreaktor (links) und Abmessungen der Sonde (rechts)

Der Ausschluss von Luftblasen aus der Auswertung der Tropfengrößenverteilungen erfolgt über die Definition aufgenommener Momentaufnahmen ohne Edukt-Phase als

Nullwert. Dadurch werden sowohl die Anzahl der Messereignisse, als auch die Verteilung der Luftblasen von den Auswertungen der Momentaufnahmen abgezogen. Hierbei muss die Annahme getroffen werden, dass sich das Luftblasenregime während der gemessenen Prozesses nicht verändert.

4.9.3 *Off-line Tropfengrößenbestimmung*

Für die *off-line* Tropfengrößenbestimmung wurden Mikroskopaufnahmen der Reaktorproben genommen, welche mittels der Bildverarbeitungssoftware ImageJ Version 1.30 ausgewertet wurden. Diese ist eine Java basierte, frei verfügbare Software, die unter: <http://rsb.info.nih.gov/ij/> zu finden ist. Für die Mikroskopaufnahmen wurde die Neubauer-Zählkammer verwendet, welche einen definierten Abstand von 0.1 mm zwischen Deckglas und Objektträger gewährleistet. Des Weiteren kann durch die definierte Größe der Quadrate der Zählkammer die Längenskalibrierung der Software durchgeführt werden. Als Mikroskop wurde ein Lichtmikroskop des Modelltyps Axiolab der Fa. Zeiss mit einer maximalen Vergrößerung von 10x100 verwendet. Zur Untersuchung wurden 5 µL Probevolumen auf den Objektträger gegeben.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Herstellung von *Lactobacillus kefir* Zellen für die asymmetrischen Reduktionen

Die Zielsetzung der Kultivierung war eine hohe Biotrockenmassekonzentration bei gleichzeitigen hohen Enzymaktivitäten für die Reduktionsreaktionen. Hinsichtlich dieser Zielsetzung wurden die Einflüsse des pH, des Sauerstoffeintrags und der Nährstoffzusammensetzung untersucht. Als Referenzprozess diente hierbei die von Hummel [1990] und Haberland et al. [2002] beschriebene Kultivierung von *L. kefir* zur Herstellung der Phenylethanol-Alkoholdehydrogenase (LK-ADH₁).

Im den folgenden Kapiteln werden zuerst die wichtigsten Punkte bei der Prozessoptimierung beschrieben, gefolgt von einer Schilderung der Biokatalysator-Herstellung im 150 L-Maßstab.

Das Wachstum wurde photometrisch über die Zunahme der Biotrockenmassekonzentration verfolgt. Als Messgröße für die Enzymaktivität wurde die Aktivität der LK-ADH₁ über die Prozesszeit bestimmt.

Die Untersuchungen zum Einfluss von pH und Glukose-Konzentration auf das Wachstum und auf die LK-ADH₁-Aktivität wurden in Schüttelkolben und in gerührten 75 mL Reaktoren durchgeführt (vergleiche Kapitel 4.6.3 zur Kultivierung in Schüttelkolben und Kapitel 4.6.2 zur Kultivierung im gerührten System). Auf dieser Basis wurden Versuche im 5 L Labor-Rührkesselreaktor durchgeführt, bei dem eine Regelung des pO₂ möglich war (zur Beschreibung des Reaktors, siehe Kapitel 4.5.5). Abschließend wurde das etablierte Zulaufverfahren aus dem 5 L-Labormaßstab in den 150 L-Maßstab übertragen. (zur Beschreibung des Prozesses siehe Kapitel 4.5).

5.1.1 Parameterstudien zur Kultivierung von *Lactobacillus kefir*

In Vorversuchen hat sich gezeigt, dass die Anwesenheit eines Acetat-Salzes im Medium essentiell für das Erzielen hoher LK-ADH₁-Aktivitäten ist. Des Weiteren wurde festgestellt, dass durch den Einsatz von technischem Hefeextrakt höhere Enzymaktivitäten erreicht werden können als bei dem Einsatz von aufgereinigtem Hefeextrakt für die Mikrobiologie.

pH

Die Untersuchungen wurden im gerührten Reaktorsystem durchgeführt, bei denen der Sauerstoffeintrag über eine Kanüle im Kolbenhals gewährleistet wurde. Eine mögliche Sauerstofflimitierung konnte dadurch ausgeschlossen werden.

Werden die spezifischen Enzymaktivitäten in Abhängigkeit vom pH in Abb. 5.1-1 (A) betrachtet, so ist zu erkennen, dass durch eine Regelung des pH auf 6 bzw. 6.5 die höchsten Enzymaktivitäten von $\sim 1400 \text{ U g}^{-1} \text{ BTM}$ erzielt werden können. Die geregelten Ansätze weisen dabei deutlich höhere Enzymaktivitäten auf als die

ungeregelten Ansätze. Eine Ausnahme macht hier nur der Ansatz mit einer Regelung auf pH 7.0. Bei den unregulierten Ansätzen ist hierbei jeweils der Anfangs-pH zu Beginn der Kultivierung aufgetragen. Der Referenzprozess zur Kultivierung von *L. kefir* wird ohne pH-Regelung durchgeführt. Der pH des Mediums wird dabei vor Beginn der Kultivierung auf pH 6.2 gestellt. Während der Kultivierungsdauer von 24 h sinkt dieser auf pH 4.2.

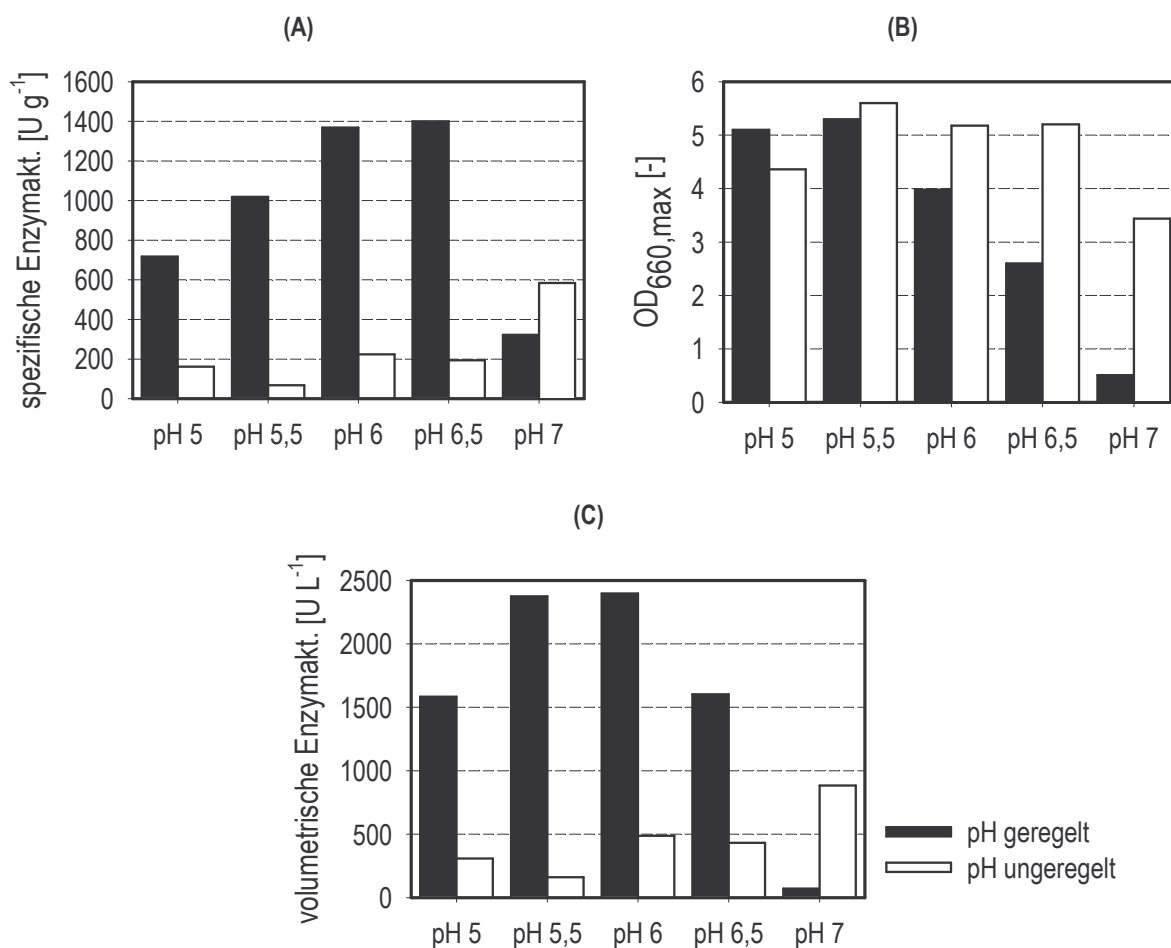


Abb. 5.1-1 (A) spezifische Enzymaktivität der LK-ADH₁, (B) Wachstum (aufgetragen als $\text{OD}_{660,\text{max}}$) und (C) volumetrische Enzymaktivität der LK-ADH₁ als Funktion des pH ($V_R = 50 \text{ mL}$, gerührtes Reaktionssystem mit Rührerdrehzahl von 200 min^{-1} , aerob)

Wird der Einfluss auf das Zellwachstum in Abb. 5.1-1 (B) betrachtet, so ist erkennbar, dass bei pH 6.0 und 6.5 eine höhere Zellkonzentration bei den unregulierten Ansätzen erreicht wird. Diese Tendenz ist auch für pH 7.0 zu erkennen. Bei pH 5.0 und 5.5 sind die erreichten Zellkonzentrationen für pH geregelte und unregelte Ansätze dagegen vergleichbar. Geregelte und unregelte Ansätze haben dabei gemeinsam, dass die maximal erreichbare Zellkonzentration mit ansteigendem pH abnimmt.

Es wird angenommen, dass bei pH 6.0 und 6.5 die spontane Selbstzersetzung von Wasserstoffperoxid für die hohen Enzymaktivitäten verantwortlich ist. Dieses wird unter aeroben Bedingungen bei der Glukose-Verstoffwechslung gebildet und ist ein starkes Oxidationsmittel, welches die LK-ADH₁ und wohlmöglich auch andere Enzyme

denaturieren kann. Für die weitere Prozessführung wurde pH 6.0 als Optimum eingesetzt, da hier mit einer volumetrischen Aktivität von 2400 U L^{-1} der beste Kompromiss aus Zelldichte und Enzymaktivität vorliegt. Die volumetrische Aktivität des Ansatzes mit pH 6.5 beträgt dagegen 1600 U L^{-1} .

Glukose als Kohlenstoffquelle

Wird der Einfluss von Glukose auf das Zellwachstum in Abb. 5.1-2 betrachtet, so ist zu erkennen, dass im Satz-Verfahren durch Vorlage höherer Glukose-Konzentrationen eine Wachstumssteigerung erreicht werden kann. Die eingesetzte Glukose-Konzentration des Referenzansatzes aus der Literatur beträgt hierbei 20 g L^{-1} im Satz-Verfahren, bei einer End-Zelldichte OD_{660} von 4-4.5.

Die bei der Untersuchung erreichte End-Zelldichte OD_{660} bei gleicher Glukose-Konzentration liegt bei 5.8 und ist somit um den Faktor 1.3 höher als im Referenzansatz. Dieses könnte aus einem höheren Sauerstoffeintrag bei dem eingesetzten Kultivierungsbedingungen resultieren.

Bei Glukose-Konzentrationen von 30 bis 50 g L^{-1} kann die End-Zelldichte bis um den Faktor 2.7 verdoppelt werden. Dabei wurde nach 27 h bei den Ansätzen mit 40 bis 50 g L^{-1} noch kein Eintritt in die stationäre Phase beobachtet, so dass durchaus höhere Zellkonzentrationen erreicht werden können.

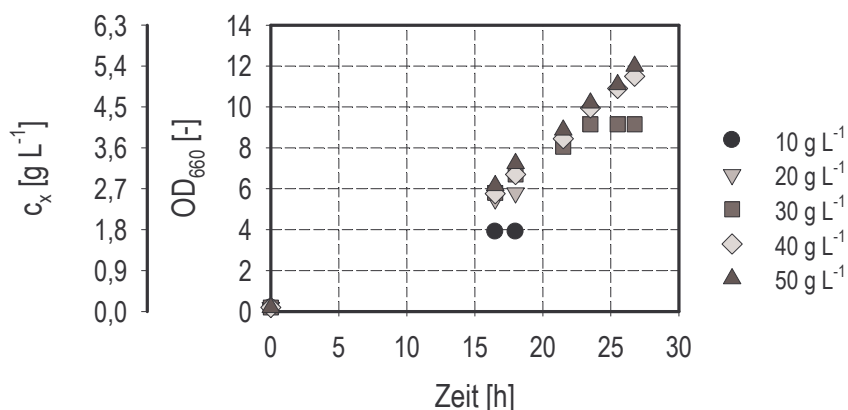


Abb. 5.1-2 Einfluss der Glukose-Konzentration auf das Wachstum von *L. kefir* im Satz-Verfahren (Schüttelkolben, nicht pH-geregelt)

Weitere Untersuchungen im 5 L-Laborrührkesselreaktor haben gezeigt, dass durch die Glukose-Zudosierung nach Ende der Satz-Phase ein weitere Wachstumssteigerung erzielt werden kann. Jedoch wird diese Wachstumssteigerung von dem Bedarf nach Aminosäuren limitiert. Durch den Einsatz eines Glukose-Hefeextrakt-Gemisches als Zulaufmedium konnte das Wachstum weiter verbessert werden. Dem Zulauf-Medium wurden des Weiteren die vier Hauptsalzbestandteile (di-Kaliumhydrogenphosphat, di-Ammoniumhydrogencitrat, Magnesiumsulfat-Heptahydrat und Mangansulfat-Monohydrat) in 2.5-facher bis 5-facher Konzentration beigemischt, um mögliche Limitierungen auszuschließen (siehe Kapitel 4.5.6). Des Weiteren hat sich eine Glukose-Konzentration von 2 bis 5 g L^{-1} als vorteilhaft für die LK-ADH₁-Aktivität

gezeigt. Dieser Konzentrationsbereich wurde daher während der Zulaufphase über die Zudosierungsrate des Zulaufmediums eingestellt.

Sauerstoff

Ein sehr signifikanter Parameter bei der Herstellung des Biokatalysators ist der Sauerstoffeintrag. Untersuchungen zum Einfluss von Sauerstoff auf das Wachstum von *L. kefir* haben gezeigt, dass das Wachstum mit ansteigendem Sauerstoffeintrag deutlich zunimmt und hierbei höhere Zellkonzentrationen erreicht werden können. Dieses ist durch die bessere ATP-Bildung unter aeroben Bedingungen bedingt (siehe Kapitel 3.9.1). Wie bereits erwähnt wird unter aeroben Bedingungen jedoch Wasserstoffperoxid bei der Glukose-Verstoffwechselung gebildet, welches einen negativen Einfluss auf die Enzymaktivität ausübt. Bei der Biokatalysator-Herstellung muss daher ein Optimum zwischen Zellkonzentration und Enzymaktivität erreicht werden, welches sich in der volumetrischen Enzymaktivität [U L^{-1}] widerspiegelt.

Des Weiteren hat sich gezeigt, dass hierbei der gemessene pO_2 im Reaktor nicht als Anhaltspunkt bzw. Regelgröße verwendet werden kann. Dieser wurde bei allen Kultivierungen auf 0 % bzw. zwischen 0 % bis 3 % geregelt. Als signifikante Größe in Hinsicht auf die Enzymaktivität hat sich jedoch der Sauerstoffeintrag (OTR) erwiesen. Dieser wurde nach Gleichung 51 (siehe Kapitel 3.9.3) *on-line* über die Abgasanalytik abgeschätzt und während des Prozesses verfolgt. In Tabelle 5.5-1 ist der Einfluss des Sauerstoffeintrags auf die Enzymaktivität für verschiedene Kultivierungen exemplarisch dargestellt. Weitere Bedingungen der aufgelisteten Kultivierungen sind dem Anhang B-II zu entnehmen.

Tabelle 5.1-1 Vergleich des Einflusses des OTR auf das Metabolitverhältnis und auf die spezifische Aktivität der LK-ADH₁

Kultivierung	Mittl. OTR	pO ₂	spez. Konz. Lactat	spez. Konz. Acetat	Metabolitverhältnis Lactat : Acetat	LK-ADH ₁
	[$\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$]	[%]	[mmol g^{-1}]	[mmol g^{-1}]		[U g^{-1}]
1	1.2	0 ^u	k.A.	k.A.	k.A.	1387
2	4.6	0 – 3 ^r	36	39	1 : 1.08	850
3	10.2	0 – 3 ^r	36	50.5	1 : 1.40	172
4	14.5	0 – 3 ^r	24	47	1 : 1.96	119

u: ungeregelt, r: geregelt

Es ist zu erkennen, dass die erreichte Enzymaktivität mit zunehmendem Sauerstoffeintrag deutlich abnimmt. Hierbei kann das Mengenverhältnis der gebildeten Metabolite Lactat zu Acetat ebenfalls als Anhaltspunkt für den Sauerstoffeintrag des Prozesses verwendet werden. Je höher der Sauerstoffeintrag, desto mehr Acetat wird gebildet.

Zur Verdeutlichung dieses Effektes sind in Abb. 5.1-3 nochmals die Kultivierungen 2 und 4 vergleichend dargestellt. Die Kultivierung 2 wurde dabei im 5 L-Maßstab und die

Kultivierung 4 bereits im 150 L-Maßstab durchgeführt. Bei der Maßstabsübertragung lag hierbei mit Ausnahme der Begasungsrate und des Sauerstoffeintrags eine identische Prozessführung vor. Dieses umfasst die Regelung des pO_2 auf 0-3 %, sowie eine identische Zudosierungsrate des Glukose-Hefeextrakt-Zulaufmediums. Die Begasungsrate in der 5 L-Kultivierung betrug 0.6 vvm. In der 150 L-Kultivierung wurde diese dagegen zwischen 0.1 bis 0.2 vvm gehalten.

Es ist erkennbar, dass bei der Maßstabsübertragung ein identisches Zellwachstum erreicht werden konnte, welches auch im Verlauf der Glukose-Konzentration zu sehen ist. Aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen des Titrationsmittels NaOH der in Abb. 5.1-3 verglichenen Kultivierungen und der daraus resultierenden verschiedenen Verdünnungseffekte, wurden die Biotrockenmassenkonzentrationen auf das Reaktionsvolumen der jeweiligen Satz-Phasen normiert.

Wird bei der Kultivierung im 5 L-Maßstab nach 76 h eine spezifische Aktivität von 850 U g^{-1} erreicht, so nimmt diese bei der Kultivierung im 150 L-Maßstab mit zunehmender Prozesszeit ab und erreicht nach 71 h eine Aktivität von 119 U g^{-1} . Der Vergleich der über die Prozesszeit gemittelten Sauerstoffeintragsraten zeigte dann für die 150 L-Kultivierung einen um den Faktor 3 höheren OTR.

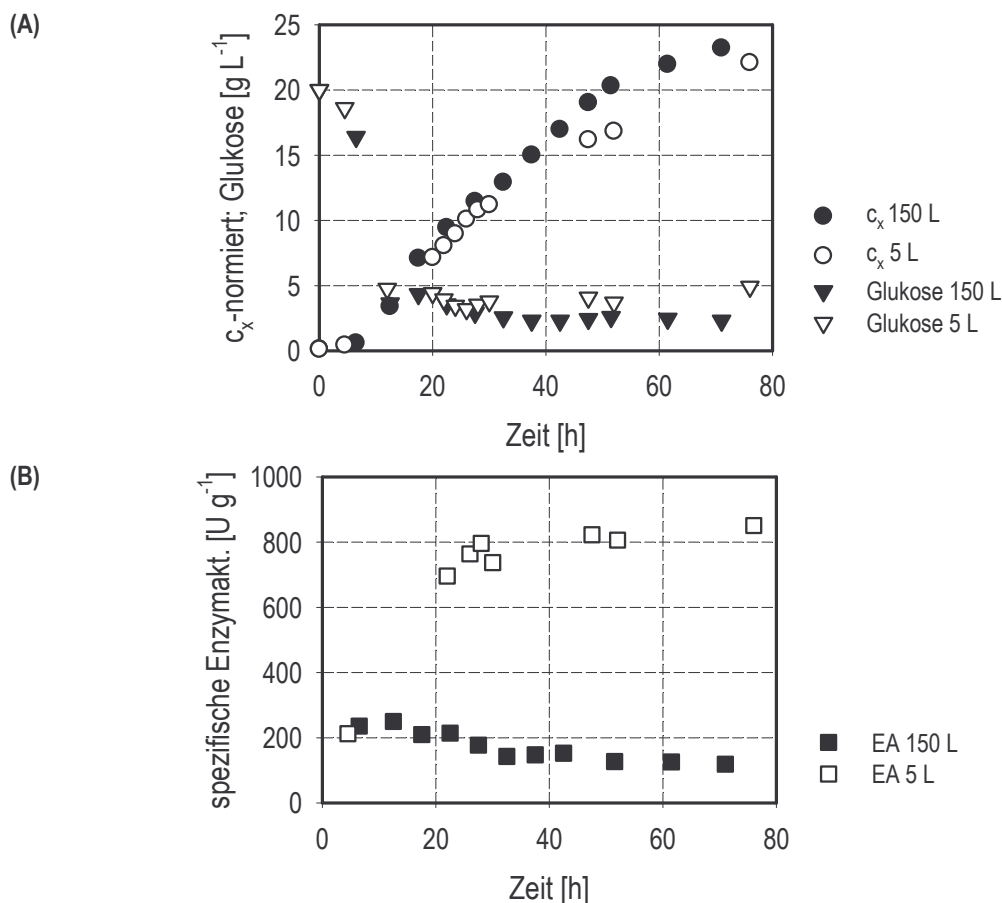


Abb. 5.1-3 Vergleich der Verläufe der Zellkonzentration und des Glukoseverbrauchs (A), sowie der spezifischen Enzymaktivität der LK-ADH₁ (B) der Kultivierungen im 5 L- und 150 L-Maßstab

5.1.2 Produktion von *Lactobacillus kefir* im 150 L-Maßstab

Der Sauerstoffeintrag wurde bei der Produktion im 150 L-Maßstab über die Rührerdrehzahl auf einen Wert $< 8 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ geregelt (siehe auch Kapitel 4.5.6). Zur Überwachung des Prozesses wurde während der Kultivierung die Aktivität der LK-ADH₁ *off-line* bestimmt. War hier eine abnehmende Tendenz zu erkennen, so wurde eine weitere Drosselung der Rührerdrehzahl vorgenommen.

Die Zeitverläufe für die Zellkonzentration, die Glukosekonzentration und die spezifische Enzymaktivität von LK-ADH₁ sind in Abb. 5.1-4 dargestellt. Nach einer Kultivierungsdauer von 71 h wurde eine Zellkonzentration von 10.8 g L^{-1} erreicht. Durch die Regelung der Sauerstoffeintragsrate auf einen Mittelwert von $7.6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ konnte eine spezifische Enzymaktivität von 844 U g^{-1} am Ende des Prozesses erreicht werden. Dieses entspricht einer volumetrischen Enzymaktivität von 9115 U L^{-1} .

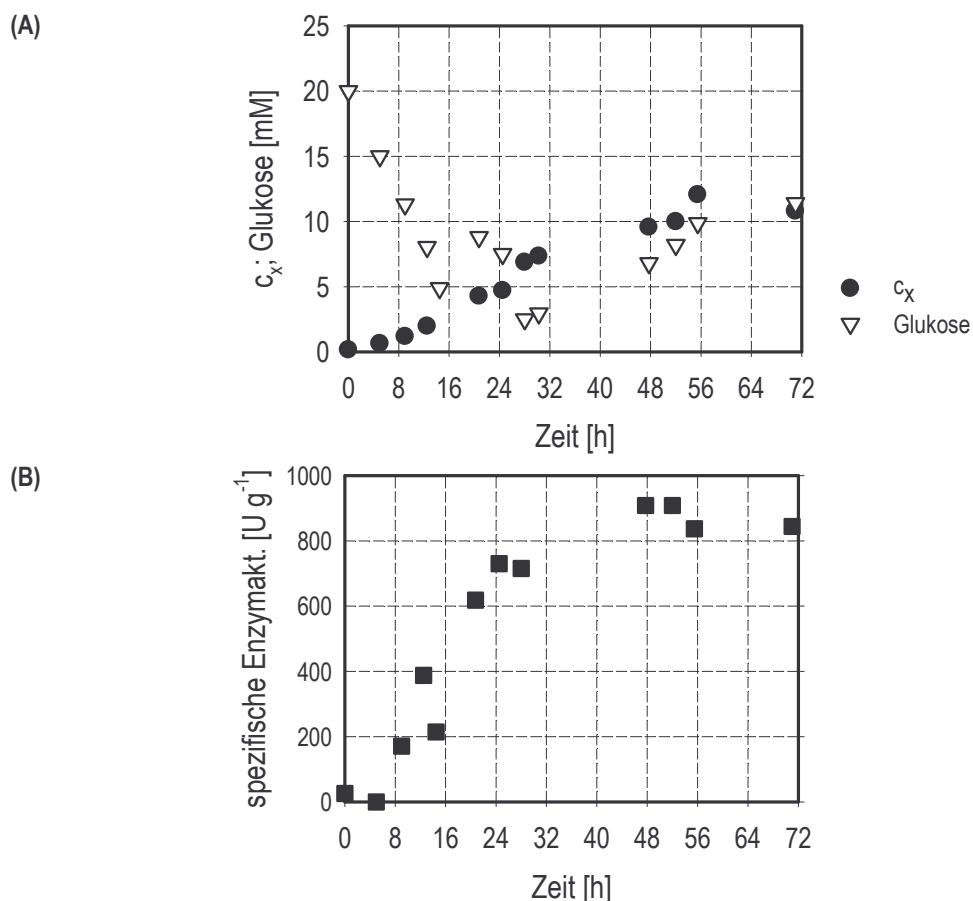


Abb. 5.1-4 (A) Zellkonzentration und Glukosekonzentration und (B) spezifische Enzymaktivität der LK-ADH₁ bei der Herstellung von *L. kefir* im 150 L-Maßstab

Trotz eines um den Faktor 1.7 höheren mittleren Sauerstoffeintrags bezüglich der in Kapitel 5.1.1 vorgestellten Kultivierung im 5 L-Maßstab (siehe Abb. 5.1-3), ist die erreichte Zellkonzentration mit 10.8 g L^{-1} um 24 % geringer. Die erreichte Zellkonzentration der Kultivierung im 5 L-Maßstab betrug hierbei 14.2 g L^{-1} bei einer mittleren Sauerstoffeintragsrate von $4.6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Das Wachstum nimmt eigentlich mit steigendem Sauerstoffeintrag zu. Aufgrund der Messungenauigkeiten der

vorhandenen Massendurchflussmesser für die Zuluftströme ist die Bestimmung der Sauerstofftransporten jedoch fehlerbehaftet. Dieses bedeutet, dass die tatsächliche Sauerstofftransportrate der Kultivierung im 150 L-Maßstab höher liegen könnte als der ermittelte Mittelwert.

Ein Vergleich dieses optimierten Prozesses mit der Referenzkultivierung [Haberland et al., 2002] ist in Tabelle 5.5-2 dargestellt.

Tabelle 5.1-2 Vergleich des optimierten Kultivierung von *L. kefir* und des Referenzprozesses

Vergleichsgröße	Referenz	Optimierter Prozess	Steigerung
Verfahren	Satzverfahren, 48 h	Zulaufverfahren, 71 h	---
Volumen	190 L	150 L	---
Medium	Standard MRS-Medium	optimiertes MRS-Medium	---
pH-Kontrolle	pH 6.2, ungeregt	pH 6.0, geregelt	---
Biotrockenmassekonzentration	2 g L ⁻¹	10.8 g L ⁻¹	+ 440 %
Spezifische Enzymaktivität	600 U g ⁻¹ *	844 U g ⁻¹	+ 41 %
Volumetrische Enzymaktivität	1400 U L ⁻¹	9115 U L ⁻¹	+ 551 %
Raum-Zeit Ausbeute	0.042 g L ⁻¹ h ⁻¹	0.152 g L ⁻¹ h ⁻¹	+ 262 %
Medienkosten ²	509,- €	148,- €	- 244%
	1.34 €/g	0.09 €/g	- 1366 %

*: Mittelwert der erreichbaren Enzymaktivität nach Hummel [1990]

Durch die Optimierung der Prozessbedingungen konnte eine Steigerung der Zellkonzentration von 440 % erzielt werden. Die erreichte spezifische Aktivität der LK-ADH₁ ist mit 844 U g⁻¹ 41 % besser als die Referenz. Die volumetrische Enzymaktivität konnte hierbei um 551 % verbessert werden. Wird die Raum-Zeit-Ausbeute des Prozesses betrachtet, so ist eine Verbesserung um 262 % zu verzeichnen.

Durch den Einsatz des optimierten MRS-Mediums mit technischem Hefeextrakt als einzige komplexe Mediumkomponente konnten die Medienkosten gegenüber dem Standard-MRS-Medium mit Hefeextrakt mikrobiologischen Grades, Casein Pepton und Fleischextrakt als komplexe Bestandteile um 244 % reduziert werden. Werden die Mediumkosten auf die jeweiligen Biotrockenmassen bezogen, so sind die Kosten um 1366 % geringer.

² Die Kalkulation wurde für das jeweilige Kultivierungsvolumen mit 25 g L⁻¹ Komplexbestandteilen durchgeführt.

5.2 Asymmetrische Synthese von 1-(*R*)-(4-Cl-Phenyl)-Ethanol

4-Cl-Acetophenon wurde aufgrund ähnlicher physikalisch-chemischer Stoffeigenschaften wie 6-Cl-3,5-Dioxohexansäure-*tert*-Butylester als Referenzedukt für die verfahrenstechnischen Untersuchungen zur mikrodispersiven Tropfenbildung eingesetzt. Des Weiteren ist bekannt, dass 4-Cl-Acetophenon mit hoher Aktivität von der *Lactobacillus kefir* ADH₁ (Phenylethanol-Alkoholdehydrogenase) umgesetzt werden kann (siehe Kapitel 3.9.4). Dieses erfolgt in einer einstufigen Reduktionsreaktion ohne die Entstehung von Nebenprodukten. Um ein besseres Verständnis für die Ganzzellbiotransformation mit *L. kefir* zu gewinnen, wurde auch die asymmetrische Synthese von 1-(*R*)-(4-Cl-Phenyl)-Ethanol (1-(*R*)-4-Cl-PE) aus 4-Cl-AP reaktionstechnisch untersucht. Über die 1-(*R*)-4-Cl-PE Synthese sollten des Weiteren erste Informationen zur LK-ADH₁, zur Cofaktor-Regenerierung durch *L. kefir* und zum Einfluss verschiedener Prozessparameter gewonnen werden. Die Untersuchungen zur 1-(*R*)-4-Cl-PE- Synthese mit *L. kefir* wurden in 0.2 M KPi-Puffer mit 2 mM MgCl₂, pH 6.5 bei einer Umsetzungstemperatur von 30°C durchgeführt. Als Biokatalysator wurden kommerziell erworbene *L. kefir*-Zellen eingesetzt (siehe Kapitel 4.4.7).

5.2.1 Untersuchungen zur Stabilität der Alkoholdehydrogenase LK-ADH₁

Aus der Literatur ist bekannt, dass der Metabolismus des fakultativ anaeroben *L. kefir* stark von aeroben oder anaeroben Bedingungen abhängt (siehe Kapitel 3.9). Je nach Stoffwechselform können verschiedene Nebenprodukte gebildet werden, welche wiederum inhibierende bzw. denaturierende Einflüsse auf die an der Reaktion beteiligten Alkoholdehydrogenasen haben können. Der Einfluss einer Stickstoffatmosphäre auf die Stabilität der Alkoholdehydrogenase von ruhenden Zellen wurde ermittelt und mit dem Aktivitätsverlauf bei Luftbegasung verglichen. Die Untersuchungen wurden in dem in Kapitel 4.6.2 beschriebenen gerührtem System (25 mL-Maßstab) durchgeführt. Die Präparation der Zellen erfolgt nach dem gleichen Schema wie für eine Biotransformation (siehe Kapitel 4.4.7).

In Abb. 5.2-1 sind die Aktivitätsverläufe der LK-ADH₁ über einen Inkubationszeitraum von 29 h dargestellt. Die Aktivitäten sind dabei jeweils auf die Ausgangsaktivität zum Zeitpunkt $t = 0$ h bezogen. Diese liegt für die verwendeten Zellen bei 700 – 750 U g⁻¹. Es ist zu erkennen, dass kein Verlust der LK-ADH₁-Aktivität unter anaeroben Bedingungen zu verzeichnen ist. Unter aeroben Bedingungen dagegen sind nach 29 h nur noch 40 % der Ausgangsaktivität erhalten. Der Einsatz einer Stickstoff-Atmosphäre ist daher vorteilhaft bei einem längeren Einsatz von *L. kefir* für Biotransformationen.

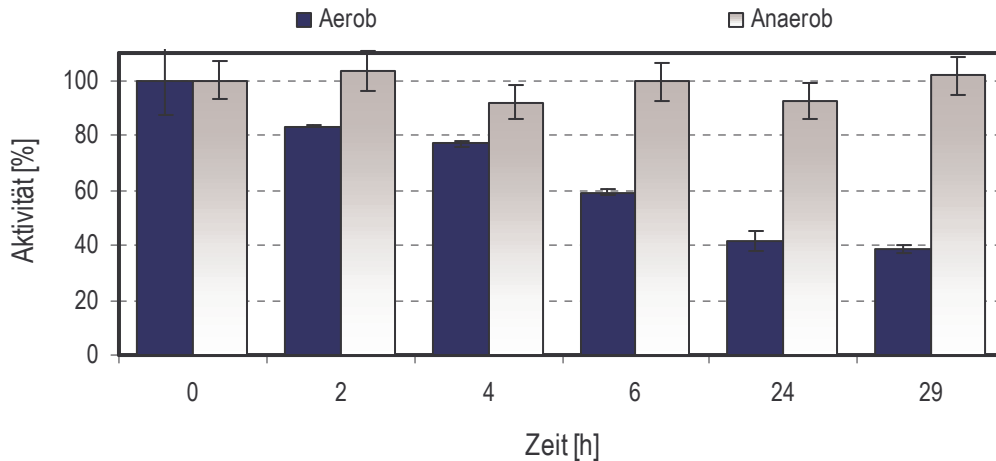


Abb. 5.2-1 Vergleich der Stabilität von LK-ADH₁ unter aeroben und anaeroben Bedingungen

Der Einfluss des Edukts 4-Cl-AP auf die LK-ADH₁-Stabilität wurde unter anaeroben Bedingungen untersucht. Dafür wurden 3 g L⁻¹ Zellen für den untersuchten Zeitraum mit 10 mM 4-Cl-AP inkubiert. In Abb. 5.2-2 ist zu erkennen, dass durch die Einwirkung des Edukts auch unter anaeroben Bedingungen ein Verlust der Enzymaktivität zu verzeichnen ist. Bereits nach 6 h Inkubationszeit nimmt die Aktivität um 53 % ab. Nach 29 h sind nur noch 7.4 % der Ausgangsaktivität vorhanden.

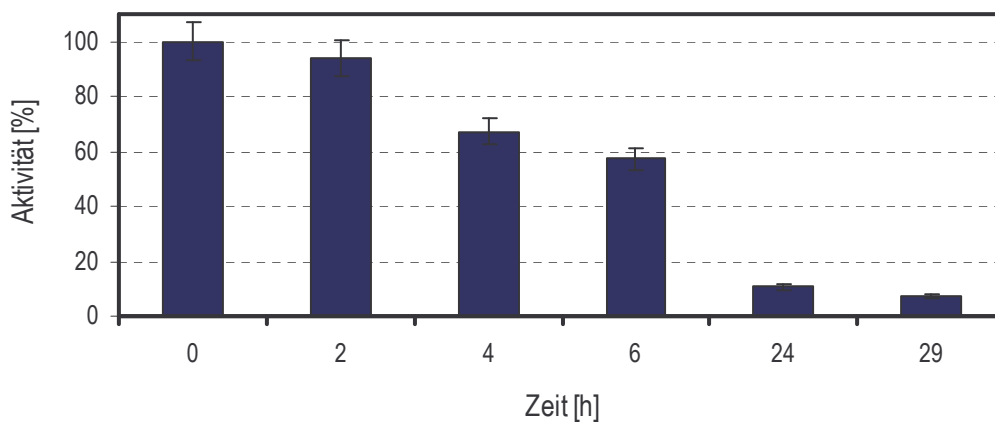


Abb. 5.2-2 Einfluss von 4-Cl-Acetophenon auf die Stabilität der LK-ADH₁ unter anaeroben Bedingungen

Die Umsetzungskapazität der Zellen wird bei der Biotransformation von 4-Cl-AP also durch den eduktbedingten Aktivitätsverlust des katalysierenden Enzyms begrenzt. Die Enzymaktivität nach 29 h beträgt 51 U g⁻¹. Bei der eingesetzten Zellkonzentration von 3 g L⁻¹ entspricht dieses einer volumetrischen Aktivität von 153 U L⁻¹. Wird diese Aktivität, basierend auf der Definition eines Units (siehe Kapitel 3.6.5), in die theoretisch umsetzbare Eduktskonzentration umgerechnet, so beträgt diese 9 mmol L⁻¹ h⁻¹.

5.2.2 Untersuchungen zum Cosubstrat

Auswahl eines geeigneten Cosubstrats

Die Cofaktor-Regenerierung bei der Ganzzellbiotransformation soll über die zellinternen Stoffwechselwege von *L. kefir* erfolgen. Eine Möglichkeit zur NADPH-Regenerierung ist die Verstoffwechslung von Glukose über den 6-Phosphoglukonat-/Phosphoketolase-Weg und der darauf folgenden heterofermentativen Milchsäuregärung. Als Nebenprodukte der Cofaktor-Regenerierung können dabei Lactat, Acetat, Ethanol und CO₂ entstehen (siehe Kapitel 3.9.1). Eine für *L. kefir* bekannte Alternative ist die substratgekoppelte Cofaktor-Regenerierung über die LK-ADH₁ mit Isopropanol als Cosubstrat (siehe Kapitel 3.6.3). Des Weiteren wurde Glycerin als mögliches Cosubstrat untersucht. Die Untersuchungen wurden mit einer Zellkonzentration von 2 g L⁻¹ und einer 4-Cl-AP-Ausgangskonzentration von 5 mM durchgeführt. Alle Cosubstrate wurden in einem molares Mengenverhältnis von 5 : 1 zum 4-Cl-AP eingesetzt. Da festgestellt werden konnte, dass im pH-Bereich zwischen 4 bis 6.5 kein Unterschied in der Biotransformation vorliegt, konnten die Ansätze ohne pH-Regelung durchgeführt werden.

In Abb. 5.2-3 werden die untersuchten Cosubstrate miteinander verglichen. Hierbei wird die beste Ausbeute bei Einsatz von Glukose als Cosubstrat erreicht (90 % nach einer Umsetzungsdauer von 7 h). Die spezifische Produktbildungskapazität beträgt für Glukose 2.25 mmol g⁻¹ bei einem Enantiomerenüberschuss von 99.7 %.

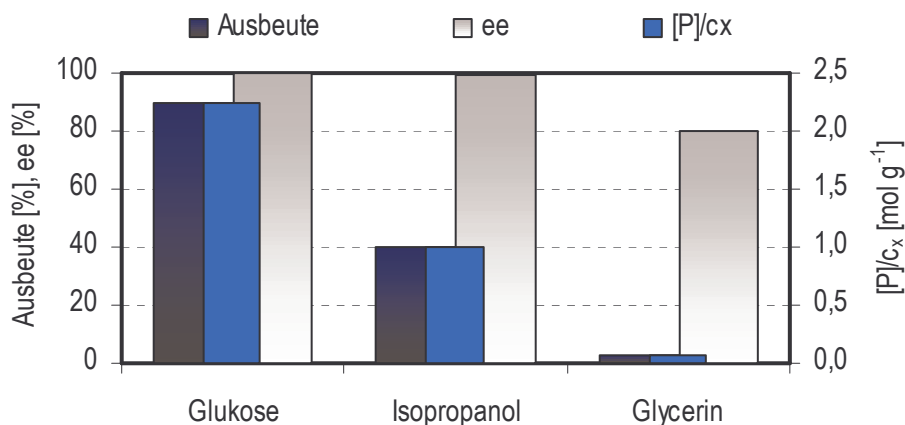


Abb. 5.2-3 Untersuchungen zur Auswahl eines geeigneten Cosubstrats: Vergleich der Ausbeute, des Enantiomerenüberschusses und der spezifischen Produktbildungskapazität mit Glukose, Isopropanol oder Glycerin als Cosubstrat ($c_x = 2 \text{ g L}^{-1}$, 5 mM 4-Cl-AP, Cosubstrat : 4-Cl-AP = 5:1, 0.2 M KPi-Puffer, pH 6.5, 30°C)

Mit Isopropanol als Cosubstrat wird dagegen nach 8 h Umsetzung nur eine Ausbeute von 40 % erreicht. Die spezifische Produktbildungskapazität beträgt dabei 1 mmol g⁻¹. Der Enantiomerenüberschuss liegt bei 99 %. Glycerin hat sich für die Cofaktor-Regenerierung bei *L. kefir* als ungeeignet erwiesen. Nach 8 h wurde lediglich eine Ausbeute von 3 % erreicht. Zusätzlich ist der Enantiomerenüberschuss dieser Biotransformation mit 80 % unzureichend.

Bestimmung des notwendigen Mengenverhältnisses für Glukose

Wird der Pentose-Phosphat-Weg und die anschließende heterofermentative Milchsäuregärung betrachtet, so entstehen bei der Verstoffwechslung eines Glukose-Moleküls 2 Moleküle NADPH. Dies bedeutet, dass für die Cofaktor-Regenerierung pro mol 4-Cl-AP theoretisch nur ein halbes mol Glukose benötigt wird.

Die experimentellen Untersuchungen wurden unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Zusätzlich zu dem bereits untersuchten Mengenverhältnis von 5 : 1 wurden Mengenverhältnisse Glukose : 4-Cl-AP von 2 : 1, 1 : 1 und 1 : 2 untersucht. Die anderen Reaktionsbedingungen sind analog zur oben beschriebenen Versuchsreihe.

Es hat sich gezeigt, dass für alle untersuchten Mengenverhältnisse von Glukose zu 4-Cl-AP eine Ausbeute > 98 % erreicht werden konnte. Werden die Raum-Zeit-Ausbeuten betrachtet (siehe Tabelle 5.2-1), so ist zu erkennen, dass die Produktbildungsrate mit geringer werdendem Glukose-Überschuss abnimmt. Der theoretische Glukose-Bedarf für die Cofaktor-Regenerierung kann mit einem Verhältnis von 1 : 2 erfüllt werden. Um auch hohe Produktbildungsraten zu erzielen, ist der Einsatz eines Mengenverhältnisses Glukose zu 4-Cl-AP von 2 : 1 von Vorteil.

Tabelle 5.2-1 Vergleich der Raum-Zeit-Ausbeuten für verschiedene Glukose zu Edukt Mengenverhältnisse ($c_x = 2 \text{ g L}^{-1}$, 5 mM 4-Cl-AP, 0.2 M KPi-Puffer, pH 6.5, 30°C)

Glukose : 4-Cl-AP	Raum-Zeit-Ausbeute [mmol L ⁻¹ h ⁻¹]
5 : 1	2.57
2 : 1	2.46
1 : 1	1.98
1 : 2	1.82

Untersuchungen zur Nebenproduktbildung

Mit Glukose als Cosubstrat wurden Untersuchungen zum Glukoseverbrauch und zur Nebenproduktbildung unter aeroben und anaeroben Bedingungen durchgeführt. Unter anaeroben Bedingungen werden pro Molekül verstoffwechselter Glukose theoretisch ein mol Lactat, ein mol Ethanol und ein mol CO₂ gebildet. Liegt Sauerstoff als Elektronenakzeptor vor, so wird vermehrt Acetat und Wasserstoffperoxid gebildet (siehe Kapitel 3.9.1). In Tabelle 5.2-2 wird die Nebenproduktbildung bei der Umsetzung von 5 mM 4-Cl-AP unter aeroben und anaeroben Bedingungen vergleichend dargestellt.

Es ist zu erkennen, dass unter anaeroben Bedingungen nur soviel Glukose verbraucht wird, wie für die Cofaktor-Regenerierung bei der Umsetzung von 5 mM 4-Cl-AP benötigt wird. Unter aeroben Bedingungen wird dagegen während der Umsetzung mehr Glukose verbraucht als eigentlich für die Cofaktor-Regenerierung benötigt. Unter diesen Bedingungen ist wie erwartet eine verstärkte Acetat-Bildung zu beobachten. Des Weiteren konnte unter aeroben Bedingungen eine Wasserstoffperoxidbildung

festgestellt werden. Da Lactobacillen keine Katalase besitzen, wäre eine Akkumulation von Peroxid im Medium inhibierend auf die Biokatalysator-Aktivität. Als starkes Oxidationsmittel kann Peroxid sowohl die LK-ADH₁ denaturieren, sowie das bereits gebildete Produkt wieder zu 4-Cl-AP oxidieren.

Tabelle 5.2-2 Vergleich Nebenproduktbildung unter aeroben und anaeroben Bedingungen bei Einsatz von Glukose als Cosubstrat

	Anaerob	Aerob
Glukoseverbrauch	~ 2.5 – 3 mM	~ 5 mM
Lactatbildung	1 mM	1.5 - 2 mM
Acetatbildung	2 mM	~ 4 - 4.5 mM
Ethanolbildung	0 mM	0 mM
Wasserstoffperoxidbildung	0.5 mM	1.5 mM

Eine Ethanol-Bildung konnte unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht gemessen werden. Bei der HPLC-Analyse von Biotransformationen mit höheren Eduktskonzentrationen konnte Ethanol jedoch nachgewiesen werden.

Untersuchungen zum Einfluss der Metabolite Lactat und Acetat auf die Biotransformation

Um Inhibierungseffekte durch die bei der Cofaktor-Regenerierung gebildeten Metabolite abschätzen zu können, wurden Ansätze mit 3 g L⁻¹ *L. kefir* mit verschiedenen Konzentrationen von jeweils Lactat und Acetat versehen und die Biotransformation von 5 mM 4-Cl-AP untersucht. Die untersuchten Lactat-Konzentrationen betragen 10, 50, 100 und 150 mM; die Acetat-Konzentrationen 20, 100, 200 und 300 mM.

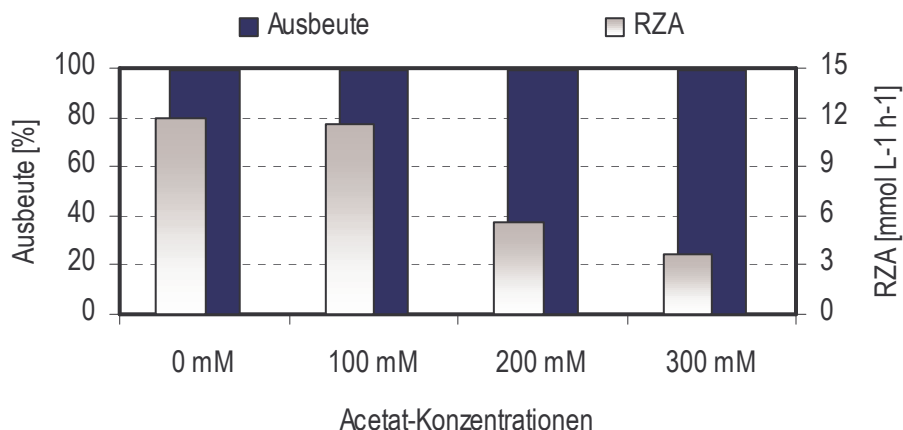


Abb. 5.2-4 Einfluss des Stoffwechselprodukts Acetat auf die Synthese von 1-(R)-(4-Cl-Phenyl)-Ethanol ($c_x = 3 \text{ g L}^{-1}$, 5 mM 4-Cl-AP, 10 mM Glukose, 0.2 M KPi-Puffer, pH 6.5, 30°C)

Für die untersuchten Lactat-Konzentrationen konnte kein Einfluss auf die Biotransformation festgestellt werden. Die erreichten Ausbeuten lagen bei allen Ansätzen bei 99 %, bei einer Raum-Zeit-Ausbeute um $7.6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Diese Ausbeute konnte ebenfalls für alle Ansätze mit Acetat gemessen werden, jedoch war bei der Acetat-Konzentration von 200 mM eine Abnahme der Raum-Zeit-Ausbeute zu verzeichnen (Abb. 5.2-4). Betrug die Raum-Zeit-Ausbeute im Ansatz mit 100 mM Acetat noch $11.6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, so liegt diese bei Inkubation in 200 mM Acetat nur noch bei $5.6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und bei dem Ansatz mit 300 mM Acetat bei $3.7 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Höhere Acetat-Konzentrationen scheinen die Reaktion also zu verlangsamen, diese jedoch nicht vollständig zu inhibieren.

5.2.3 Inhibierung durch 1-(R)-(4-Cl-Phenyl)-Ethanol

Wird Glukose als Cosubstrat verwendet, so wurde eine von der eingesetzten Biokatalysatormenge abhängige, irreversible Hemmung der Umsetzung festgestellt. In der anfänglichen Umsetzungsphase können zwar hohe Umsatzraten verzeichnet werden, nach Erreichen einer bestimmten Produktkonzentration kommt es jedoch zu einem Ende der Reaktion. Die erreichbare Produktkonzentration ist dabei von der Zellkonzentration abhängig. Durch den Einsatz von höheren *L. kefir*-Konzentrationen können höhere 1-(R)-4-Cl-PE-Konzentrationen erreicht werden, bevor es zu einem Erliegen der Biotransformation kommt. Wird jedoch die spezifische Produktbildungskapazität für die eingesetzten Zellkonzentrationen berechnet, so ist zu erkennen, dass diese mit steigender Biotrockenmassekonzentration abnimmt (Abb. 5.2-5).

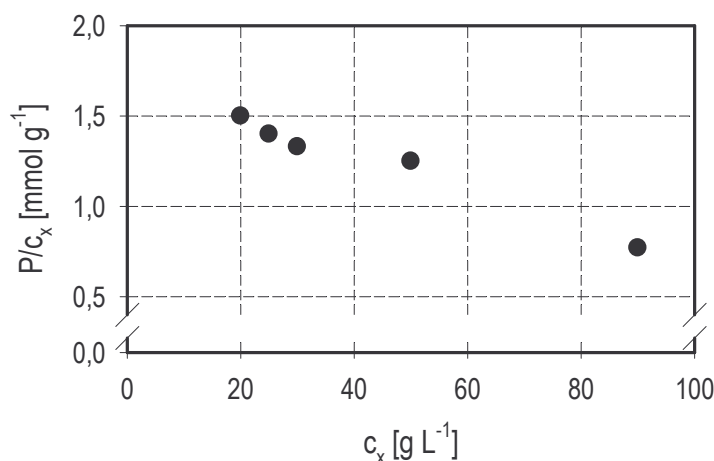


Abb. 5.2-5 Abhängigkeit der spezifischen Produktbildungskapazität von der Zellkonzentration (für eine 4-Cl-AP-Konzentration von 100 mM)

Eine Hemmung durch das gebildete Lactat und Acetat kann bis zu einer Lactat-Konzentration von 150 mM bzw. einer Acetat-Konzentration von 100 mM ausgeschlossen werden. Des Weiteren konnten auch nach Ende der Umsetzung hohe Aktivitäten der LK-ADH₁ nachgewiesen werden.

Um zu untersuchen, ob das Edukt 4-Cl-AP oder das Produkt 1-4-Cl-PE für diese Hemmung der Umsetzung verantwortlich ist, wurden 20 g L⁻¹ Zellen mit verschiedenen 4-Cl-AP- bzw. 1-4-Cl-PE-Konzentrationen im KPi-Umsetzungspuffer für 1 h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden das Edukt bzw. das Produkt von den Zellen abgetrennt. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen anschließend auf ihre Umsetzungsfähigkeit überprüft. Die eingesetzte 4-Cl-AP-Konzentration betrug dabei 40 mM mit einer Glukose-Konzentration von 80 mM.

Für die untersuchten 4-Cl-AP-Konzentrationen von 80 mM und 120 mM zeigte sich keine Verschlechterung des Umsatzes im Vergleich zum Ansatz ohne Edukt-Inkubation. Die eingesetzten 4-Cl-AP-Konzentrationen entsprechen dabei einem Edukt zu Biokatalysator-Verhältnis von 4 mmol g⁻¹ und 6 mmol g⁻¹. Das Edukt beeinträchtigt in diesen hohen Konzentrationen den Biokatalysator nicht. Des Weiteren zeigt dies, dass das Vorliegen des Edukts als zweite organische Phase ebenfalls keinen negativen Einfluss auf die Umsetzungsfähigkeit von *L. kefir* ausübt³. Die 4-Cl-AP-Konzentrationen von 80 mM und 120 mM entsprechen hierbei jeweils einem Phasenanteil von 0.009 und 0.015.

Für die untersuchten 1-4-Cl-PE-Konzentrationen von 20 mM, 40 mM, 80 mM und 120 mM zeigte sich, dass in keinem der Ansätze, die in Produkt vorinkubiert wurden eine Umsetzung des zudosierten 4-Cl-AP stattfand. Die untersuchten Produkt-Konzentrationen entsprechen hierbei einem Produkt zu Biokatalysator-Verhältnis [P]/c_x von 1 mmol g⁻¹ bis 6 mmol g⁻¹. Dieses bedeutet auch, dass ab einer gewissen Produktkonzentration der Biokatalysator irreversibel beschädigt wird, so dass auch eine Produktentfernung keine weitere Umsetzung mehr ermöglichen würde.

Eine Analyse der Glukose-Konzentration zeigte, dass korrelierend zum Umsetzungsende keine Abnahme der Glukose-Konzentration mehr zu verzeichnen war. In Abb. 5.2-6 sind die Konzentrationsverläufe für eine Biotransformation mit 50 g L⁻¹ *L. kefir* exemplarisch dargestellt. Die eingesetzte 4-Cl-AP-Konzentration betrug hierbei 150 mM und die Glukose-Konzentration 200 mM. Die Umsetzung wurde im gerührten Reaktionssystem mit einem Reaktionsvolumen von 15 mL ohne zusätzliche Stickstoff-Überlagerung durchgeführt.

Aus den Konzentrationsverläufen ist zu entnehmen, dass die Umsetzung nach 3 – 4 h zum Erliegen kam. Es wurde eine 1-(R)-4-Cl-PE-Konzentration von 58.5 mM erreicht. Dieses entspricht einer Ausbeute von 39 %. Der erreichte Enantiomerenüberschuss der Biotransformation betrug 99.5 %. Aus dem Konzentrationsverlauf von 4-Cl-AP kann kein genauer Zeitpunkt für das Ende der Umsetzung bestimmt werden, da die

³ Es ist zu beachten, dass zur Vereinfachung der Massenbilanzierung die Mengenangabe für 4-Cl-AP und 1-4-Cl-PE als Konzentration (in mM) erfolgt. Bedingt durch die geringen Löslichkeiten in wässrigen Systemen liegen jedoch beide bei Mengen oberhalb der Löslichkeitsgrenze als zweite Phase vor. Die korrekte Mengenangabe wäre in diesem Fall der Phasenanteil (ϕ_v). Zur Übersicht wird dieser im Fall der Biotransformationen mit einer zweiten Edukt- oder Produkt-Phase zusätzlich angegeben. Dieses gilt ebenfalls für die in den späteren Kapiteln behandelten Edukte und Produkte. Die Löslichkeitsdaten sind hierbei dem Anhang B-I zu entnehmen. Für 4-Cl-AP beträgt die Löslichkeit in Wasser 7.7 mM. Die Löslichkeit von 1-4-Cl-PE beträgt 9 mM

Konzentrationschwankungen zu hoch sind. Die Schwankungen der Edukt- und Produktkonzentrationen sind durch die Schwierigkeiten einer homogenen Probenahme im Zwei-Phasen-System gegeben. Die Konzentrationen von Edukt und Produkt befinden sich hierbei weit oberhalb der Löslichkeitsgrenze, so dass beide als zweite Phase vorliegen.

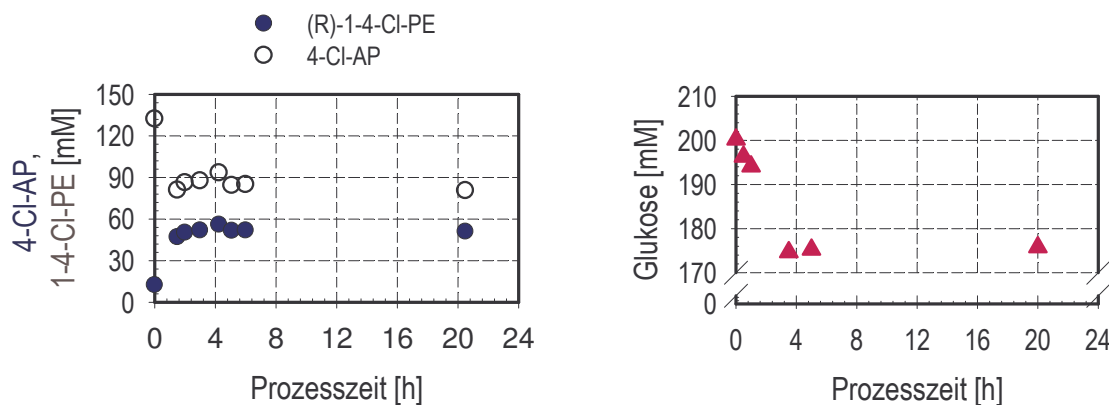


Abb. 5.2-6 Exemplarischer Verlauf der 4-Cl-AP-, 1-(R)-4-Cl-PE- und Glukose-Konzentration für eine 4-Cl-AP-Biotransformation mit Produktinhibierung ($c_x = 50 \text{ g L}^{-1}$, 150 mM 4-Cl-AP, 200 mM Glukose, 0.2 M KPi-Puffer, pH 6.5, 30°C)

Wird die Deaktivierungskonstante k_1 des Biokatalysators für diese Umsetzung berechnet, so beträgt diese 3.2 h^{-1} . Die daraus resultierende Halbwertszeit des Biokatalysators beträgt 0.22 h.

Um zu untersuchen, welche Art der Inhibierung vorliegt, wurde der Einfluss einer externen Cofaktor-Zugabe untersucht. Hierbei wurde die oxidierte Form des benötigten Cofaktors NADP^+ verwendet. Dabei wurden 3 verschiedene NADP^+ -Konzentrationen von 0.1 mM, 0.2 mM und 0.5 mM untersucht. Die Zudosierung des NADP^+ erfolgt jeweils 3 mal zu den Zeitpunkten 0 h, 2 h und 4 h. Grund dafür ist die bekannte Instabilität von NADP^+ in Puffersystemen (siehe Kapitel 3.6.3). Die verwendete *L. kefir*-Konzentration beträgt 1.5 g L^{-1} bei einer 4-Cl-AP-Ausgangskonzentration von 10 mM und einer Glukose-Konzentration von 20 mM.

Die erzielten Ausbeuten der Ansätze mit NADP-Zudosierung werden in Abb. 5.2-7 der Ausbeute des Ansatzes ohne NADP gegenübergestellt. Auf den ersten Blick scheint dabei die Cofaktor-Zugabe die Umsetzung zu unterstützen, wobei ein Optimum für die untersuchte NADP-Konzentration von 0.1 mM zu verzeichnen ist. Durch Zudosierung von 0.1 mM NADP konnte die Ausbeute gegenüber dem Ansatz ohne NADP-Zugabe um den Faktor 1.8 auf 91 % gesteigert werden. Die Steigerung der Ausbeute konnte jedoch nur nach der ersten NADP-Zugabe beobachtet werden. Bei allen Ansätzen wurde hierbei nach 2 h das Ende der Umsetzung erreicht. Die zweite und dritte NADP-Zudosierung bewirkten keine Weiterreaktion. Dieses ist in der Abnahme der Wechselzahl (t_{tn}) für die einzelnen Zudosierungszeitpunkte zu erkennen. Dabei wurde bei der Berechnung der Wechselzahl die gebildete 1-(R)-4-Cl-PE-Konzentration auf die Gesamtkonzentration des zudosierten NADP zu den jeweiligen Zeitpunkten bezogen.

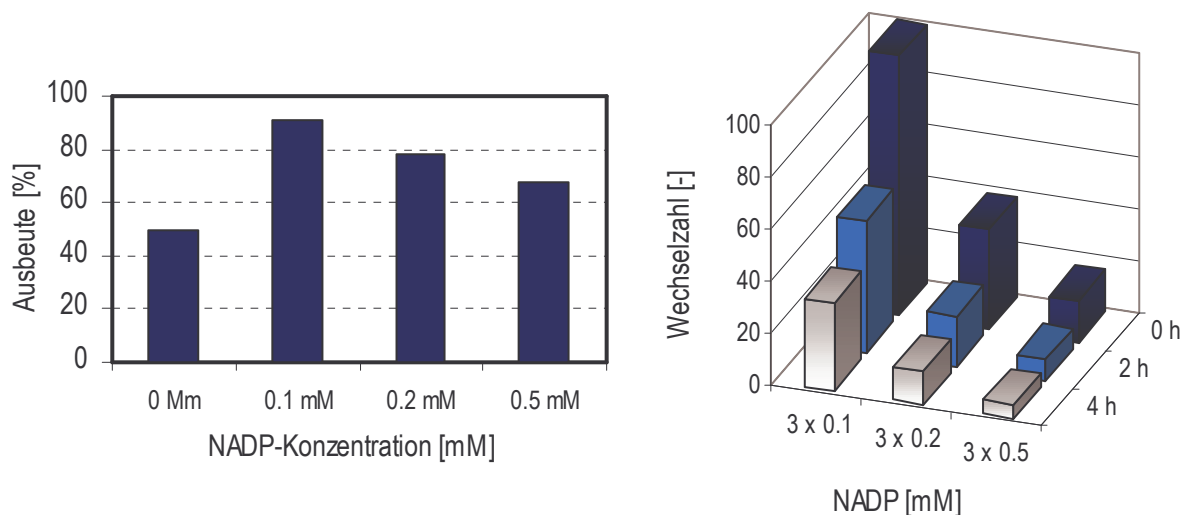


Abb. 5.2-7 Einfluss einer mehrfachen NADP-Zudosierung auf die 1-(R)-4-Cl-PE-Synthese für verschiedene NADP-Konzentrationen: Ausbeute und Wechselzahl (*t_{tn}*) ($c_x = 1.5 \text{ g L}^{-1}$, 10 mM 4-Cl-AP, 20 mM Glukose, 0.2 M KPi-Puffer, pH 6.5, 30°C)

Diskussion

Es konnte eine Hemmung der 4-Cl-AP-Reduktion mit *L. kefir* durch das entstehende Produkt 1-(R)-4-Cl-PE festgestellt werden. Diese entspricht jedoch nicht einer klassischen Enzyminhibierung der LK-ADH₁, da in diesem Fall die Inhibierung allein von der Produktkonzentration abhängig sein muss und unabhängig von der eingesetzten Biokatalysatorkonzentration. Die vorliegende Hemmung ist jedoch von der eingesetzten Biokatalysatormenge abhängig. Durch den Einsatz höherer Zellkonzentrationen können höhere 1-(R)-4-Cl-PE-Konzentrationen erreicht werden. Die kritische Produkt-Grenzkonzentration nimmt also mit steigender Zellkonzentration zu. Die spezifische Produktbildungskapazität nimmt jedoch mit steigender Zellkonzentration ab.

Die Beobachtung, dass zeitgleich zum Erliegen der Umsetzung keine Glukose-Verwertung mehr beobachtet wird, ist ein Indiz dafür, dass die Cofaktor-Regenerierungskette unterbrochen sein könnte. Dieses kann sowohl den Glukose-Transport durch die Zellmembran, als auch ein oder mehrere Enzyme des 6-Phosphoglukonat-/Phosphoketolase-Weges betreffen. Diese Hypothese wird von der Tatsache unterstützt, dass nach Eintreten der Umsetzungsinhibierung auch eine Zugabe der oxidierten Stufe des Cofaktors NADP⁺ keine Weiterreaktion hervorruft.

Der Glukose-Transport bei Milchsäurebakterien kann über zwei Wege verlaufen, entweder über ein Permease-System oder ein Phosphotransferase-System (siehe Kapitel 3.9.3). Beide Transportmechanismen haben gemeinsam, dass an dem Glukose-Transport Enzyme bzw. eine Enzymkaskade beteiligt sind. Lagert sich das Produkt 1-(R)-4-Cl-PE in der Zellmembran ein, so können dadurch membrangebundene oder membran-nahe Transportproteine in ihrer Funktion beeinträchtigt sein. Dieser Mechanismus könnte auch die Biotrockenmasseabhängigkeit der Inhibierung erklären, da hier eine

Produktkonzentrationen proportional zur Zellkonzentration benötigt wird, um die kritische Membrankonzentration zu überschreiten.

Eine weitere Möglichkeit wäre eine irreversible Inhibierung bzw. Denaturierung einer oder mehrerer Enzyme des Regenerierungsweges. Eine Methode zur reproduzierbaren Messung der kollektiven Aktivität der Regenerierungsenzyme über Glukose konnte jedoch nicht etabliert werden. Daher ist es nicht möglich, eine definitive Aussage über den Inhibierungsmechanismus zu treffen.

Sollte die Umsetzungskapazität der Zellen durch eine Produktabtrennung erhöht werden, so müsste dieses bereits für sehr geringe Produktkonzentrationen geschehen, was technisch sehr aufwendig ist.

Des Weiteren wurde eine Biokatalysator-Konzentration von 50 g L^{-1} für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Bedingt durch die Zellkonzentrationsabhängigkeit der 1-(R)-4-Cl-PE-Synthese, ist die Einhaltung einer definierten Zellkonzentration wichtig. Die Biokatalysator-Konzentration wurde ausgewählt, da bei dieser Konzentration sowohl hohe 1-(R)-4-Cl-PE-Konzentrationen erreicht werden können, als auch noch eine gute Ausschöpfung der Biokatalysatorkapazität gegeben ist.

5.2.4 Untersuchungen zum Einfluss von Löslichkeitsvermittlern und organischen Lösungsmitteln

Organische Lösungsmittel und Löslichkeitsvermittler werden bei Biotransformationen schlecht wasserlöslicher Edukte oftmals eingesetzt, um die Eduktlöslichkeit zu erhöhen (siehe Kapitel 3.7.1 und 3.7.3). Eine weitere Anwendung ist jedoch auch die Erhöhung der Durchgängigkeit der Zellmembran, um einen Transport von Edukt, Produkt bzw. anderen benötigten Komponenten für die Biotransformation durch die Membran zu erhöhen [van der Werf et al., 1995; Liu et al., 1999].

Neben einer Reihe verschiedener primärer und sekundärer Alkohole unterschiedlicher Kettenlänge wurde der Einfluss verschiedener Detergentien, wie z.B. Dimethylsulfoxid (DMSO) und Triton X-100 und verschiedener organischer Lösungsmittel, wie z.B. Diethylether, Toluol, einem Ethanol/Toluol-Gemisch, Butyl-Acetat und Ethyl-Acetat auf die 1-(R)-4-Cl-PE-Synthese untersucht.

Die Untersuchungsreihe zum Alkoholeinfluss auf die Umsetzung erfolgte im geschüttelten Reaktionssystem im $400 \mu\text{L}$ Maßstab bei einer Schüttelfrequenz von 1400 min^{-1} (siehe Kapitel 4.6.1). Die verwendete *L. kefir*-Konzentration betrug 50 g L^{-1} . Es wurden 150 mM 4-Cl-AP ($\phi_{V,4-Cl-AP} = 0.019$) und 200 mM Glukose eingesetzt. Für alle Alkohole wurde ein Volumenanteil von 20% v/v verwendet. In Abb. 5.2-8 sind die spezifischen Produktbildungskapazitäten der Ansätze mit Alkohol normiert auf den Referenzansatz ohne Alkoholzugabe dargestellt. Die Alkohole werden dabei in primäre und sekundäre Alkohole aufgeteilt. Zusätzlich sind noch die Verteilungskonstanten in *n*-Octanol und Wasser $\log P_{o/w}$ für die jeweiligen Alkohole aufgelistet.

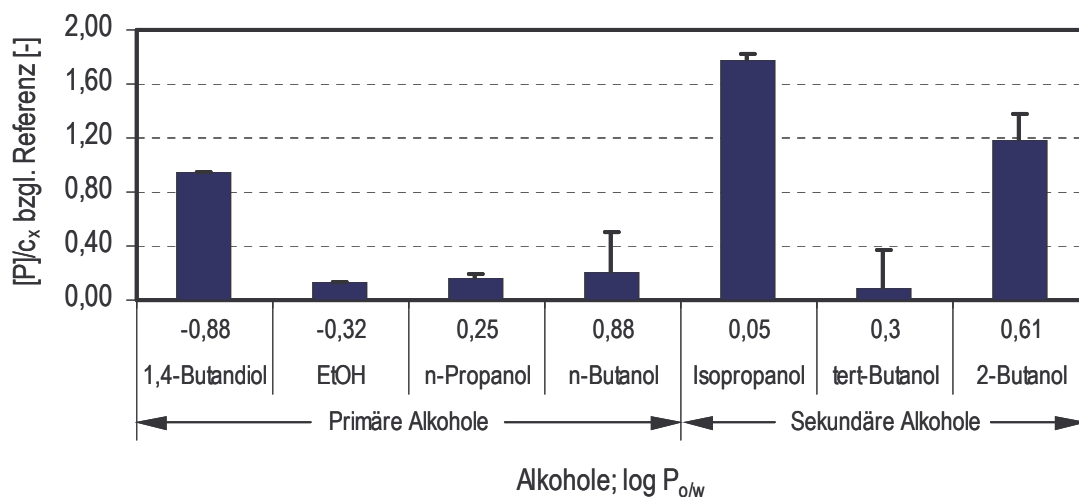


Abb. 5.2-8 Einfluss verschiedener Alkohole auf die spezifische Produktbildungskapazität der 4-Cl-AP-Umsetzung ($c_x = 50 \text{ g L}^{-1}$, 150 mM 4-Cl-AP, 200 mM Glukose, 0,2 M KPi-Puffer, pH 6,5, 30°C, 400 μL Reaktionsvolumen im Thermomixer)

Es ist zu erkennen, dass lediglich die Zugabe der beiden sekundären Alkohole Isopropanol und 2-Butanol eine Verbesserung der spezifischen Produktbildungskapazität bezüglich des Referenzansatzes hervorruft. Die spezifische Produktbildungskapazität des Referenzansatzes beträgt hierbei 1.17 mmol g^{-1} . Durch die Zugabe von Isopropanol kann diese auf 2.1 mmol g^{-1} und durch die Zugabe von 2-Butanol auf 1.39 mmol g^{-1} verbessert werden. Bei keinem der Ansätze mit Zugabe eines primären Alkohols konnte eine Verbesserung gegenüber der Referenz erzielt werden. Bei den Ansätzen mit Ethanol, n-Propanol und n-Butanol, sowie auch bei dem Ansatz mit *tert*-Butanol wurde die Umsetzung durch die Alkohol-Zugabe deutlich verschlechtert.

Die Ergebnisse für die Detergentien und organische Lösungsmittel sind in Abb. 5.2-9 dargestellt.

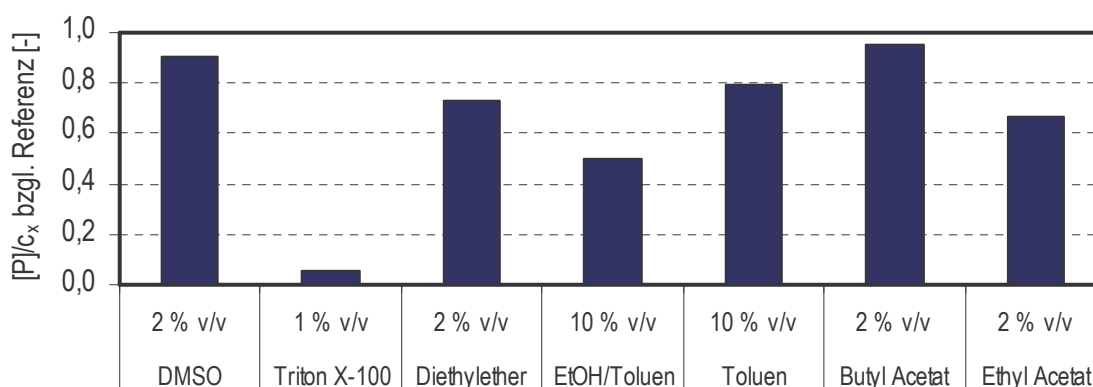


Abb. 5.2-9 Einfluss von Detergentien und organischen Lösungsmitteln auf die spezifische Produktbildungskapazität bei der 4-Cl-AP-Umsetzung ($c_x = 50 \text{ g L}^{-1}$, 150 mM 4-Cl-AP, 200 mM Glukose, 0,2 M KPi-Puffer, pH 6,5, 30°C, 400 μL Reaktionsvolumen im Thermomixer)

Die Umsetzungsbedingungen sind analog zur Untersuchungsreihe mit den Alkoholen. Die verwendeten Konzentrationen wurden der Literatur entnommen und sind in der Abbildung aufgelistet. Auch hier sind die aufgetragenen spezifischen Produktbildungskapazitäten auf einen Referenzansatz normiert. Es ist erkennbar, dass durch keines der Detergentien bzw. organischen Lösungsmittel eine Verbesserung der Umsetzung erreicht werden kann. Der Einsatz von Triton X-100 hat sich hierbei als stark hemmend gezeigt. Hier betrug die spezifische Produktbildungskapazität lediglich 0.06 bezogen auf den Referenzansatz.

Für exemplarische Vertreter der untersuchten Substanzklassen wurde der Einfluss auf die Membranintegrität bestimmt. Die Membranintegrität wird hierbei über die Membrandurchlässigkeit für zwei unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe bestimmt (siehe Kapitel 4.8.3). Der grüne Farbstoff SYTO 9 kann dabei in alle Zellen einer Probe eindringen, während der rote Farbstoff Propidium Iodid nur in Zellen mit beschädigter Membran eindringen kann. Zellen mit einer verringerten Membranintegrität nehmen also verstärkt den roten Fluoreszenzfarbstoff auf. Über das Verhältnis der gemessenen Emissionen der beiden Farbstoffe kann eine Aussage über die Membranintegrität getroffen werden. Die Referenz-Membranintegrität (100 %) wird hierbei für in physiologischer Kochsalzlösung suspendierte Zellen bestimmt.

Für die Untersuchungen wurden 50 g L^{-1} *L. kefir* für 4 h mit der jeweiligen Substanz im geschüttelten Ansatz inkubiert. Als Referenz diente ein Ansatz, welcher für den gleichen Zeitraum in KPi-Umsetzungspuffer (0.2 M, pH 6.5) inkubiert wurde. Für Isopropanol und n-Propanol wurde hierbei der Einfluss bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen untersucht. Die gemessenen Membranintegritäten nach 4 h sind in Abb. 5.2-10 dargestellt.

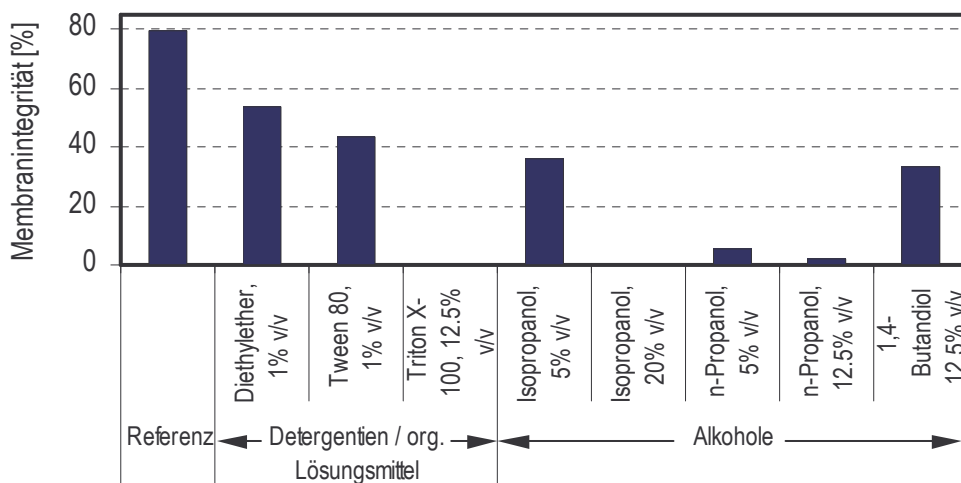


Abb. 5.2-10 Einfluss der Detergentien, organischen Lösungsmittel bzw. Alkohole auf die Membranintegrität

Bei Betrachtung der nach 4 h ermittelten Membranintegritäten ist zu erkennen, dass alle untersuchten Substanzen eine Verringerung der Membranintegrität hervorrufen. Dieses ist vor allem für Triton X-100, n-Propanol und Isopropanol mit 20 % v/v zu verzeichnen. Für Isopropanol konnte eine Abhängigkeit von der eingesetzten

Isopropanol-Konzentration festgestellt werden. Konnte für den Ansatz mit 5 % v/v Isopropanol eine Membranintegrität von 35 % gemessen werden, so lag die Membranintegrität bei 20 % v/v Isopropanol nicht mehr im Messbereich der verwendeten Messmethode.

Diskussion

Die Untersuchung der Membranintegrität zeigte eine Beeinträchtigung der Membranintegrität durch ausgesuchte Vertreter der Substanzklassen. Im Fall von Triton X-100 und n-Propanol, welche den stärksten Verlust der Membranintegrität verursachen, korreliert dieser mit schlechten Umsetzungskapazitäten bezogen auf den Referenzansatz.

Eine Verbesserung der 1-(R)-4-Cl-PE-Synthese mit *L. kefir* konnte für die untersuchten Substanzen nur bei den Ansätzen mit Isopropanol- und 2-Butanol-Zugabe erzielt werden. Bei Isopropanol ist dabei die Verbesserung trotz der starken Beeinträchtigung der Membranintegrität bei 20 % v/v Isopropanol zu erreichen. Werden hier die Produktbildungskapazitäten für die primären und sekundären Alkohole verglichen, so ist zu erkennen, dass durch keines der primären Alkohole eine Steigerung der Umsetzung zu beobachten ist. Wird argumentiert, dass die Steigerung der Produktbildungskapazität durch Isopropanol und 2-Butanol aus ihrer Wirkung als Löslichkeitsvermittler resultieren, so müsste diese Wirkung für alle untersuchten Alkohole im ähnlichen Größenordnungsbereich liegen.

Wie bereits erwähnt besitzt LK-ADH₁ die Fähigkeit zur substratgekoppelten Cofaktor-Regenerierung. Da sie für Reduktionsreaktionen Ketone als Edukt erkennt, benötigt sie in Umkehrung sekundäre Alkohole als Cosubstrat für diese Reaktion. Es ist daher zu vermuten, dass Isopropanol und 2-Butanol aufgrund ihrer Funktion als zusätzliches Cosubstrat zu einer Umsetzungssteigerung führen.

5.2.5 Einsatz von Isopropanol als zweites Cosubstrat

In Abb. 5.2-11 sind Konzentrationsverläufe für 4-Cl-AP und 1-(R)-4-Cl-PE vergleichend für einen Ansatz mit Glukose als Cosubstrat (Abb. 5.2-11 A) und für einen Ansatz mit 20 % v/v Isopropanol als zweites Cosubstrat (Abb. 5.2-11 B) dargestellt. In Tabelle 5.2-3 sind die Ergebnisse beider Umsetzungen zusammengefasst. Es ist zum einen erkennbar, dass die Umsetzungsgeschwindigkeit durch die Zugabe von Isopropanol um den Faktor 2 gesteigert werden kann. Die Raum-Zeit-Ausbeute am Anfang der Reaktion (zwischen 0 h und 1 h) beträgt beim Ansatz mit Isopropanol 69.3 mmol L⁻¹ h⁻¹ und ist somit um den Faktor 2.2 größer als beim Referenzansatz. Des Weiteren kann durch die Zugabe von Isopropanol eine um den Faktor 2.3 höhere 1-(R)-4-Cl-PE-Konzentration von 121 mM erreicht werden (entspricht einem Phasenanteil von 0.015). Die spezifische Produktbildungskapazität konnte somit von 1.0 mmol g⁻¹ auf 2.4 mmol g⁻¹ verbessert werden. Bei einem Vergleich der beiden Umsetzungen fällt jedoch auf, dass auch beim Einsatz von Isopropanol keine 100 %-ige Ausbeute erreicht wird.

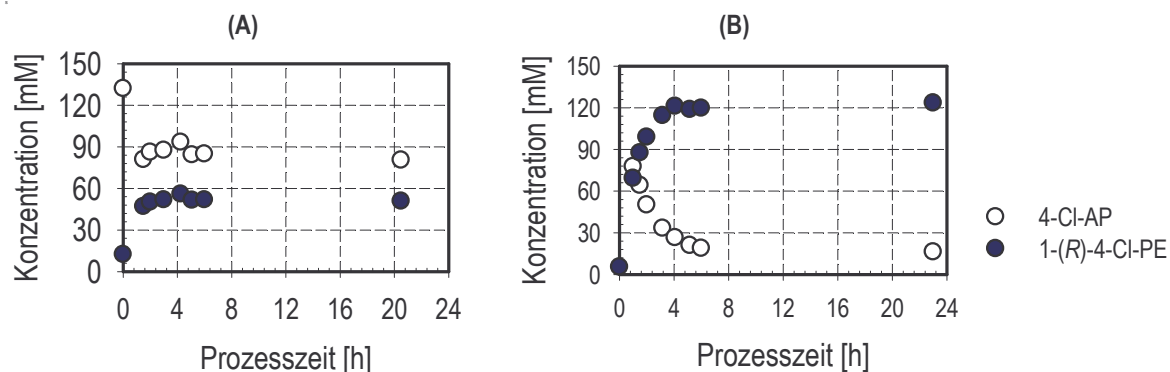


Abb. 5.2-11 Vergleich der 4-Cl-AP- und 1-(R)-4-Cl-PE- Konzentrationsverläufe für einen Ansatz mit Glukose als Cosubstrat (A) und einen Ansatz mit Glukose und 20 % v/v Isopropanol als Cosubstrate (B) ($c_x = 50 \text{ g L}^{-1}$, 150 mM 4-Cl-AP, 200 mM Glukose, 0.2 M KPi-Puffer, pH 6.5, 30°C, gerührte Blasensäule, 0.54 kW m^{-3} , keine zusätzliche Stickstoffüberlagerung)

Tabelle 5.2-3 Vergleich der Ergebnisse für Glukose als Cosubstrat und für Glukose und Isopropanol als Cosubstrat

	Glukose	Glukose + Isopropanol
1-(R)-4-Cl-PE [mM]	52	121
Ausbeute [%]	37 (nach 3 h)	81.5 (nach 4h)
[P]/ c_x [mmol g ⁻¹]	1.0	2.4
RZA _{max} [mmol L ⁻¹ h ⁻¹]	31.3	69.3
RZA [mmol L ⁻¹ h ⁻¹]	17.3	29.7
ee [%]	99.5	97.6

Untersuchungen mit Variation der Isopropanol-Konzentration zeigen eine Abhängigkeit der Produktbildung von der Isopropanol-Konzentration. Mit zunehmender Isopropanol-Konzentration steigt hierbei die Ausbeute. In Abb. 5.2-12 sind die Ergebnisse der Versuchsreihe für eine 4-Cl-AP-Konzentration von 150 mM vergleichend dargestellt. Werden die spezifische Produktbildungskapazität (Abb. 5.2-12 B) und die erreichten 1-(R)-4-Cl-PE-Konzentrationen (Abb. 5.2-12 C) betrachtet, so ist die Verbesserung der Umsetzung mit steigender Isopropanol-Konzentration deutlich zu erkennen. Bei Einsatz von 30 % v/v Isopropanol konnte die spezifische Produktbildung um den Faktor 2.3 gegenüber der Referenz gesteigert werden. Die erreichte 1-(R)-4-Cl-PE-Konzentration beträgt hierbei 130 mM ($\phi_{V,1-4-Cl-PE} = 0.016$). Die Tendenz ist bei der Ausbeute (Abb. 5.2-12 A) nur bis zu einer Isopropanol-Konzentration von 20 % v/v deutlich zu erkennen. Dieses liegt jedoch an Abweichungen der eingesetzten *L. kefir*-Konzentration, sowie an leichten Abweichungen in der 4-Cl-AP-Ausgangskonzentration.

Ein Nachteil beim Einsatz von Isopropanol ist die Abnahme des Enantiomerenüberschusses auf Werte zwischen 94.7 % bis 96.8 % (Abb. 5.2-12 D).

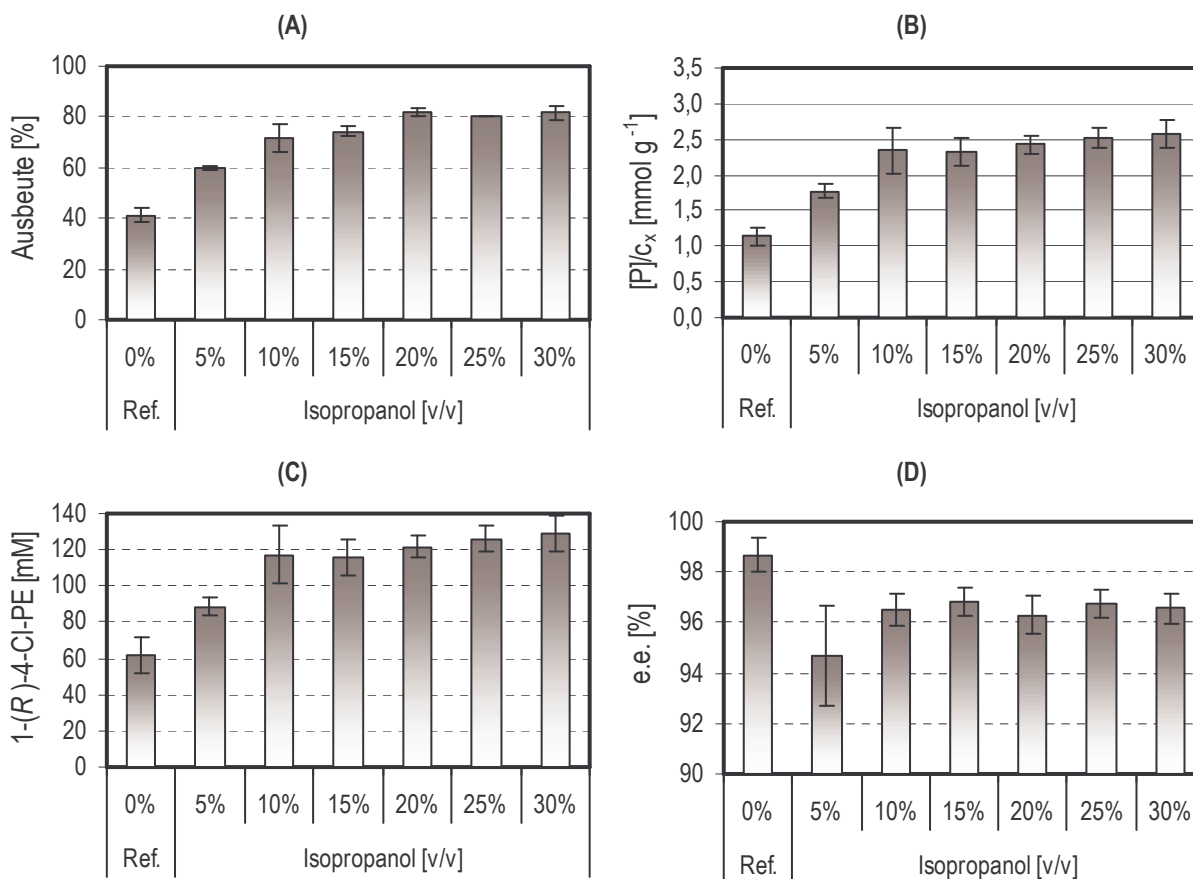


Abb. 5.2-12 Abhängigkeit von: (A) Ausbeute, (B) spezifischer Produktbildungskapazität, (C) 1-(R)-4-Cl-PE-Endkonzentration und (D) ee von der Isopropanol-Konzentration bei Einsatz von Isopropanol als zweites Cosubstrat neben Glukose ($c_x = 50 \text{ g L}^{-1}$, 150 mM 4-Cl-AP, 200 mM Glukose, 0.2 M KPi-Puffer, pH 6.5, 30°C, 5 h Reaktionsdauer, 400 μL Reaktionsvolumen im Thermomixer, 1400 min^{-1})

Des Weiteren wurde der Einfluss der beiden Cosubstrate Isopropanol und Glukose auf die LK-ADH₁-Stabilität unter anaeroben Bedingungen untersucht. Dafür wurden 3 g L⁻¹ Zellen für den untersuchten Zeitraum mit 2 % v/v Isopropanol bzw. 20 mM Glukose inkubiert. In Abb. 5.2-13 ist zu erkennen, dass durch beide Cosubstrate eine Abnahme der LK-ADH₁-Aktivität zu verzeichnen ist. Die Abnahme ist im Fall von Isopropanol stärker als bei Glukose. Nach einer Inkubationszeit von 29 h sind hierbei nur ~40 % der Ausgangsaktivität vorhanden. Hierbei kann nicht unterschieden werden, inwiefern die Abnahme der Aktivitäten durch das Cosubstrat oder die gebildeten Stoffwechselprodukte bedingt ist.

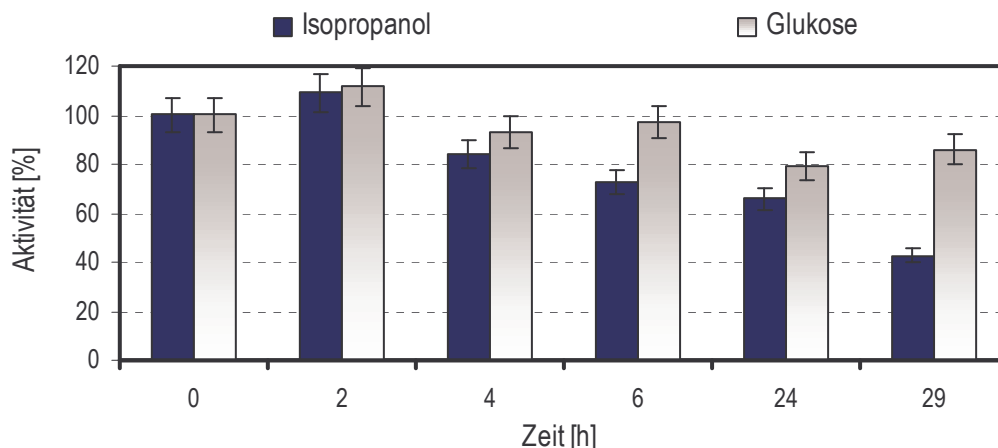


Abb. 5.2-13 Untersuchungen zum Einfluss von Isopropanol und Glukose auf die Stabilität von LK-ADH₁

Diskussion

Beim Einsatz von Isopropanol als zweites Cosubstrat in Kombination mit Glukose kann die produktbedingte Hemmung der 1-4-Cl-PE-Synthese mit *L. kefir* umgangen werden. Diese Tatsache ist ein weiteres Indiz dafür, dass die Cofaktor-Regenerierungskette die Inhibierungsstelle ist. Nicht erklärbar ist, warum beim Einsatz von Isopropanol als alleiniges Cosubstrat deutlich schlechtere Ausbeuten erreicht werden (siehe Kapitel 5.2.2).

Es konnte auch festgestellt werden, dass durch den Einsatz höherer Isopropanol-Konzentrationen, bei gleicher 4-Cl-AP-Ausgangskonzentration, eine höhere Produktbildung erreicht wird. Die 1-(R)-4-Cl-PE-Synthese lässt sich durch Verschiebung des thermodynamischen Gleichgewichts beim Einsatz hoher Isopropanol-Konzentrationen vorantreiben. Dieses konnte bereits bei anderen Biotransformationen mit substratgekoppelter Cofaktor-Regenerierung durch dieselbe LK-ADH₁ und Isopropanol als Cosubstrat festgestellt werden (siehe Kapitel 3.2.2 und Kapitel 3.6.3). Eine andere Alternative zur Gleichgewichtsverschiebung wäre hier die Abtrennung des gebildeten Acetons.

Die Zunahme der Produktbildung mit steigender Isopropanol-Konzentration wurde nur bis zu einem Volumenanteil von 30 % v/v untersucht. Es wird angenommen, dass diese Verbesserung nur bis zu einer begrenzten Isopropanol-Konzentration gegeben ist, da ab einer bestimmten Konzentration der toxische Effekt des Isopropanols oder des gebildeten Acetons auf die Zellmembran oder auf das katalysierende Enzym überwiegen wird.

5.2.6 Einfluss der 4-Cl-Acetophenon-Ausgangskonzentration auf die Umsetzung

Neben der Abhängigkeit der Produktbildung von der Isopropanol-Konzentration konnte eine Abhängigkeit von der Edukt-Ausgangskonzentration festgestellt werden. Mit steigender 4-Cl-AP-Ausgangskonzentration steigt hierbei die Produktbildung, wie in Abb. 5.2-14 am Beispiel der spezifischen Produktbildungskapazität dargestellt. Dabei

ist dieser Effekt sowohl bei den Referenzansätzen ohne Isopropanol, als auch bei den Ansätzen mit Isopropanol als zusätzliches Cosubstrat festzustellen.

So nimmt z.B. bei einer Isopropanol-Konzentration von 20 % v/v die spezifische Produktbildungskapazität von 1.9 mmol g⁻¹ bei 100 mM 4-Cl-AP auf 2.84 mmol g⁻¹ bei 200 mM 4-Cl-AP und auf 4.35 mmol g⁻¹ bei 300 mM 4-Cl-AP zu. Bezogen auf den Referenzansatz bedeutet dies eine um den Faktor 3.7 höhere spezifische Produktbildungskapazität.

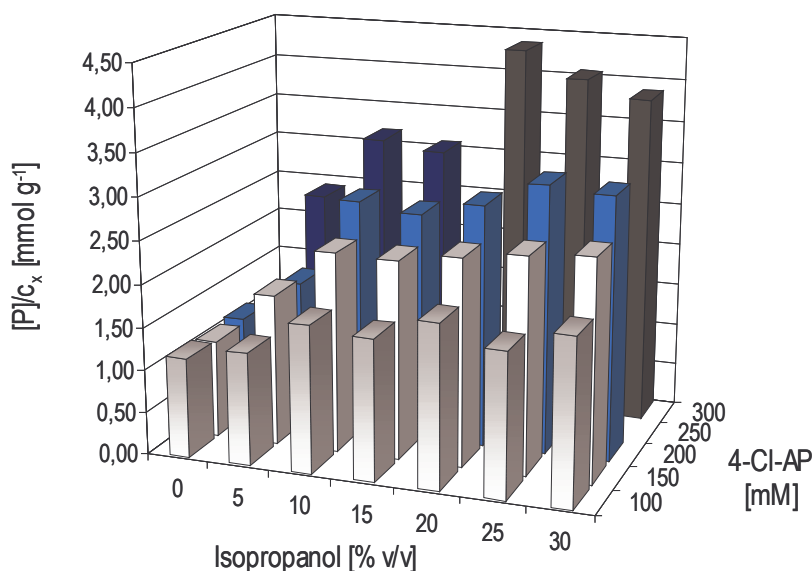


Abb. 5.2-14 Abhängigkeit der spezifischen Produktbildungskapazität von der Isopropanol-Konzentration und der 4-Cl-Acetophenon-Ausgangskonzentration ($c_x = \sim 50 \text{ g L}^{-1}$, 200 mM Glukose, 0.2 M KPi-Puffer, pH 6.5, 30°C, 5 h Reaktionsdauer, 400 μL Reaktionsvolumen im Thermomixer, 1400 min⁻¹)

Die Produktkonzentrationen wurden hierbei für alle Ansätze nach einer Prozesszeit von 5 h ermittelt. Wird also die Produktbildungsgeschwindigkeit betrachtet, bedeutet dies, dass genauso wie bei den Ansätzen mit Isopropanol-Zugabe die anfängliche Raum-Zeit-Ausbeute bei höheren 4-Cl-AP-Konzentration größer sein muss.

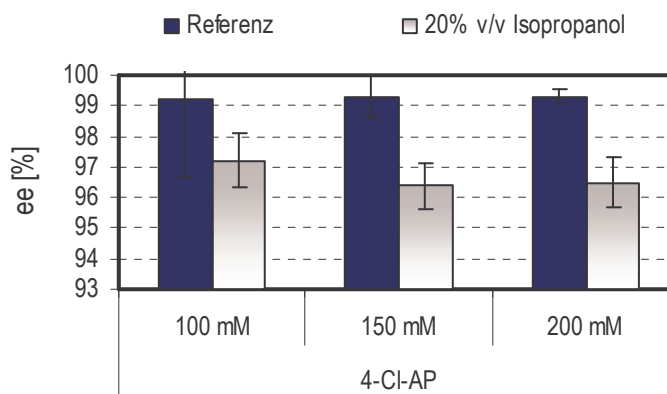


Abb. 5.2-15 Untersuchung zum Einfluss der 4-Cl-AP-Ausgangskonzentration auf den Enantiomerenüberschuss von 1-(R)-4-Cl-PE ($c_x = 50 \text{ g L}^{-1}$, 0 % und 20 % v/v Isopropanol, 200 mM Glukose, 0.2 M KPi-Puffer, pH 6.5, 30°C, 5 h Reaktionsdauer, 400 μL Reaktionsvolumen im Thermomixer, 1400 min⁻¹)

Wird der Enantiomerenüberschuss betrachtet, so ist kein Einfluss der 4-Cl-AP-Ausgangskonzentration zu erkennen. Dieses ist in Abb. 5.2-15 am Beispiel der Referenzansätze und der Versuchsreihe mit 20 % v/v Isopropanol dargestellt.

5.2.7 Einfluss des Leistungseintrags und der Prozesszeit auf den Enantiomerenüberschuss

Die Untersuchungen zum Einfluss des Leistungseintrags auf die 1-(R)-4-Cl-PE-Synthese wurden in der gerührten Blasensäule mit bekanntem Leistungseintrag im 200 mL-Maßstab (siehe Kapitel 4.6.3) und zur Überprüfung im geschüttelten System im 400 μ L-Maßstab (siehe Kapitel 4.6.1) durchgeführt. In Abb. 5.2-16 werden die Ergebnisse für das gerührte Reaktionssystem mit einem Isopropanol-Anteil von 20 % v/v vorgestellt.

Es ist zu erkennen, dass der Enantiomerenüberschuss mit zunehmendem Leistungseintrag abnimmt (Abb. 5.2-16 (A)). Bei einer Erhöhung des Leistungseintrags von 0.54 kW m^{-3} auf 5.4 kW m^{-3} ist z.B. eine Abnahme des Enantiomerenüberschusses um 2 % zu verzeichnen. Der Leistungseintrag hat jedoch keinen Einfluss auf die Produktbildung. Werden die Konzentrationsverläufe für das 1-(R)-4-Cl-PE über die Prozesszeit in Abb. 5.2-16 (B) betrachtet, so ist keine Abhängigkeit vom Leistungseintrag erkennbar.

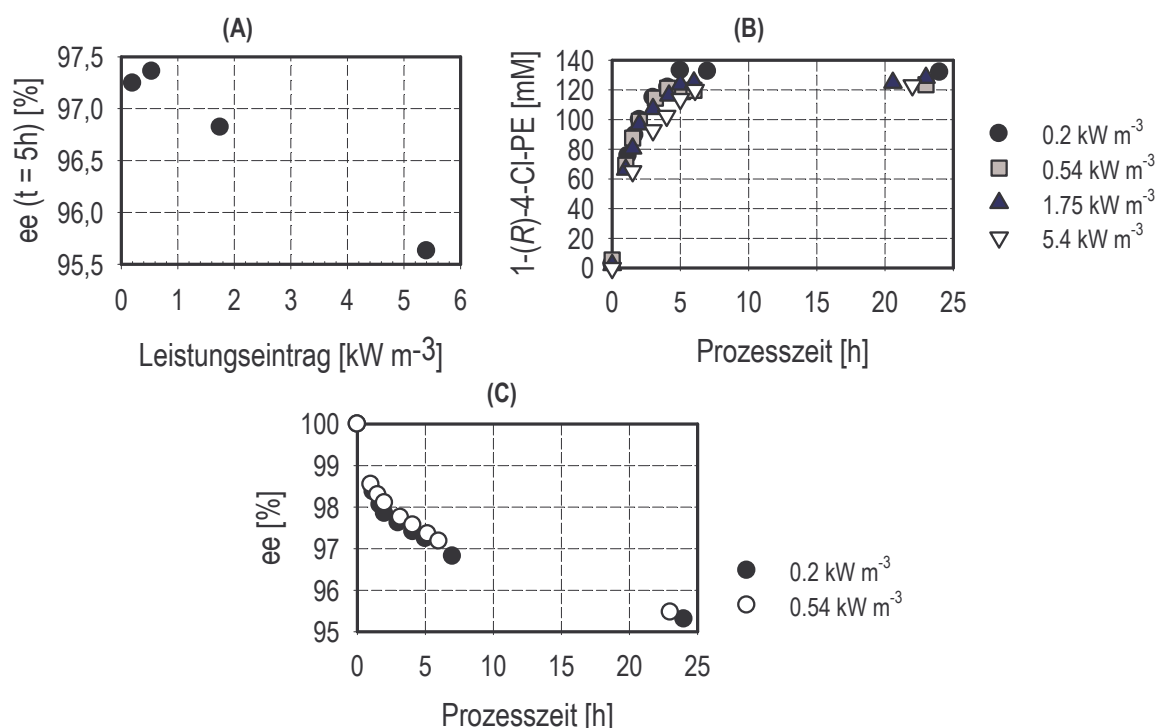


Abb. 5.2-16 Einfluss des Leistungseintrags auf: (A) den Enantiomerenüberschuss und (B) die 1-4-Cl-PE-Bildung, sowie (C) Veränderung des Enantiomerenüberschusses über der Prozesszeit ($c_x = 50 \text{ g L}^{-1}$, 20 % v/v Isopropanol, 200 mM Glukose, 0.2 M KPi-Puffer, pH 6.5, 30°C, 5 h Reaktionsdauer, $V_R = 200 \text{ mL}$, gerührte Blasensäule)

Dieser Effekt lässt sich in den Umsetzungen im geschüttelten System genauso feststellen. Hierbei wurden verschiedene Schüttelfrequenzen überprüft. Bei Ansätzen ohne Isopropanol wurden hierbei keine Unterschiede der spezifischen Produktbildungsrate bei Veränderung der Schüttelfrequenz beobachtet. Wird die Schüttelfrequenz von 500 min^{-1} auf 1000 min^{-1} verdoppelt so ist jedoch eine Verschlechterung des Enantiomerenüberschusses von $\sim 99.3 \%$ auf $\sim 98.3 \%$ zu verzeichnen.

Die Abnahme des Enantiomerenüberschusses mit zunehmendem Leistungseintrag ist also sowohl bei Einsatz von Glukose als alleiniges Cosubstrat, als auch in Kombination mit Isopropanol zu verzeichnen. Es wird ausgeschlossen, dass der Grund für die Verschlechterung des Enantiomerenüberschusses eine bessere Bioverfügbarkeit durch den besseren Stofftransport bei höherem Leistungseintrag sein könnte. Dadurch würde die Umsetzungsgeschwindigkeit der (*S*)-spezifischen Alkoholdehydrogenase(n), die sonst viel langsamer umsetzen als die (*R*)-ADH, unterstützt werden. Dagegen spricht jedoch, dass keine Abnahme des Enantiomerenüberschusses mit steigender 4-Cl-AP-Konzentration zu verzeichnen ist.

Wahrscheinlicher ist eine Abhängigkeit der Aktivitäten der (*R*)- und (*S*)-spezifischen Enzyme vom Sauerstoffeintrag. Dieser steigt mit zunehmendem Leistungseintrag. Da die Umsetzungen in einem Zeitraum von 5 h zu Ende waren, wurde eine zusätzliche Stickstoffüberlagerung zum Erhalt der LK-ADH₁-Stabilität als nicht notwendig erachtet. Messungen des pO_2 in den gerührten Ansätzen ergaben zwar über die gesamte Umsetzungsdauer 0 %, es besteht jedoch die Möglichkeit, dass der Sauerstoffeintrag trotzdem zu hoch war. Um diese Annahme weiter zu klären, müssten vergleichende Umsetzungen mit und ohne Stickstoffüberlagerung durchgeführt werden.

Ein weiterer zu beobachtender Effekt betrifft die Abnahme des Enantiomerenüberschusses über die Prozesszeit, hier am Beispiel der Umsetzungen mit 0.2 und 0.54 kW m^{-3} in Abb. 5.2-16 (C) dargestellt. Es konnte bei allen Umsetzungen festgestellt werden, dass der Enantiomerenüberschuss mit einer Verlangsamung der Produktbildungsrate immer weiter abnimmt. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass durch die Abnahme der Produktbildungsrate der LK-ADH₁ die Umsetzung des 4-Cl-AP durch andere konkurrierende (*S*)-spezifische Enzyme stärker ins Gewicht fällt.

5.2.8 Asymmetrische Synthese von 1-(*R*)-(4-Cl-Phenyl)-Ethanol im 200 mL-Maßstab

Um die Produktbildungskapazität von *L. kefir* weiter auszuschöpfen, soll mit Hilfe eines geeigneten Zudosierungsprofils für 4-Cl-AP und/oder Isopropanol die spezifische Produktbildungskapazität $[P]/c_x$ maximiert werden. Hierbei sind die bereits erwähnten Effekte zu beachten, dass sowohl höhere Konzentrationen an Edukt, als auch an Isopropanol die 1-4-Cl-PE-Synthese begünstigen. Ein weiterer Effekt ist die Abnahme des Enantiomerenüberschusses beim Einsatz von Isopropanol und mit Abnahme der Produktbildungsrate über der Prozesszeit. Der Schwerpunkt der Untersuchungen ist

daher ein Optimum für die spezifische Produktbildungskapazität und den Enantiomerenüberschuss über eine geeignete Prozessführung zu finden.

In Abb. 5.2-17 sind die Konzentrationsverläufe von 4-Cl-AP und 1-(*R*)-4-Cl-PE (rechts) für verschiedene 4-Cl-AP-Zudosierungsprofile (links) exemplarisch dargestellt. Mit Ausnahme des Ansatzes (A) wurden die Versuche in der gerührten Blasensäule mit einem definierten Leistungseintrag von 1.75 kW m^{-3} (B) und 0.54 kW m^{-3} (C) durchgeführt ($V_R = 200 \text{ mL}$, siehe Kapitel 4.6.3). Der Ansatz (A) wurde in einem gerührten Reaktionssystem mit 150 mL Reaktionsvolumen durchgeführt (siehe Kapitel 4.6.2). Die dazugehörigen Produktbildungsraten sind in Abb. 5.5-18 dargestellt.

In Abb. 5.2-17 (A) ist das Ergebnis für das lineare 4-Cl-AP-Zudosierungsprofil mit $19.6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ abgebildet. Die Zudosierung erfolgte hierbei über 24 h . In Abb. 5.2-17 (B) wird ein Versuch mit profilierter 4-Cl-AP-Zudosierung dargestellt, wobei die zudosierte 4-Cl-AP-Konzentration mit jeder Zudosierung abnimmt. Die zudosierten 4-Cl-AP-Konzentrationen wurden hierbei anhand der zeitlichen Produktbildungsraten anderer Versuche mit intermittierender 4-Cl-AP-Zudosierung ermittelt. Die zudosierte 4-Cl-AP-Konzentration am Anfang betrug hierbei 23.5 mM , während die Konzentration bei der letzten Zudosierung (nach 6 h) 9 mM 4-Cl-AP betrug. Abschließend ist in Abb. 5.2-17 (C) ein Ansatz dargestellt, bei dem 4-Cl-AP intermittierend im Überschuss mit Konzentrationen zwischen 75 und 90 mM pro Zudosierung zugegeben wurde. Bei allen Ansätzen wurde Isopropanol parallel zur 4-Cl-AP-Zudosierung stündlich im 10-fachen Konzentrationsüberschuss bezogen auf 4-Cl-AP zudosiert.

Wird der Ansatz mit linearer Edukt-Zudosierung (A) betrachtet, so ist zu erkennen, dass bis zum Ende der Umsetzung immer noch eine Produktbildungsrate von $10 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ festzustellen ist. Bis zum Ende der Reaktion ist also noch Produktbildungskapazität der Biokatalysatoren vorhanden. Die erreichte 1-(*R*)-4-Cl-PE-Konzentration nach 24 h beträgt 256 mM bei einer spezifischen Produktbildungskapazität von 5.12 mmol g^{-1} , die Ausbeute liegt dabei jedoch nur bei 54% , der Enantiomerenüberschuss nach 24 h betrug lediglich 96.5% . Diese Art der Prozessführung ist hinsichtlich der Ausbeute und des Enantiomerenüberschusses nicht optimal.

Beim Ansatz mit profilierter 4-Cl-AP-Zudosierung (B) konnte eine Ausbeute von 76% erreicht werden, die erreichte spezifische Produktbildungskapazität betrug jedoch nur 1.63 mmol g^{-1} , bei einer 1-(*R*)-4-Cl-PE-Konzentration von 81.7 mM . Die Produktbildungsrate nimmt hierbei über der Prozesszeit ab und erreicht bei einer Prozesszeit von 19 h einen Wert von $0.8 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, welches durch die abnehmende Konzentration an 4-Cl-AP bedingt ist.⁴

⁴ Der Enantiomerenüberschuss für diese Umsetzung konnte aufgrund von Trennungsproblemen bei der chiralen GC-Analytik nicht bestimmt werden.

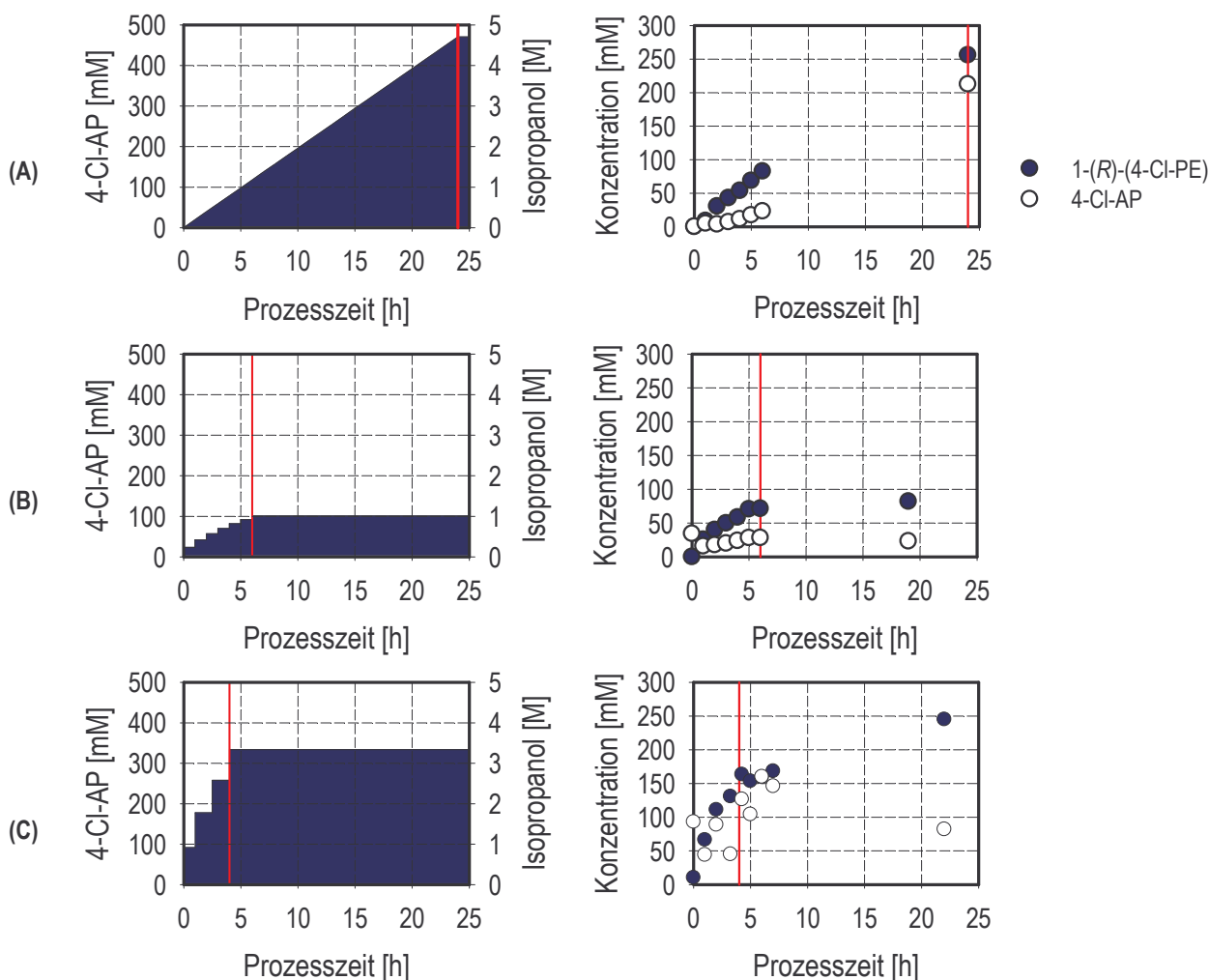


Abb. 5.2-17 Vergleich verschiedener 4-Cl-AP-Zudosierungsprofile: (A) lineare 4-Cl-AP-Zudosierung, (B) profilierte 4-Cl-AP-Zudosierung – Konzentration abnehmend, (C) 4 x ~100 mM 4-Cl-AP ($c_x = 50 \text{ g L}^{-1}$, Isopropanol 10-fach, 0.2 M KPi-Puffer, pH 6.5, 30°C)

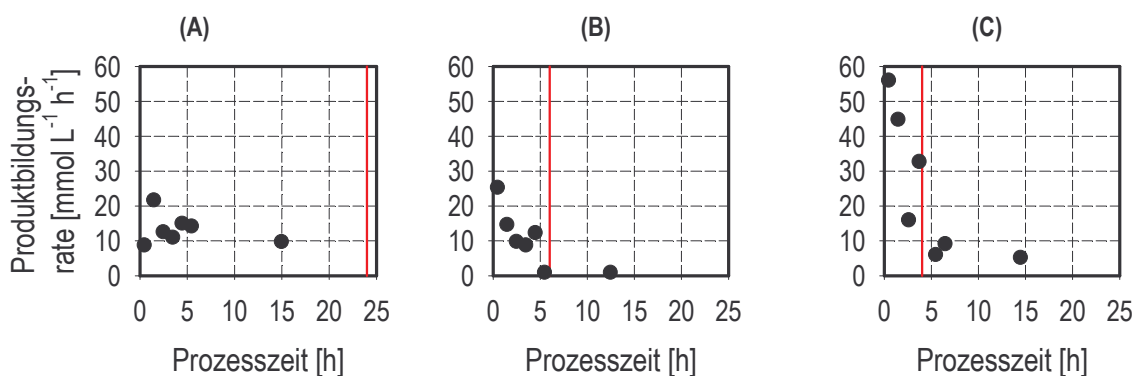


Abb. 5.2-18 Vergleich der Produktbildungsraten für verschiedene 4-Cl-API-Zudosierungsprofile: (A) lineare 4-Cl-AP-Zudosierung, (B) profilierte 4-Cl-AP-Zudosierung – Konzentration abnehmend, (C) 4 x ~100 mM 4-Cl-AP ($c_x = 50 \text{ g L}^{-1}$, 0.2 M KPi-Puffer, pH 6.5, 30°C)

Bei dem Ansatz mit Zudosierung des 4-Cl-AP im Überschuss (C) kann bei einer vergleichbaren Ausbeute von 74 % eine 1-(R)-4-Cl-PE-Konzentration von 245 mM erreicht werden, welches einer spezifischen Produktbildungskapazität von

4.9 mmol g⁻¹ entspricht. Die Produktbildungsrate nimmt hierbei wie beim Ansatz (B) ab, beträgt aber noch 5.1 mmol L⁻¹ h⁻¹ am Ende des Prozesses bei 22 h. Die Deaktivierungskonstante k_1 des Biokatalysators für die Umsetzung (C) liegt bei 0.44 h⁻¹ und ergibt somit eine Halbwertszeit von 1.56 h. Der erreichte Enantiomerenüberschuss betrug hierbei 97.4 %.

Diskussion

Die erreichten spezifischen Produktbildungskapazitäten und Ausbeuten, sowie die Enantiomerenüberschüsse der geschilderten Versuche mit 4-Cl-AP-Zudosierung werden in Abb. 5.2-19 nochmals zusammengefasst und zwei Biotransformationsansätzen im Satz-Verfahren gegenübergestellt.

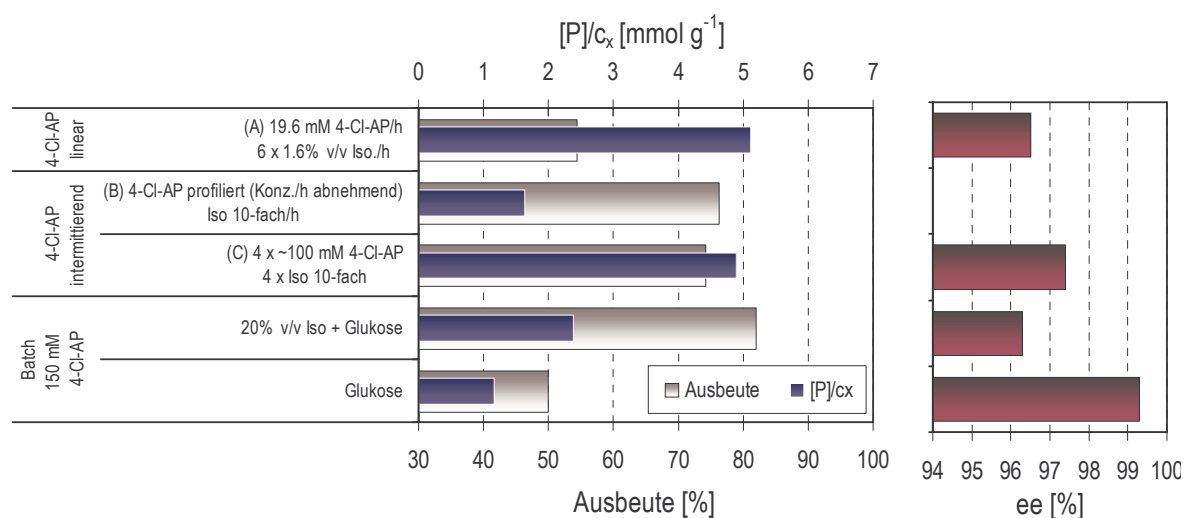


Abb. 5.2-19 Vergleich der spezifischen Produktbildungskapazität, der Ausbeute und des Enantiomerenüberschusses für verschiedene 4-Cl-AP-Zudosierungsprofile ($c_x = 50 \text{ g L}^{-1}$, 0.2 M KPi-Puffer, pH 6.5, 30°C)

Es ist zu erkennen, dass durch den Einsatz eines geeigneten 4-Cl-AP-Zudosierungsprofils eine bessere Ausschöpfung der Zellen, gekennzeichnet durch die spezifische Produktbildungskapazität, ermöglicht wird. Werden die Ansätze (B) und (C) miteinander verglichen, so ist zu erkennen, dass eine Zugabe höherer Konzentrationen des Edukts 4-Cl-AP die Reaktion immer weitertreibt. Bei einer einmaligen Zugabe einer vergleichbaren Eduktskonzentration am Anfang der Umsetzung wird eine längere Zeit benötigt, um die gleiche 1-(R)-4-Cl-PE-Konzentration zu erreichen, welches durch eine Verlangsamung der Reaktion mit abnehmender 4-Cl-AP-Konzentration bedingt ist. Dies bedeutet wiederum eine Abnahme des Enantiomerenüberschusses parallel zur Verlangsamung der Umsetzung.

Durch die Analyse der Cosubstrate Glukose und Isopropanol und der bei der Cofaktor-Regenerierung gebildeten Stoffwechselprodukte Lactat und Acetat bzw. Aceton, konnte festgestellt werden, dass wirklich beide Cosubstrate während der Umsetzung verwertet werden. In Abb. 5.2-20 ist ein exemplarischer Verlauf der gemessenen

Konzentrationen für die Umsetzung mit profilierter 4-Cl-AP-Zudosierung (B) dargestellt.

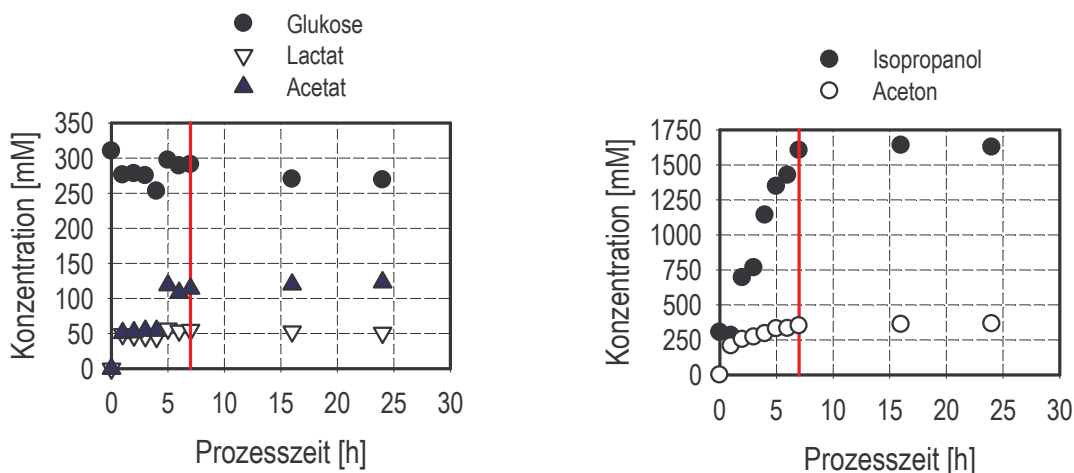


Abb. 5.2-20 Exemplarischer Konzentrationsverlauf der Cosubstrate und deren Stoffwechselprodukte für den Ansatz aus Abb. 5.2-17 (B) ($c_x = 50 \text{ g L}^{-1}$, 150 mM 4-Cl-AP, 200 mM Glukose, 0.2 M KPi-Puffer, pH 6.5, 30°C, 5 h Reaktionsdauer, 400 μL Reaktionsvolumen im Thermomixer, 1400 min^{-1})

Bei den Ansätzen (A) und (B) wurde hierbei die doppelte Glukosemenge bezogen auf 4-Cl-AP eingesetzt. Aufgrund der Erkenntnis, dass Glukose nur in den ersten Stunden verstoffwechselt wird (siehe Abb. 5.2-6), wurde beim Ansatz (C) nur 200 mM Glukose für eine 4-Cl-AP-Gesamtkonzentration von 330 mM am Anfang der Reaktion vorgelegt. Hierbei ist anzumerken, dass die HPLC-Messungen für Glukose, Lactat und Acetat starken Schwankungen unterliegen. Es wird angenommen, dass dies durch die hohen Konzentrationen an 4-Cl-AP und 1-4-Cl-PE bedingt sind. Es kann jedoch festgestellt werden, dass Glukose unter Bildung von Lactat und Acetat verstoffwechselt wird.

Werden die Verläufe für Isopropanol und Aceton betrachtet, so ist am gebildeten Aceton zu erkennen, dass nur äquimolare Mengen an Isopropanol für die Cofaktor-Regenerierung verbraucht werden. Für die Umsetzung wird jedoch ein starker Überschuss an Isopropanol benötigt. Es wird angenommen, dass der Grund hierfür die Verschiebung des thermodynamischen Gleichgewichtes durch die Aceton-Akkumulation ist.

5.2.9 Beurteilung der Biotransformation zur 1-(R)-(4-Cl-Phenyl)-Ethanol-Synthese

In Abb. 5.2-21 sind vergleichend die erreichte 1-(R)-4-Cl-PE-Konzentration, sowie die spezifische Produktbildungskapazität des mikrodispersiven Ansatzes mit intermittierender 4-Cl-AP-Zudosierung im Überschuss (siehe Abb. 5.2-17 C) und eines Referenzansatzes im einfachen Satz-Verfahren dargestellt. Die Unterschiede der Prozessführung sind Tabelle 5.2-4 zu entnehmen. Umsetzungen zur Synthese von 1-(R)-4-Cl-PE mit ganzen Zellen aus der Literatur sind nicht bekannt. Umsetzungsdaten zur Enzym-Biotransformation, welche mit *Lactobacillus*-ADHs im

Rahmen einer Parameteruntersuchung zur Bestimmung des Substratspektrums der *Lactobacillus*-ADH durchgeführt wurden, werden in Kapitel 3.5 vorgestellt.

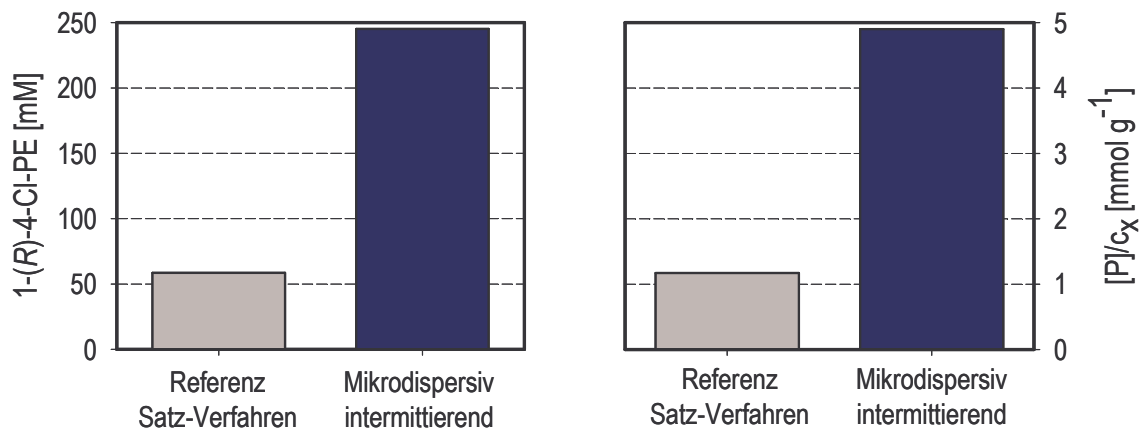
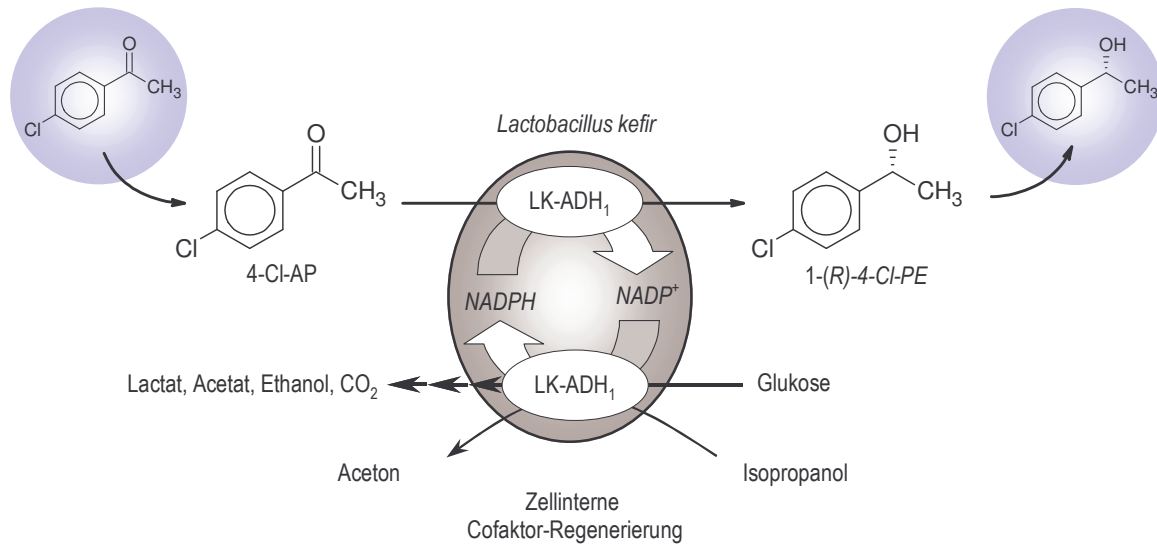


Abb. 5.2-21 Vergleich 1-(R)-4-Cl-PE-Konzentration und der spezifischen Produktbildungskapazität des mikrodispersiven Ansatzes mit optimierter 4-Cl-AP-Zudosierung und eines Referenzansatzes im Satz-Verfahren

Tabelle 5.2-4 Vergleich der Prozessführung des Referenzansatzes und des Ansatzes mit intermittierender 4-Cl-AP-Zudosierung

	Referenz – Satz-Verfahren	4-Cl-AP - intermittierend
Reaktionssystem	gerührtes Reaktionssystem	gerührte Blasensäule (0.54 kW m ⁻³)
V _R	15 mL	200 mL
c _x	50 g L ⁻¹	50 g L ⁻¹
4-Cl-AP	150 mM (t = 0h)	4 x 4-Cl-AP (siehe Abb. 5.2-17 C)
Cosubstrat	200 mM Glukose	200 mM Glukose 4 x Isopropanol (10-fache Konz. bzgl. 4-Cl-AP)

Das Prinzip der mikrodispersiven Eduktbereitstellung ohne Einsatz einer zweiten, nicht wasserlöslichen organischen Phase konnte am Beispiel der 1-(R)-4-Cl-PE-Synthese aus

4-Cl-AP mit *L. kefir* angewandt werden. Hierbei ist zu erkennen, dass durch Optimierung der Prozessführung eine Verbesserung der 1-(*R*)-4-Cl-PE-Synthese erzielt werden konnte. Dieses umfasst zum einen den Einsatz von Isopropanol als zweites Cosubstrat in Kombination mit Glukose. Wird Glukose als alleiniges Cosubstrat eingesetzt, so ist die Synthese durch eine irreversible Inhibierung durch das Produkt 1-4-Cl-PE limitiert. Unter diesen Bedingungen konnte keine Verbesserung der Umsetzung durch den Einsatz von organischen Lösungsmitteln und anderer Löslichkeitsvermittler erreicht werden. Nur durch den Einsatz von Isopropanol als zweites Cosubstrat konnte die Inhibierung durch 1-4-Cl-PE umgangen werden.

Eine Steigerung der spezifischen Produktbildungskapazitäten sowie der 1-(*R*)-4-Cl-PE-Endkonzentrationen konnte des Weiteren auch durch ein geeignetes 4-Cl-AP- / Isopropanol-Zudosierungsprofils erreicht werden. Beträgt die erreichte 1-(*R*)-4-Cl-PE-Endkonzentrationen des einfachen Ansatzes im Satz-Verfahren 58.5 mM, so kann diese bei dem intermittierenden Ansatz auf 245 mM gesteigert werden. Dieses entspricht eine Verbesserung der spezifischen Produktbildungsrate von 1.17 auf 4.9 mmol L⁻¹ h⁻¹. Hierbei war die Zugabe von Cofaktoren nicht notwendig. Die Halbwertszeit von *L. kefir* konnte dabei von 0.22 h bei der Referenzumsetzung auf 1.56 h bei der Umsetzung mit intermittierender 4-Cl-AP-Zudosierung gesteigert werden.

Des Weiteren konnte durch Anpassung des Sauerstoffeintrags der negative Effekt des Isopropanols auf den Enantiomerenüberschuss unterdrückt werden, so dass für den hier geschilderten Ansatz z.B. ein Enantiomerenüberschuss von 97.4 % erreicht werden konnte. Eine weitere Verbesserung des Enantiomerenüberschusses könnte hierbei durch eine zusätzliche Stickstoffüberlagerung erreicht werden.

Durch die Biotransformation unter definierten Reaktionsbedingungen im 200 mL-Maßstab mit definiertem Leistungseintrag (0.54 kW m⁻³), ist die Übertragbarkeit des Prozesses auf einen größeren Maßstab sichergestellt. Bei der mikrodispersiven Edukt-Bereitstellung ist der Leistungseintrag maßgebend für die Maßstabsübertragung.

5.3 Asymmetrische Synthese von 6-Cl-(3*R*,5*S*)-Dihydroxyhexansäure-*tert*-Butylester

Die asymmetrische Synthese von 6-Cl-(3*R*,5*S*)-Dihydroxyhexansäure-*tert*-Butylester ((3*R*,5*S*)-DHHB) mit *Lactobacillus kefir* wird in zwei Stufen von zwei Alkoholdehydrogenasen katalysiert (siehe Kapitel 3.2.4). Die erste ADH (LK-ADH₁), welche auch die in Kapitel 5.2 beschriebene asymmetrische Reduktion katalysiert, besitzt die Fähigkeit, Ketone mit sperrigen Seitengruppen zu reduzieren (siehe Kapitel 3.9.4). Diese setzt im ersten Schritt das 6-Cl-3,5-Dioxohexansäure-*tert*-Butylester (DOHTB) zum 6-Cl-5-(*S*)-Hydroxy-3-Oxohexansäure-*tert*-Butylester (5-(*S*)-HOHB) um. Eine zweite *L. kefir*-ADH (LK-ADH₂), welche Hydroxyketone als Edukt umsetzen kann, reduziert das Monohydroxy-Zwischenprodukt weiter zum gewünschten Dihydroxyhexansäure-Endprodukt. Dieses ist, wie in Kapitel 3.2 beschrieben, ein essentieller chiraler Baustein bei der Synthese der Statin-Seitenketten.

Als Cofaktor benötigen beide Enzyme NADPH. Dieses soll über die zelleigenen Regenerierungswege wieder gewonnen werden.

Ein Problem dieser Biotransformation ist die Instabilität des Edukts DOHTB in wässrigen Medien (siehe Kapitel 3.3.2). Eine bezüglich der Umsetzungsbedingungen mit *L. kefir* relevante Nebenreaktion ist die intramolekulare Zyklisierung unter Abspaltung von HCl bei einem pH > 5.5. Als Nebenprodukt dieser Reaktion entsteht ein Furanon-Zyklisierungsprodukt (ODFA). Diese Reaktion ist sowohl eine Funktion des pH, als auch der Puffersubstanz und der Temperatur.

Sowohl die beiden Reaktionsstufen, als auch die Zerfallsreaktion zum Furanon-Nebenprodukt sind in Abb. 5.3-1 schematisch dargestellt. Das für die Untersuchungen verwendete DOHTB wurde vom Forschungszentrum Jülich, sowie von Jülich Fine Chemicals synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Die DOHTB-Reinheit beträgt hierbei 80 % (siehe Kapitel 3.3.1).

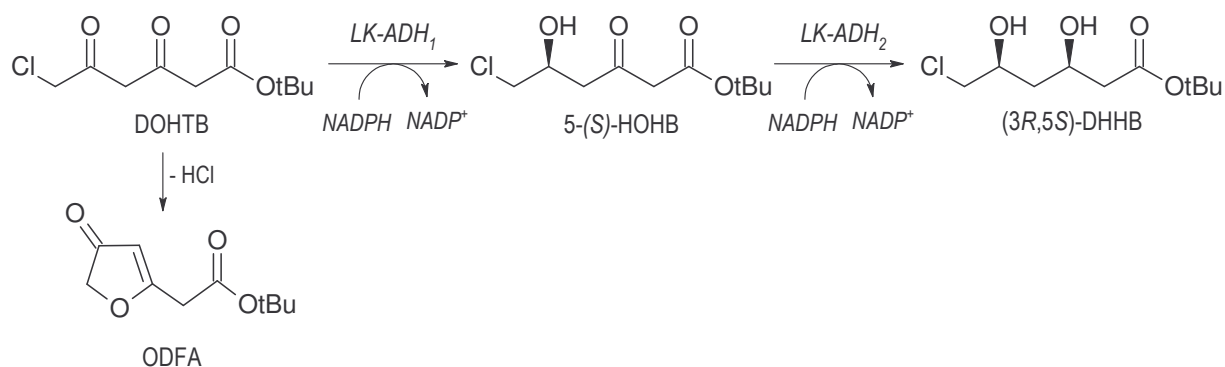


Abb. 5.3-1 Schema der zweistufigen Synthese von 6-Cl-(3*R*,5*S*)-Dihydroxyhexansäure-*tert*-Butylester mit *L. kefir*, sowie der Nebenreaktion zu Furanon

Schwerpunkte der reaktionstechnischen Untersuchungen zur Synthese dieses (3*R*,5*S*)-Dihydroxyhexanoatprodukts sind die Maximierung der Ausbeute, welches eine

Unterdrückung der ODFA-Bildung notwendig macht, sowie die Maximierung des Diastereomerenüberschusses.

Basierend auf der Annahme, dass die von der LK-ADH₁ katalysierte Reduktionsreaktion am C5 sehr regio- und enantioselektiv ist (ee 99.4 %, siehe Kapitel 3.2.4), werden zur Beurteilung der Ausbeute und der Stereoselektivität der gesamten Biotransformation nur die Endproduktkonzentrationen des 6-Cl-(3R,5S)-Dihydroxyhexansäure-*tert*-Butylester und seines Diastereomers 6-Cl-(3S,5S)-Dihydroxyhexansäure-*tert*-Butylester zur Ermittlung des Diastereomerenüberschusses bestimmt. Des Weiteren werden zur Beurteilung der Reaktionen die Konzentration des Zwischenprodukts 6-Cl-5-Hydroxy-3-Oxohexansäure-*tert*-Butylester (HOHB) und des bekannten Nebenprodukts ODFA bestimmt.

Die in Kapitel 5.3.1 bis 5.3.7 geschilderten Untersuchungen wurden mit kommerziell erworbenen *L. kefir*-Zellen durchgeführt (siehe Kapitel 4.4). Bei den in Kapitel 5.3.8 geschilderten Untersuchungen wurden dagegen selbst hergestellte *L. kefir*-Zellen verwendet (siehe Kapitel 4.5, sowie Kapitel 5.1).

5.3.1 Untersuchungen zur Stabilität der Alkoholdehydrogenasen

Analog zur Untersuchung der Stabilität der LK-ADH₁ in Kapitel 5.2.1 wurde auch für die LK-ADH₂ der Einfluss von Stickstoff auf die Stabilität untersucht. Der Verlauf der Aktivität der LK-ADH₂ unter anaeroben Bedingungen für einen Zeitraum bis 90 h ist in Abb. 5.3-2 dargestellt.

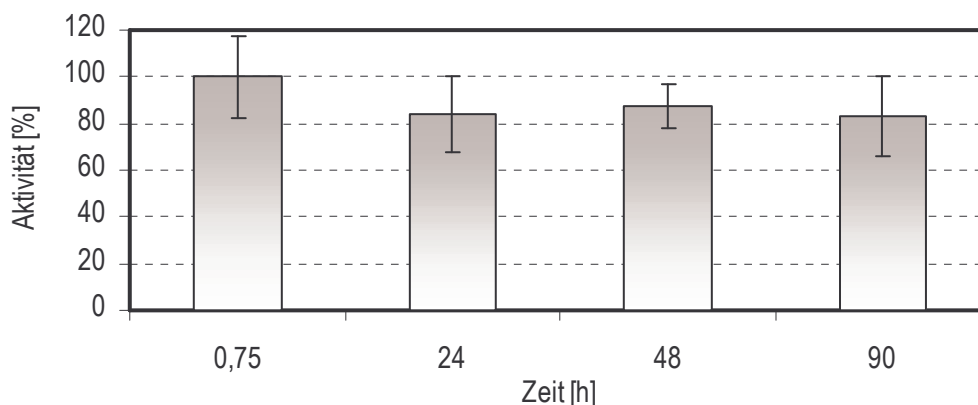


Abb. 5.3-2 Stabilität der LK-ADH₂ unter anaeroben Bedingungen

Unter Berücksichtigung der Messungenauigkeit kann die Aussage getroffen werden, dass auch für die LK-ADH₂ unter Einhaltung anaerober Bedingungen die Stabilität des Enzyms unterstützt werden kann. Die Ausgangsaktivität der LK-ADH₂ liegt dabei bei 70 U g⁻¹ und ist somit um den Faktor 10 geringer als die Aktivität der LK-ADH₁, welche die erste Reduktionsreaktion katalysiert. Der Einfluss einer Luftbegasung auf die LK-ADH₂-Aktivität wurde nicht untersucht. Für die LK-ADH₂-Stabilität kann hiermit gezeigt werden, dass der Einsatz einer Stickstoff-Atmosphäre vorteilhaft bei einem längeren Einsatz der *L. kefir*-Zellen für eine Biotransformation ist.

5.3.2 Ermittlung geeigneter Reaktionsbedingungen

Mit einem Schwerpunkt auf Maximierung der (3*R*,5*S*)-DHHB-Ausbeute und des Diastereomerenüberschusses wurde des Weiteren der Einfluss von Temperatur, pH, Pufferart und Puffermolarität auf die Biotransformation untersucht. Die Ansätze zur Untersuchung des Temperatureinflusses und des pH-Einflusses, sowie zum Vergleich der Puffer fanden im 25 mL-Maßstab im Satz-Verfahren (gerührtes Reaktionssystem, siehe Kapitel 4.6.2) statt. Die Untersuchungen zum Einfluss der Molarität wurden im geschüttelten Reaktionssystem im 400 μ L Maßstab durchgeführt (siehe Kapitel 4.6.1). Die *L. kefir*-Konzentration betrug 50 g L⁻¹, bei einer DOHTB-Konzentration von 25 mM ($\phi_{V,DOHTB} = 0.006$)⁵ und einer Glukose-Konzentration von 50 mM. Da bei Verwendung von Glukose als Cosubstrat für die Cofaktor-Regenerierung Lactat und Acetat entstehen, muss bei den Ansätzen eine pH-Regelung durchgeführt werden. Als Reaktionsdauer wurden 20 h festgelegt.

Einfluss von Temperatur und pH

Die Ausbeuten an Endprodukt, Zwischen- und Nebenprodukten, sowie die dazugehörigen Diastereomerenüberschüsse für verschiedene Temperaturen und pH nach 20 h sind in Abb. 5.3-3 dargestellt. Die Versuchsreihe wurde in dem in der Literatur verwendeten Umsetzungspuffer durchgeführt (Citrat-Phosphat-Puffer, pH 5.5, 0.2 M, 0.1 mM Mg Cl₂) [Wolberg, 2001]. Neben pH 5.5 wurden Umsetzungen auch bei pH 6.0 und pH 6.5 durchgeführt. Die Umsetzungstemperatur des Referenzansatzes betrug 22°C. Neben dieser Temperatur wurden die Umsetzungen auch bei 25°C und 30°C untersucht. Eine Temperatur von 30°C ist die optimale Wachstumstemperatur für *L. kefir*. 25°C und 30°C stellen die Grenzen des optimalen Temperaturbereiches für die LK-ADH₁ dar (siehe Kapitel 3.9.5).

Wird die Ausbeute des DHHB-Endprodukts betrachtet, so weisen die Ansätze bei 25°C und pH 6.0 bzw. pH 6.5 mit Ausbeuten von 98 % bzw. 99 % die besten Ergebnisse auf. Bei beiden Ansätzen wurde das HOHB-Zwischenprodukt vollständig in DHHB umgewandelt. Der Furanon-Anteil liegt für alle Ansätze zwischen 1 % bis 4 %. Bei 22°C und pH 5.5, wo eine Akkumulation des HOHB-Zwischenprodukts zu beobachten ist, wurde die geringste DHHB-Ausbeute erzielt (19 %). Diese Akkumulation des HOHB-Zwischenprodukts ist auch bei 30°C zu sehen. Die erzielten Ausbeuten liegen hier bei 72 % bis 82 %.

Werden die Diastereomerenüberschüsse betrachtet, so ist zu erkennen, dass bei 30°C die geringsten Diastereomerenüberschüsse erzielt werden (97.3-97.5 %). Bei 25°C kann eine pH-Abhängigkeit des Diastereomerenüberschusses beobachtet werden. Mit steigendem pH von 5.5 auf 6.5 nimmt hierbei der Diastereomerenüberschuss von 97.3 % auf 98.8 % zu. Die beste Stereoselektivität wurde jedoch bei 22°C erreicht (99 %). Dieser Wert entspricht einem Diastereomerenverhältnis $dr_{s:a}$ von 199:1.

⁵ Die Löslichkeit von DOHTB in Wasser beträgt 0.55 mM. Die Löslichkeit von DHHB beträgt 29 mM. Beides wurde für 25°C kalkuliert.

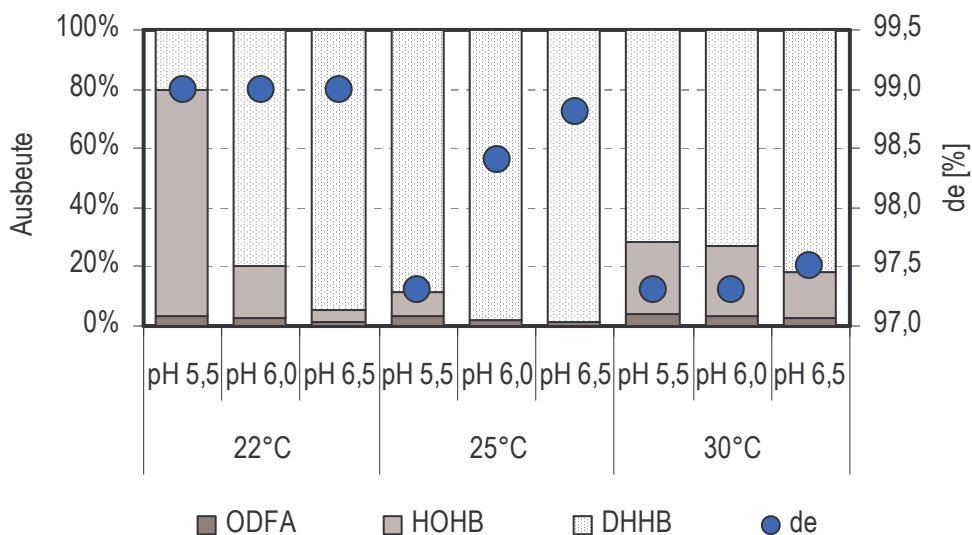


Abb. 5.3-3 Einfluss von pH und Temperatur auf die (3R,5S)-DHHB-Ausbeute und den Diastereomerenüberschuss ($c_x = 50 \text{ g L}^{-1} \text{ BTM}$, 25 mM DOHTB , $\varphi_{V,DOHTB} = 0.006$, 50 mM Glukose , $0.2 \text{ M Citrat-Phosphat-Puffer}$, 0.1 mM MgCl_2)

In Abb. 5.3-4 werden exemplarisch die zeitlichen Verläufe der Zusammensetzungen für 22°C und 25°C bei pH 6.5 verglichen.

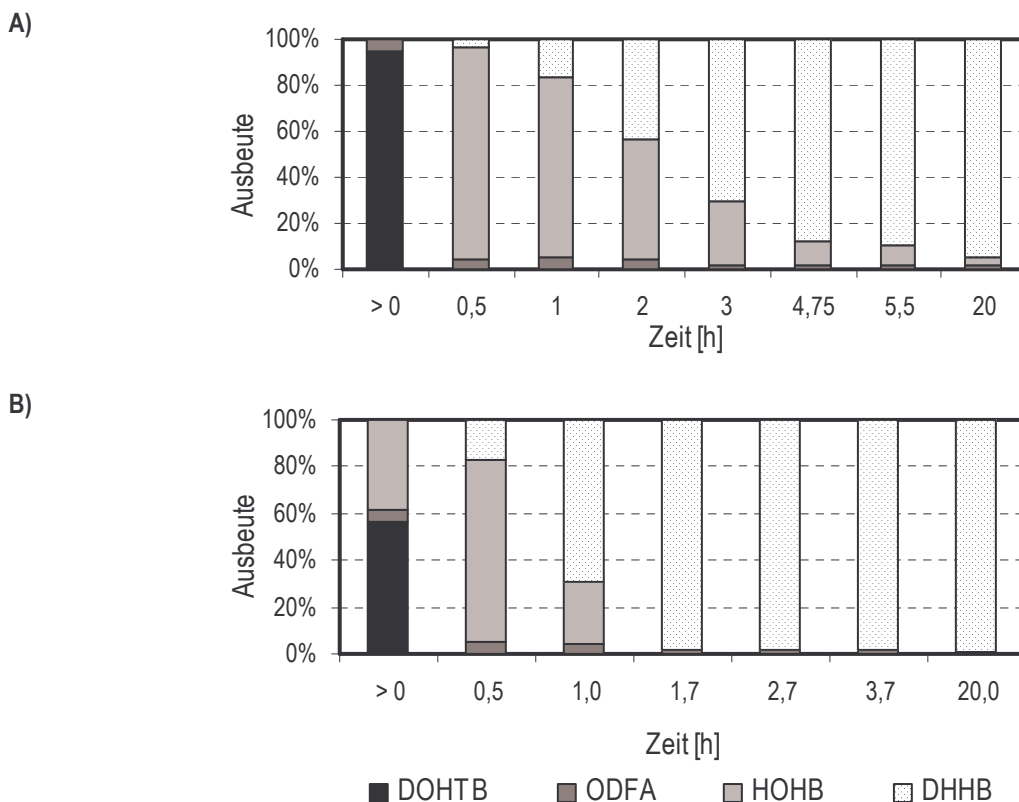


Abb. 5.3-4 Vergleich der zeitlichen Konzentrationsverläufe bei: A) 22°C und B) 25°C ($c_x = 50 \text{ g L}^{-1} \text{ BTM}$, 25 mM DOHTB , $\varphi_{V,DOHTB} = 0.006$, 50 mM Glukose , $0.2 \text{ M Citrat-Phosphat-Puffer}$, $\text{pH } 6.5$, 0.1 mM MgCl_2)

Zum einen ist zu erkennen, dass die Umsetzungsgeschwindigkeit der ersten Reaktionsstufe höher ist als die der zweiten Reduktionsreaktion. Die Produktbildungsrate zum HOHB (zwischen $t = 0$ und 0.5 h) bei 22°C beträgt $36.8 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, während die Produktbildungsrate zum DHHB $1.4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ beträgt. Bei 25°C ist das Verhältnis der beiden Produktbildungsraten zueinander $29.2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ zu $6.4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Werden die beiden untersuchten Temperaturen miteinander verglichen, so ist zu erkennen, dass die DHHB-Synthese bei 25°C schneller abläuft als bei 22°C . Während bei 25°C das Edukt bereits nach 1.7 h vollständig umgesetzt ist (RZA $10.6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) ist eine vollständige DHHB-Synthese bei 22°C erst nach 4.75 h erreicht (RZA $3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Vergleich zwischen KPi-Puffer und Citrat-Phosphat-Puffer

Der optimale zellinterne pH für die LK-ADH₁ liegt für Reduktionsreaktionen bei pH 7.0 und liegt somit im Pufferbereich von Phosphat-Puffern (pH 5.5 – 8). Bei Citrat-Puffern liegt der Pufferbereich dagegen im Bereich zwischen \sim pH 3 – 6 [Holtzhauer, 1997]. Soll der zellinterne pH im Bereich um pH 7 gehalten werden, so wird dieses durch die Auswahl eines Puffers mit geeignetem Pufferbereich unterstützt. Für die DHHB-Synthese wurden mit Schwerpunkt auf die DHHB-Ausbeute und den Diastereomerenüberschuss. Untersuchungen zum Vergleich des KPi- und Citrat-Phosphat-Puffer durchgeführt. Die Pufferkonzentration in der Versuchsreihe betrug 0.2 M , der pH 6.5 . Die untersuchten Temperaturen waren 22°C , 25°C und 30°C . Als benötigter Effektor für die LK-ADH₁ wurden 0.1 mM MgCl_2 beigefügt. Alle anderen Bedingungen sind analog zur oben geschilderten Versuchsreihe.

In Abb. 5.3-5 ist zu erkennen, dass bei den untersuchten Bedingungen kaum Unterschiede in der Biotransformation festzustellen sind. Die besten Ausbeuten wurden auch hier für beide Puffer bei 25°C und einem pH von 6.5 erzielt (98% - 99% Ausbeute). Bei 30°C wird die Katalyse zum DHHB in KPi-Puffer leicht begünstigt. Die DHHB-Ausbeute in KPi-Puffer beträgt hierbei 89% , wogegen die Ausbeute in Citrat-Phosphat-Puffer bei 82% liegt. Gleichzeitig ist jedoch festzustellen, dass bei 30°C niedrigere Diastereomerenüberschüsse erreicht werden. Die beste Stereoselektivität wird für beide Puffer bei einer Umsetzungstemperatur von 22°C erreicht. Die DHHB-Ausbeute für KPi-Puffer ist hierbei mit 98% leicht besser als im Citrat-Phosphat-Puffer mit 95% Ausbeute.

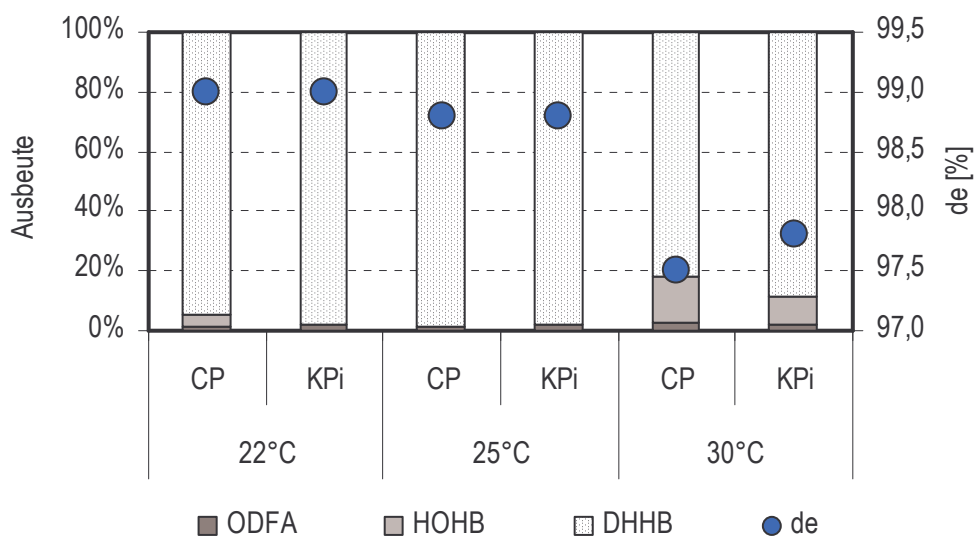


Abb. 5.3-5 Vergleich von Citrat-Phosphat-Puffer und KPi-Puffer auf die DHHB-Synthese ($c_x = 50 \text{ g L}^{-1}$ BTM, 25 mM DOHTB, $\varphi_{V,DOHTB} = 0.006$, 50 mM Glukose, 0,2 M Citrat-Phosphat-Puffer, pH 6,5, 0,1 mM MgCl_2)

Einfluss der Puffermolarität

Die Untersuchungen zum Einfluss der Puffermolarität wurden für beide Puffer bei einer Inkubationstemperatur von 25°C durchgeführt. In Abb. 5.3-6 sind die Ausbeuten aus Endprodukt, Zwischen- und Nebenprodukten dargestellt.

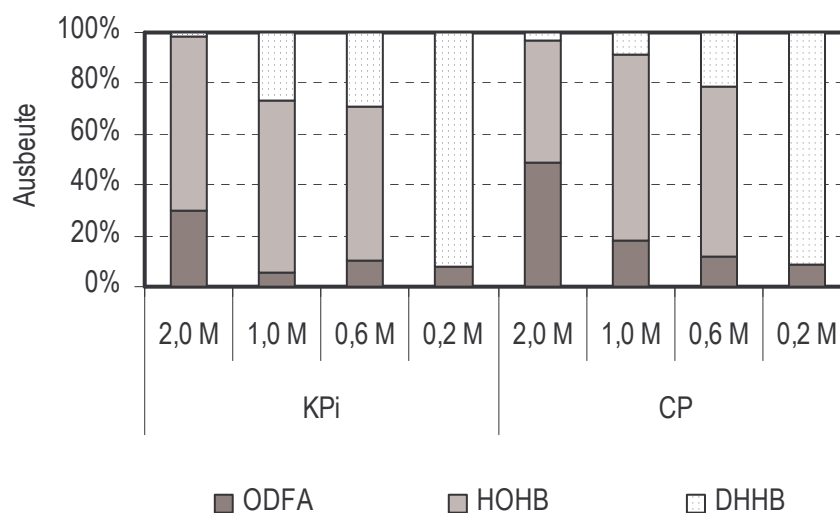


Abb. 5.3-6 Einfluss der Puffermolarität auf die DHHB-Synthese ($c_x = 50 \text{ g L}^{-1}$ BTM, 25 mM DOHTB, $\varphi_{V,DOHTB} = 0.006$, 50 mM Glukose, pH 6,5, 25°C, 0,1 mM MgCl_2)

Für beide Puffer ist eine Abhängigkeit der DHHB-Bildung von der Molarität zu erkennen. Diese wird im untersuchten Molaritätsbereich mit abnehmenden Molaritäten begünstigt. Bei einer Molarität von 2 M sind am Ende der Reaktion sowohl sehr hohe Anteile des Nebenproduktes ODFA, als auch des Zwischenproduktes HOHB zu verzeichnen. Die DHHB-Ausbeuten liegen hier bei 2 % für KPi-Puffer und 3 % für

Citrat-Phosphat-Puffer. Der Furanon-Anteil im Citrat-Phosphat-Puffer ist hierbei um den Faktor 1.7 höher. Die ODFA-Bildung nimmt mit sinkender Molarität ab. In den Ansätzen mit einer Molarität zwischen 0.6 M – 2 M ist mit Ausnahme des Ansatzes in 2 M Citrat-Phosphat-Puffer der Anteil des HOHB-Zwischenprodukts ähnlich. Im Ansatz mit 0.2 M Puffer wurde das Zwischenprodukt vollständig in das DHHB-Endprodukt umgesetzt. Die erreichten Ausbeuten liegen hier bei 91-92.5 %.

Diskussion

Aus den Zeitverläufen der Umsetzungen ist zu erkennen, dass die LK-ADH₁ eine höhere Aktivität und somit eine höhere Umsetzungsgeschwindigkeit besitzt als die LK-ADH₂. Dieses ist auch an den gemessenen Enzymaktivitäten des Zellextrakts zu sehen. Während die Ausgangsaktivität der LK-ADH₁ zwischen 700 – 750 U g⁻¹ BTM liegt, ist diese für die LK-ADH₂ mit 70 U g⁻¹ um den Faktor 10 geringer. Die zweite Reduktionsreaktion ist somit der geschwindigkeitslimitierende Schritt der gesamten DHHB-Biotransformation mit *L. kefir*-Zellen.

Die Zeitverläufe der Umsetzungen zeigten weiterhin, dass bei Ansätzen mit höherer ODFA- bzw. HOHB-Akkumulation ab einem gewissen Zeitpunkt keine weitere Umsetzung des HOHB-Zwischenprodukts in DHHB zu verzeichnen ist. Daraus folgt die Annahme, dass eine Inhibierung der LK-ADH₂ durch das Nebenprodukt ODFA und/oder durch das Zwischenprodukt HOHB gegeben ist. Um diese Annahme zu verifizieren bzw. die Effekte beider Substanzen auf die Reduktion durch die LK-ADH₂ voneinander trennen zu können, müssen Untersuchungen mit Zugabe von jeweils einem der beiden Substanzen mit definierten Konzentrationen durchgeführt werden. Damit können auch die inhibierenden Grenzkonzentrationen für beide Substanzen ermittelt werden. Von den durchgeführten Versuchen ist die geringste DHHB-Ausbeute für den Ansatz mit 12,3 mM ODFA und 12 mM HOHB zu verzeichnen (3 % Ausbeute, 2 M Citrat-Phosphat-Puffer, pH 6.5, 25°C). Es wird keine Inhibierung der LK-ADH₁ durch ODFA angenommen. Auch bei hohen ODFA-Konzentrationen konnte HOHB-Bildung beobachtet werden. Um feststellen zu können, ob Inhibierungseffekte der LK-ADH₁ durch HOHB vorhanden sind, muss die Furanon-Bildung bei Versuchen mit mehrfacher DOHTB-Zudosierung verfolgt werden. Existiert eine Inhibierung durch HOHB, so müsste im Fall einer HOHB-Akkumulation eine verstärkte Furanon-Bildung bei den späteren Edukt-Zudosierungen zu verzeichnen sein.

Bezüglich des Schwerpunkts DHHB-Ausbeute zeigten sich bei den Bedingungen 25°C, pH 6.0 bzw. pH 6.5, 0.2 M Puffer die besten Ergebnisse. Zwischen den beiden untersuchten Puffer sind bei diesen Bedingungen keine Unterschiede zu verzeichnen. Das gebildete HOHB wird hierbei vollständig in das Endprodukt DHHB umgesetzt, wobei die höchsten Raum-Zeit-Ausbeuten zu verzeichnen waren (RZA 10.6 mmol L⁻¹ h⁻¹).

Bei den untersuchten Umsetzungstemperaturen von 22°C und 30°C ist dagegen eine Akkumulation des HOHB-Zwischenprodukts zu beobachten. Des Weiteren ist für 22°C die pH-Abhängigkeit der HOHB-Reduktion in DHHB gut zu erkennen. Mit steigendem pH steigt die DHHB-Ausbeute. Von den untersuchten pH deuten die Ergebnisse darauf

hin, dass die LK-ADH₂-Aktivität bei pH 6.5 am höchsten ist. Dagegen ist die weitere Reduktion des Zwischenprodukts HOHB bei allen untersuchten Temperaturen bei pH 5.5, welcher bei der Referenzumsetzung verwendet wurde (siehe Kapitel 3.2.4), am geringsten verglichen mit den anderen untersuchten pH. Dieser pH wurde in dem Fall ausgewählt, da der Zerfall von DOHTB in ODFA bei den niedrigen pH-Bereichen minimiert wird (siehe Kapitel 3.2.2).

Wird der Diastereomerenüberschuss als Schwerpunkt betrachtet, so wird bei einer Inkubationstemperatur von 22°C die beste Stereoselektivität erreicht (de 99 % für alle untersuchten pH, einem $dr_{s:a}$ von 199:1 entsprechend). Bei 25°C ist eine pH-Abhängigkeit des Diastereomerenüberschusses feststellbar. Diese liegen zwischen 97.3 % für pH 5.5 und 98.8 % für pH 6.5 ($dr_{s:a}$ von jeweils 73:1 und 166:1). Bei 30°C liegen die Diastereomerenüberschüsse zwischen 97.3 % bis 97.5 %. Es wird angenommen, dass die Aktivität anderer um das HOHB-konkurrierenden (S)-spezifischen Alkoholdehydrogenasen oder möglicher Racemasen bei 30°C höher ist. Aufgrund des tendenziell besseren Diastereomerenüberschusses und der vergleichbar guten DHHB-Ausbeute wurde trotz der niedrigeren Raum-Zeit-Ausbeute gegenüber 25°C eine Umsetzungstemperatur von 22°C und ein pH von 6.5 als Reaktionsbedingungen für die folgenden Versuche ausgewählt. Des Weiteren wurde KPi-Puffer als Umsetzungsmedium eingesetzt.

Für die untersuchte Edukt-Konzentration und den Umsetzungszeitraum konnte kein Vorteil von KPi-Puffer gegenüber Citrat-Phosphat-Puffer aufgrund des geeigneteren Pufferbereiches beobachtet werden. In Hinsicht auf die Prozessentwicklung zur Biotransformation mit höheren Eduktkonzentrationen, welche mit einem höheren Glukose-Verbrauch als Cosubstrat verbunden sind, wurde dennoch KPi-Puffer aufgrund seines geeigneteren Pufferbereiches gewählt. Ein höherer Glukose-Verbrauch ist mit einer verstärkten Bildung der Stoffwechselprodukte Lactat und Acetat verbunden, welche den pH des Reaktionssystems senken.

Als beste Pufferkonzentration hat sich in dem untersuchten Bereich 0.2 M erwiesen. Anhand der Versuchsdaten wird angenommen, dass die Puffermolarität einen Einfluss auf die ODFA-Bildung ausübt. Der ODFA-Anteil steigt nämlich mit steigender Molarität. Der Anteil des Zwischenprodukts HOHB ist dagegen bei den Ansätzen mit 0.6 M, 1 M und 2 M vergleichbar. Das Ergebnis für 0.6 M KPi-Puffer wurde hierbei nicht berücksichtigt. Dieses ist ein weiterer Hinweis darauf, dass eine Inhibierung der LK-ADH₂ durch das Nebenprodukt ODFA vorliegt. Je höher der ODFA-Anteil der Ansätze, desto weniger DHHB wird gebildet. Bei der Pufferkonzentration von 0.2 M ist der ODFA-Anteil gering genug, so dass das Zwischenprodukt vollständig reduziert werden kann.

Die Untersuchungen zum Einfluss der Puffermolarität, wie auch zum Einfluss der Temperatur und des pH zeigen, dass die LK-ADH₂ an engere Grenzen bezüglich der Reaktionsbedingungen gebunden ist als die LK-ADH₁, welche über den gesamten untersuchten Bereich ihre katalytische Aktivität behält. Neben einem direkten Einfluss der Reaktionsbedingungen auf die LK-ADH₂-Aktivität, treten zusätzlich mögliche durch

das Nebenprodukt und/oder Zwischenprodukt bedingten Inhibierungen des Enzyms auf.

Bei den gewählten Umsetzungsbedingungen (22°C, pH 6.5, 0.2 M KPi-Puffer) wird eine DHHB-Konzentration von 24.5 mM erreicht (entspricht einer Ausbeute von 98 %). Die spezifische Produktbildungskapazität beträgt hierbei 0.49 mmol g⁻¹ BTM und die Raum-Zeit-Ausbeute 3.2 mmol L⁻¹ h⁻¹. Des Weiteren hat sich gezeigt, dass über die Auswahl geeigneter Reaktionsbedingungen sowie dem Einsatz einer Biokatalysator-Konzentration von 50 g L⁻¹ die Zerfallsreaktion des Edukts in ODFA auch bei einem pH von 6.5 weitgehend unterdrückt werden kann.

5.3.3 Untersuchungen zur spezifischen Produktbildungskapazität

Analog der Biotransformation zur Synthese von 1-(R)-(4-Cl-Phenyl)-Ethanol wurde für die DHHB-Synthese untersucht, ob eine Biotrockenmasseabhängigkeit der spezifischen Produktbildungsrate ebenfalls gegeben ist. Die Untersuchungen dafür wurden in geschüttelten 400 µL-Ansätzen mit 50 mM DOHTB ($\phi_{V,DOHTB} = 0.013$) und 50 mM Glukose durchgeführt (0.2 M KPi-Puffer, pH 6.5, 25°C, 5 mM MgCl₂). Die Reaktionsdauer betrug 20 h.

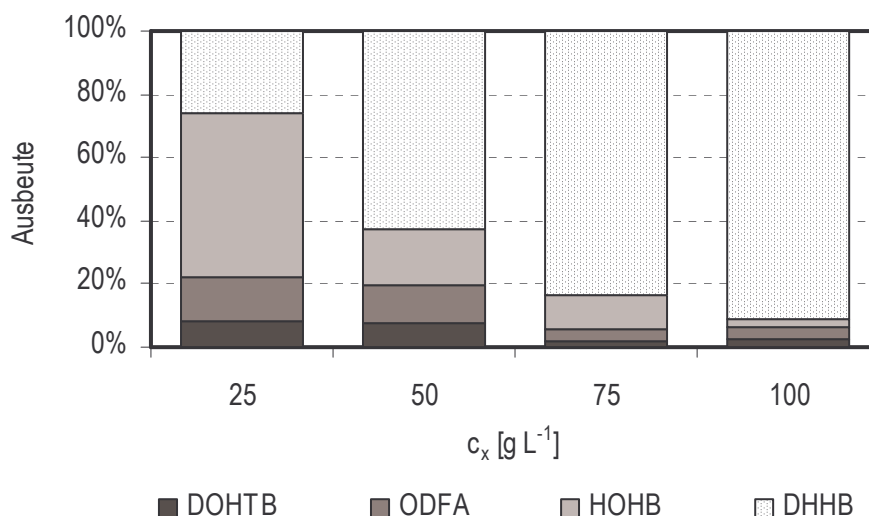


Abb. 5.3-7 Ausbeuten in Abhängigkeit der Biotrockenmassekonzentration (50 mM DOHTB, $\phi_{V,DOHTB} = 0.013$, 50 mM Glukose, 0.2 M KPi-Puffer, pH 6.5, 25°C, 20h)

Die Endzusammensetzungen nach 20 h sind in Abb. 5.3-7 dargestellt. Es ist erkennbar, dass die Nebenproduktbildung durch den Einsatz höherer Biotrockenmassekonzentrationen unterdrückt werden kann. Bei keinem der Ansätze konnte jedoch eine vollständige Umsetzung in DHHB erreicht werden. Es ist ebenfalls zu erkennen, dass die Umsetzungsgeschwindigkeit des Zwischenprodukts in DHHB mit steigender Biotrockenmassekonzentration zunimmt. Dieses resultiert in geringeren Akkumulationen des Zwischenprodukts. Bei den Ansätzen mit 25 g L⁻¹ und 50 g L⁻¹

L. kefir kann die Zwischenproduktakkumulation jedoch auch zusätzlich durch die verstärkte ODFA-Bildung bedingt sein.

Werden die spezifischen Produktbildungskapazitäten für die untersuchten Biotrockenmassen in Abb. 5.3-8 betrachtet, so ist bei 50 g L^{-1} ein Optimum zu erkennen. Die geringere Produktbildungskapazität bei 25 g L^{-1} Biotrockenmasse ist durch die geringere erreichte DHHB-Konzentration dieses Ansatzes zu erklären. Jedoch sind auch die Kapazitäten für 75 g L^{-1} und 100 g L^{-1} , bei denen höhere DHHB-Konzentrationen erreicht werden, geringer als beim Ansatz mit 50 g L^{-1} *L. kefir*. Der Grund für diese Abnahme der spezifischen Produktbildungskapazität mit steigender Zellkonzentration konnte nicht abschließend geklärt werden. Für die weiteren Biotransformationen zur DHHB-Synthese wurde hinsichtlich der Ausschöpfung der Umsetzungskapazität des Biokatalysators eine *L. kefir*-Konzentration von 50 g L^{-1} ausgewählt.

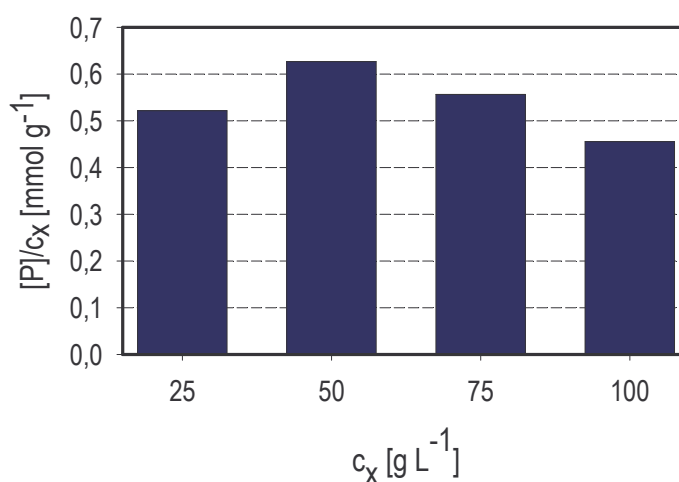


Abb. 5.3-8 Biotrockenmasseabhängigkeit der spezifischen Produktbildungskapazität (50 mM DOHTB, $\varphi_{V,DOHTB} = 0.013$, 50 mM Glukose, 0.2 M KPi-Puffer, pH 6.5, 25°C, 20 h)

5.3.4 Untersuchungen des Sauerstoffeinflusses auf die Nebenproduktbildung

Der Einfluss von Sauerstoff auf die Biotransformation von DOHTB wurde in Ansätzen mit linearer Edukt-Zudosierung in Parallelansätzen untersucht. Dabei wurden stickstoffbegaste mit luftbegasten Ansätzen verglichen. Die Versuche wurden im gerührten Reaktionssystem mit 75 mL durchgeführt. Die Zudosierung des Edukts erfolgte mit einer Rate von $12 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und einer Zudosierungsdauer von 4 h. Das Cosubstrat Glukose wurde im doppeltem Überschuss vorgelegt. Um zwischen dem Sauerstoffeinfluss auf das Edukt und auf den Biokatalysator unterscheiden zu können, wurde die Eduktvorlage einmal mit Luft und einmal mit Stickstoff überlagert. In beiden Fällen wurde das Reaktionssystem mit Luft begast. Im dritten Ansatz wurden sowohl Eduktvorlage, als auch Reaktionssystem mit Stickstoff überlagert.

Die DHHB-Ausbeute der drei Ansätze nach 24 h sind in Abb. 5.3-9 vergleichend dargestellt. Es ist zu erkennen, dass durch die Einstellung einer sauerstofffreien Reaktionsumgebung, welches auch das Abschirmen des Edukts von Sauerstoff umfasst, die DHHB-Ausbeute erhöht werden kann. Die Ausbeuten von Endprodukt, Zwischenprodukt und Nebenprodukten sind in Abb. 5.3-10 abgebildet.

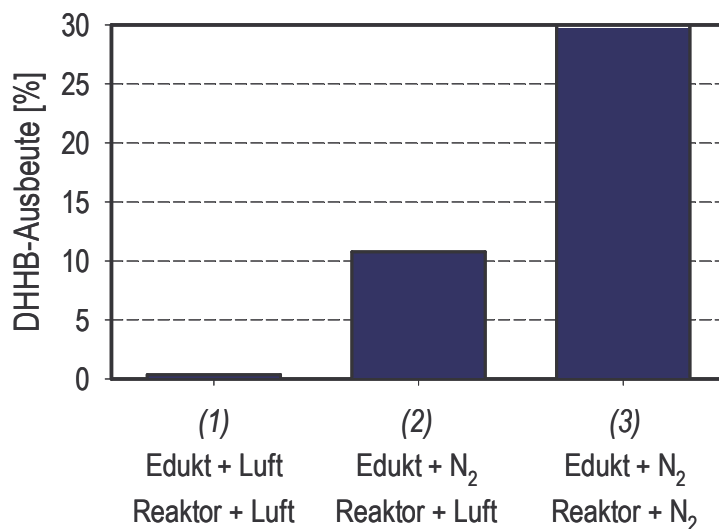


Abb. 5.3-9 Sauerstoffeinfluss auf die DHHB-Synthese (Gesamt: 50 mM DOHTB, $\varphi_{V,DOHTB} = 0.013$, 100 mM Glukose, 0.2 M KPi-Puffer, pH 6.5, 22°C, 24 h)

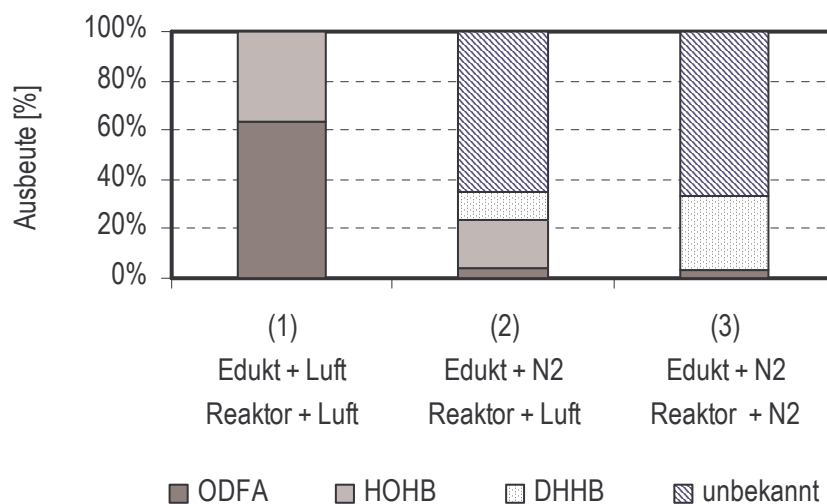


Abb. 5.3-10 Einfluss von Sauerstoff auf die Endzusammensetzung von Endprodukt, Zwischenprodukt und der Nebenprodukte (Gesamt: 50 mM DOHTB, $\varphi_{V,DOHTB} = 0.013$, 100 mM Glukose, 0.2 M KPi-Puffer, pH 6.5, 22°C, 24 h)

Werden sowohl Eduktvorlage, als auch das Reaktionssystem mit Luft begast, ist der Anteil am ODFA-Nebenprodukt sehr hoch (63.8 %). Das gebildete HOHB-Zwischenprodukt (35.9 %) wurde akkumuliert und nicht weiter in DHHB reduziert. Es wurde lediglich eine DHHB-Ausbeute von 0.3 % erreicht.

Wurde die Eduktvorlage mit Stickstoff überlagert, das Reaktionssystem jedoch nicht, so kann die ODFA-Bildung auf 1.5 mM (entspricht 3 %) unterdrückt werden. Das HOHB-Zwischenprodukt wird jedoch ebenfalls bis zum Reaktionsende bei 24 h akkumuliert (16 %). Die erreichte DHHB-Ausbeute beträgt hier 10.8 %.

Die beste DHHB-Ausbeute wurde bei dem Ansatz erreicht, bei dem sowohl das Reaktionsgefäß, als auch die Eduktvorlage mit Stickstoff überlagert wurden. Bei einem Furanon-Anteil von 2.4 % wurde hier eine DHHB-Ausbeute von 29.9 % erreicht. Dabei wurde das Zwischenprodukt vollständig in DHHB reduziert.

Des Weiteren ist aus Abb. 5.3-10 erkennbar, dass bei allen Ansätzen im Gegensatz zu den Satz-Ansätzen zur Ermittlung geeigneter Reaktionsbedingungen ein Anteil unbekannter Nebenprodukte zu verzeichnen ist, wobei dieser Anteil bei den Ansätzen (2) und (3) ~65 % beträgt. Der Anteil der unbekanntenen Nebenprodukte wurde dabei aus der zudosierten Eduktmenge abgeschätzt.

Bei Betrachtung der Zusammensetzung der unbekanntenen Nebenprodukte am Ende der Umsetzung ist ein deutlicher Unterschied zwischen den Ansätzen (2) und (3) zu erkennen (siehe Abb. 5.3-11). Die Signale der gaschromatographischen Analytik sind hierbei über ihre Retentionszeiten (t_R) für die verwendete Methode aufgetragen. Dabei kann zwischen Nebenprodukten unterschieden werden, die bereits in der Edukt-Charge vorkommen (als Verunreinigungen) und Nebenprodukten, welche während der Umsetzung gebildet werden.

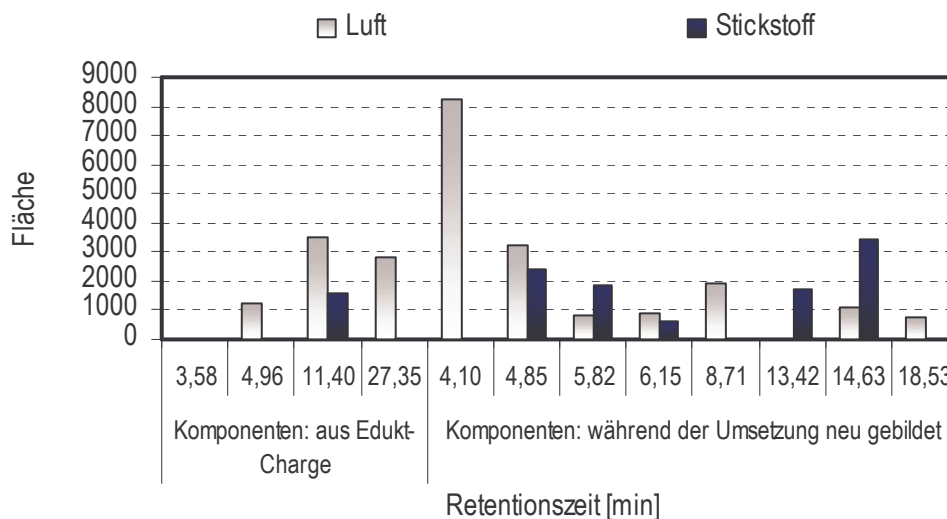


Abb. 5.3-11 Einfluss von Sauerstoff auf die Endzusammensetzung der unbekanntenen Nebenprodukte

Die unbekanntenen Nebenprodukte können dabei wie folgt zusammengefasst werden:

<i>Komponenten, aus der Eduktcharge stammend:</i>				
nur im Ansatz mit Luftbegasung bzw. hier deutlich größer	4.96 min	11.40 min	27.35 min	
<i>Komponenten, während der Umsetzung neu gebildet:</i>				
nur im Ansatz mit Luftbegasung bzw. hier deutlich größer	4.10 min	4.85 min	8.71 min	18.53 min
nur im Ansatz mit N ₂ -Begasung bzw. hier deutlich größer	5.82 min	13.42 min	14.63 min	

Zum einen ist zu erkennen, dass Nebenprodukte aus der DOHTB-Charge unterschiedlich stark abgebaut werden. Der Abbau kann sowohl einen Zerfall der Komponenten bedeuten, als auch eine Umsetzung durch *L. kefir*. Bei den Ansätzen mit Stickstoffüberlagerung sind hierbei die Verunreinigungen vollständig (t_R 4.96 und 27.35 min) bzw. stärker (t_R 11.4 min) abgebaut. Eine signifikante Verunreinigung wird bei beiden Ansätzen vollständig abgebaut (t_R 3.58 min).

Bei den unbekanntenen Nebenprodukten, welche während der Umsetzung entstehen, sind sowohl Komponenten vorhanden, die verstärkt im stickstoffbegasten Ansatz, als auch Komponenten, die verstärkt im luftbegasten Ansatz gebildet werden.

Diskussion

Aufgrund der Unterschiede der ODFA-Bildung der Ansätze (1) und (2) wird angenommen, dass sich bei Kontakt des Edukts mit Sauerstoff der Zerfall des Edukts in ODFA verstärkt wird. Aufgrund der hohen ODFA-Konzentration wurde beim Ansatz (1) die Umsetzung von HOHB in das Endprodukt inhibiert. Die ODFA-Bildung kann im Ansatz (2) durch die Überlagerung der Eduktvorlage mit Stickstoff zwar unterdrückt werden, die Akkumulation des Zwischenprodukts HOHB zeigt jedoch, dass andere inhibierende Faktoren eine Rolle spielen müssen.

Das verwendete Edukt besitzt eine Reinheit von 80 % (siehe Kapitel 3.3.1). Von den 20 % Verunreinigungsanteil des Edukts ist ein kleiner Teil bekannt (siehe Tabelle 3.3-1). Eine Mögliche Nebenreaktion ist dabei in Abb. 5.3-12 abgebildet.

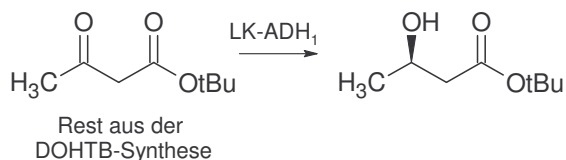


Abb. 5.3-12 Mögliche Reaktion eines bekannten Nebenprodukts aus der DOHTB-Charge

Es besteht die Möglichkeit, dass Moleküle aus den 20 % Verunreinigung neben ODFA eine inhibierende Wirkung auf die LK-ADH₂ ausüben. Werden die Ansätze (2) und (3) miteinander verglichen so ist ein Einfluss von Sauerstoff auf diese Inhibierungseffekte zu erkennen. Dieses ist sowohl am Unterschied der Ausbeuten, als auch am Unterschied der Zusammensetzung der unbekanntenen Nebenprodukte festzustellen. Des Weiteren wird bei Betrachtung der Signalzusammensetzung der unbekanntenen

Nebenprodukte deutlich, dass Komponenten aus dem Verunreinigungsanteil des Edukts abgebaut werden.

Unter aeroben und anaeroben Bedingungen müssen also Unterschiede im Metabolismus des Biokatalysators vorhanden sein. Eine Beeinflussung der Biotransformation kann dabei von folgenden Komponenten hervorgerufen werden:

- Komponenten des 20 %-Verunreinigungsanteils des DOHTB,
- Umsetzungs- bzw. Abbauprodukte der Komponenten des 20 %-Verunreinigungsanteils,
- andere unbekannte Umsetzungs- bzw. Abbauprodukte (aus DOHTB, HOHB, ODFA oder DHHB).

Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen, dass die vorliegende Biotransformation zur DHHB-Synthese mit *L. kefir* unter Sauerstoffatmosphäre sehr instabil ist. Dieses macht eine Stickstoffbegasung unerlässlich, wenn gute und reproduzierbare Ausbeuten erhalten werden sollen.

Um eine bessere Erkenntnis über die inhibierenden Effekte zu bekommen, wäre eine Analyse der unbekannt Nebenprodukte von Interesse. Hierbei ist zu beachten, dass mittels der gaschromatographischen Analyse die erfassten Nebenprodukte nur auf die verwendete Methode und Trennsäule zu begrenzen sind. Soll eine Identifikation der Nebenprodukte erfolgen, so sind andere Analysemethoden, wie zum Beispiel die Massenspektrometrie (MS), die Kernresonanzspektroskopie (NMR) oder die Infrarotspektroskopie (IR), heranzuziehen.

5.3.5 Vergleich der Zusammensetzung verschiedener Edukt-Chargen

Während der Arbeit wurde mit drei verschiedenen Chargen des DOHTB gearbeitet (die Zusammenstellung der DOHTB-Chargen und die Auflistung der damit durchgeführten Versuche sind in Anhang B-III aufgelistet). Eine Untersuchung der Chargen mittels gaschromatographischer Analytik ergab, dass die DOHTB-Reinheit zwar gleich war, die Zusammensetzung des 20 % Verunreinigungsanteils sich jedoch deutlich voneinander unterschied. Die Signale der Nebenprodukte sind in Abb. 5.3-13 über den jeweiligen Retentionszeiten dargestellt.

Werden mit den unterschiedlichen Edukt-Chargen Biotransformationsversuche unter sonst gleichen Reaktionsbedingungen durchgeführt, so lässt sich auch ein Unterschied in den erzielten Ausbeuten erkennen. Wird der in Kapitel 5.3.4 geschilderte Ansatz mit Stickstoffbegasung des gesamten Reaktionssystems, welcher mit der DOHTB-Charge 2 durchgeführt wurde, mit einem vergleichbaren Ansatz der Edukt-Charge 3 verglichen, so ist die erreichte DHHB-Konzentration des Ansatzes mit der Charge 3 mit einer Ausbeute von 53.7 % um den Faktor 1.8 höher. Wird die Zusammensetzung der Signale der unbekannt Nebenprodukte nach Ende der Reaktion beider Chargen miteinander verglichen, so ist auch hier ein deutlicher Unterschied in der Endzusammensetzung zu erkennen (Daten dem Anhang B-III zu entnehmen).

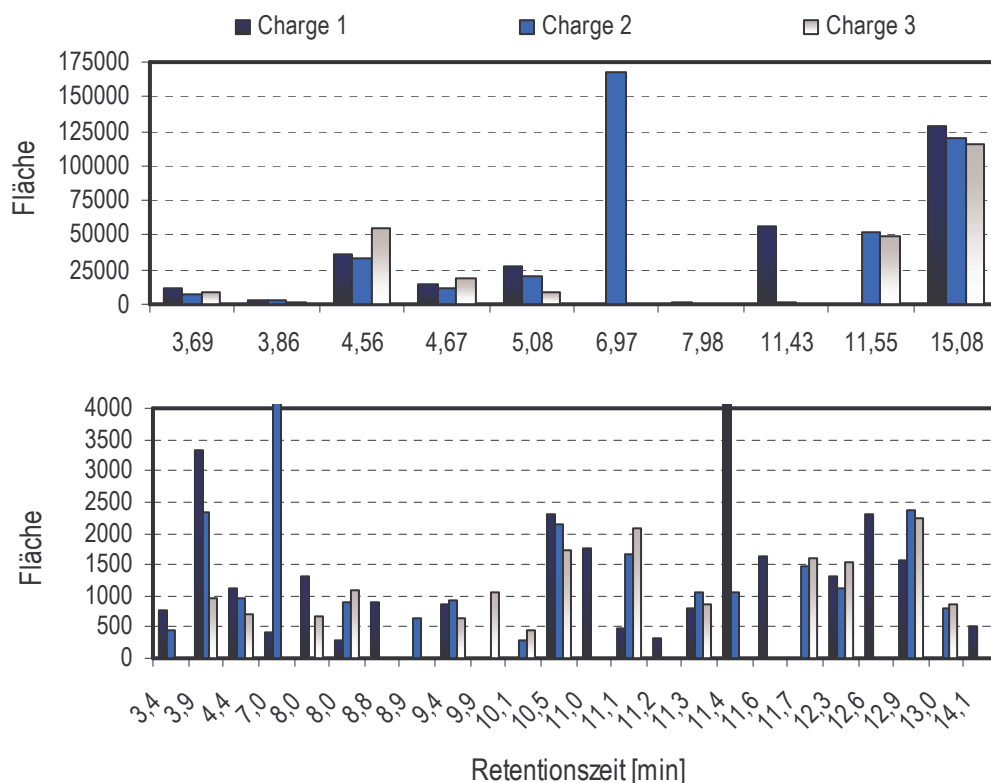


Abb. 5.3-13 Vergleich der Signalfächen der unbekanntenen Nebenprodukte für alle drei DOHTB-Chargen (oben: Nebenprodukte mit einer Signalfäche > 4000, unten: Nebenprodukte mit einer Signalfäche < 4000)

Es wird also deutlich, dass auch eine definierte Zusammensetzung des 20 % Verunreinigungsanteils wichtig für die Reproduzierbarkeit der untersuchten Biotransformation ist. Die Anwesenheit von möglichen Inhibitoren oder Effektoren in diesem Nebenproduktanteil ist nicht auszuschließen. Diese Aussage wird von den Untersuchungen in Kapitel 5.3.4 unterstützt, welche ebenfalls zeigten, dass diese unbekanntenen Nebenprodukte möglicherweise einen Einfluss auf die Biotransformation ausüben könnten.

5.3.6 Untersuchungen zur Ermittlung eines geeigneten Edukt-Zudosierungsprofils

Aufgrund der Instabilität des Edukts und der möglichen Inhibierungseffekte durch das Nebenprodukt ODFA und/oder das Zwischenprodukt ist die Ermittlung eines geeigneten Edukt-Zudosierungsprofils für die Prozessoptimierung unerlässlich. Schwerpunkte sind hierbei sowohl hohe Konzentrationen des Endprodukts DHHB, als auch eine möglichst hohe DHHB-Ausbeute.

Die Untersuchungen zur Ermittlung eines geeigneten Edukt-Zudosierungsprofils erfolgten zunächst empirisch. Als Grundlage für die Zudosierungsgeschwindigkeit wurden dabei die Produktbildungsraten der Satz-Ansätze herangezogen (siehe Kapitel 5.3.2). Die Ansätze mit verschiedenen Edukt-Zudosierungsraten ermöglichen dabei, bessere Aussagen über mögliche Inhibierungseffekte zu treffen. Dieses umfasst zum

einen die oben bereits erwähnten Inhibierungen, zum anderen eine mögliche Endproduktinhibierung durch DHHB.

Es wurden sowohl Ansätze mit intermittierender Edukt-Zudosierung, als auch konstantem Zudosierungsprofil untersucht. Eine weitere Variation betraf die absolute Menge an zudosiertem Edukt, welche über die Zudosierungsdauer bestimmt wurde. Nach Ende der Zudosierung wurde die Reaktion weiter verfolgt, um die langsamere Weiterreaktion des Zwischenprodukts in DHHB zu ermöglichen. Ein Teil der Versuche fanden in Citrat-Phosphat-Puffer statt, wobei für die verwendeten Prozessbedingungen die Vergleichbarkeit mit KPi-Puffer gegeben ist (Pufferkonzentration 0.2 M, pH 6.5, 22°C). Die Versuche fanden in gerührten Reaktionssystemen mit Reaktionsvolumina zwischen 25 mL und 100 mL statt (siehe Kapitel 4.6.2). Eine Auflistung der Versuchsbedingungen ist Anhang B-IV zu entnehmen.

In Abb. 5.3-14 sind die DHHB-Ausbeuten und die erreichten spezifischen Produktbildungskapazitäten sowohl für die Ansätze mit intermittierender Edukt-Zudosierung, als auch für die Ansätze mit konstanter linearer Edukt-Zudosierung dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass kein signifikanter Unterschied in den Ausbeuten und in der spezifischen Produktbildungskapazität zu verzeichnen ist. Die beste Ausbeute wurde bei dem Ansatz mit linearer Edukt-Zudosierung und einer Zudosierungsrate von $6.7 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht (55.7 mM DHHB, $\varphi_{V,DHHB} = 0.005$, Ausbeute 85 %, spezifische Produktbildungskapazität 0.99 mmol g^{-1}). Die erreichten Ausbeuten der intermittierenden Ansätze mit $4 \times 25 \text{ mM}$ jede 2 h und $8 \times 12.5 \text{ mM}$ jede Stunde, sowie des Ansatzes mit einer linearen Edukt-Zudosierung von $10 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ liegen im vergleichbaren Bereich um 50 % bis 57.5 %.

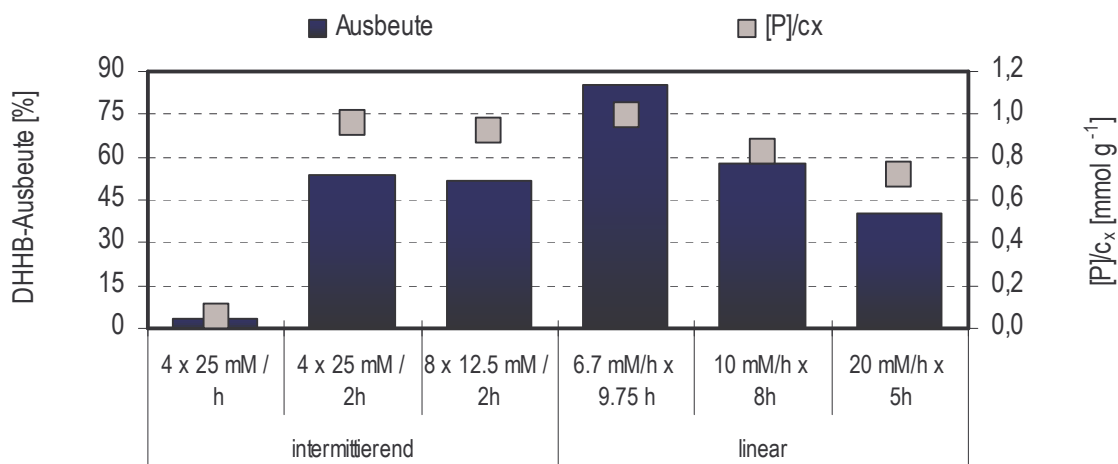


Abb. 5.3-14 Vergleich der Ausbeute und der spezifischen Produktbildungskapazität der Ansätze zur Ermittlung eines geeigneten Edukt-Zudosierungsprofils

In Abb. 5.3-15 sind die Ausbeuten an Endprodukt, Zwischenprodukt und Nebenprodukten für die Ansätze dargestellt. Es ist zu erkennen, dass bei fast allen Ansätzen eine Bilanzlücke mit unbekanntem Nebenprodukten vorliegt. Hierbei konnte für die verschiedenen DOHTB-Zudosierungsprofile ein Unterschied festgestellt werden.

Werden die Ansätze mit linearer DOHTB-Zudosierung verglichen, so ist zu erkennen, dass die Edukt-Zudosierungsrate einen Einfluss auf die Bildung der unbekannt Nebenprodukte hat. Durch eine Erhöhung der DOHTB-Zudosierung von 6.7 auf 10 mmol L⁻¹ h⁻¹ steigt der Anteil der unbekannt Nebenprodukte von 12 % auf 42 %. Bei dem Ansatz mit einer Zudosierungsrate von 20 mmol L⁻¹ h⁻¹ kann aus dem Konzentrationsverlauf entnommen werden, dass die Umsetzung nach 26.75 h im Gegensatz zu den beiden anderen Ansätzen noch nicht zu Ende war (siehe Anhang B-IV). Die Verlangsamung der DHHB-Bildung kann hierbei zum einen durch die HOHB-Akkumulation (100 mM) verursacht sein, welches ein weiteres Indiz für die Inhibierung der zweiten Reduktionsreaktion durch HOHB ist. Zum anderen ist bei diesem Ansatz ein Furanon-Anteil von 12.5 % festzustellen, welcher auch eine inhibierende Rolle spielen kann.

Die geringe Ausbeute des Ansatzes mit einer Zudosierung von 4 mal 25 mM DOHTB jede Stunde kann dagegen auf die starke Bildung des Nebenprodukts ODFA zurückgeführt werden. Hierbei kann beobachtet werden, dass der Anteil der Bilanzlücke bei den Ansätzen mit hohem Furanon-Anteil am geringsten ist.

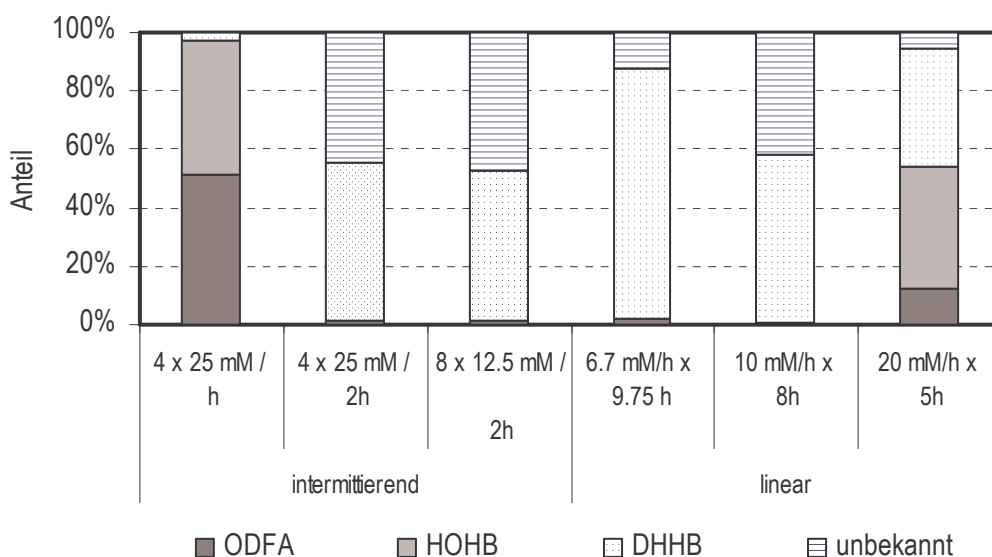


Abb. 5.3-15 Vergleich der Endzusammensetzung der Ansätze zur Ermittlung eines geeigneten Edukt-Zudosierungsprofils

In Abb. 5.3-16 sind exemplarisch die Konzentrationsverläufe und die DHHB-Produktbildungsraten für den Ansatz mit linearer Zudosierungsrate von 6.7 mmol L⁻¹ h⁻¹ (Abb. 5.3-16 A) und für den Ansatz mit intermittierender DOHTB-Zudosierung von 4 mal 25 mmol L⁻¹ jede zweite Stunde (Abb. 5.3-16 B) dargestellt.

Bei dem Ansatz mit linearer Edukt-Zudosierung werden die unbekannt Nebenprodukte parallel zur Edukt-Zudosierung gebildet. Die höchste Produktbildungsrate wurde zwischen 8 h und 9.75 h erreicht und betrug 4.2 mmol L⁻¹ h⁻¹. Dieses entspricht dem Zeitpunkt mit höchster Zwischenprodukt-

Akkumulation. Aufgrund fehlender Datenpunkte zwischen 9.75 h und dem Ende der Reaktion macht die Berechnung einer Raum-Zeit-Ausbeute in dem Fall keinen Sinn.

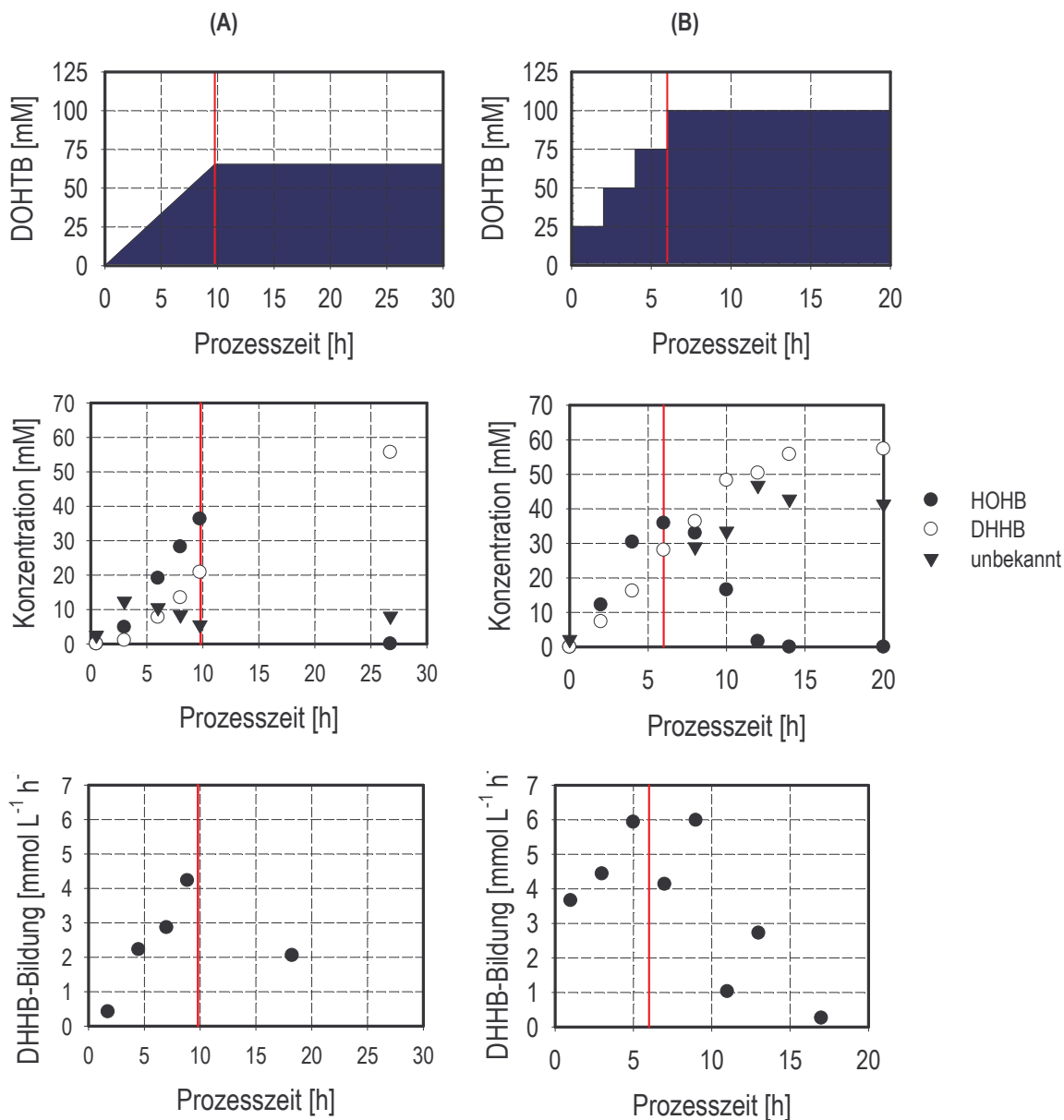


Abb. 5.3-16 Konzentrationsverläufe und DHHB-Produktbildungsraten für: A) eine lineare Edukt-Zudosierungsrate von $6.7 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ für 9.75 h, B) eine intermittierende Edukt-Zudosierung von $4 \times 25 \text{ mmol L}^{-1}$ jede 2 h; das Ende der Zudosierung ist jeweils mit einer vertikalen Linie markiert; die DOHTB-Zudosierungsprofile sind über den Konzentrationsverläufen dargestellt

Bei dem intermittierenden Ansatz konnte eine Raum-Zeit-Ausbeute von $3.98 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht werden. Die Produktbildungsrate bis zu 10 h betrug $\sim 5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Hier treten die unbekanntes Nebenprodukte erst nach Ende der Edukt-Zudosierung (mit einem Strich markiert) zum Vorschein. Dieses kann aus Schwankungen in der Probenahme resultieren. Auch hier besteht die Problematik einer homogenen Probenahme, da die Löslichkeitsgrenzen für die Komponenten sehr gering sind und deswegen hauptsächlich ein Zwei-Phasen-System vorliegt.

Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass sich bei anderer Prozessführung die Nebenproduktbildung voneinander unterscheidet und in diesem Fall die Nebenprodukte aus dem HOHB-Zwischenprodukt gebildet werden.

Diskussion

In Abb. 5.3-17 ist die zeitliche Veränderung der Signalfäche der unbekannt Nebenprodukte des Ansatzes mit einer linearen Edukt-Zudosierungsrate von $6.7 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ für ausgewählte Signale dargestellt. Das Ende der Edukt-Zudosierung ist mit der Linie gekennzeichnet. In Abb. 5.3-17 (A) ist dabei der zeitliche Verlauf für ein Signal aus dem 20 %-Verunreinigungsanteil des Edukts abgebildet. Es ist dabei zu erkennen, dass eine Abnahme des Signals über der Prozesszeit gegeben ist. Hierbei ist sowohl ein Zerfall, als auch ein Umsatz der Komponente durch die Biokatalysatoren möglich. Da die Berechnungen und die Kalibrierungen bereits mit einer Eduktreinheit von 80 % durchgeführt wurden, fallen diese Komponenten nicht mit in die Bilanzlücke. In Abb. 5.3-17 (B) und (C) sind zeitliche Signalverläufe von während der Biotransformation gebildeten, unbekannt Nebenprodukten dargestellt. Alle haben gemeinsam, dass während der Edukt-Zudosierungsphase eine Zunahme der Signalfäche zu verzeichnen ist. Bei einer Gruppe, wie z.B. bei den Retentionszeiten 6.2 min und 13.4 min, ist nach Ende der Edukt-Zudosierung keine weitere Flächenzunahme mehr zu beobachten. Dieser Verlauf korreliert mit dem Verlauf der Bilanzlücke der unbekannt Nebenprodukte aus Abb. 5.3-16 (A). Bei dem Signal mit der Retentionszeit von 14.6 min ist auch nach Ende der Edukt-Zudosierung eine weitere Flächenzunahme gegeben. Dieses könnte z.B. das Signal vom Abbau- bzw. Umsetzungsprodukt des Nebenprodukts bei 11.4 min sein. Bei der dritten Gruppe ist eine Abnahme der Signalfäche der während der Umsetzung gebildeten Produkte nach Ende der Edukt-Zudosierung zu erkennen. Auch dieser Verlauf korreliert mit der Bilanzlücke im Prozess.

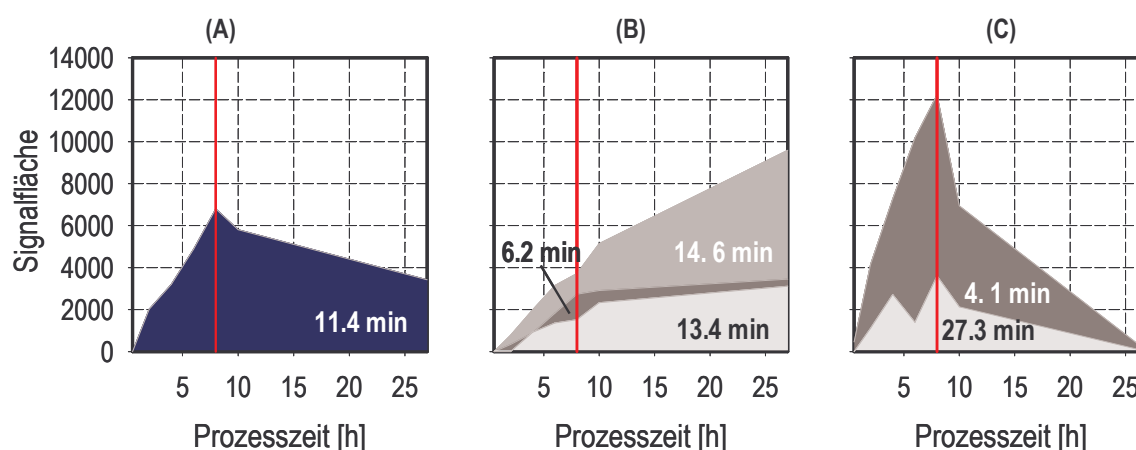


Abb. 5.3-17 Veränderung der Signalfäche über der Prozesszeit für die unbekannt Nebenprodukte: A) Verunreinigung aus DOHTB-Charge, B) und C) während der Biotransformation gebildete unbekannt Nebenprodukte

Werden die Verläufe in Abb. 5.3-17 (B) und (C) mit Ausnahme des Signals bei 14.6 min sowie der Verlauf der Bilanzlücke der unbekannt Nebenprodukte

betrachtet, so liegt die Vermutung nahe, dass die unbekanntenen Nebenprodukte von mehreren Zerfallsreaktionen oder durch enzymkatalysierte Umsetzungsreaktionen des Edukts stammen. Sie können nicht vom Zwischenprodukt stammen, da in dem Fall der zeitliche Verlauf mit dem DHHB-Verlauf korrelieren muss. Ein Zerfall bzw. eine weitere Umsetzung des Endprodukts DHHB kann auch ausgeschlossen werden, da hier die DHHB-Konzentration nach Ende der Umsetzung abnehmen müsste.

Werden die Ansätze mit Edukt-Überdosierung betrachtet, so ist erkennbar, dass die Bilanzlücken der unbekanntenen Nebenprodukte hier sehr klein sind (siehe Abb. 5.3-15). Dieses könnte dadurch begründet sein, dass die Zerfalls- bzw. Umsetzungsreaktionen des Edukts zu den unbekanntenen Nebenprodukten mit der Zerfallsreaktion zu ODFA konkurrieren. Angenommen die Geschwindigkeitskonstante der ODFA-Bildung ist viel höher als die anderen Geschwindigkeitskonstanten, wird die Bildung der unbekanntenen Nebenprodukte somit durch die ODFA-Bildung unterdrückt.

5.3.7 Modellgestützte Ermittlung der kinetischen Daten

Die durch die Versuche mit Edukt-Zudosierung gewonnenen Konzentrationsverläufe (siehe Kapitel 5.3.6) wurden zusammen mit den Prozessdaten der Satz-Ansätze als Grundlage zur modellgestützten Bestimmung der kinetischen Daten des Biotransformationssystems verwendet (siehe Kapitel 4.7). Dabei wurde eine Parameteridentifikation für 6 verschiedene Modelle durchgeführt. Die Generationsanzahl des verwendeten genetischen Algorithmus betrug 50. Hierbei wurden 6 Prozesse für die Identifikation und 4 Prozesse für die Validierung verwendet (siehe Abb. 4.7-1). Eine Auflistung der verwendeten Prozesse ist dem Anhang B-V zu entnehmen.

Im folgenden wird das Modell mit der besten Anpassung vorgestellt. Eine schematische Darstellung der Reaktionen mit ihren jeweiligen Produktbildungsraten für das ausgewählte Modell ist in Abb. 5.3-18 dargestellt. Die Produktbildungsrate v_1 entspricht dabei der Umsetzungsgeschwindigkeit der LK-ADH₁ und v_3 der Umsetzungsgeschwindigkeit der LK-ADH₂. Des Weiteren wird über v_2 der Edukt-Zerfall in die Nebenprodukte beschrieben. Diese Zerfallsgeschwindigkeit umfasst sowohl das bekannte Nebenprodukt ODFA, als auch die bereits erwähnten unbekanntenen Nebenprodukte.

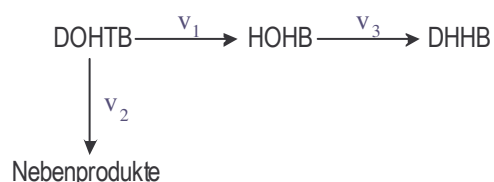


Abb. 5.3-18 Schematische Darstellung der an der DHHB-Synthese mit *L. kefir* beteiligten Reaktionen und der jeweiligen Reaktionsgeschwindigkeiten

Für das Reaktormodell wurden dabei folgende Annahmen getroffen:

- Idealer Rührkesselreaktor mit idealer Durchmischung des Reaktionsmediums. Es liegen keine örtlichen Unterschiede der Prozessvariablen im Reaktor vor, so dass die Impulsbilanzgleichungen entfallen.
- Isotherme Reaktionsbedingungen im Reaktor, so dass die Energieerhaltung nicht berücksichtigt werden muss.

Des Weiteren wurden für die einzelnen Reaktionen folgende Annahmen gemacht:

- Michaelis-Menten-Kinetik für die Umsetzung des Edukts DOHTB in das Monohydroxy-Zwischenprodukt HOHB.
- Inhibierungskinetik der DHHB-Bildungsrate durch das Edukt der LK-ADH₂ HOHB.
- Konstanter Zerfall des Edukts DOHTB in die Nebenprodukte mit einer Reaktion erster Ordnung.

Für DOHTB, HOHB und DHHB wurde des Weiteren die Annahme eines „quasi-gelösten“ Stoffsystems getroffen. Voraussetzung für diese Annahme ist, dass sehr feine Tropfen für die Komponenten im Reaktionssystem vorliegen müssen. Dieses würde bedeuten, dass eine ausreichend hohe Stoffaustauschfläche zur Verfügung steht. Unter der Annahme einer daraus resultierenden hohen Stofftransportrate, wurden die Komponenten bei dem erstellten Modell nicht als zweite Phase betrachtet.

Basierend auf den oben aufgeführten Annahmen für das Reaktormodell, wird zur Beschreibung des Reaktors lediglich die Massenbilanz benötigt. Diese wird für den Satz-Betrieb, ohne Massenaustausch mit der Umgebung, für die Komponente i durch folgende Gleichung wiedergegeben:

$$\frac{dc_i}{dt} = v_i \quad (59)$$

Für Prozesse mit der Edukt-Zudosierungsrate F und keinem Ablauf des Reaktionsgemisches V_R ergibt sich folgende Gleichung:

$$\frac{dc_i}{dt} = \frac{F}{V_R} (c_{i,\text{ein}} - c_i) + v_i \quad (60)$$

Das formalkinetische Modell mit sechs kinetischen Parametern ($v_{\text{HOHB,max}}$, $K_{\text{m,HOHB}}$, k_d , $v_{\text{DHHB,max}}$, $K_{\text{m,DHHB}}$ und $K_{\text{i,DHHB}}$) ist im folgenden wiedergegeben:

$$v_1 = \frac{d[\text{HOHB}]}{dt} = v_{\text{HOHB,max}} \cdot \frac{[\text{DOHTB}]}{K_{\text{m,HOHB}} + [\text{DOHTB}]} \quad (61)$$

$$v_2 = k_d \cdot [\text{DOHTB}] \tag{62}$$

$$v_3 = \frac{d[\text{DHHB}]}{dt} = v_{\text{DHHB,max}} \cdot \frac{[\text{HOHB}]}{K_{m,\text{DHHB}} + [\text{HOHB}] + [\text{HOHB}]^2 / K_{i,\text{DHHB}}} \tag{63}$$

Die ermittelten formalkinetischen Parameter sind in Tabelle 5.3-1 zusammengefasst.

Tabelle 5.3-1 *Ermittelte formalkinetische Parameter der DHHB-Synthese mit L.kefir*

$v_{\text{HOHB,max}}$	981.9	$\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$
$K_{m,\text{HOHB}}$	849.3	mmol L^{-1}
k_d	1.75	h^{-1}
$v_{\text{DHHB,max}}$	13.7	$\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$
$K_{m,\text{DHHB}}$	19.8	mmol L^{-1}
$K_{i,\text{DHHB}}$	100	mmol L^{-1}

Die Bestimmtheitsmaße für das ermittelte formalkinetische Modell sind in Abb. 5.3-19 für die Konzentrationsverläufe von DOHTB, HOHB und DHHB dargestellt. Die dunklen Balken stellen dabei die Prozesse dar, welche zur Parameteridentifikation verwendet wurden. Die weissen Balken stellen dagegen die Prozesse zur Validierung dar.

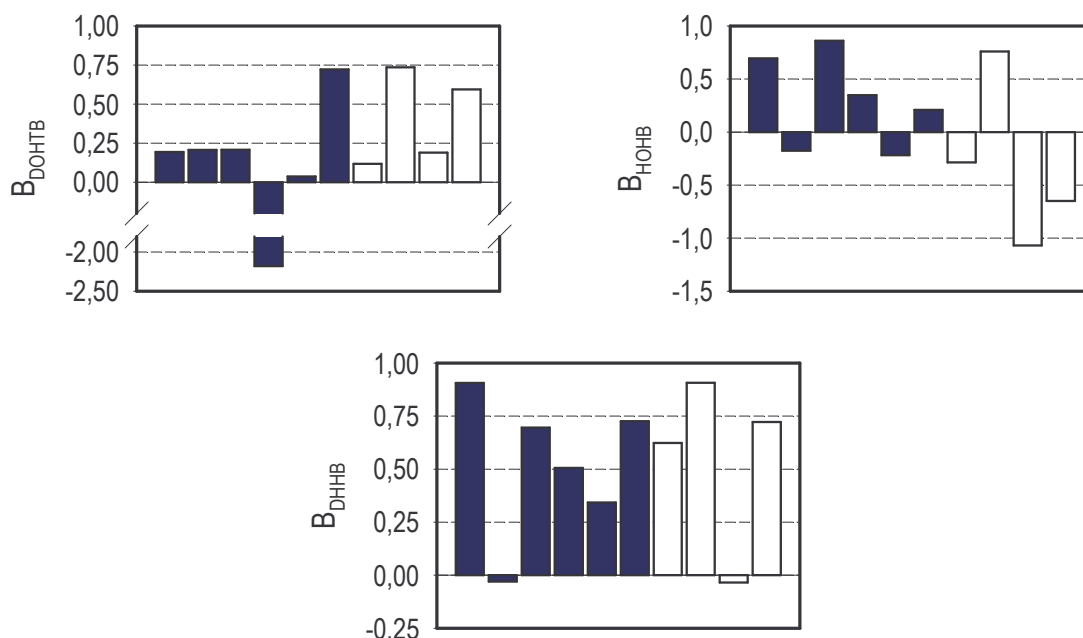


Abb. 5.3-19 *Darstellung des Bestimmtheitsmaßes B des formalkinetischen Modells für DOHTB, HOHB und DHHB: die dunklen Balken stellen die Prozesse zur Parameteridentifikation, die weissen Balken die Prozesse zur Validierung dar.*

Während in technischen Anwendungen häufig ein Bestimmtheitsmaß von mindestens 0.9 verlangt wird, um einen funktionellen Zusammenhang festzustellen, wird in biologischen Anwendungen mit wesentlich geringeren Bestimmtheitsmaßen gearbeitet [Weihs et al., 1999; Wolf, 1994]. Es ist zu erkennen, dass für DHHB eine gute Anpassung der Konzentrationsverläufe für einen großen Teil der Prozesse gegeben ist. Hierbei konnten für 60 % der Prozesse ein Bestimmtheitsmaß > 0.6 erreicht werden, welches für das untersuchte System als untere Grenze für eine zufrieden stellende Anpassung festgelegt wurde. Für 2 Prozesse wurde ein Bestimmtheitsmaß von 0.9 erreicht. Die Anpassungsgüten für die DOHTB- und HOHB-Konzentrationsverläufe sind im Gegensatz dazu geringer. In beiden Fällen wird nur für 30 % der Prozesse ein Bestimmtheitsmaß > 0.6 erreicht. Der Schwerpunkt bei der Modelldiskriminierung und Parameteridentifikation wurde jedoch auf die Anpassung des DHHB-Verlaufs gelegt.

In Abb. 5.3-20 sind Vergleiche der modellierten und experimentell ermittelten Konzentrationen für DOHTB, HOHB und DHHB eines ausgewählte Prozesses für die Parameteridentifikation exemplarisch dargestellt.

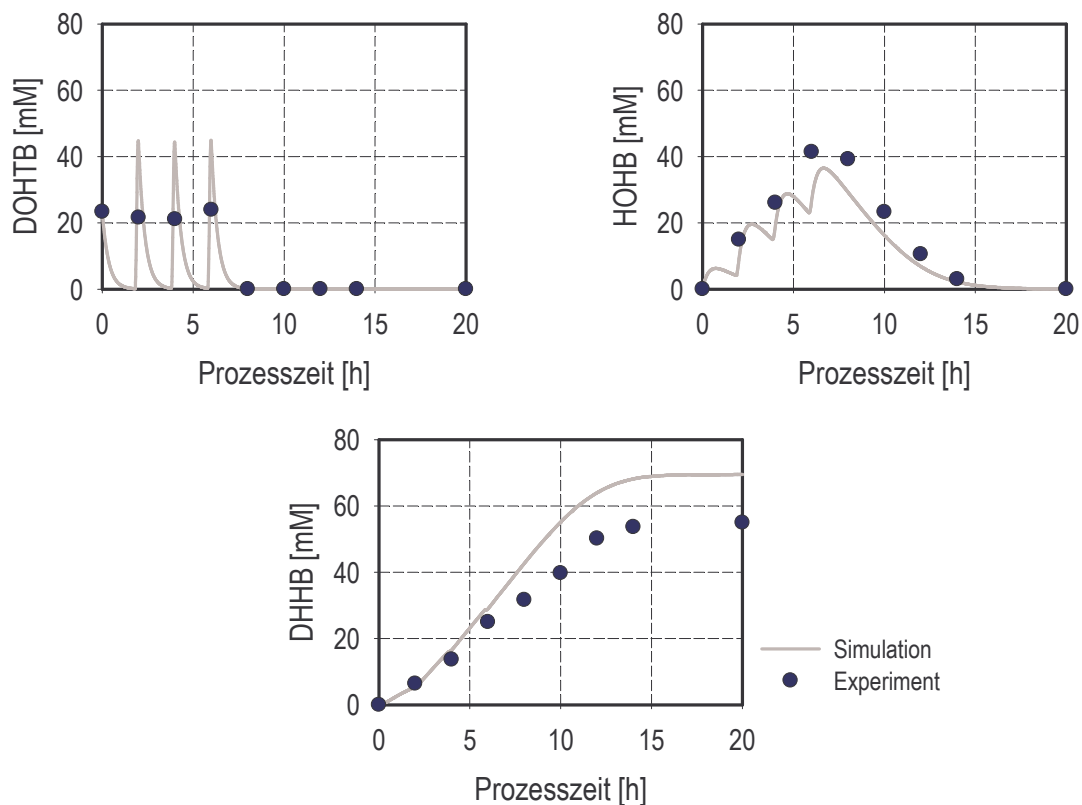


Abb. 5.3-20 Darstellung der modellierten und experimentell ermittelten Konzentrationen eines Ansatzes zur Parameteridentifikation: Bestimmtheitsmaße $DOHTB = 0.21$, $HOHB = 0.86$, $DHHB = 0.70$ (Ansatz IV, Anhang B-V, intermittierende DOHTB-Zudosierung, $4 \times 25 \text{ mM} / 2\text{h}$, 0.2 M Citrat-Phosphat-Puffer, $\text{pH } 6.5$, 22°C)

Die in Abb. 5.3-21 dargestellten Prozessverläufe gelten für einen ausgewählten Prozess, der zur Validierung eingesetzt wurde.

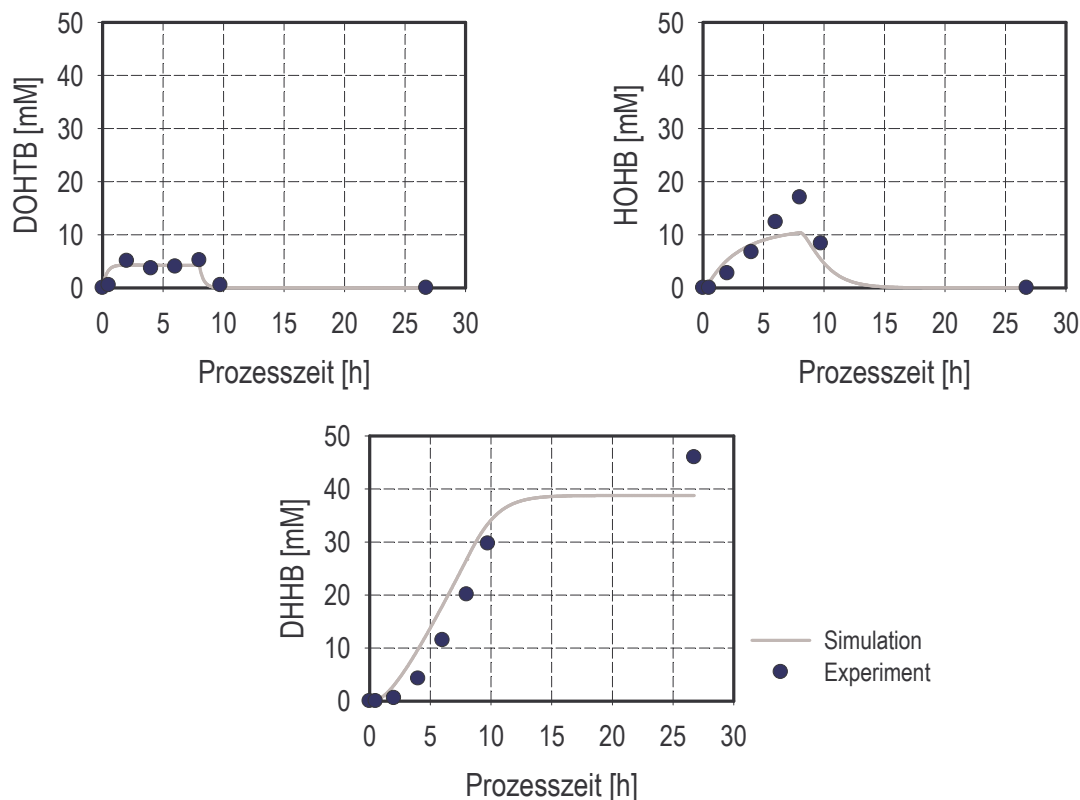


Abb. 5.3-21 Darstellung der modellierten und experimentell ermittelten Konzentrationen eines Ansatzes zur Validierung: Bestimmtheitsmaße $DOHTB = 0.74$, $HOHB = 0.76$, $DHHB = 0.91$ (Ansatz IX, Anhang B-V, lineares DOHTB-Zudosierungsprofil, $12.6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1} \times 8 \text{ h}$, 0.2 M KPi-Puffer , $\text{pH } 6.5$, 22°C)

Es ist erkennbar, dass in beiden dargestellten Prozessen, welche mit unterschiedlicher Edukt-Zudosierungsart durchgeführt wurden, das ermittelte formalkinetische Modell die experimentellen Daten zufrieden stellend wiedergeben kann.

Im formalkinetischen Modell nicht berücksichtigt wurde zum einen die mögliche Inhibierung der Umsetzung des Zwischenprodukts HOHB zu DHHB durch das Furanon-Nebenprodukt ODFA. Soll diese Inhibierung mit in das Modell einbezogen werden, so sind gezielte Versuche mit ODFA-Akkumulation notwendig. Ebenfalls nicht berücksichtigt wurden mögliche Inhibierungseffekte durch die unbekanntes Verunreinigungen bzw. der aus ihnen entstehenden Nebenprodukte. Für diesen Zweck müsste jedoch eine genauere Identifikation der unbekanntes Substanzen stattfinden.

5.3.8 Entwicklung eines DOHTB-Zudosierungsprofils und Implementierung im 50 mL-Maßstab

Das in Kapitel 5.3.7 beschriebene einfache formalkinetische Modell mit den identifizierten kinetischen Parametern wurde abschließend benutzt, um ein optimiertes DOHTB-Zudosierungsprofil zu entwickeln. Für die Ermittlung eines optimalen Zudosierungsprofils wurde der genetische Algorithmus verwendet (siehe Kapitel 4.8). Wie bereits in Kapitel 4.8 erwähnt wurden zwei Iterationsrunden mit

Zudosierungszeiträumen von 24 h und 10 h durchgeführt. Die Anzahl der Generationen lag hierbei für beide Iterationsrunden bei 50.

Die höchste DHHB-Konzentration wurde dabei für ein Zudosierungsprofil für den Zudosierungszeitraum von 10 h geschätzt. Dieses Profil ist in Abb. 5.3-22 (A) dargestellt. Die Konzentration an zudosiertem Edukt ist in Abb. 5.3-22 (B) abgebildet. Am Ende der Zudosierung wurde eine DOHTB-Konzentration von insgesamt 140 mM zugegeben. Die für dieses Zudosierungsprofil simulierten Konzentrationsverläufe für DOHTB, HOHB und DHHB sind in Abb. 5.3-22 (C) bis (E) dargestellt.

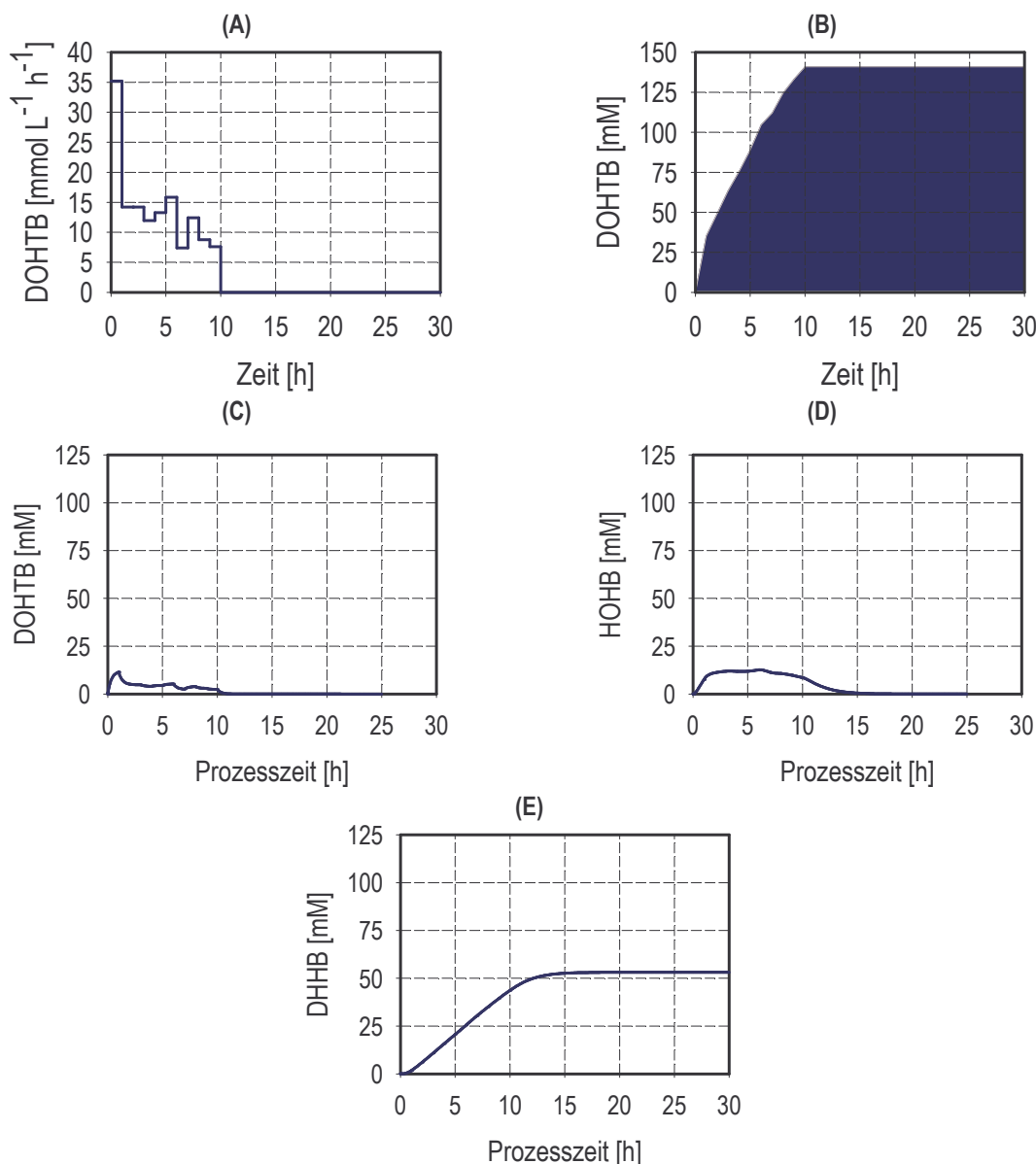


Abb. 5.3-22 Modellgestütztes Edukt-Zudosierungsprofil für die DHHB-Synthese mit *L. kefir* und die dafür simulierten Konzentrationsverläufe: (A) DOHTB-Zudosierungsrate [$\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$], (B) zudosierte DOHTB-Gesamtkonzentration [mM], (C) simulierter DOHTB-Konzentrationsverlauf, (D) simulierter HOHB-Konzentrationsverlauf, (E) simulierter DHHB-Konzentrationsverlauf

Das oben beschriebene DOHTB-Zudosierungsprofil wurde in einem Prozess mit 50 mL Reaktionsvolumen implementiert. Dafür wurden die nach der Beschreibung in Kapitel 4.5.6 hergestellten *L. kefir*-Zellen eingesetzt. Die vorgelegte Glukose-Konzentration betrug 400 mM. Die Verläufe der HOHB- und der DHHB-Konzentration sind Abb. 5.3-23 (A) zu entnehmen.

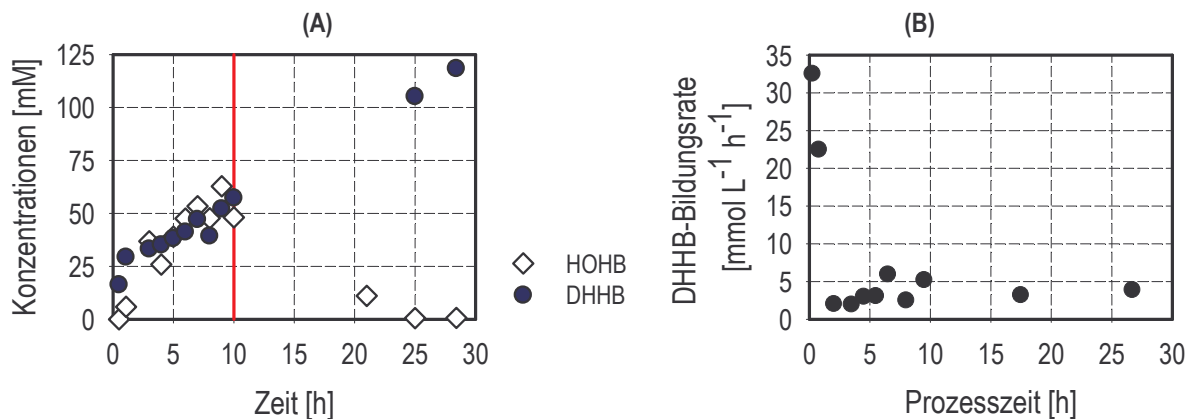


Abb. 5.3-23 (A) Konzentrationsverläufe für HOHB und DHHB für die Umsetzung mit modellgestützter DOHTB-Zudosierung (Zudosierung über 10 h, $V_R = 50$ mL, Ende der Zudosierung mit der vertikalen Linie markiert), (B) zeitlicher Verlauf der DHHB-Produktbildungsrate ($c_x = 50$ g L⁻¹, 400 mM Glukose, 0.2 M KPi-Puffer, pH 6.5, 22°C)

Nach einer Prozesszeit von 28 h ist das Ende der Umsetzung zu verzeichnen. Nach dieser Zeit wird eine DHHB-Konzentration von 120 mM erreicht ($\phi_{V,DHHB} = 0.018$). Die HOHB-Konzentration zu diesem Zeitpunkt beträgt nur noch 0.5 mM. Die erreichte DHHB-Ausbeute beträgt hierbei 85 % bei einer Raum-Zeit-Ausbeute von 4.3 mmol L⁻¹ h⁻¹ und einer spezifischen Produktbildungskapazität von 2.8 mmol g⁻¹. Der Anteil des bekannten Nebenprodukts ODFA liegt lediglich bei 1.6 % und der Anteil der unbekannt Nebenprodukte bei 13.4 %. Der Diastereomerenüberschuss wurde für die Prozesszeiten 10 h, 25 h, 45 h und 53 h ermittelt. Bei allen Proben konnte ein Diastereomerenüberschuss von > 99.5 % festgestellt werden. Die Konzentrationen des (3S,5S)-Enantiomers lagen hierbei unterhalb der Nachweisgrenze.

Die aus den DHHB-Messwerten ermittelten Produktbildungsrate für DHHB sind in Abb. 5.3-23 (B) über der Prozesszeit aufgetragen. Nach den anfänglich hohen Produktbildungsrate zwischen 20 und 30 mmol L⁻¹ h⁻¹ werden bis zum Ende der Zudosierung Produktbildungsrate zwischen 2 und 5 mmol L⁻¹ h⁻¹ erreicht. Dabei resultiert die Abnahme der Produktbildungsrate nach 10 h Prozesszeit aus dem Ende der Edukt-Zudosierung und korreliert mit einer Abnahme des akkumulierten Zwischenprodukts HOHB.

Werden die experimentellen Konzentrationsverläufe mit den vorhergesagten Verläufe verglichen, welche anhand der zuvor identifizierten kinetischen Parameter erstellt wurden, so ist eine deutliche Abweichung für alle Konzentrationsverläufe zu erkennen (siehe Abb. 5.3-24).

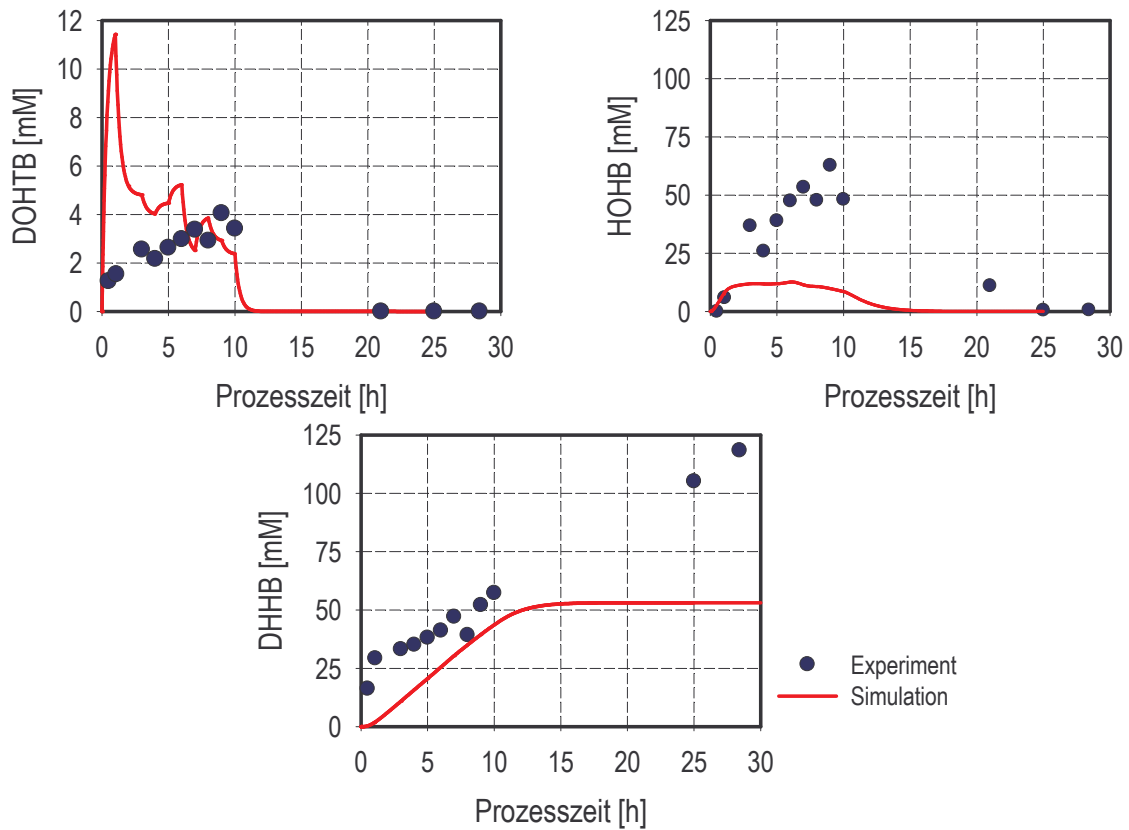


Abb. 5.3-24 Vergleich der experimentellen Konzentrationsverläufe mit den simulierten Verläufen für das DOHTB-Zudosierungsprofil

Der Grund für diese schlechte Übereinstimmung könnten andere formalkinetische Parameter für die selbst hergestellten Zellen, welche bei diesem Prozess eingesetzt wurden, sein. Daher wurde eine Neuentdeckung der formalkinetischen Parameter für diese Zellen durchgeführt. Für die Parameteridentifikation wurde dabei die bereits in Kapitel 5.3.7 benutzte Methode verwendet (siehe auch Kapitel 4.7). Das formalkinetische Modell wurde hierbei beibehalten. In Tabelle 5.3-2 werden die neu ermittelten formalkinetischen Parameter den Parametern der bisher verwendeten, kommerziell erworbenen Zellen gegenübergestellt.

Tabelle 5.3-2 Vergleich der neu ermittelten formalkinetischen Parameter für die selbst hergestellten Zellen mit den Parametern der kommerziell erworbenen Zellen

Parameter	kommerziell erworbene Zellen	hergestellte Zellen	
$V_{\text{HOHB,max}}$	981.9	764.92	$\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$
$K_{\text{m,HOHB}}$	849.3	101.83	mmol L^{-1}
k_{d}	1.75	1.72	h^{-1}
$V_{\text{DHHB,max}}$	13.7	29.33	$\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$
$K_{\text{m,DHHB}}$	19.8	6.52	mmol L^{-1}
$K_{\text{i,DHHB}}$	100	6.69	mmol L^{-1}

In Abb. 5.3-25 sind die experimentellen Konzentrationsverläufe und die nach den neu ermittelten formalkinetischen Parametern simulierten Verläufe dargestellt. Mit Ausnahme der DOHTB-Verlaufs ($B_{\text{DOHTB}} = -0.88$) konnte eine gute Anpassung erreicht werden. Die Bestimmtheitsmaße für HOHB und DHHB sind hierbei 0.86 und 0.69.

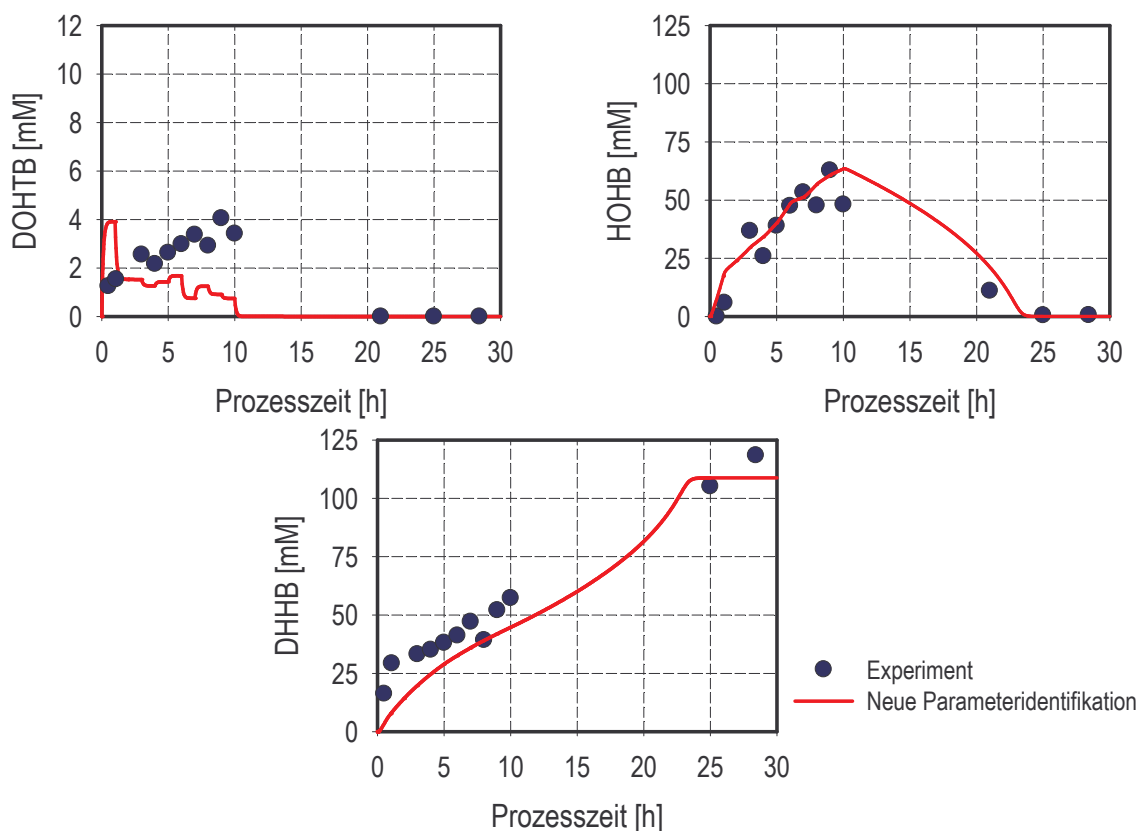


Abb. 5.3-25 Vergleich der experimentellen Konzentrationsverläufe und der für die neu ermittelten Parameter simulierten Konzentrationsverläufe

Beim Vergleich der formalkinetischen Parameter lässt sich der Unterschied der Konzentrationsverläufe zwischen den kommerziell erworbenen und den selbst hergestellten *L. kefir*-Zellen erklären. In Abb. 5.3-26 sind die ermittelten kinetischen Parameter der Umsetzung von DOHTB zu HOHB durch LK-ADH₁ und der Weiterreaktion von HOHB zu DHHB durch LK-ADH₂ nochmals vergleichend für beide Biokatalysatoren dargestellt. Die Geschwindigkeitskonstante zur Nebenproduktbildung war bei beiden Biokatalysatoren vergleichbar und liegt bei $\sim 1.7 \text{ h}^{-1}$.

Die ermittelte maximale Produktbildungsrate von DOHTB zu HOHB für die selbst hergestellten Zellen ist zwar geringer, die Michaelis-Menten-Konstante K_m der Umsetzung ist jedoch für die neuen Zellen um den Faktor 8 kleiner. Dies bedeutet, dass bei den selbst hergestellten Zellen bereits bei viel niedrigeren DOHTB-Konzentrationen höhere HOHB-Produktbildungsraten erreicht werden. Da diese Reaktion sehr schnell ist, werden die konkurrierenden Reaktionen zur Nebenproduktbildung unterdrückt.

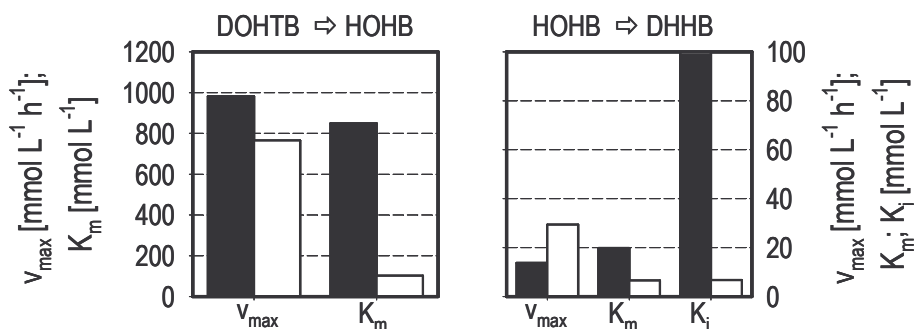


Abb. 5.3-26 Vergleich der formalkinetischen Parameter für die kommerziell erworbenen (dunkle Balken) und die selbst hergestellten *L. kefir*-Zellen (weiße Balken)

Werden die kinetischen Parameter für die Weiterreaktion zum DHHB betrachtet, so ist hier zu erkennen, dass die selbst hergestellten Zellen sowohl eine höhere Umsetzungsgeschwindigkeit, als auch eine geringere Michaelis-Menten-Konstante K_m besitzen. Die niedrigere Inhibierungskonstante K_i bedeutet zwar, dass die selbst hergestellten Zellen bereits bei geringeren HOHB-Konzentrationen inhibiert werden, dieses konnte jedoch bei dieser Umsetzung durch den schnellen Abbau des Zwischenprodukts HOHB kompensiert werden.

Zur Überprüfung der Tendenz der modellgestützten kinetischen Parameter wurden Messungen der Enzymaktivität der LK-ADH₂ im Zellextrakt durchgeführt. Dafür fanden Messungen mit 4-Hydroxy-4-Methyl-2-Pentanon (HMP) bei Konzentrationen zwischen 0.5 bis 50 mM in der Probe statt. Auch hier konnte eine Inhibierung des Enzyms durch das Monohydroxyketon HMP festgestellt werden. Bei einer Kurvenanpassung für eine Substratinhibierungskinetik durch die ermittelten Messwerte mittels Sigma-Plot konnten folgende kinetische Parameter ermittelt werden: $v_{max} = 235 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $K_m = 6.52 \text{ mmol L}^{-1}$ und $K_i = 80 \text{ mmol L}^{-1}$ (siehe Abb. 5.3-27). Diese unterscheiden sich von den kinetischen Parametern für die Reduktion von HOHB. Es ist hierbei zu beachten, dass die kinetischen Parameter für ein anderes Edukt ermittelt wurden und somit relativ zu betrachten sind. Die Inhibierung durch das HMP ist mit einer um den Faktor 12 höhere Inhibierungskonstante K_i weniger stark. Die ermittelten Michaelis-Menten-Konstanten K_m beider Substanzen sind dagegen vergleichbar.

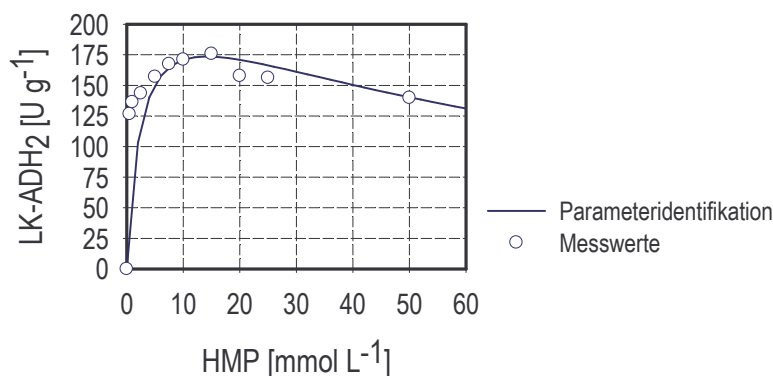


Abb. 5.3-27 Untersuchungen zur Substratinhibierungskinetik für die LK-ADH₂ im Zellextrakt, gemessen mit 4-Hydroxy-4-Methyl-2-Pentanon (HMP)

5.3.9 Beurteilung der Biotransformation zur 6-Cl-(3R,5S)-Dihydroxyhexansäure-tert-Butylester-Synthese

In Abb. 5.3-28 sind vergleichend die erreichte DHHB-Konzentration, die spezifische Produktbildungskapazität und die Raum-Zeit-Ausbeute des Prozesses mit optimiertem Edukt-Zudosierungsprofil und des Referenzprozesses aus der Literatur [Wolberg, 2001] dargestellt.

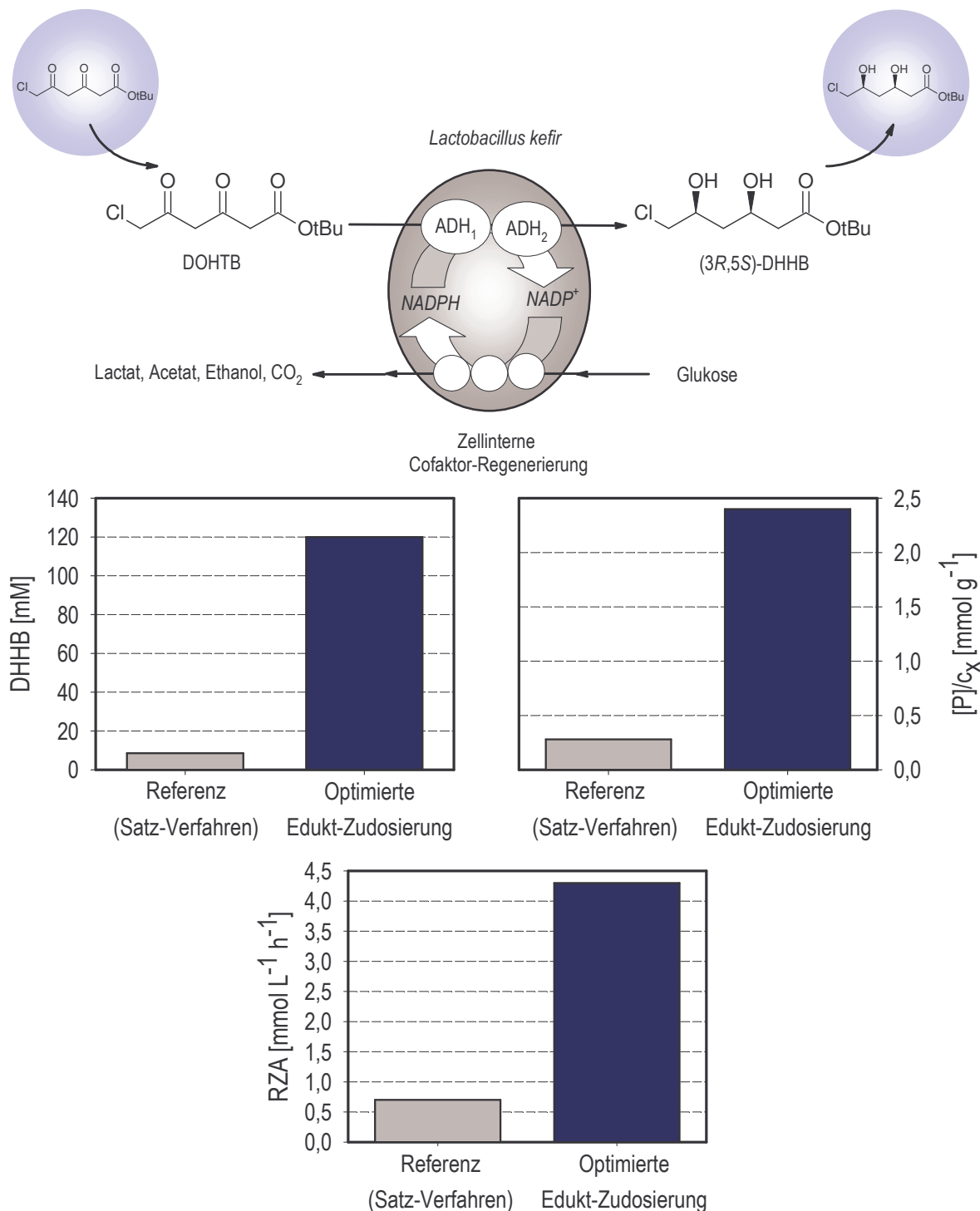


Abb. 5.3-28 Vergleich DHHB-Konzentration, der spezifischen Produktbildungskapazität und der Raum-Zeit-Ausbeute des Prozesses mit optimierter Edukt-Zudosierung und des Referenzansatzes aus der Literatur

Es ist zu erkennen, dass gegenüber dem Referenzprozess, welcher im Satz-Verfahren durchgeführt wurde, für alle Größen eine Verbesserung erreicht werden konnte. Die erreichte DHHB-Konzentration ist mit 120 mM um den Faktor 14 höher. Bei der spezifischen Produktbildungskapazität konnte mit 2.4 mmol g^{-1} eine Verbesserung um den Faktor 8.6 erreicht werden. Die Raum-Zeit-Ausbeute konnte von $0.7 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ auf $4.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ gesteigert werden. Dieses bedeutet eine Verbesserung um den Faktor 6. Wird die Ausbeute betrachtet, so wird hier eine Verbesserung um den Faktor 2.5 von 34 % auf 85.7 % erreicht. Der erreichte Diastereomerenüberschuss betrug beim Prozess mit optimierter Edukt-Zudosierung mehr als 99 %, welches einem Diastereomerenverhältnis $d_{r,s;a}$ von 199:1 entspricht. Für den Referenzansatz wurde dieser mit 135:1 bestimmt.

Es konnte also gezeigt werden, dass eine direkte Synthese von 6-Cl-(3*R*,5*S*)-Dihydroxyhexansäure-*tert*-Butylester auf mikrobiellem Wege mit *Lactobacillus kefir* durchführbar ist und somit der bisherige chemische Reduktionsschritt des HOHB-Zwischenprodukts umgangen werden kann.

Die Umsetzungsgeschwindigkeit des Gesamtprozesses wird deutlich von der Geschwindigkeit der zweiten Reduktionsreaktion des Zwischenprodukts HOHB in DHHB limitiert. Dieses ist sowohl beim Vergleich der maximalen Produktbildungsraten, als auch beim Vergleich der Michaelis-Konstanten zu erkennen. Werden zum Beispiel die formalkinetischen Parameter der selbst hergestellten *L. kefir* betrachtet, so ist die maximale Geschwindigkeit der ersten Reduktion $v_{\text{HOHB,max}}$ um den Faktor 26 höher als $v_{\text{DHHB,max}}$. Die Michaelis-Menten-Konstante der ersten Reduktion $K_{\text{m,HOHB}}$ ist um den Faktor 15.6 größer als $K_{\text{m,DHHB}}$. Des Weiteren ist bei der zweiten Reduktion eine Inhibierung durch das Zwischenprodukt HOHB gegeben.

Der Prozess mit optimiertem Edukt-Zudosierungsprofil wurde mit selbst hergestellten *L. kefir* durchgeführt, die nach einem optimierten Herstellungsverfahren produziert wurden. Bei einem Vergleich der formalkinetischen Parameter dieser Zellen mit kommerziell erworbenen Zellen konnte festgestellt werden, dass sich diese deutlich voneinander unterscheiden. Dieses ist ein weiterer Beweis dafür, dass die Kultivierungsbedingungen des Biokatalysators einen großen Einfluss auf die Enzymaktivitäten ausüben. Dieses kann sowohl Enzyme, welche die Umsetzung katalysieren, als auch andere Enzyme der Zelle betreffen. Für eine Optimierung von Biotransformationen sind daher Untersuchungen zur Biokatalysatorherstellung ein ausschlaggebender Punkt. Des Weiteren ist für die Prozessführung eine reproduzierbare Biokatalysatorqualität von großer Bedeutung.

Für die selbst hergestellten Zellen wären hierbei weiterführende Versuche zur genaueren Identifikation und Validierung der formalkinetischen Parameter notwendig. Dafür könnten folgende Untersuchungen gezielt durchgeführt werden:

- Satz-Prozesse mit Variation der DOHTB-Konzentration zur weiteren Verfeinerung von $v_{\text{HOHB,max}}$, $K_{\text{m,HOHB}}$, $v_{\text{DHHB,max}}$ und $K_{\text{m,DHHB}}$.

-
- Untersuchungen zur Inhibierung der LK-ADH₂ durch HOHB. Hierfür könnten mit Hilfe des genetischen Algorithmus gezielt Prozesse mit Akkumulation des HOHB generiert werden.
 - Untersuchungen zur möglichen Inhibierung der LK-ADH₂ durch die Nebenprodukte (ODFA und unbekannte Nebenprodukte), sowie eine Identifikation der unbekanntenen Nebenprodukte. Analog zur Inhibierung durch HOHB könnten hierfür gezielt Prozesse mit Akkumulation der Nebenprodukte generiert werden.

5.4 Asymmetrische Synthese von Ethyl-4-Cl-3-(S)-Hydroxybuttersäure-Ethylester

Ethyl-4-Cl-3-(S)-Hydroxybuttersäure-Ethylester ((S)-CHBE) wird in der konvergenten Statin-Synthese als Vorstufe zur Herstellung von 6-Cl-(3R,5S)-Dihydroxyhexansäureestern eingesetzt (siehe Kapitel 3.4). Die Herstellung des chiralen Bausteins über den enzymatischen bzw. mikrobiellen Weg ist dabei schon gut erforscht. In vielen Fällen werden Hefen als Biokatalysator eingesetzt, wobei hier der niedrige Enantiomerenüberschuss oftmals ein Problem darstellt. Als Edukt für die Synthese dient hierbei Ethyl-4-Cl-Acetoacetat (4-Cl-ACE), welches in einer einstufigen Reduktion in (S)-CHBE umgesetzt wird. Die Fähigkeit von *L. kefir* zur asymmetrischen Reduktion von 4-Cl-ACE zur Herstellung von (S)-CHBE wurde im 15 mM-Maßstab untersucht [Aragozzini et al., 1992]. Hierbei konnte *L. kefir* im Gegensatz zu den Hefen einen hohen Enantiomerenüberschuss (> 99 %) aufweisen.

Basierend auf den gesammelten Erfahrungen aus den beiden in Kapitel 5.2 und 5.3 geschilderten asymmetrischen Synthesen, soll das Prinzip der mikrodispersiven Edukt-Bereitstellung bei der asymmetrischen Reduktion von 4-Cl-ACE mit *L. kefir* als Biokatalysator überprüft werden. Die Untersuchungen wurden dabei mit einer Biokatalysator-Konzentration von 50 g L⁻¹, in 0.2 M KPi-Umsetzungspuffer, pH 6.5, bei 30°C durchgeführt. Als Biokatalysator wurden hierbei ebenfalls die kommerziell erworbenen *L. kefir*-Zellen eingesetzt.

5.4.1 Untersuchung zum Einfluss von Isopropanol auf die Umsetzung

Analog zur 1-4-Cl-PE-Synthese mit *L. kefir*, soll der Einfluss von Isopropanol als Cosubstrat untersucht und mit Ansätzen, bei denen Glukose als einziges Cosubstrat verwendet wird verglichen werden. Dabei soll sowohl die Möglichkeit untersucht werden, Isopropanol als alternatives Cosubstrat oder als zusätzliches Cosubstrat in Kombination mit Glukose einzusetzen. Bei Einsatz von Glukose wurde diese im Mengenverhältnis von 1.5 : 1 zu 4-Cl-ACE verwendet. Für Isopropanol wurde dagegen ein Volumenanteil von 20 % v/v eingesetzt. Die Umsetzungen im Satz-Verfahren fanden in gerührten Reaktionssystemen mit einem Volumen von 25 mL ohne zusätzliche Stickstoffüberlagerung statt (siehe Kapitel 4.6.2). Es wurden Umsetzungen mit 4-Cl-ACE-Ausgangskonzentrationen von 150 mM, 300 mM ($\varphi_{V,4-Cl-ACE} = 0.002$) und 500 mM ($\varphi_{V,4-Cl-ACE} = 0.022$) durchgeführt⁶.

In Abb. 5.4-1 sind die spezifische Produktbildungskapazität und der Enantiomerenüberschusses vergleichend für die einzelnen Ansätze dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die (S)-CHBE-Produktbildung durch den Einsatz von Isopropanol gesteigert werden kann. Dabei ist für eine Konzentration von 300 mM 4-Cl-ACE kein

⁶ Die Löslichkeitsgrenze von 4-Cl-ACE in Wasser beträgt 285 mM. Die Löslichkeit von CHBE in Wasser beträgt 750 mM. Erst oberhalb dieser Konzentrationen liegen 4-Cl-ACE und CHBE als zweite Phase vor. Bei Berechnung des Phasenanteils wurde hierbei nur der in Wasser ungelöste Anteil berücksichtigt.

Unterschied zwischen dem Ansatz mit Glukose und Isopropanol und dem Ansatz mit Isopropanol festzustellen. Die Ausbeute konnte hierbei durch den Einsatz von Isopropanol von 22 % bei dem Ansatz mit Glukose als Cosubstrat auf 100 % gesteigert werden. Die erreichten spezifischen Produktbildungskapazitäten betragen hierbei 5.7 mmol g^{-1} . Bei einer 4-Cl-ACE-Konzentration von 450 mM wird dagegen für den Ansatz mit Isopropanol als alleiniges Cosubstrat die beste spezifische Produktbildungskapazität von 9.3 mmol g^{-1} bei einer Ausbeute von 100 % erreicht. Die dabei erreichten Raum-Zeit-Ausbeute sind $193 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ für 300 mM 4-Cl-ACE und $138.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ für 450 mM 4-Cl-ACE.

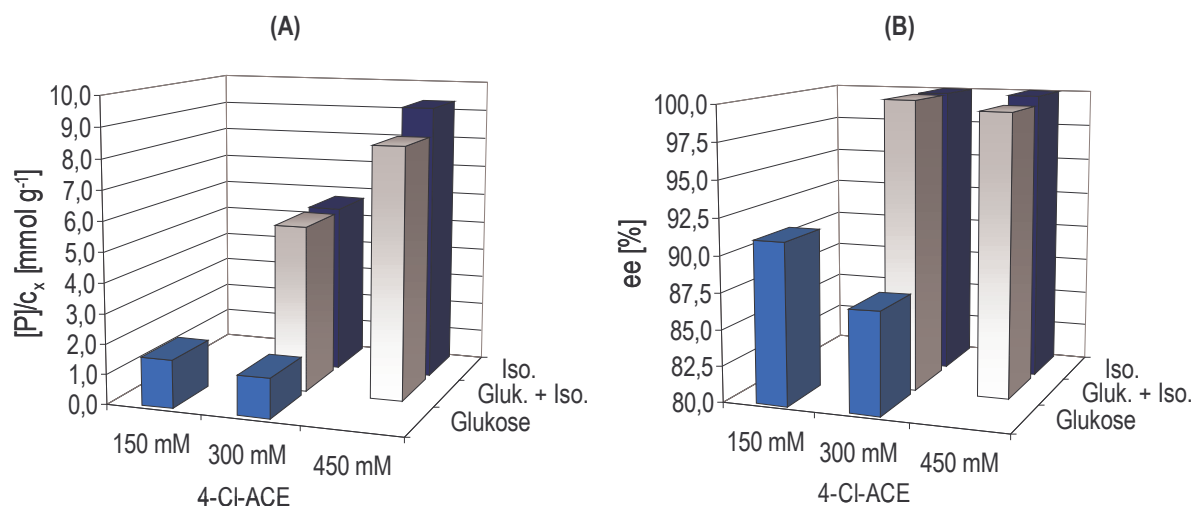


Abb. 5.4-1 Untersuchungen zum Einfluss von Isopropanol (Iso) auf (A) die spezifische Produktbildungskapazität und (B) den Enantiomerenüberschuss für verschiedene 4-Cl-ACE-Ausgangskonzentrationen ($c_x = 50 \text{ g L}^{-1}$, Glukose 1.5-fach / 20 % v/v Isopropanol, 0.2 M KPI-Puffer, pH 6.5, 30°C, 5 h Reaktionsdauer)

Wird der Enantiomerenüberschuss betrachtet, so ist zu erkennen, dass durch den Einsatz von Isopropanol der Enantiomerenüberschuss gegenüber den Ansätzen mit Glukose als alleiniges Cosubstrat signifikant verbessert werden kann. In allen Ansätzen mit Isopropanol war ein Enantiomerenüberschuss $> 99 \%$ zu verzeichnen. In den Ansätzen mit Isopropanol als alleiniges Cosubstrat lag der Enantiomerenüberschuss sogar oberhalb der Nachweisgrenze von 99.8 %. Der Enantiomerenüberschuss des vergleichbaren Ansatzes mit Glukose bei 300 mM 4-Cl-ACE beträgt 87 %, für 150 mM 4-Cl-ACE 99.1 %.

Für Isopropanol als alleiniges Cosubstrat wurden Untersuchungen zum Einfluss der Konzentration durchgeführt. Die untersuchten Isopropanol-Konzentrationen betragen 5 %, 10 %, 15 % und 20 % v/v. Die Konzentrationsverläufe für 4-Cl-ACE und (S)-CHBE der Ansätze mit Isopropanol (B) sind in Abb. 5.4-2 einer Referenz mit Glukose als Cosubstrat (A) gegenübergestellt. Für den untersuchten Isopropanol-Konzentrationsbereich war kein Unterschied in den Umsetzungen zu erkennen. In Abb. 5.4-2 (B) sind die Mittelwerte für die Konzentrationen aller Ansätze aufgetragen. Nach 3 h wurde hierbei für alle Isopropanol-Konzentrationen eine Ausbeute von 99.9 % erreicht.

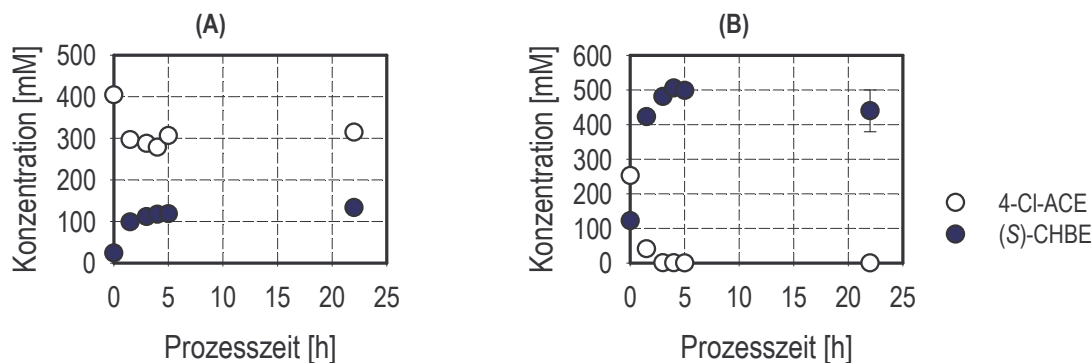


Abb. 5.4-2 Untersuchungen zum Einfluss der Isopropanol-Konzentration auf die (S)-CHBE-Synthese: (A) Referenzansatz mit Glukose als Cosubstrat, (B) Mittelwert der Ansätze mit Isopropanol ($c_x = 50 \text{ g L}^{-1}$, 0.2 M KPi-Puffer , $\text{pH } 6.5$, 30°C)

Diskussion

Es ist bekannt, dass 4-Cl-ACE instabil in wässrigen Lösungen ist. Um hohe Ausbeuten erreichen zu können, werden die Biotransformationen zur (S)-CHBE-Synthese aus diesem Grund mit langsamer Zudosierung von 4-Cl-ACE oder in organisch-wässrigen Zwei-Phasen-Systemen durchgeführt. Bei der Umsetzung mit *L. kefir* und Isopropanol als Cosubstrat konnte für die eingesetzten 4-Cl-ACE-Konzentrationen von 150 mM bis 500 mM kein Zerfall des Edukts festgestellt werden, welches aus den hohen Produktbildungsraten resultiert. Für den Anfang der Umsetzung konnten hierbei Produktbildungsraten von $265\text{--}290 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ festgestellt werden. Für die untersuchten 4-Cl-ACE-Konzentrationen wurde dabei nach 3 – 5 h eine Ausbeute von 100 % erreicht. Durch den Einsatz von *L. kefir* als Biokatalysator, welche die asymmetrische Reduktion von 4-Cl-ACE mit hohen Produktbildungsraten ermöglicht, kann also auf den Einsatz von organischen Lösungsmitteln als Edukt-Depot verzichtet werden.

Ein weiterer bekannter Effekt bei der asymmetrischen Reduktion von 4-Cl-ACE ist die Verbesserung des Enantiomerenüberschusses durch eine langsame 4-Cl-ACE-Freilassung in die wässrige Phase. Dadurch wird die Umsetzung durch konkurrierende (R)-spezifische Enzyme mit höherer Michaelis-Menten-Konstante K_m als die LK-ADH₁ unterdrückt. Bei den Ansätzen mit Glukose als alleiniges Cosubstrat kann beim Vergleich der Ansätze mit einer 4-Cl-ACE-Ausgangskonzentration von 150 mM und 300 mM festgestellt werden, dass sich der Enantiomerenüberschuss mit steigender 4-Cl-ACE-Konzentration von 99.1 % auf 87 % verschlechtert. Dieser Effekt kann ebenfalls durch den Einsatz von Isopropanol als Cosubstrat und der damit verbundenen hohen Umsetzungsrate der LK-ADH₁ unterdrückt werden.

5.4.2 Asymmetrische Synthese von Ethyl-4-Cl-3-(S)-Hydroxybuttersäure-Ethylester im 200 mL-Maßstab

Basierend auf den gewonnenen Umsetzungsdaten soll der Prozess im 200 mL-Maßstab implementiert werden. Die Umsetzung in der gerührten Blasensäule mit definiertem Leistungseintrag soll auch hier die Grundlage für eine weitere Maßstabsvergrößerung in den Laborreaktor darstellen. Der Leistungseintrag wurde basierend auf den Untersuchungen mit 4-Cl-AP auf 0.54 kW m^{-3} eingestellt, um eine mögliche Verschlechterung des Enantiomerenüberschusses zu verhindern. Die spezifische Produktbildungskapazität der Biokatalysatoren sollte über eine intermittierende 4-Cl-ACE-Zudosierung weiter erhöht werden. Die intermittierende 4-Cl-ACE-Zugabe wurde in zwei Schritten mit einer Zudosierung von jeweils 600 mM ($\phi_{V,4\text{-Cl-ACE}} = 0.043$) zu Beginn der Umsetzung und nach 3.5 h durchgeführt. Auch hierdurch soll eine Verschlechterung des Enantiomerenüberschusses durch zu hohe 4-Cl-ACE-Ausgangskonzentrationen vermieden werden. Als Isopropanol-Konzentration wurden 10 % v/v ausgewählt.

Die Konzentrationsverläufe der Umsetzung sind in Abb. 5.4-3 (A) dargestellt. Nach einer Prozesszeit von 14 h konnte eine (S)-CHBE-Endkonzentration von 1.2 M ($\phi_{V,CHBE} = 0.060$) bei einer Ausbeute von 97 % erreicht werden, welches einer spezifischen Produktbildungskapazität von 24 mmol g^{-1} und einer Raum-Zeit-Ausbeute von $85.7 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ entspricht. Der Enantiomerenüberschuss beträgt dabei 99.5 %.

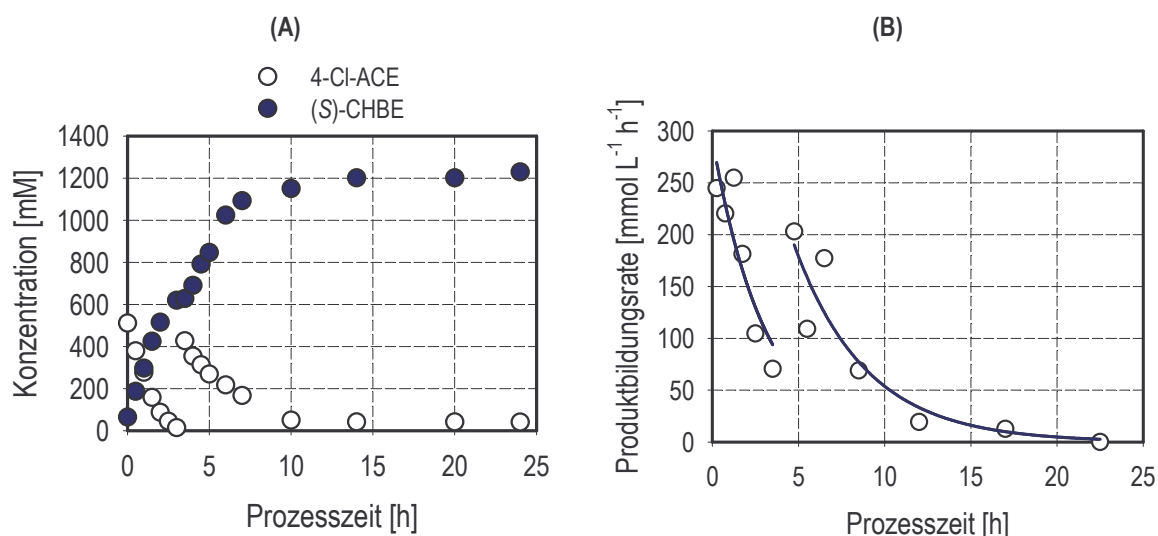


Abb. 5.4-3 (A) Konzentrationsverläufe für 4-Cl-ACE und (S)-CHBE der asymmetrischen Synthese im 200 mL Maßstab, (B) zeitlicher Verlauf der CHBE-Produktbildungsrate ($c_x = 50 \text{ g L}^{-1}$, 10 % v/v Isopropanol, 0.2 M KPi-Puffer, pH 6.5, 30°C, gerührte Blasensäule, 0.54 kW m^{-3})

Der Verlauf der CHBE-Produktbildungsrate über der Prozesszeit ist in Abb. 5.4-3 (B) dargestellt. Die Punkte stellen dabei die anhand der Messwerte berechneten Produktbildungsrate dar. Die Schwankungen in der Produktbildungsrate resultieren hierbei aus Abweichungen bei der Probenahme und spiegeln sich in Schwankungen der Gesamtbilanz wieder. Zur Abschätzung der Halbwertszeit des Biokatalysators wurden exponentielle Interpolationen der experimentellen Produktbildungsrate für die beiden Zudosierungs-Zeiträume von 0 - 3.5 h und 4.75 - 22.5 h durchgeführt. Die dabei

ermittelte Deaktivierungskonstanten k_1 betragen 0.32 h^{-1} für die erste Zudosierung und 0.24 h^{-1} für die zweite Zudosierung. Dies entspricht einer Halbwertszeit des Biokatalysators von 2.1 h für die erste Zudosierung und 2.9 h für die zweite Zudosierung.

Diskussion

Im Fall einer Deaktivierung des Biokatalysators müsste ein kontinuierlich abfallender Verlauf der Produktbildungsrate über der Zeit beobachtet werden. In diesem Fall wäre die Halbwertszeit für jeden Zudosierungsabschnitt gleich.

Liegt eine Edukt-Limitierung vor, so wird nach erneuter Zugabe des Edukts eine Produktbildungsrate höher als die Endproduktbildungsrate des vorherigen Zudosierungsabschnitts erreicht.

Bei dem oben beschriebenen Prozess liegt für den ersten Abschnitt (0 h bis 3.5 h) also eine Edukt-Limitierung vor. Es kann aus diesem Zeitabschnitt keine Halbwertszeit bestimmt werden.

Um eine Aussage über die Deaktivierung der Zellen im zweiten Abschnitt treffen zu können, müssten erneute Edukt-Zudosierungen durchgeführt werden. Anhand der vorhandenen Daten kann hier eine Limitierung nicht ausgeschlossen werden.

5.4.3 Beurteilung der Biotransformation zur Ethyl-4-Cl-3-(S)-Hydroxybuttersäure-Ethylester-Synthese

In Abb. 5.4-4 wird die in Kapitel 5.4.2 geschilderte Umsetzung hinsichtlich der erreichten (S)-CHBE-Endkonzentration und des Enantiomerenüberschusses mit bekannten (S)-CHBE-Synthesen aus der Literatur vergleichend dargestellt. Die Referenzumsetzung mit *L. kefir* wurde von Aragozzini et al. [1992] im Rahmen einer Untersuchungsreihe zur Umsetzungsfähigkeit verschiedener Lactobacillen vorgestellt. (siehe auch Kapitel 3.4.2). Als Referenz für eine 4-Cl-ACE-Reduktion mit Hefen wurde die von Seebach et al. [1985] beschriebene (S)-CHBE-Synthese genommen. Beide Umsetzungen haben hierbei gemeinsam, dass sie in einem einphasigen, wässrigen System, ohne zusätzliche Zugabe von Cofaktoren durchgeführt wurden.

Es ist zu erkennen, dass bei dem mikrodispersiven Ansatz mit Einsatz von Isopropanol als Cosubstrat eine signifikant höhere (S)-CHBE-Endkonzentration erreicht werden kann. Bei dem Referenzansatz mit *L. kefir* werden 15 mM (S)-CHBE gebildet, welches bei der Umsetzung einer Ausbeute von 100 % und einer spezifischen Produktbildungskapazität von $\sim 1.0 \text{ mmol g}^{-1}$ entspricht. Die erreichte (S)-CHBE-Konzentration des Referenzansatzes mit *S. cerevisiae* beträgt 82 mM, bei einer Ausbeute von 69 % und einer spezifischen Produktbildungskapazität von 1.1 mmol g^{-1} . Die bei dem mikrodispersiven Prozess erreichte (S)-CHBE-Konzentration ist somit um den Faktor 80 höher als beim Referenzansatz mit *L. kefir* und um den Faktor 14.6 höher als beim Referenzansatz mit Bäckerhefe.

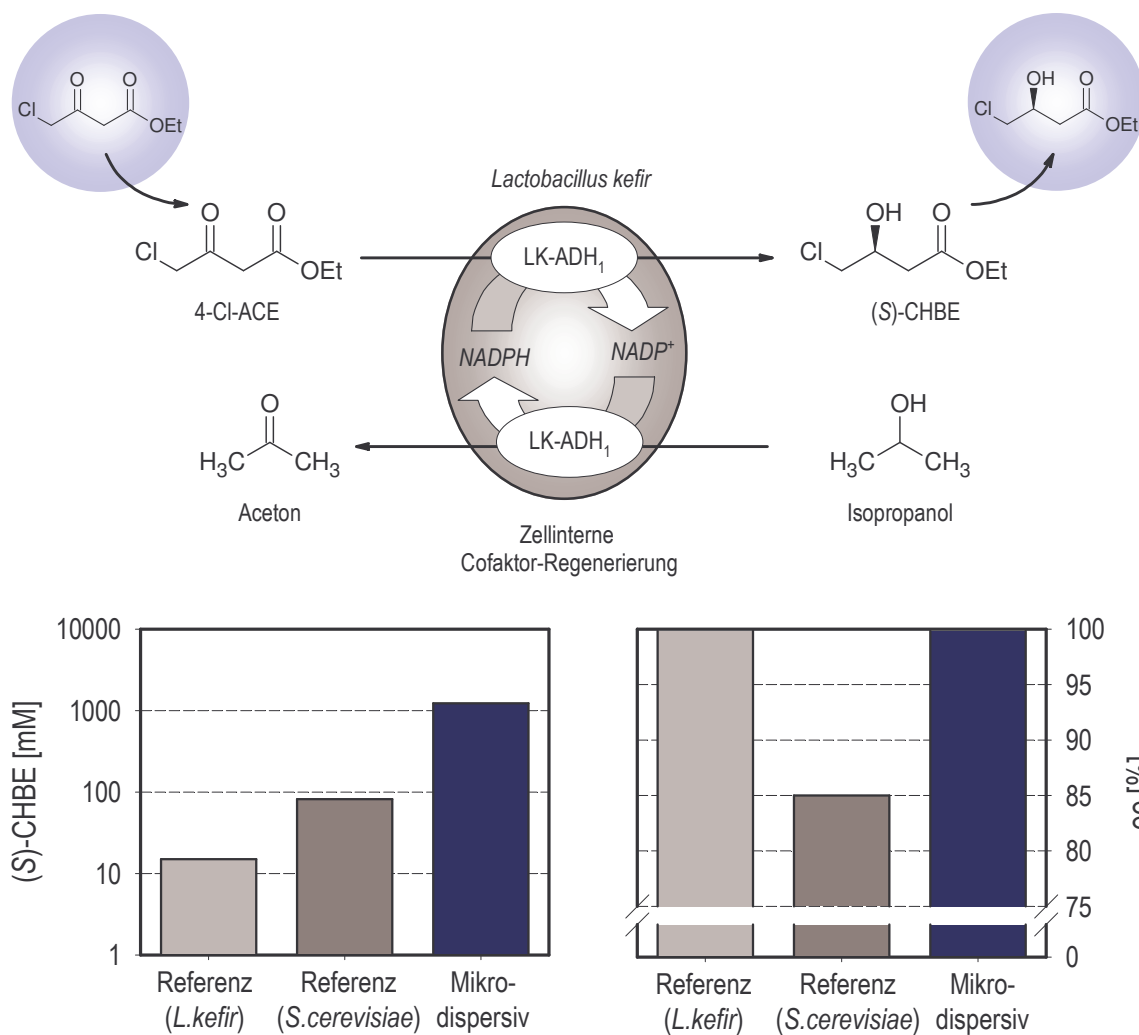


Abb. 5.4-4 Vergleich (S)-CHBE-Konzentration und des Enantiomerenüberschusses des mikrodispersiven Ansatzes mit intermittierender 4-Cl-ACE-Zudosierung und Referenzansätze aus der Literatur

Wird der Enantiomerenüberschuss verglichen, so ist zu erkennen, dass bei beiden *L. kefir*-Ansätzen ein besserer Enantiomerenüberschuss erreicht werden kann. Der geringe Enantiomerenüberschuss stellt bei den Hefe-Biotransformationen zur (S)-CHBE-Herstellung ein Problem dar. Hierbei wurden viele Ansätze zur Erhöhung des Enantiomerenüberschusses entwickelt, wie zum Beispiel die Aceton- und/oder Hitzebehandlung der Zellen [Shimizu und Kataoka, 2002; Yasohara et al., 1999; Patel et al., 2002], der Einsatz eines geeigneten Cosubstrats [Sybesma et al., 1998], der Einsatz von organisch-wässrigen-2-Phasen-Systemen [Sybesma et al., 1998], die Immobilisierung der Hefe [Nakamura et al., 1985], die Zugabe von Enzyminhibitoren [Nakamura et al., 1987] und die chemische Modifikation des Edukts [Shieh et al., 1985; Sybesma et al., 1998]. Bei einem Ansatz mit rekombinanten *Pichia pastoris* konnte in einem Zwei-Phasen-System mit *n*-Butylacetat und gleichzeitiger Dosierung von 4-Cl-ACE und Zellsuspension ein Enantiomerenüberschuss von 95 % bei einer Ausbeute von 91 % erreicht werden [Engelking, 2004]

Bei der Ganzzellbiotransformation mit *L. kefir* wurde durch den Einsatz von Isopropanol als Cosubstrat die Umsetzung hoher 4-Cl-ACE-Konzentrationen im einphasigen, wässrigen System ermöglicht, ohne dabei Einbußen des

Enantiomerenüberschusses verzeichnen zu müssen. Der erreichte Enantiomerenüberschuss betrug hierbei 99.5 %.

Die industriellen Ansätze zur (S)-CHBE-Synthese werden oftmals in organisch-wässrigen Zwei-Phasen-System mit externer NADP-Zugabe durchgeführt. Bei der (S)-CHBE-Synthese mittels *Candida magnoliae* [Shimizu und Kataoka, 1999; Yasohara et al., 1999] wird eine (S)-CHBE-Konzentration von 680 mM bei einem Enantiomerenüberschuss von 96 % erreicht. Kizaki et al. [2001] untersuchten die Umsetzung mittels rekombinanten *E. coli*, welche das Carbonyl-Reduktase-Gen aus *Candida magnoliae* und ein Glukose-Dehydrogenase-Gen aus *Bacillus megaterium* coexprimieren. Hierbei kann ein Enantiomerenüberschuss von 100 % bei einer Ausbeute von 85 % erreicht werden. Die erreichbare Konzentration im Ein-Phasen-System beträgt hierbei 1.25 M und im Zwei-Phasen-System 2.58 M. Wird der mikrodispersive Ansatz mit diesen (S)-CHBE-Synthesen verglichen, so sind sowohl die erreichten (S)-CHBE-Konzentrationen, als auch die Enantiomerenüberschüsse vergleichbar.

In Tabelle 5.4-1 wird die asymmetrische Synthese von (S)-CHBE mit Wildtyp *L. kefir* dem Prozess mit rekombinanten *E. coli* gegenübergestellt.

Tabelle 5.4-1 Vergleich der asymmetrischen (S)-CHBE-Synthese mit rekombinanten *E. coli* [Kizaki et al., 2001] und mit Wildtyp *L. kefir* (DSMZ 20587) als Biokatalysator

Parameter	rekombinanter <i>E. coli</i>		Wildtyp <i>L. kefir</i>	
Reaktionsansatz	organisch-wässriges-2-Phasen-System (<i>n</i> -Butyl-Acetat, 50 % v/v)	-	2-Phasen-System ohne organisches Lösungsmittel: Edukt als Tropfen in wässriger Phase (2 x 4.3 % v/v)	+
Reaktionsvolumen	100 mL		200 mL	
Permeabilisierung der Zellen	Triton X-100	-	keine	+
NADP(H)-Zugabe	42 µM NADP (ttn = 21600)	-	keine	+
Cosubstrat	Glukose (Produkte: Gluconolacton, CO ₂)	+	Isopropanol (10 % v/v) (Produkt: Aceton)	-
Biokatalysator-Herstellung	<i>E. coli</i> -Kultivierung	+	<i>L. kefir</i> -Kultivierung	-
4-Cl-ACE	3 M		1.24 M	
(S)-CHBE	2.58 M	++	1.2 M (6 % v/v)	+
ee	100 %	+	99.5 %	+
Ausbeute	85 %	+	97 %	++

5.5 Verfahrenstechnische Untersuchungen zur mikrodispersiven Eduktbereitstellung

Das Ziel der mikrodispersiven Eduktbereitstellung ist die Etablierung einer großen spezifischen Stoffaustauschfläche, um somit Stofftransportlimitierungen bei der Biotransformation zu umgehen. Dispersionen werden hierbei als Gemische aus mindestens zwei nicht miteinander mischbaren Flüssigkeiten definiert. Flüssig-Flüssig-Systeme mit Sauterdurchmesser zwischen 0.5 und 50 μm werden als Mikrodispersionen bezeichnet [Paul et al., 2004].

Die charakteristische Größe bei den verfahrenstechnischen Untersuchungen zur mikrodispersiven Edukt-Bereitstellung ist der mittlere Tropfendurchmesser der Dispersion (Sauterdurchmesser). Über den Sauterdurchmesser kann die zur Verfügung stehende Stoffaustauschfläche und bei Kenntnis des Strömungszustandes die resultierende Edukt-Transportrate ermittelt werden. Hierbei wird die Annahme getroffen, dass die Tropfen kugelförmig sind.

Als Referenzedukt für die verfahrenstechnischen Untersuchungen diene 4-Cl-Acetophenon (4-Cl-AP). Diese Verbindung weist ähnliche physikalisch-chemische Stoffeigenschaften auf wie 6-Cl-3,5-Dioxohexansäure-*tert*-Butylester (DOHTB) (siehe Anhang B-I). Der Schwerpunkt für die Vergleichbarkeit liegt hierbei bei den für die Tropfenbildung und den Stoffaustausch wichtigen physikalischen Größen der Edukte (Dichte, Grenzflächenspannung, Viskosität und die Löslichkeit in wässrigen Systemen). Die dritte Substanz ist Ethyl-4-Cl-Acetoacetat (4-Cl-ACE), ein anderes Ausgangsedukt zur Synthese von chiralen HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor-Bausteinen.

Für alle Edukte erfolgen Abschätzungen des Sauterdurchmessers und der resultierenden Stoffaustauschflächen und Edukt-Transportraten. Diese Ergebnisse sind in den folgenden Kapiteln zuerst dargestellt.

Die experimentellen Untersuchungen zur Mikrodispersion von 4-Cl-Acetophenon wurden mit Hilfe der *in-line* 3-D-ORM-Messtechnik im Rührkesselreaktor durchgeführt (siehe Kapitel 4.9). Hier wurden der Einfluss des Leistungseintrags, des Phasenanteils des Edukts, sowie die Anwesenheit eines möglichen Cosolvenz (Isopropanol) auf den Sauterdurchmesser untersucht. Abschließend wurden Untersuchungen zur Tropfengröße von 4-Cl-AP bei Anwesenheit von *L. kefir* durchgeführt. Experimentelle Untersuchungen zur Tropfenbildung von 6-Cl-3,5-Dioxohexansäure-*tert*-Butylester sind aufgrund der Instabilität des Edukts in wässrigen Systemen nur begrenzt möglich.

5.5.1 Modellgestützte Ermittlung des Sauterdurchmessers und der Stoffaustauschfläche in Abhängigkeit vom Leistungseintrag

In Abb. 5.5-1 sind vergleichend die Verläufe der berechneten Sauterdurchmesser für 4-Cl-AP und DOHTB in Abhängigkeit des Leistungseintrags für die in Kapitel 3.8.1 vorgestellten Modelle dargestellt. Das Modell von Chen und Middleman (1967) in Gleichung 31 basiert auf dem von Hinze (1955) erstellten Modell für verdünnte

Dispersionen. Bei dem Modell von Mersmann und Grossmann (1980) in Gleichung 33 wird die Turbulenzdämpfung durch den Phasenanteil der dispersen Phase berücksichtigt. Eine Erweiterung des Modells für viskose disperse Phasen wurde von Calabrese et al. (1986a,b) bzw. Wang und Calabrese (1986) vorgeschlagen (siehe Gleichung 33, Kapitel 3.8.1). Die Abhängigkeit des Leistungseintrags von der Rührerdrehzahl für das eingesetzte System sowie die Stoffdaten für Wasser ist dem Anhang A-IX zu entnehmen. Die Stoffdaten der untersuchten Edukte sind in Anhang B-I zusammengestellt.

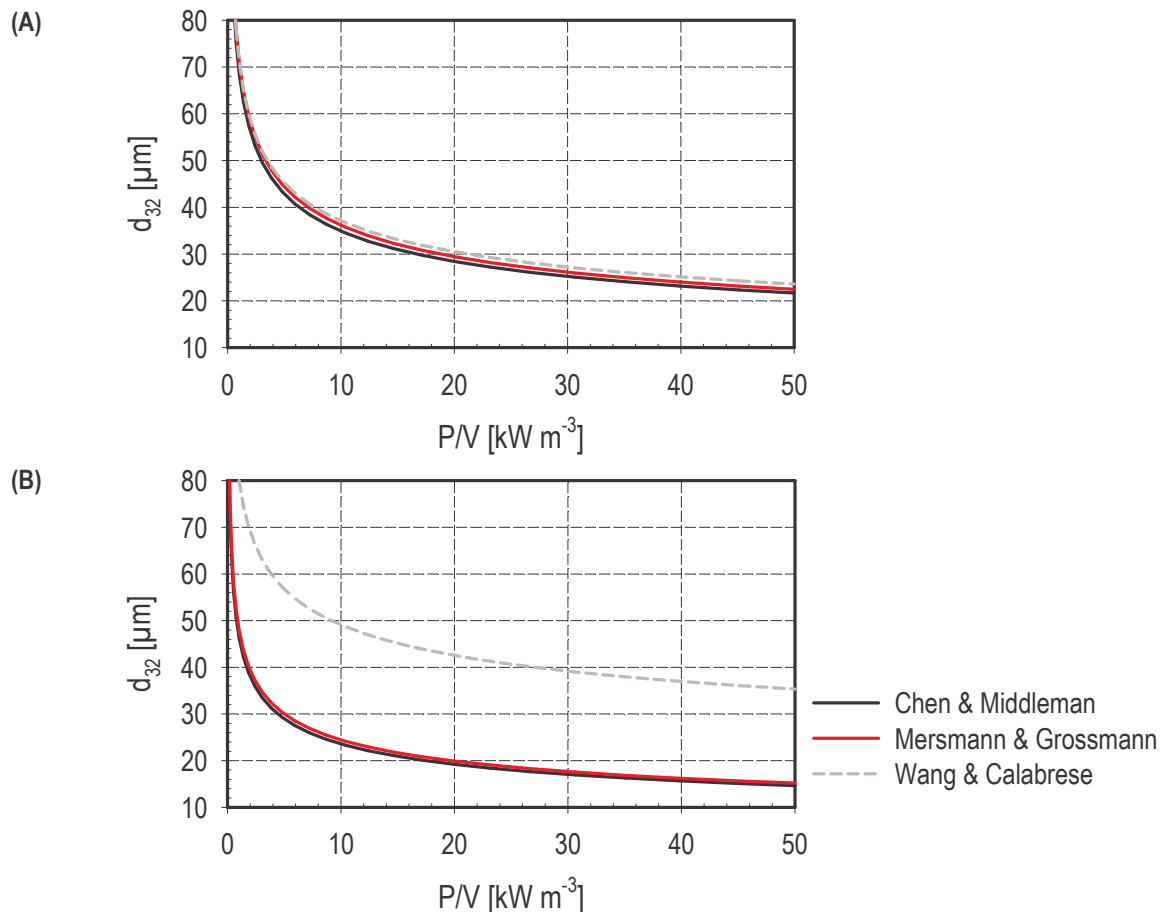


Abb. 5.5-1 Vergleich der Modelle zur Abschätzung des Sauterdurchmessers für 4-Cl-AP (A) und DOHTB (B)

Es ist zu erkennen, dass das Modell von Chen und Middleman für verdünnte Dispersionen, bei dem weder der Phasenanteil noch die Viskosität der dispersen Phase berücksichtigt werden, die kleinsten Sauterdurchmesser abschätzt. Bei der Abschätzung nach Mersmann und Grossmann wurde ein Phasenanteil von 0.012 verwendet, welches in einem Arbeitsvolumen von 1.7 L einer 4-Cl-Acetophenon-Konzentration von 100 mM entspricht. Hierbei sind, bei Berücksichtigung des Phasenanteils, die ermittelten Sauterdurchmesser um den Faktor 1.04 größer als die Schätzwerte nach Chen und Middleman.

Wird die Viskosität der dispersen Phase ($\eta_{(4\text{-Cl-AP})} = 2.73 \text{ mPa s}$, $\eta_{(\text{DOHTB})} = 56.1 \text{ mPa s}$) mit in das Modell von Wang und Calabrese einbezogen, so ergeben sich die größten Sauterdurchmesser im Vergleich zu den beiden anderen Modellen. Dieser Effekt macht sich vor allem bei DOHTB aufgrund der hohen Viskosität bemerkbar. Der Effekt der

Viskosität auf den Tropfendurchmesser steigt hierbei mit zunehmendem Leistungseintrag. Unter Berücksichtigung der hohen Viskosität von DOHTB werden für alle weiteren Abschätzungen des Sauterdurchmessers das Modell von Wang und Calabrese eingesetzt.

In Abb. 5.5-2 sind für 4-Cl-Acetophenon die Verläufe des Sauterdurchmessers d_{32} und der daraus resultierenden volumenbezogenen Stoffaustauschfläche a für verschiedene Leistungseinträge dargestellt. Für alle Berechnungen von a wird ein Volumenanteil φ_V von 0.012 angenommen. Vergleichend sind die analogen Verläufe für 6-Cl-3,5-Dioxohexansäure-*tert*-Butylester in Abb. 5.5-3 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die theoretisch erzielbaren Sauterdurchmesser für DOHTB größer sind. Für einen Leistungseintrag von 5.9 kW m^{-3} (einer Rührerdrehzahl von 1000 min^{-1} entsprechend) beträgt der $d_{32(4\text{-Cl-AP})}$ $43 \text{ }\mu\text{m}$ während der $d_{32(\text{DOHTB})}$ bei $55 \text{ }\mu\text{m}$ liegt. Wird für einen gleichen Phasenanteil der dispersen Eduktphase die volumenbezogene Stoffaustauschfläche berechnet, so ist diese für 4-Cl-AP bei diesem Leistungseintrag um den Faktor 1.65 höher.

Die größeren Sauterdurchmesser für DOHTB resultieren aus der um den Faktor 20.5 höheren dynamischen Viskosität des Edukts bezüglich 4-Cl-AP. Die andere physikalische Stoffgröße, die einen Einfluss auf den Sauterdurchmesser hat, ist die Grenzflächenspannung zwischen der Eduktphase und der kontinuierlichen wässrigen Phase. Der Sauterdurchmesser nimmt mit abnehmender Grenzflächenspannung zu. Hierbei ist die Grenzflächenspannung von DOHTB geringer als für 4-Cl-AP ($\sigma_{(4\text{-Cl-AP/KPi-Puffer})} = 24.4 \text{ mN m}^{-1}$, $\sigma_{(\text{DOHTB/KPi-Puffer})} = 12.7 \text{ mN m}^{-1}$).

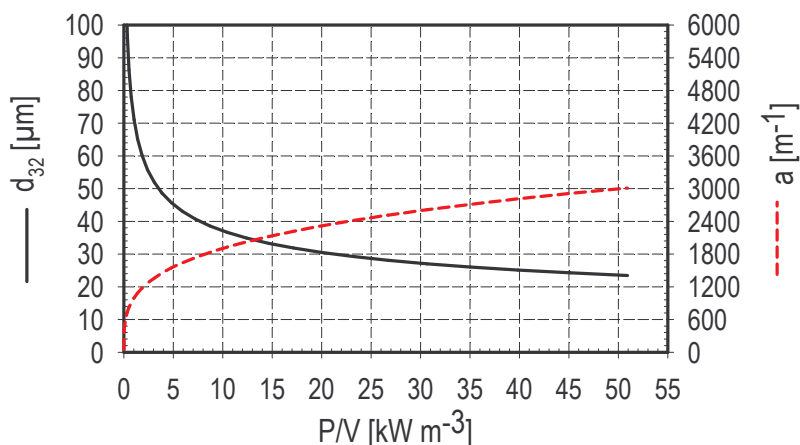


Abb. 5.5-2 Verlauf des Sauterdurchmessers d_{32} und der volumenbezogenen Stoffaustauschfläche a für 4-Cl-Acetophenon in KPi-Puffer (0.2M) in Abhängigkeit des Leistungseintrags P/V ($V_R = 1.7 \text{ L}$, $\varphi_V = 0.012$, entspricht 100 mM 4-Cl-AP, 30°C)

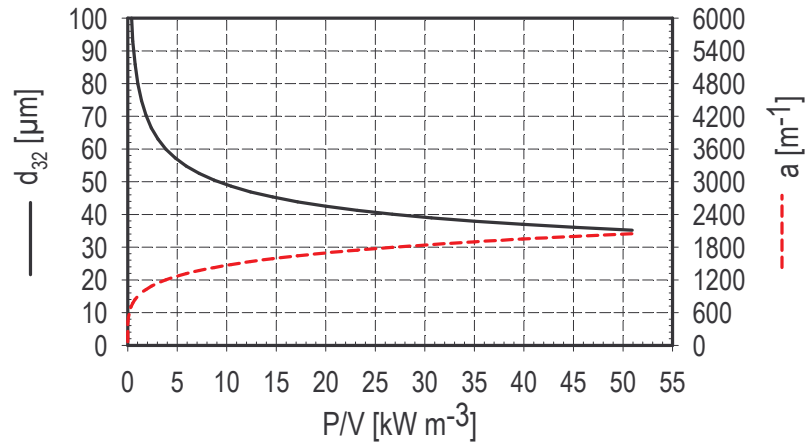


Abb. 5.5-3 Verlauf des Sauterdurchmessers d_{32} und der volumenbezogenen Stoffaustauschfläche a für 6-Cl-3,5-Dioxohexansäure-tert-Butylester in KPi-Puffer (0.2M) in Abhängigkeit des Leistungseintrags P/V ($V_R = 1.7 \text{ L}$, $\phi_V = 0.012$, entspricht 50 mM DOHTB, 30°C)

In Abb. 5.5-4 sind die analogen Verläufe für 4-Cl-ACE dargestellt. Die dynamische Viskosität dieses Edukts ist mit 4-Cl-AP vergleichbar ($\eta_{(4\text{-Cl-ACE})} = 4.72 \text{ mPa s}$). Die geringere Grenzflächenspannung ($\sigma_{(4\text{-Cl-ACE}/\text{H}_2\text{O})} = 6.4 \text{ mN m}^{-1}$) resultiert in kleineren Sauterdurchmessern und somit in einer höheren Stoffaustauschfläche a (für einen Leistungseintrag von 5.9 kW m^{-3} ist $d_{32(4\text{-Cl-ACE})} = 23 \mu\text{m}$ und $a = 3120 \text{ m}^{-1}$).

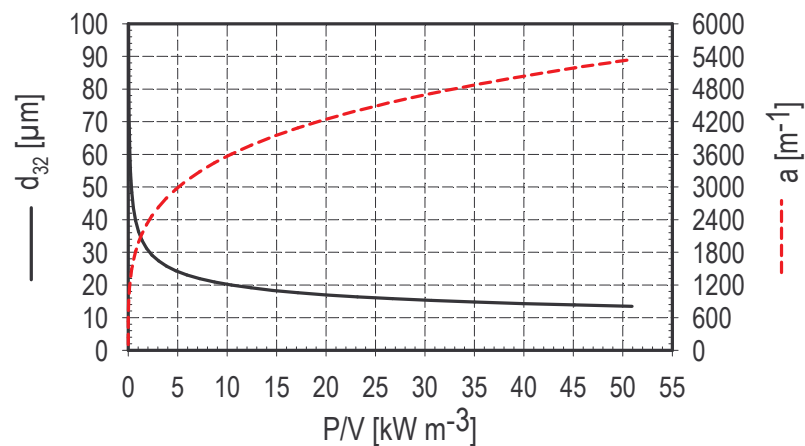


Abb. 5.5-4 Verlauf des Sauterdurchmessers d_{32} und der volumenbezogenen Stoffaustauschfläche a für Ethyl-4-Cl-Acetoacetat in H_2O in Abhängigkeit des Leistungseintrags P/V ($V_R = 1.7 \text{ L}$, $\phi_V = 0.012$, entspricht 60 mM 4-Cl-ACE, 20°C)

5.5.2 Modellgestützte Abschätzung der maximalen Edukt-Transportrate

Die Berechnung der Edukt-Transportrate erfolgt über die Gleichungen 39 bis 45 in Kapitel 3.8.3. Für die Diffusionskoeffizienten wurde ein mittlerer Schätzwert verwendet (siehe Tabelle 3.8-1). Die Diffusionskoeffizienten wurden dabei für die Systeme Edukt/H₂O bei einer Temperatur von 30°C ermittelt und sind in Tabelle 5.1-1 zusammengestellt. Die Standardabweichung liegt dabei zwischen 10-15 %.

Tabelle 5.5-1 *Abgeschätzte Diffusionskoeffizienten für 4-Cl-Acetophenon, 6-Cl-3,5-Dioxohexansäure-tert-Butylester und Ethyl-4-Cl-Acetoacetat in Wasser ($\eta_{(H_2O)} = 0.7977 \text{ mPa s}$, $V_{(H_2O)} = 18 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$, $\sigma_{(H_2O)} = 71.2 \text{ mN m}^{-1}$)*

Edukt	$D_{i,H_2O} [\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}]$	Standardabweichung $[\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}]$
4-Cl-AP	1,04E-05	1,02E-06
DOHTB	8,04E-06	1,24E-06
4-Cl-ACE	9,84E-06	9,96E-07

Der Stoffübergangskoeffizient β wurde über die Sherwood-Zahl und den Diffusionskoeffizienten ermittelt. Als Korrelation zwischen dem maximalen Tropfendurchmesser d_{max} und dem Sauterdurchmesser d_{32} wurde der Mittelwert aus den Tropfengrößenbestimmungen für 4-Cl-AP verwendet, welcher 2.66 beträgt. In Abb. 5.5-5 ist der Verlauf des Stoffübergangskoeffizienten β in Abhängigkeit vom Leistungseintrag für 4-Cl-Acetophenon im verwendeten Reaktorsystem dargestellt. Bei dem höchsten Leistungseintrag des verwendeten Reaktorsystems von $\sim 51 \text{ kW m}^{-3}$ wird ein Stoffübergangskoeffizient von $13.3 \times 10^{-5} \text{ m s}^{-1}$ erreicht. Für einen Leistungseintrag von 5.9 kW m^{-3} beträgt der Stoffübergangskoeffizient $7.4 \times 10^{-5} \text{ m s}^{-1}$.

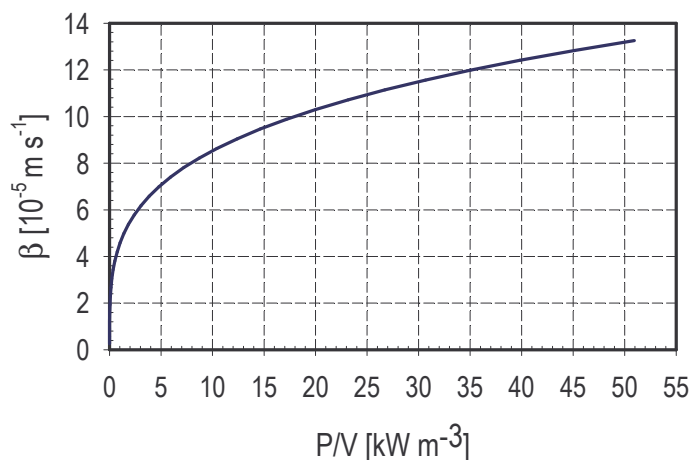


Abb. 5.5-5 *Stoffübergangskoeffizient β für 4-Cl-Acetophenon in Abhängigkeit des Leistungseintrags P/V*

Zur Abschätzung der maximalen Edukt-Transportrate wurden folgende Annahmen getroffen:

- Die gelöste Edukt-Konzentration in der wässrigen Phase $c_{E,w\infty}$ wurde als Null angenommen. Die berechnete Edukt-Transportrate entspricht somit ETR_{\max} .
- Die gebildeten Produkttropfen liegen getrennt von den Edukt-Tropfen in der wässrigen Lösung vor. Eine Extraktion des Edukts durch die Produkt-Tropfen kommt nicht vor. Somit verändert sich das Gleichgewicht an der Phasengrenzfläche nicht. $c_{E,0}$ und c_E^* bleiben über die Prozesszeit konstant (siehe Abb. 5.5-6 A).

Die somit ermittelten Edukt-Transportraten für 4-Cl-AP sind in Abb. 5.5-6 (B) dargestellt.

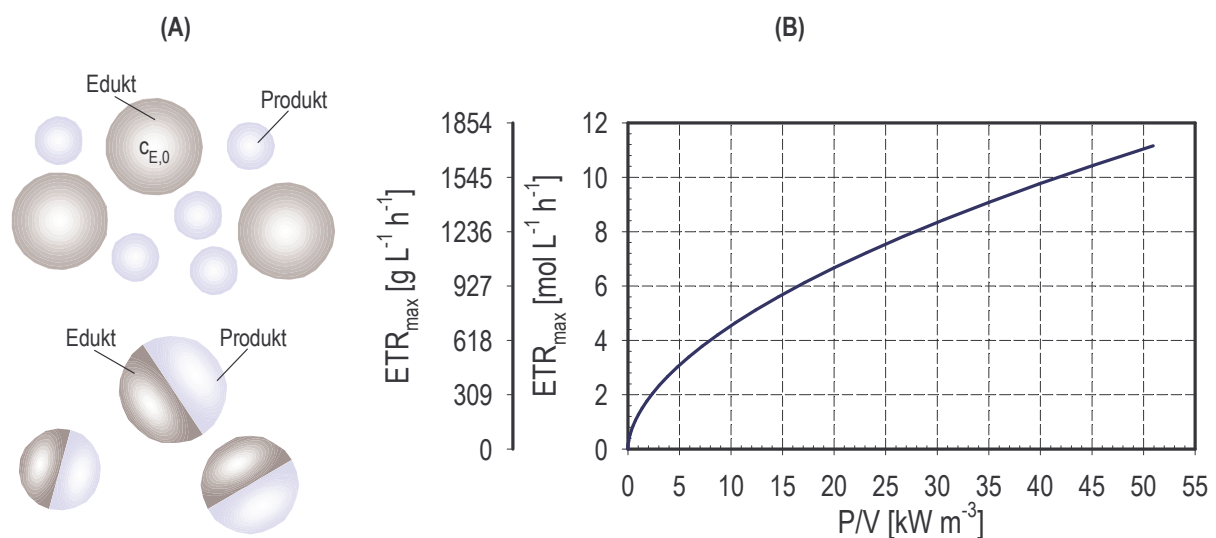


Abb. 5.5-6 (A) Schematische Darstellung der beiden Möglichkeiten des Vorkommens der Edukt- und Produkttropfen, (B) Edukt-Transportrate ETR für 4-Cl-Acetophenon in Abhängigkeit des Leistungseintrags P/V

5.5.3 Parameterstudien zum Einfluss des Leistungseintrags und des Phasenanteils auf die Edukt-Transportrate

Neben dem Leistungseintrag übt der Phasenanteil der dispersen Phase einen signifikanten Einfluss auf die Edukt-Transportrate aus. In den Abb. 5.5-7 bis 5.5-9 sind die maximalen Edukt-Transportraten ETR_{\max} für 4-Cl-AP, DOHTB und 4-Cl-ACE als Funktion des Leistungseintrags und des Phasenanteils dargestellt.⁷

Der Leistungseintragsbereich entspricht einem Rührerdrehzahlbereich zwischen 50 und 1700 min^{-1} (bei einem Volumen von 1.7 L). Die Phasenanteile für 4-Cl-AP und DOHTB

⁷ Basierend auf der Annahme, dass die gelöste Edukttkonzentration in der wässrigen Phase gleich Null gesetzt wird, wird im Gegensatz zur Berechnung des Edukt-Phasenanteils bei den Biotransformationen die gelöste Edukttkonzentration bei der Berechnung von φ_V nicht mit berücksichtigt.

entsprechen einem Konzentrationsbereich von 25 mM bis 150 mM. Für 4-Cl-ACE wurde, basierend auf den bei den Biotransformationen eingesetzten Konzentrationen, die Parameterstudie für einen Konzentrationsbereich zwischen 350 mM und 600 mM durchgeführt (siehe Kapitel 5.4).

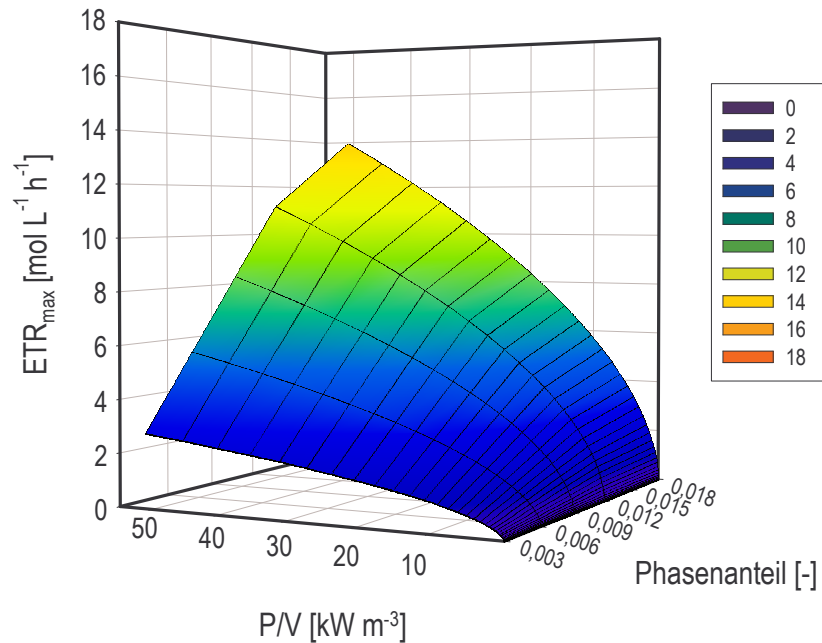


Abb. 5.5-7 Abhängigkeit des ETR_{max} vom Leistungseintrag und vom Phasenanteil der Eduktphase φ_V für 4-Cl-AP ($V_R = 1.7 \text{ L}$, ein Phasenanteil von 0.003 entspricht einer 4-Cl-AP-Konzentration von 25 mM)

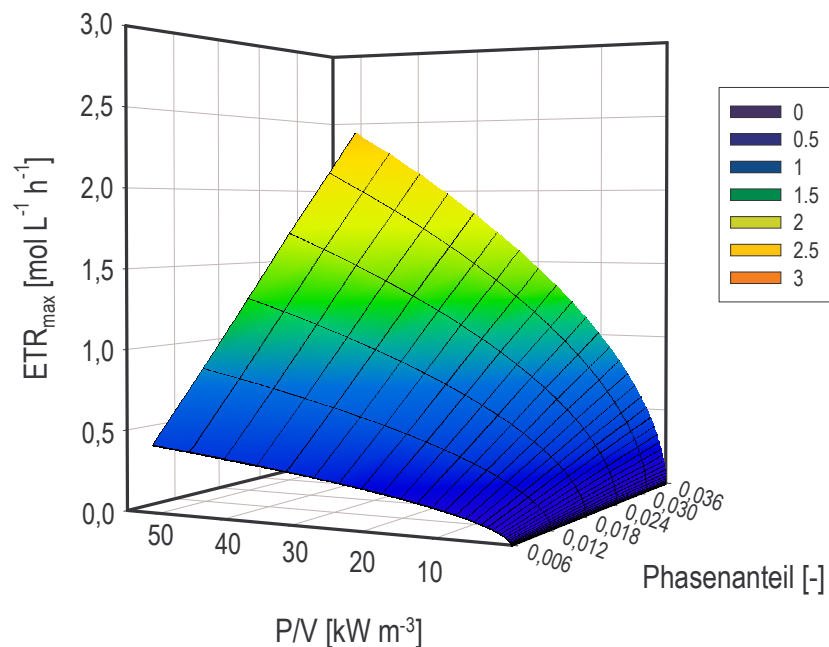


Abb. 5.5-8 Abhängigkeit des ETR_{max} vom Leistungseintrag und vom Phasenanteil der Eduktphase φ_V für DOHTB ($V_R = 1.7 \text{ L}$, ein Phasenanteil von 0.006 entspricht einer DOHTB-Konzentration von 25 mM)

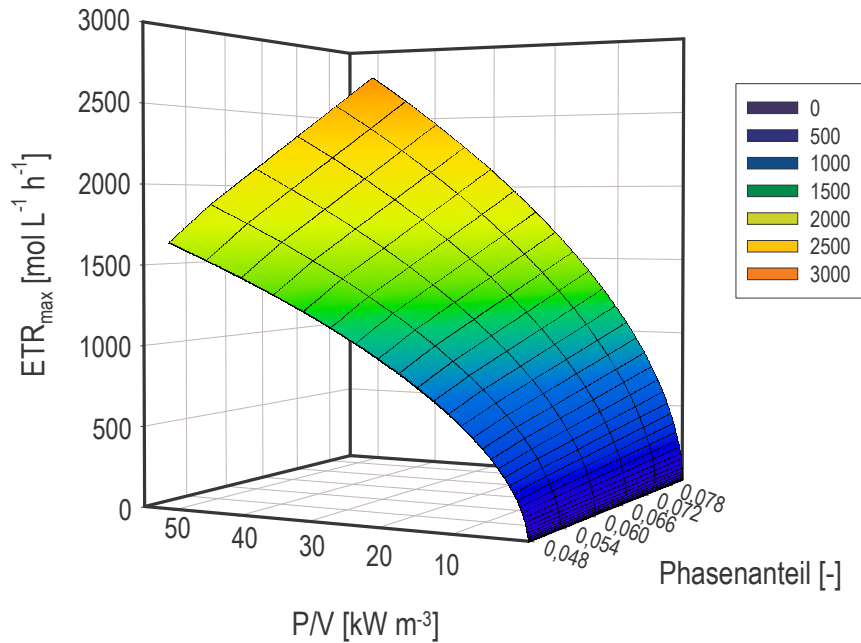


Abb. 5.5-9 Abhängigkeit des ETR_{max} vom Leistungseintrag und vom Phasenanteil der Eduktphase φ_V für 4-Cl-ACE ($V_R = 1.7$ L, ein Phasenanteil von 0.048 entspricht einer 4-Cl-ACE-Konzentration von 350 mM)

In Abb. 5.5-10 sind die maximalen Edukt-Transportraten für alle Edukte bei einem Leistungseintrag von 5.9 kW m^{-3} und einem Phasenanteil von 0.012 vergleichend dargestellt.

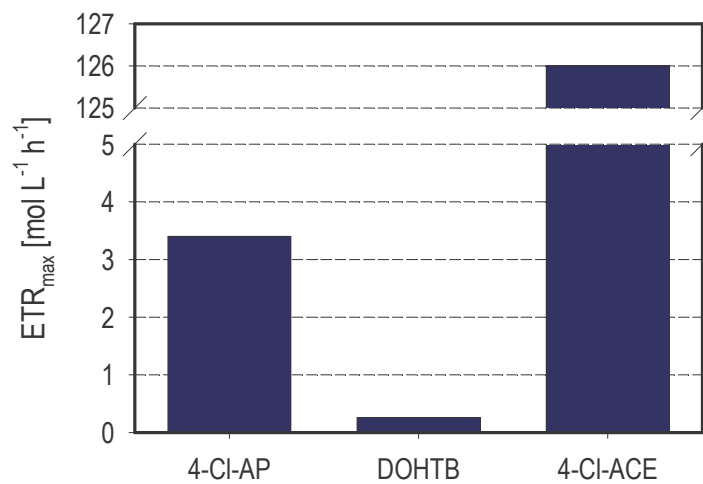


Abb. 5.5-10 Vergleich der Edukt-Transportraten und des Stoffübergangskoeffizienten für 4-Cl-Acetophenon, 6-Cl-3,5-Dioxohexansäure-tert-Butylester und Ethyl-4-Cl-Acetoacetat bei einem Leistungseintrag von 5.9 kW m^{-3} (1000 min^{-1} , $V_R = 1.7$ L, $\varphi_V = 0.012$)

Es ist zu erkennen, dass die maximale Edukt-Transportrate für DOHTB bei vergleichbaren Bedingungen am geringsten ist. Der Grund dafür ist sowohl die geringere Stoffaustauschfläche als auch der niedrigere Konzentrationsgradient ($c_i^* - c_{i,w\infty}$). Die Edukt-Transportrate beträgt hierbei 0.26 $\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$. Die Edukt-

Transportrate von 4-Cl-ACE von $126 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ist hierbei um den Faktor 274 höher. Hierbei resultiert die hohe Edukt-Transportrate für 4-Cl-ACE aus der hohen Gleichgewichtskonzentration für 4-Cl-ACE an der Phasengrenzfläche (285 mM).

5.5.4 Experimentelle Untersuchungen zum Einfluss des Leistungseintrags auf den Sauterdurchmesser von 4-Cl-Acetophenon

Werden die theoretisch erzielbaren Sauterdurchmesser betrachtet, so kann durch eine Erhöhung des Leistungseintrags von 1.8 kW m^{-3} auf 30.6 kW m^{-3} (entspricht einer Verdoppelung der Rührerdrehzahl von 750 min^{-1} auf 1500 min^{-1}) eine Verbesserung der volumenbezogenen Stoffaustauschfläche von 4-Cl-AP um den Faktor 2.2 erreicht werden. Für die Edukt-Transportrate bedeutet dies bei einem Phasenanteil von 0.003 eine Erhöhung um den Faktor 2 von $\sim 0.44 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ auf $\sim 0.85 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Für Rührerdrehzahlen von 750, 1000, 1250 und 1500 min^{-1} wurden die Tropfengrößenverteilungen für 4-Cl-AP *in-line* im Rührkesselreaktor bestimmt, wobei jede Minute eine Momentaufnahme der Größenverteilung aufgenommen wurde. Nachdem sich ein Gleichgewichtszustand eingestellt hat, wurden aus den Tropfengrößenverteilungen die Sauterdurchmesser nach Gleichung 17 ermittelt. Der Gleichgewichtszustand wurde aus den Trendverläufen der gemessenen Tropfen pro Sekunde, sowie der Durchmesser d_{10} , d_{50} und d_{90} entnommen. In Tabelle 5.1-2 sind die Ergebnisse für 25 mM 4-Cl-AP aufgelistet. Diese Konzentration entspricht einem Phasenanteil von 0.003.

Tabelle 5.5-2 Vergleich der experimentell bestimmten Sauterdurchmesser mit den Schätzungen nach Wang & Calabrese

Ansatz	P/V [kW m^{-3}]	d_{32} -nach Wang & Calabrese [μm]	d_{32} -gemessen [μm]	Abweichung [%]
750 rpm	1.8	60	56	-7.5
1000 rpm	5.9	43	49	11.7
1250 rpm	14.6	33	46	26.9
1500 rpm	30.6	27	46	41.9

Bei einem Vergleich der nach Wang und Calabrese berechneten und der experimentell ermittelten Werte ist zu erkennen, dass die experimentell bestimmten Werte für den untersuchten Leistungseintragsbereich ab 5.9 kW m^{-3} oberhalb der Schätzwerte liegen. Lediglich für einen Leistungseintrag von 1.8 kW m^{-3} ist der geschätzte Wert größer als der experimentell ermittelte Wert. Tendenziell nimmt der Sauterdurchmesser mit zunehmendem Leistungseintrag ab. Die Abweichung der gemessenen Werte von den geschätzten Werten nimmt dabei mit steigendem Leistungseintrag zu.

Die Abschätzung der Sauterdurchmesser nach Wang und Calabrese ist also nur begrenzt gültig. Für eine genaue Abschätzung der Edukt-Transportrate ist daher eine

experimentelle Bestimmung der Tropfendurchmesser zu bevorzugen. Die Abweichung könnte dabei folgende Ursachen haben:

- Die Modelle zur Berechnung des Sauterdurchmessers gelten nur für Normalverteilungen. Die Messungen zeigten jedoch bimodale Verteilungen. In Abb. 5.5-11 sind die Tropfengrößenverteilungen für die untersuchten Rührerdrehzahlen abgebildet. Es wird sichtbar, dass sich die Verteilung von einer bimodalen Verteilung bei niedrigen Rührerdrehzahlen mit steigender Drehzahl Richtung kleinere Tropfendurchmesser verschiebt. Jedoch wird auch bei einer Rührerdrehzahl von 1500 min^{-1} keine unimodale Tropfengrößenverteilung erreicht. Die geschätzten Sauterdurchmesser sind somit niedriger als die tatsächlichen Durchmesser.
- Mikroskopische Analysen der Proben zeigten, dass Tropfen $< 10 \mu\text{m}$ vorhanden waren, welche mit der 3-D-ORM-Messtechnik nicht erfassbar sind. Die Anzahl dieser Tropfen nimmt mit steigendem Leistungseintrag zu. Dies bedeutet, dass die mit 3-D-ORM ermittelten Sauterdurchmesser dadurch nach oben verfälscht werden.

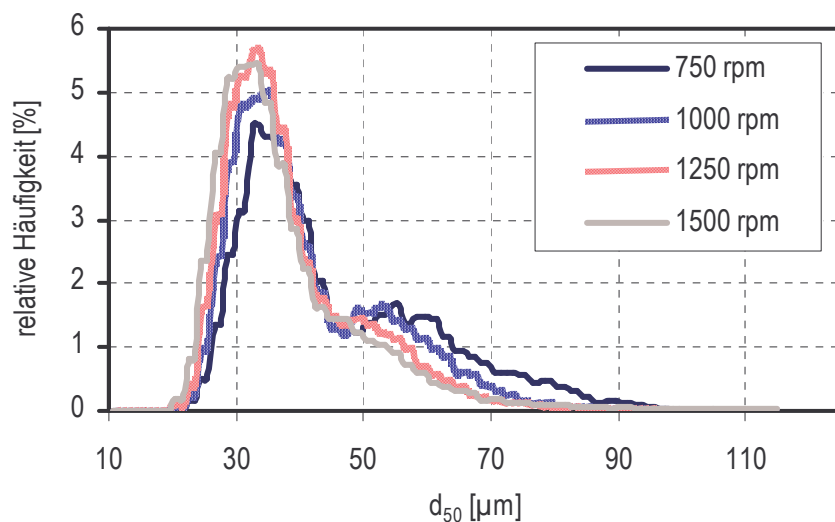


Abb. 5.5-11 Tropfengrößenverteilungen für 25 mM 4-Cl-AP bei verschiedenen Rührerdrehzahlen ($750 \text{ min}^{-1}=1.8 \text{ kW m}^{-3}$, $1000 \text{ min}^{-1}=5.9 \text{ kW m}^{-3}$, $1250 \text{ min}^{-1}=14.6 \text{ kW m}^{-3}$, $1500 \text{ min}^{-1}=30.7 \text{ kW m}^{-3}$)

In Abb. 5.5-12 sind die aus den experimentell ermittelten Sauterdurchmessern berechneten volumenbezogenen Stoffaustauschflächen und Edukt-Transportraten dargestellt. Trotz des geringen Phasenanteils von 0.003 liegt die zur Verfügung stehende Stoffaustauschfläche zwischen 322 bis 388 m^2 , mit dazu korrelierenden Edukt-Transportraten von 528 bis $827 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Eine Verdoppelung der Rührerdrehzahl bedeutet also eine Erhöhung der Edukt-Transportrate um den Faktor 1.6.

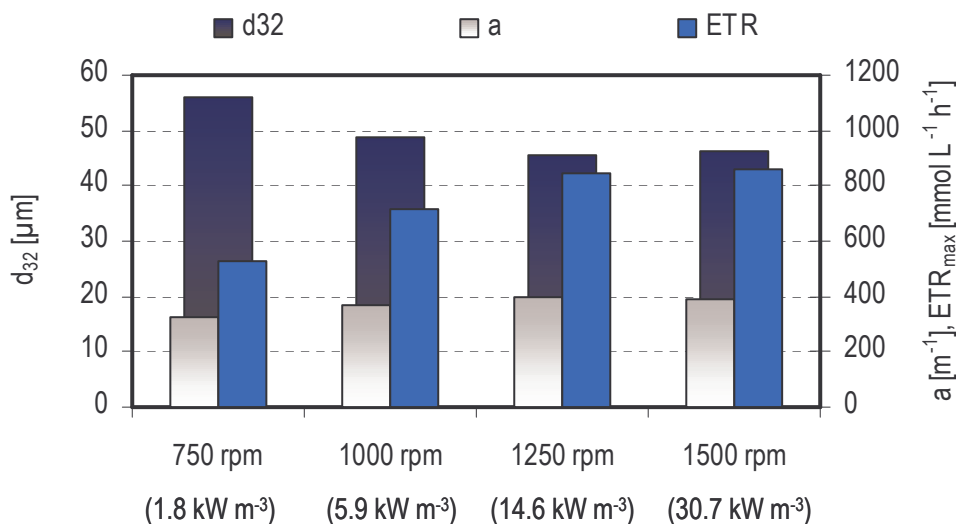


Abb. 5.5-12 Geschätzte volumenbezogene Stoffaustauschflächen und Edukt-Transportraten für die experimentell ermittelten Sauterdurchmesser für 4-Cl-AP bei verschiedenen Leistungseinträgen ($V_R = 1.7 \text{ L}$, $\varphi_V = 0.003$, 25 mM 4-Cl-AP)

5.5.5 Experimentelle Untersuchungen zum Einfluss des Phasenanteils auf den Sauterdurchmesser von 4-Cl-Acetophenon

Wie bereits in Kapitel 3.8.1 erwähnt, üben Koaleszenzeffekte bei höheren Phasenanteilen der dispersen Phase einen Einfluss auf die Tropfenbildung aus. In der Literatur werden hierbei Systeme mit einem Phasenanteil < 0.01 als verdünnte Dispersionen betrachtet bei denen die Koaleszenzeffekte vernachlässigt werden können [Paul et al., 2004]. Für Phasenanteile zwischen 0.003 bis 0.012 wurden Messungen zur Tropfengrößenverteilung für einen Leistungseintrag von 5.9 kW m^{-3} durchgeführt. Der Phasenanteil wird bei der Berechnung des Sauterdurchmessers nach Wang und Calabrese (1987) nicht berücksichtigt. Aus Abb. 5.5-13 wird ersichtlich, dass sich die gemessenen Sauterdurchmesser für die Phasenanteile zwischen 0.003 bis 0.009 mit Durchmesser zwischen 49 bis 51 μm kaum voneinander unterscheiden. Bei einem Phasenanteil von 0.012 wurde dagegen bereits ein Sauterdurchmesser von 56 μm beobachtet.

Bei den volumenbezogenen Stoffaustauschflächen und den daraus resultierenden Edukt-Transportraten kann im Gegensatz zum Sauterdurchmesser eine starke Zunahme mit steigendem Phasenanteil beobachtet werden. Beträgt die Edukt-Transportrate bei einem Phasenanteil von 0.003 noch $693 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, so steigt diese proportional zur Zunahme der Stoffaustauschfläche bei einem Phasenanteil von 0.012 um den Faktor 3.2 auf $2197 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

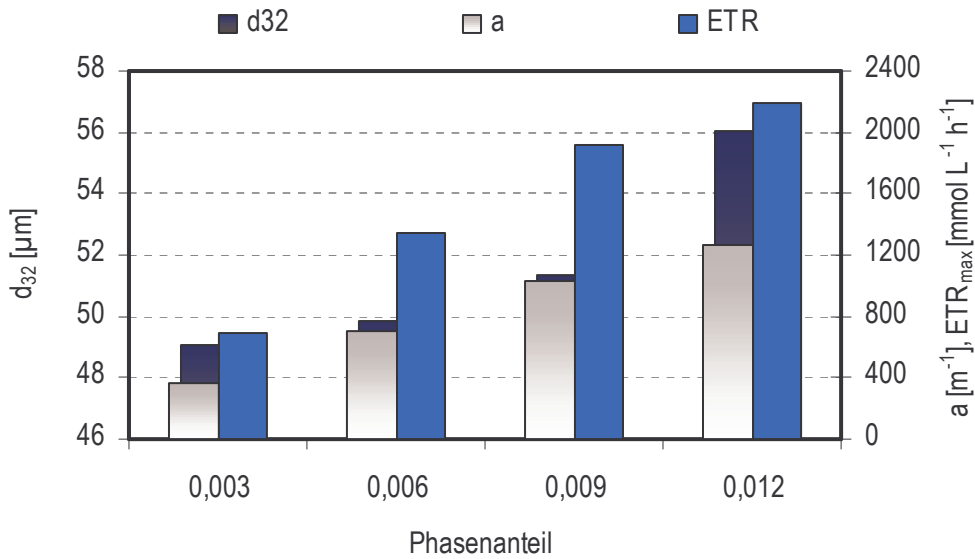


Abb. 5.5-13 Geschätzte volumenbezogene Stoffaustauschflächen und Edukt-Transportraten für die experimentell ermittelten Sauterdurchmesser für 4-Cl-AP bei verschiedenen Phasenanteilen ($P/V = 5.9 \text{ kW m}^{-3}$, 1000 min^{-1} , $V_R = 1.7 \text{ L}$)

5.5.6 Experimentelle Untersuchungen zum Einfluss von Isopropanol als Cosolvenz auf den Sauterdurchmesser von 4-Cl-Acetophenon

Gut wasserlösliche Alkohole werden oftmals als Löslichkeitsvermittler eingesetzt, um die Eduktkonzentration in der wässrigen Phase zu erhöhen (siehe Kapitel 3.7.3). Die Zugabe des Alkohols ruft dabei eine Verringerung der Grenzflächenspannung zwischen der wässrigen Phase und den Edukt-Tropfen hervor. Diese resultiert wiederum in einer Verringerung des Sauterdurchmessers.

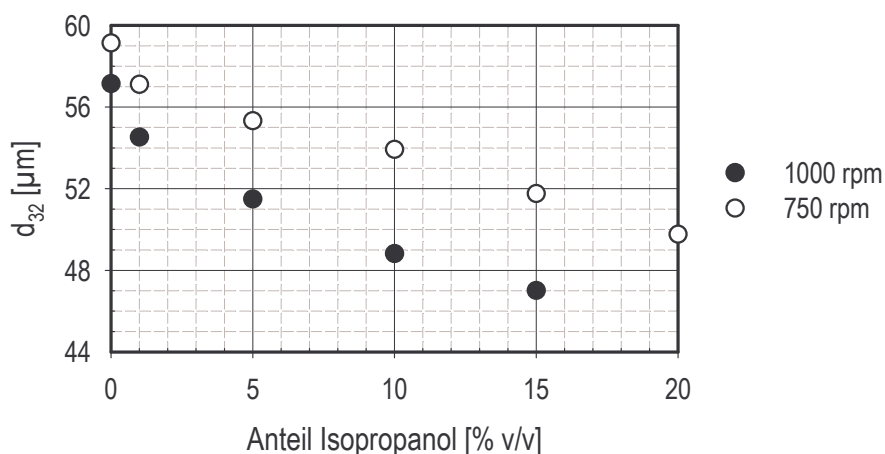


Abb. 5.5-14 Gemessene Sauterdurchmesser in Abhängigkeit der Isopropanol-Konzentration ($V_R = 1.7 \text{ L}$, $\varphi_V = 0.009$, 75 mM 4-Cl-AP)

Für verschiedene Isopropanol-Volumenanteile wurden die Tropfengrößenverteilungen bei Rührerdrehzahlen von 750 min^{-1} und 1000 min^{-1} aufgenommen. Die daraus

ermittelten Sauterdurchmesser sind Abb. 5.5-14 zu entnehmen. Es ist zu erkennen, dass der Sauterdurchmesser mit steigendem Isopropanol-Anteil geringfügig abnimmt. Bei einer Rührerdrehzahl von 750 min^{-1} (1.8 kW m^{-3}) wird durch die Zugabe von 20 % v/v Isopropanol, bezogen auf den Ansatz ohne Isopropanol-Zugabe, lediglich ein um $9 \text{ }\mu\text{m}$ geringerer Sauterdurchmesser erzielt. Bei einer Drehzahl von 1000 min^{-1} (5.9 kW m^{-3}) ist bei einem Isopropanol-Anteil von 15 % v/v der Sauterdurchmesser um $10 \text{ }\mu\text{m}$ geringer als bei dem Ansatz ohne Isopropanol.

In Abb. 5.5-15 sind die volumenbezogenen Stoffaustauschflächen und den daraus resultierenden maximalen Edukt-Transportraten für die Versuchsreihe bei 1000 min^{-1} dargestellt. Wird der Ansatz mit 15 % v/v Isopropanol mit dem Ansatz ohne Isopropanol verglichen, so wird bei 15 % v/v Isopropanol eine um 22 % größere Stoffaustauschfläche und eine um 41 % höhere maximale Edukt-Transportrate geschätzt.

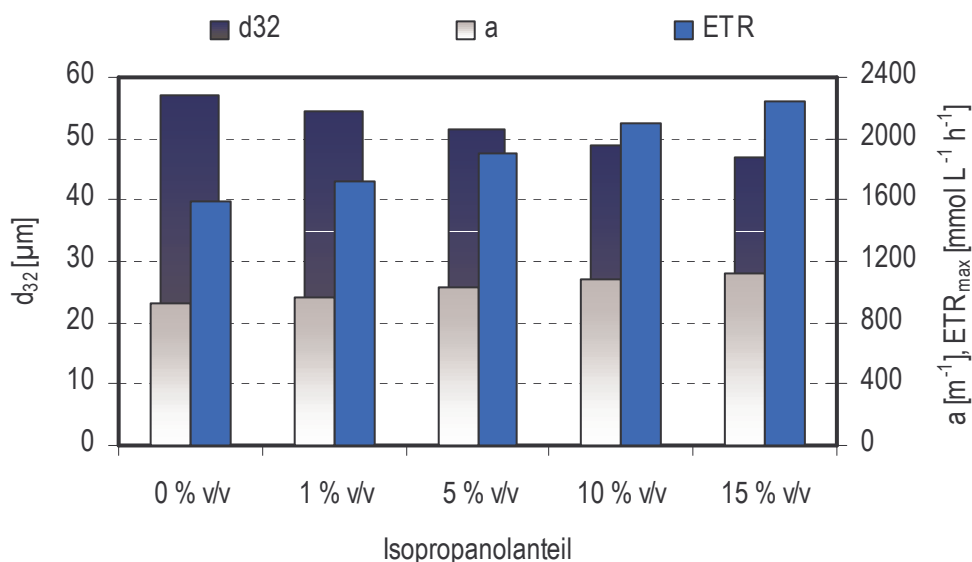


Abb. 5.5-15 Geschätzte volumenbezogene Stoffaustauschflächen und Edukt-Transportraten für die experimentell ermittelten Sauterdurchmesser für 4-Cl-AP bei verschiedenen Isopropanol-Konzentrationen ($V_R = 1.7 \text{ L}$, $P/V = 5.9 \text{ kW m}^{-3}$, 1000 min^{-1} , $\varphi_V = 0.009$, 75 mM 4-Cl-AP)

5.5.7 Experimentelle Untersuchungen zur Tropfenbildung in Anwesenheit von *Lactobacillus kefir*

Der Einfluss des Biokatalysators auf die Tropfengrößenverteilung bei verschiedenen 4-Cl-AP-Phasenanteilen wurde im Rührkesselreaktor KLF 2000 bei einer *L. kefir*-Konzentration von 10 g L^{-1} und einer Rührerdrehzahl von 750 min^{-1} durchgeführt. Parallel zur *in-line* Tropfengrößenbestimmung mittels 3-D-ORM wurden Reaktorproben mikroskopisch untersucht. Die 4-Cl-AP-Zudosierung erfolgte hierbei nach Einstellung eines Gleichgewichtszustandes und wurde in 25 mM-Schritten, bis hin zu einer Konzentration von 150 mM durchgeführt. Diese Konzentration entspricht einem Phasenanteil von 0.018. Wie in Abb. 5.5-16 zu erkennen, ist nach jeder Zudosierung

ein Anstieg in der Anzahl der gemessenen Tropfen pro Minute zu beobachten, welcher mit einem Anstieg des d_{50} korrelierte (die Edukt-Zudosierungen sind jeweils mit einem Pfeil markiert). Des Weiteren steigt die Anzahl der gemessenen Tropfen pro Minute mit zunehmendem Phasenanteil von 4-Cl-AP. Die Anzahl der gemessenen Tropfen ist jedoch viel kleiner im Vergleich zum Ansatz ohne Zellen bei sonst gleichen Bedingungen. Bei einer Rührerdrehzahl von 750 min^{-1} und 25 mM 4-Cl-AP beträgt die Anzahl der gemessenen Tropfen pro Minute $\sim 6000 \text{ min}^{-1}$. Hier wurden nach Erreichen des Gleichgewichts lediglich 10 bis 30 Tropfen pro Minute registriert. Für 75 mM 4-Cl-AP wurden im Ansatz ohne Zellen ~ 20000 Tropfen pro Minute gemessen, in Anwesenheit von Zellen dagegen ~ 30 Tropfen pro Minute. Diese geringe Anzahl der gemessenen Tropfen pro Minute lässt eine statistische Auswertung der Messungen zur Ermittlung des Sauterdurchmessers nicht zu.

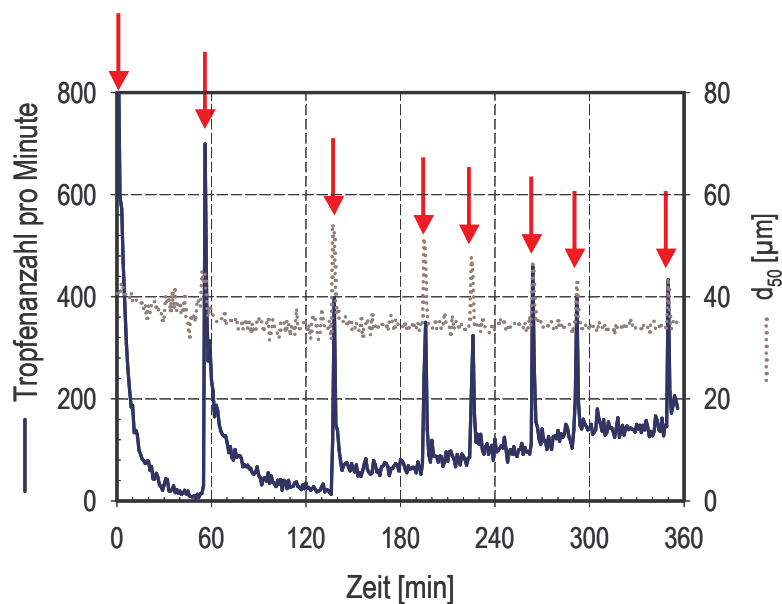


Abb. 5.5-16 Zeitlicher Verlauf der gemessenen Tropfen pro Minute und des d_{50} für ein System mit 10 g L^{-1} L. kefir ($V_R = 1.7 \text{ L}$, Rührerdrehzahl 750 min^{-1} , 4-Cl-AP-Phasenanteil bei jeder Zudosierung = 0.003 gleich 25 mM, die Zudosierungen sind durch Pfeile gekennzeichnet)

In Abb. 5.5-17 sind die mikroskopischen Aufnahmen der aus dem Reaktor entnommenen Proben dargestellt. Die Bildanalyse der Proben zeigte, dass die Durchmesser des größten Teils der Tropfen kleiner als der untere Messbereich der 3-D-ORM-Sonde von $10 \mu\text{m}$ sind. Erst bei höheren 4-Cl-AP-Phasenanteilen, wie in Abb. 5.5-17 für 150 mM ($\varphi_{V,4\text{-Cl-AP}} = 0.018$) zu erkennen, sind vereinzelte größere Tropfen um $30 \mu\text{m}$ vorhanden. Für diese Anwendung muss daher der Einsatz der 3-D-ORM- Messtechnik von einer mikroskopischen Bildanalyse unterstützt werden.

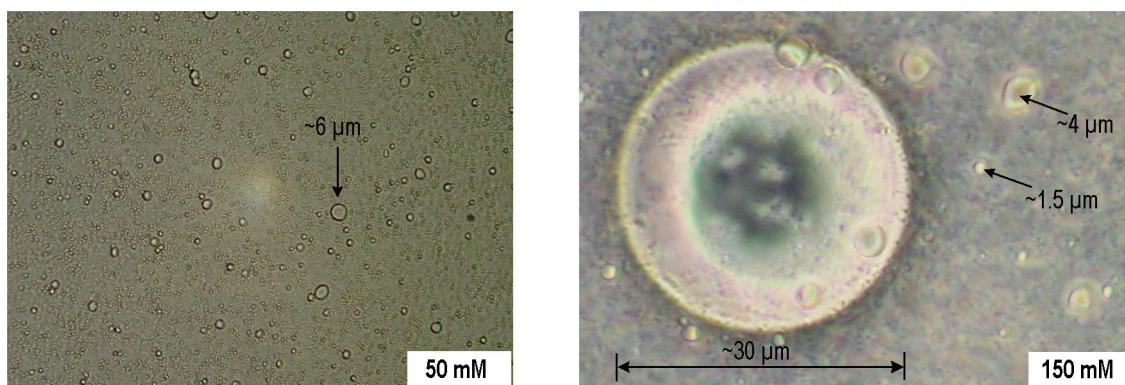


Abb. 5.5-17 Mikroskopaufnahme der Proben für verschiedene 4-Cl-AP-Phasenanteile: 50 mM ($\varphi_{V,4-Cl-AP} = 0.006$) und 150 mM ($\varphi_{V,4-Cl-AP} = 0.018$)

*Einfluss von *L. kefir* auf die Grenzflächenspannung*

Zur Untersuchung des Einflusses der Mikroorganismen auf den Tropfendurchmesser wurden die Oberflächenspannungen σ_0 für KPi-Puffer mit definierten *L. kefir*-Konzentrationen experimentell bestimmt. Die Grenzflächenspannung zwischen 4-Cl-AP und KPi-Puffer wurde mit Gleichung 54 nach Fowkes (siehe Kapitel 4.1.2) bestimmt. In Abb. 5.5-18 sind die ermittelten Oberflächen- und Grenzflächenspannungen dargestellt.

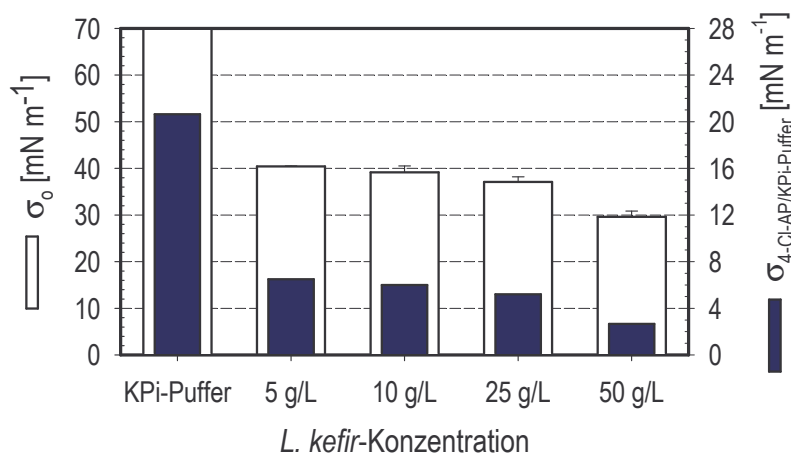


Abb. 5.5-18 Oberflächenspannungen σ_0 bei verschiedenen *L. kefir*-Konzentrationen und die daraus geschätzten Grenzflächenspannungen $\sigma_{4-Cl-AP/KPi-Puffer}$

Es ist zu erkennen, dass bereits bei einer Zellkonzentration von 5 g L⁻¹ die Oberflächenspannung des Puffers um 42 % geringer ist. Bei 50 g L⁻¹ Zellkonzentration liegt die Abnahme bei 57.6 %. Werden die Grenzflächenspannungen betrachtet, so ist diese bei 5 g L⁻¹ um 68.5 % und bei 50 g L⁻¹ um 87 % geringer.

Die für die Grenzflächenspannungen bei einem Leistungseintrag von 5.9 kW m⁻³ geschätzten Sauterdurchmesser sind in Abb. 5.5-19 vergleichend zum Sauterdurchmesser ohne Zellen dargestellt. Beträgt der Sauterdurchmesser ohne Zellen 49 μm, so ist dieser in Anwesenheit von Zellen 56 % bis 70 % kleiner. Die

Edukt-Transportrate für 50 g L⁻¹ *L. kefir* liegt bei 6400 mmol L⁻¹ h⁻¹ und ist somit um den Faktor 8.9 größer als im Ansatz ohne Zellen.

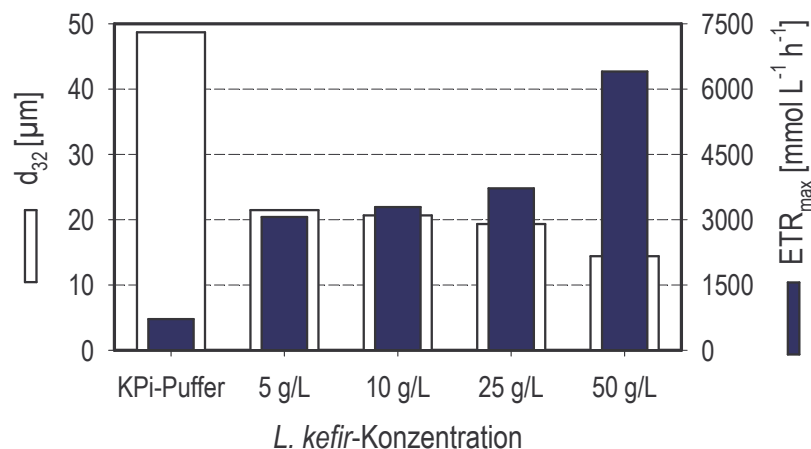


Abb. 5.5-19 Geschätzter Sauterdurchmesser und maximale Edukt-Transportraten für 4-Cl-AP bei verschiedenen *L. kefir*-Konzentrationen ($V_R = 1.7 \text{ L}$, $P/V = 5.9 \text{ kW m}^{-3}$, $\varphi_V = 0.003$, 25 mM 4-Cl-AP)

Experimentelle Bestimmung des Sauterdurchmessers in Anwesenheit von *L. kefir*

In der gerührten Blasensäule wurden Experimente zur Bestimmung der Sauterdurchmesser in Ansätzen mit *L. kefir* durchgeführt. Die *L. kefir*-Konzentration betrug 5 g L⁻¹ und der Leistungseintrag 5.9 kW m⁻³. Die Tropfendurchmesser wurden über die mikroskopische Bildanalyse bestimmt. Die mikroskopische Bildanalyse von Zellkonzentrationen höher 10 g L⁻¹ hat sich aufgrund von Problemen bei der Bildfokussierung als nicht möglich erwiesen. Der Einsatz des Farbstoffes Kristallviolett zur Färbung der Zellen, um einen stärkeren Kontrast zu den Edukt-Tropfen zu erreichen, resultierte in einer Verfälschung der Tropfendurchmesser (größere Tropfen).

Für eine 4-Cl-AP-Konzentration von 25 mM (entspricht einem Phasenanteil von 0.003) konnte ein Sauterdurchmesser von 3 μm ermittelt werden. Wurde der Phasenanteil von 4-Cl-AP verdoppelt, so ergab sich ein um 200 % größerer Sauterdurchmesser von 9 μm (die ermittelten Verteilungskurven sind dem Anhang B-VI zu entnehmen). Der Phasenanteil übt in Anwesenheit von *L. kefir* also einen Einfluss auf den Tropfendurchmesser aus. Wird diese Zunahme mit den Ansätzen ohne Zellen verglichen (siehe Abb. 5.5-13) so ist hier ein stärkerer Einfluss des Phasenanteils zu beobachten. Im Ansatz ohne Zellen hat die Verdoppelung des Phasenanteils von 0.003 auf 0.006 lediglich eine Zunahme des Sauterdurchmessers um 1.5 % hervorgerufen.

Untersuchungen bei geringeren Leistungseinträgen von 0.54 und 1.4 kW m⁻³ ergaben für 25 mM 4-Cl-AP einen Sauterdurchmesser von 14 μm . Dieses entspricht einem ETR_{max} von 6.5 mol L⁻¹ h⁻¹.

Für 6-Cl-3,5-Dioxohexansäure-*tert*-Butylester wurden ebenfalls mikroskopische Untersuchungen zur Tropfengröße in der gerührten Blasensäule durchgeführt. Für eine Konzentration von 25 mM Edukt und 5 g L⁻¹ *L. kefir* wurde bei 5.9 kW m⁻³ ein mittlerer Sauterdurchmesser von 13.8 μm ermittelt. Wie bereits aus den theoretischen Berechnungen des Sauterdurchmessers erwartet, ist dieser größer als für 4-Cl-AP bei

vergleichbarer Konzentration. Jedoch ist auch hier der Sauterdurchmesser geringer als in Abwesenheit von *L. kefir* (siehe Abb. 5.5-3).

Steigerung der maximalen Edukt-Transportrate in Anwesenheit von *L. kefir*

In Abb. 5.5-20 werden die Edukt-Transportraten mit 5 g L^{-1} *L. kefir* den Edukt-Transportraten ohne Zellen gegenübergestellt (zu den gemessenen Sauterdurchmessern: siehe Kapitel 5.5.3, 5.5.5 und 5.5.7). Der Leistungseintrag beträgt hierbei 5.9 kW m^{-3} . Bei den Ansätzen mit Zellen wurden für die Abschätzungen die experimentell bestimmten Sauterdurchmesser angenommen. Die maximalen Edukt-Transportraten für 4-Cl-AP betragen hierbei 128 mol L h^{-1} für 25 mM und $31.7 \text{ mol L h}^{-1}$ für 50 mM 4-Cl-AP. Bezogen auf die Ansätze ohne *L. kefir* bedeutet dieses eine Steigerung der maximalen Edukt-Transportrate um den Faktor 185 beziehungsweise um den Faktor 24.

Für DOHTB kann eine Steigerung um den Faktor 5.9 von $0.127 \text{ mol L h}^{-1}$ auf $0.746 \text{ mol L h}^{-1}$ festgestellt werden.

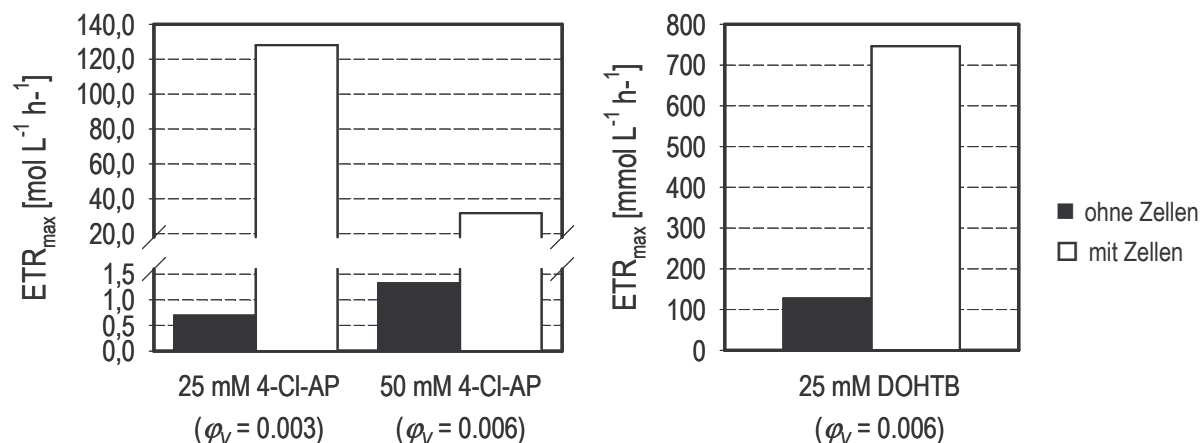


Abb. 5.5-20 Steigerung der Edukt-Transportrate in Anwesenheit von *L. kefir* (5 g L^{-1} *L. kefir*, $P/V = 5.9 \text{ kW m}^{-3}$)

Diskussion

Die Untersuchungen mit Zellen haben gezeigt, dass die Tropfendurchmesser in Anwesenheit von Zellen deutlich geringer sind als ohne Zellen. Grund dafür könnte die Ausscheidung von Biotensiden (extrazelluläre polymere Substanzen) durch *L. kefir* sein, welche zu einer Reduzierung der Grenzflächenspannung zwischen Tropfen und wässriger Phase führen. Es ist bekannt, dass *Lactobacillus sp.*-Arten die Fähigkeit besitzen das Biotensid Surfactin zu bilden [Banat et al., 2000]. Die Ausscheidung von Biotensiden durch Mikroorganismen fungiert oftmals als Aufnahmemechanismus der Zellen für schlecht wasserlösliche Edukte [Sekelsky und Shreve, 1999; Deziel et al., 1999]. Bei den Aufnahmemechanismen wird dabei zwischen folgenden Fällen unterschieden: (1) Aufnahme der in der wässrigen Phase gelösten Edukt-Moleküle, (2) Aufnahme des Edukts über einen direkten Kontakt zwischen den hydrophoben Edukt-Tropfen und der Zellen und (3) Verbesserung der Eduktaufnahme durch die Zellen über organisch-wässrige Edukt-Mizellen. Biotenside können dabei entweder die Löslichkeit in der wässrigen Phase erhöhen, die Hydrophobizität der Zellmembran

Zellmembran entspricht. Die Geschwindigkeit v_3 entspricht der maximalen Umsetzungsgeschwindigkeit des Enzyms. Diese wird aus den gemessenen Enzymaktivitäten des Zellextrakts für die eingesetzte Biotrockenmassekonzentration ermittelt (siehe auch Kapitel 3.6.5 und 5.2.1).⁸ Das gebildete Produkt wird aus der Zelle in die wässrige Phase freigesetzt (v_4) und liegt bei Überschreitung der Löslichkeitsgrenze als Tropfen vor (v_5).

Die Produktbildungsraten werden entweder von den Geschwindigkeiten v_1 , v_2 oder v_3 bestimmt. Liegt eine Stofftransportlimitierung in die wässrige Phase vor, so ist die Geschwindigkeit v_1 bestimmend. Ist der Transport des Edukts in die Zellen limitierend, so wird die Gesamtgeschwindigkeit des Prozesses von v_2 begrenzt. Im Fall einer Reaktionslimitierung ist dagegen v_3 geschwindigkeitsbegrenzend.

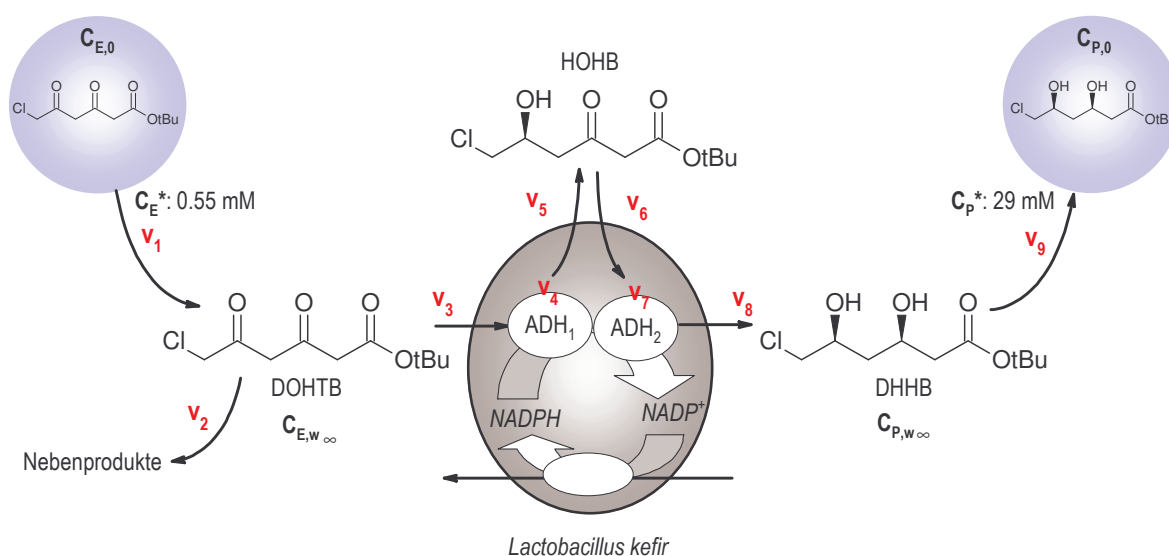


Abb. 5.5-22 Schematische Darstellung der (3R, 5S)-DHHB-Synthese mit *L. kefir* als Ganzzellbiokatalysator und mikrodispersiver Eduktbereitstellung

Die (3R, 5S)-DHHB-Synthese ist in Abb. 5.5-22 schematisch dargestellt. Bei diesem Prozess findet zusätzlich zu den oben geschilderten Vorgängen ein Transport des Zwischenprodukts HOHB in die wässrige Phase und zurück in die Zelle statt. Des Weiteren kommt es zu einer Nebenproduktbildung, wobei hier eine Zerfallsreaktion erster Ordnung von DOHTB (v_2) angenommen wird. Zusätzlich findet eine Inhibierung der LK- ADH_2 (v_7) durch HOHB statt. Bei dieser Synthese wird die Gesamtgeschwindigkeit des Prozesses also von einer der Geschwindigkeiten v_1 bis v_7 bestimmt.

⁸ Bei der Berechnung der maximalen Umsetzungsgeschwindigkeit der LK- ADH_1 ist zu beachten, dass die gemessenen Enzymaktivitäten für Acetophenon als Edukt bestimmt wurden. Die Aktivitäten für die jeweiligen Edukte müssen über die relative Aktivität bezüglich Acetophenon berechnet werden. Für 4-Cl-AP ist zum Beispiel bekannt, dass die relative Aktivität der LK- ADH_1 bezüglich Acetophenon 94 % beträgt. Für 4-Cl-ACE ist keine relative Aktivität bekannt. Hier wurde die relative Aktivität des strukturähnlichen Ethylpropionylacetat von 257 % angenommen (siehe Tabelle 3.9-1). Für die Berechnung wird von einer LK- ADH_1 -Aktivität von 700 U g^{-1} ausgegangen.

In Tabelle 5.5-3 sind die maximalen Edukt-Transportraten, die maximalen Umsetzungsgeschwindigkeiten der Enzyme und die maximalen Produktbildungsraten der Prozesse vergleichend dargestellt.⁹ Für die Bestimmung von ETR_{max} wurde für 4-Cl-AP der experimentell bestimmte Durchmesser für $5 \text{ g L}^{-1} L. kefir$ verwendet. Für DOHTB und 4-Cl-ACE wurden die geschätzten Sauterdurchmesser (ohne *L. kefir*) eingesetzt. Der angenommene Leistungseintrag für die Schätzungen betrug hierbei 0.54 kW m^{-3} .¹⁰ Die ausgewählten Phasenanteile entsprechen den Bereichen, die sich bei den Biotransformationen als relevant gezeigt haben.

Tabelle 5.5-3 Vergleich der geschätzten maximalen Edukt-Transportraten und der tatsächlichen Produktbildungsraten (ETR_{max} wurde für einen Leistungseintrag von 0.54 kW m^{-3} geschätzt)

Prozess	ETR_{max}		maximale Umsetzungsgeschw. des Enzyms ($c_x = 50 \text{ g L}^{-1}$)	maximale Produktbildungsrate
	[mol L ⁻¹ h ⁻¹]	[mol L ⁻¹ h ⁻¹]	[mol L ⁻¹ h ⁻¹]	[mol L ⁻¹ h ⁻¹]
4-Cl-AP zu 1-4-Cl-PE	6.5	$\varphi_V = 0.003$ ($5 \text{ g L}^{-1} L. kefir$)	2.1	0.080
DOHTB zu HOHB	0.033	$\varphi_V = 0.006$	0.98	0.037
HOHB zu DHHB			0.21	0.006
4-Cl-ACE zu CHBE	219	$\varphi_V = 0.082$	5.4	0.374

Bei der asymmetrischen Synthese von 1-(R)-4-Cl-PE ist zu erkennen, dass sowohl die Stofftransportrate ETR_{max} , als auch die maximale Umsetzungsgeschwindigkeit von LK-ADH₁ höher sind, als die gemessenen maximalen Produktbildungsraten. Dieses bedeutet, dass beide Geschwindigkeiten nicht limitierend für die Gesamtprozesse sein können. Es wird angenommen, dass hier der Transport des Edukts durch die Zellmembran der limitierende Faktor ist. Die maximalen Produktbildungsraten sind hierbei um den Faktor 93 geringer als ETR_{max} und um den Faktor 30 geringer als die maximale Umsetzungsgeschwindigkeit der LK-ADH₁.

Bei der DHHB-Synthese ist der Stofftransport aufgrund der geringen Löslichkeit von DOHTB am geringsten. Hierbei ist zu beachten, dass auch hier der Sauterdurchmesser bei Anwesenheit von *L. kefir* signifikant kleiner ist (siehe Abb. 5.5-20) und ETR_{max} im Umsetzungsansatz mit $50 \text{ g L}^{-1} L. kefir$ somit höher ist als der hier geschätzte ETR_{max} . Hierbei ist zu beachten, dass aufgrund der Instabilität von DOHTB in wässrigen Medien die Zudosierung hoher DOHTB-Phasenanteilen nicht möglich ist. Des Weiteren ist beim Vergleich der maximalen Umsetzungsgeschwindigkeiten der Enzyme und der

⁹ Da für DOHTB und HOHB keine relativen Aktivitäten bekannt sind, wurden für die maximalen Umsetzungsgeschwindigkeit von LK-ADH₁ und LK-ADH₂ die ermittelten formalkinetischen Daten $v_{HOHB,max}$ und $v_{DHHB,max}$ eingesetzt (siehe Kapitel 5.3.8).

¹⁰ Dieser Leistungseintrag entspricht dem verwendeten Leistungseintrag bei den 1-(R)-4-Cl-PE- und (S)-CHBE-Synthesen in der gerührten Blasensäule.

Produktbildungsraten von HOHB und DHHB zu erkennen, dass hier die Umsetzungsgeschwindigkeit der zweiten Reduktion zu DHHB die Umsetzung limitiert. Wird angenommen, dass die tatsächliche Edukt-Transportrate ETR_{\max} im Umsetzungsansatz mit *L. kefir* höher ist als der hier geschätzte Wert, so kann auch für diese Synthese angenommen werden, dass der Transport durch die Membran möglicherweise geschwindigkeitslimitierend ist. Bei diesem Prozess gilt dieses sowohl für den Transport von DOHTB, als auch von HOHB.

Bei der asymmetrischen Synthese von (S)-CHBE ist der Stofftransport deutlich größer als bei den anderen Synthesen. Auch hier ist zu erkennen, dass sowohl ETR_{\max} , als auch die maximale Umsetzungsgeschwindigkeit des Enzyms höher als die gemessenen Produktbildungsraten sind. Es ist also von einer Limitierung des Prozesses durch den Transport durch die Membran auszugehen.

Diskussion

Für die untersuchten Biotransformationen mit *L. kefir* ist der Edukt-Transport in die wässrige Phase nicht limitierend. Am Grenzbereich befindet sich hierbei die DHHB-Synthese. Bei diesem Prozess ist der Stofftransport wegen der größeren Tropfendurchmesser und der niedrigen Löslichkeit in wässrigen Systemen geringer. Die Biotransformation mit *L. kefir* ist bei dieser Synthese jedoch auch reaktionslimitiert.

Werden andere Biokatalysatoren mit höherer Umsetzungsgeschwindigkeit verwendet (zum Beispiel rekombinante Mikroorganismen mit Überexpression der Enzyme), so besteht die Möglichkeit, dass eine Erhöhung von ETR_{\max} notwendig wird. Über die durchgeführte Parameterstudie zum Einfluss des Leistungseintrags und des Phasenanteils auf ETR_{\max} (siehe Kapitel 5.5.3) kann abgeschätzt werden, wie die Parameter anzupassen sind.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die reaktionstechnische Untersuchung zur asymmetrischen Synthese chiraler Alkohole mit Bereitstellung des reinen Edukts in der Reaktionslösung ohne Einsatz einer zweiten organischen Lösungsmittelphase. Der Ansatz konnte für 3 asymmetrische Synthesen mit *Lactobacillus kefir* als Biokatalysator erfolgreich etabliert werden.

Bei der Synthese von 1-(*R*)-(4-Chlorphenyl)-Ethanol liegt eine irreversible Inhibierung durch das Produkt vor. Diese kann durch den Einsatz von Isopropanol als zusätzliches Cosubstrat umgangen werden. Durch den Einsatz von Isopropanol und Glukose als Cosubstrate, sowie eines geeigneten Zudosierungsprofils konnte bei dieser Synthese eine 1-(*R*)-(4-Chlorphenyl)-Ethanol-Konzentration von 245 mM erreicht werden. Dieses entspricht einer Ausbeute von 74%, einer Raum-Zeit-Ausbeute von 11.3 mmol L⁻¹ h⁻¹ und einer spezifischen Produktbildungskapazität von 4.9 mmol g⁻¹. Der erreichte Enantiomerenüberschuss der Synthese beträgt 97.4% ($c_x = 50 \text{ g L}^{-1}$).

Die Synthese des chiralen Bausteins 6-Cl-(3*R*,5*S*)-Dihydroxyhexansäure-*tert*-Butylesters mittels der Ganzzellbiokatalyse stellt einen neuartigen, direkten Weg in der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor-Synthese dar. 6-Cl-(3*R*,5*S*)-Dihydroxyhexansäure-*tert*-Butylester wird als Baustein in der Endphase der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor-Synthese eingesetzt. Bisher war die Herstellung aus der Diketosaure 6-Cl-3,5-Dioxohexansäure-*tert*-Butylester über den mikrobiellen Weg nur partiell möglich. Der zweite Reduktionsschritt des 6-Cl-5-(*S*)-Hydroxy-3-Oxohexansäure-*tert*-Butylesters, welcher mittels einer asymmetrischen Reduktion durch die recLB-ADH aus *L. brevis* hergestellt wurde, erfolgte hierbei auf chemischen Wege. *Lactobacillus kefir* besitzt dagegen die Fähigkeit beide Reduktionsschritte über zwei Alkoholdehydrogenasen mit einer hohen Regio- und Stereoselektivität durchzuführen.

Die formalkinetischen Parameter wurden für diese Synthese bestimmt. Durch den Einsatz eines optimierten Edukt-Zudosierungsprofils bei optimierten Reaktionsbedingungen konnte eine 6-Cl-(3*R*,5*S*)-Dihydroxyhexansäure-*tert*-Butylester-Konzentration von 120 mM nach 28 h Prozesszeit erreicht werden. Dieses entspricht einer Ausbeute von 85 %, einer Raum-Zeit-Ausbeute von 4.3 mmol L⁻¹ h⁻¹ und einer spezifischen Produktbildungskapazität von 2.4 mmol g⁻¹ ($c_x = 50 \text{ g L}^{-1}$). Der Diastereomerenüberschuss lag bei über 99.5 %.

Anders als 6-Cl-(3*R*,5*S*)-Dihydroxyhexansäure-*tert*-Butylester stellt 4-Cl-3-(*S*)-Hydroxybuttersäure-Ethylester einen etablierten Baustein bei der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor-Synthese dar, dessen mikrobielle Herstellung aus Ethyl-4-Cl-Acetoacetat mit Hefen gut erforscht, jedoch mit dem Problem einer geringen Stereoselektivität verbunden ist. Bei der asymmetrischen Reduktion mittels *Lactobacillus kefir* konnte eine 4-Cl-3-(*S*)-Hydroxybuttersäure-Ethylester-Konzentration von 1.2 M bei einem Enantiomerenüberschuss > 99.8% erreicht werden. Die erreichte Ausbeute beträgt 97%, bei einer Raum-Zeit-Ausbeute von 51 mmol L⁻¹ h⁻¹ und einer spezifischen Produktbildungskapazität von 24 mmol g⁻¹ ($c_x = 50 \text{ g L}^{-1}$). Hierbei wird die Kombination aus hohem Enantiomerenüberschuss und

hohen Raum-Zeit-Ausbeuten durch den Einsatz von Isopropanol als Cosubstrat ermöglicht. Die Synthese von 4-Cl-3-(S)-Hydroxybuttersäure-Ethylester mittels *Lactobacillus kefir* stellt also eine interessante Alternative zur Synthese mittels Hefe-Systemen dar. Sowohl hinsichtlich des Enantiomerenüberschusses, als auch hinsichtlich der Umsetzungskapazität und -Geschwindigkeit der Zellen konnten Verbesserungen erzielt werden.

In Abb. 6-1 werden die erreichten Verbesserungen der optimierten Prozesse bezüglich der jeweiligen Referenzansätze nochmals exemplarisch dargestellt.

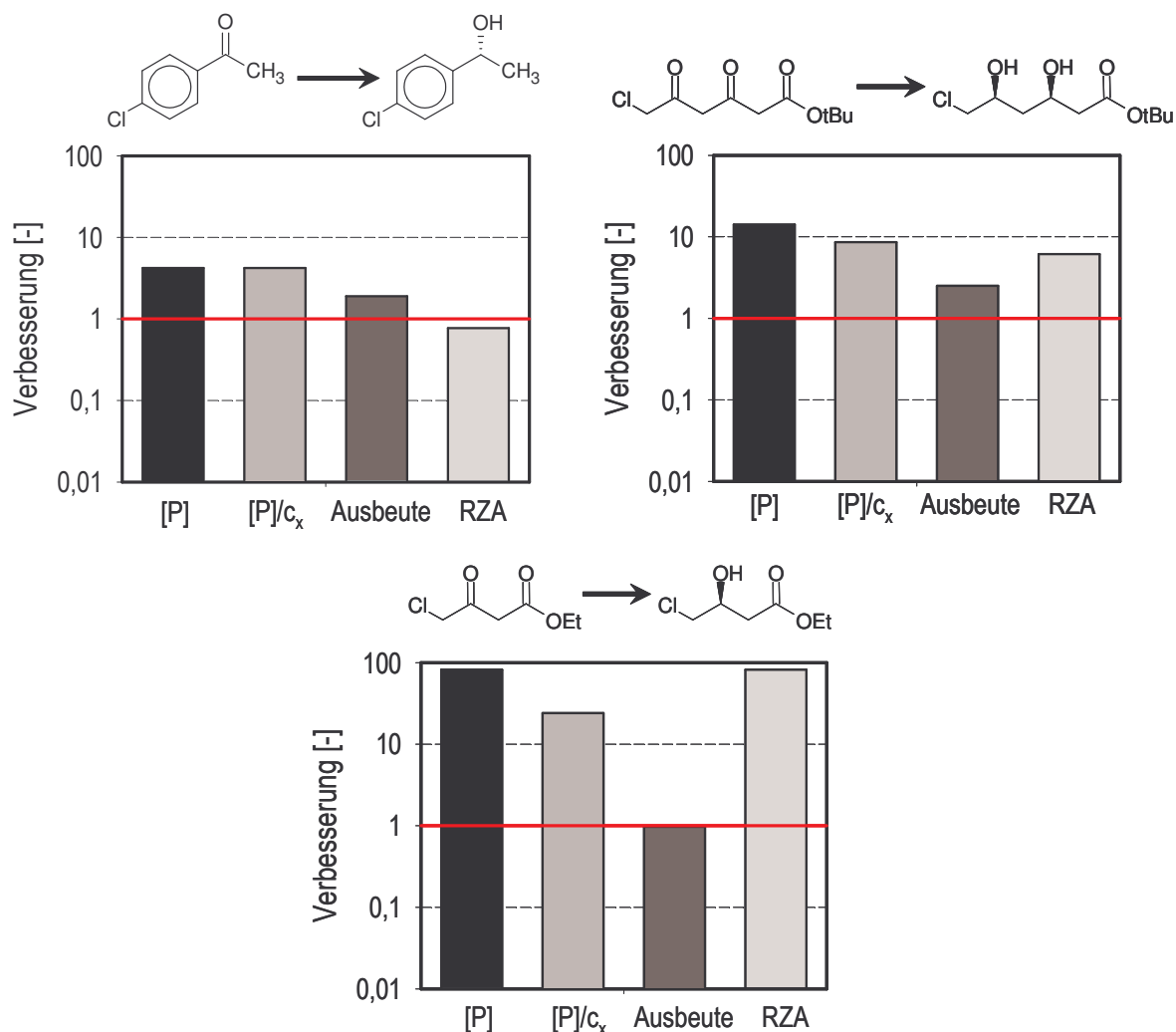


Abb. 6-1 Erreichte Verbesserungen der Prozesse bezogen auf die jeweiligen Referenzansätze für: die Produktkonzentration [P], die spezifische Produktbildungskapazität [P]/c_x, die Ausbeute und die Raum-Zeit-Ausbeute RZA

Für alle drei Edukte wurden die maximalen Edukt-Transportraten abgeschätzt. Hierbei wurde Parameterstudien zum Einfluss von Leistungseintrag und Phasenanteil auf die maximale Edukt-Transportrate durchgeführt. Beim Vergleich der maximalen Edukt-Transportraten mit den maximalen Umsetzungsgeschwindigkeiten der Enzyme und der maximalen Produktbildungsraten der Synthesen konnte festgestellt werden, dass die Synthesen unter den herrschenden Bedingungen durch den Transport der Edukte

durch die Zellmembran limitiert sind. Bei keiner der untersuchten Synthesen war eine Stofftransportlimitierung gegeben.

Die Edukt-Transportrate ist hierbei bei gleichen Bedingungen für Ethyl-4-Cl-Acetoacetat am höchsten. Bei einem Leistungseintrag von 5.9 kW m^{-3} konnte für die untersuchten Edukte folgende Sauterdurchmesser ermittelt werden: $d_{32(4\text{-Cl-ACE})} = 23 \text{ }\mu\text{m}$, $d_{32(4\text{-Cl-AP})} = 43 \text{ }\mu\text{m}$, $d_{32(\text{DOHTB})} = 55 \text{ }\mu\text{m}$. Die daraus resultierenden maximalen Edukt-Transportraten für einen Phasenanteil von 0.012 sind dabei: $\text{ETR}_{(4\text{-Cl-ACE})} = 126 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $\text{ETR}_{(4\text{-Cl-AP})} = 3.4 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $\text{ETR}_{(\text{DOHTB})} = 0.26 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Es wurde festgestellt, dass der Tropfendurchmesser in Anwesenheit von Zellen signifikant abnimmt. Bei einer Konzentration von 5 g L^{-1} *L. kefir* wurde bei 5.9 kW m^{-3} für einen 4-Cl-Acetophenon-Phasenanteil von 0.003 ein Sauterdurchmesser von $3 \text{ }\mu\text{m}$ festgestellt. Bezüglich des Ansatzes ohne Zellen bedeutet dies eine Steigerung der Edukt-Transportrate um den Faktor 185 auf $128 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Zur Herstellung des Biokatalysators *Lactobacillus kefir* konnte ein optimiertes Kultivierungsverfahren etabliert werden, bei welchem eine Zellkonzentration von 10.8 g L^{-1} erreicht wurde. Die erreichte Aktivität der LK-ADH₁ beträgt dabei 844 U g^{-1} , während die Aktivität der LK-ADH₂ bei 150 U g^{-1} liegt. Somit konnte gegenüber der Referenzkultivierung aus der Literatur eine Verbesserung des Biotrockenmassekonzentration um Faktor 5.4 erreicht werden. Die volumetrische Ausbeute konnte um Faktor 23 und die Raum-Zeit-Ausbeute um Faktor 3.6 gesteigert werden. Bei Betrachtung der kinetischen Parameter der 6-Cl-(3R,5S)-Dihydroxyhexansäure-*tert*-Butylester-Synthese wurden für diese Zellen andere Parameter ermittelt als für die Referenzzellen. Dieses Ergebnis unterstreicht nochmals die Bedeutung der Anzuchtbedingungen für die Herstellung der Biokatalysatoren.

Ausblick

Für alle drei untersuchten Biotransformationen konnte bei dem Einsatz des Wildtyp-*Lactobacillus kefir*-Stammes DSMZ 20587 die Reaktion als zweite Prozesslimitierende Größe nach dem Transport durch die Zellmembran festgestellt werden. Dieses ist sowohl für die LK-ADH₁, als auch für die LK-ADH₂ gegeben. Die kalkulierten maximal möglichen Edukt-Transportraten zeigen, dass eine Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeuten möglich ist. Daher wäre die Herstellung von rekombinanten Biokatalysatoren mit einer Überexpression der Enzyme mit integriertem Cofaktor-Regenerierungssystem von besonderem Interesse. Für eine optimale Synthese von 6-Cl-(3R,5S)-Dihydroxyhexansäure-*tert*-Butylesters ist dabei zu beachten, dass LK-ADH₂ mit der selben Enzymaktivität exprimiert werden sollte wie LK-ADH₁, welche im Wildtyp eine um den Faktor 10 höhere Aktivität besitzt.

Für den chiralen Baustein 6-Cl-(3R,5S)-Dihydroxyhexansäure-*tert*-Butylester wäre des Weiteren die Entwicklung von Ansätzen zur Produkt-Abtrennung für die industrielle Relevanz des Prozesses von besonderer Wichtigkeit. Untersuchungen in anderen Arbeiten, sowie eigene Untersuchungen (Ergebnisse nicht präsentiert), haben gezeigt, dass eine Fest-Flüssig-Extraktion mittels Adsorberharzen Amberlite XAD (Fa. Rohm

und Haas) ein geeigneter Ansatz für die Abtrennung von chiralen Alkoholen ist [Wolberg, 2001; Haberland, 2003].

Des Weiteren haben sich bei der Synthese von 6-Cl-(3*R*,5*S*)-Dihydroxyhexansäure-*tert*-Butylester, im Gegensatz zu den beiden anderen untersuchten Synthesen, weder toxische bzw. Inhibierungseffekte durch das Endprodukt DHHB, noch eine Ausschöpfung des Biokatalysators gezeigt. Aus diesem Aspekt wären hier Untersuchungen zur Wiederverwendbarkeit des Biokatalysators von Interesse.

7 Literaturverzeichnis

Agranat, I.; Caner, H.; Caldwell, J. (2002): "Putting chirality to work: the strategy of chiral switches", *Nature Reviews Drug Discovery* Vol. 1, October 2002, S. 753-768

Aragozzini F.; Maconi, E.; Craveri, R. (1986): "Stereoselective reduction of non-cyclic carbonyl compounds by some eumycetes", *Applied Microbiology and Biotechnology* 24, S. 175-177

Arragozini, F.; Valenti, M.; Santaniello, E.; Ferraboschi, P.; Grisenti, P. (1992): "Biocatalytic, enantioselective preparation of (R)- and (S)-ethyl-4-chloro-3-hydroxybutanoate, a useful chiral synthon", *Biocatalysis* Vol.5, S. 352-332

Asstech Risk Management Service GmbH (2003): *Newsletter zum Thema Statine*, www.asstech.com

Axelsson, L. (1998): "Lactic acid bacteria: Classification and physiology", *Lactic Acid Bacteria, Microbiology and Functional Aspects*, Salminen, S. und von Wright, A. (Editors), Marcel Dekker Verlag, New York, Basel, Hong Kong, S. 1-72

Banat, I.M.; Makkar, R.S.; Cameotra, S.S. (2000): "Potential commercial applications of microbial surfactants", *Applied Microbiology and Biotechnology* 53, S. 495-508

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* Heft 8, S. 1014 – 1018

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

Blandin, V.; Carpentier, J.-F.; Mortreux, A. (1999): "One-Pot and Sequential Asymmetric Hydrogenation of β - δ -Diketoesters into Functionalized 1,3-Diols: From anti- to syn-Stereoselectivity", *European Journal of Organic Chemistry*, S. 3421-3427

Blaser, H.-U.; Malan, C.; Pugin, B.; Spindler, F.; Steiner, H.; Studer, M. (2002): „Selective Hydrogenation for Fine Chemicals: Recent Trends and New Developments", *Advanced Synthesis and Catalysis* 345, No. 1+2, S. 103-151

Boivin S.; Alexandre, H.; Feuillat, M.; Charpentier, C. (1998): "Relative cell wall porosity assays using monomeric and polymeric cations in *Saccharomyces cerevisiae* cultivated in grape juice", *Biotechnology Techniques* Vol. 12, No. 6, S. 471-475

Bommarius, A.S. und Riebel B.R. (2004): *Biocatalysis*, Wiley-VCH, Weinheim, S. 1-18, S. 119-120

Böhm, H.-J.; Klebe, G.; Kubinyi, H. (Editors) (2002): *Wirkstoffdesign*, Spektrum Verlag, S. 113-127

Bradshaw, C.W.; Hummel, W.; Wong, C.-H. (1992): "Lactobacillus kefir Alcohol Dehydrogenase: A Useful Catalyst for Synthesis", *Journal of Organic Chemistry* 57, S. 1532-1536

Braun, M. und Schwartz F.H. (1999): „Apparatus for measuring particle dimensions in fluids", United States Patent US5900933

Buque, E.M.; Ifoeng, C.-J.; Straathof, A.J.J.; Jongejan, J.A.; Heijnen, J.J. (2002): "Immobilization affects the rate and enantioselectivity of 3-oxo ester reduction by baker's yeast", *Enzyme and Microbial Technology* 31, S. 656-664

Calabrese, R.V.; Chang, T.P.K.; Dang, P.T. (1986a): "Drop breakup in turbulent stirred-tank contactors: I. Effect of dispersed phase viscosity", *AIChE Journal* 32, No. 4, S. 657-666

Calabrese, R.V.; Wang, C.Y.; Bryner, N.P. (1986b): "Drop breakup in turbulent stirred-tank contactors: III. Correlations for mean size and droplet size distribution", *AIChE Journal* 32, No. 4, S. 677-681

Chaillou, S.; Pouwels, P.H.; Postma, P.W. (1999): "Transport of D-Xylose in *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus casei*, and *Lactobacillus plantarum*: Evidence for a Mechanism of Facilitated Diffusion via the Phosphoenolpyruvate:Mannose Phosphotransferase System", *Journal of Bacteriology* Vol. 181, No. 16, S. 4768-4773

Chen, H.T. und Middleman, S. (1967): „Drop Size Distribution in Agitated Liquid-Liquid Systems", *AIChE Journal* 13, No. 5, S. 989-995

Chipperfield, A.; Fleming, P.; Pohlheim, H.; Fonseca, C. (1994): *Genetic Algorithm Toolbox*, Department of Automated Control and Systems Engineering, University of Sheffield

Collins, L.D. und Daugulis, A.J. (1996): "Use of a two phase partitioning bioreactor for the biodegradation of phenol", *Biotechnology Techniques* Vol. 10, No. 9; S. 643-648

Cull, S.G.; Lovick, J.W.; Lye, G.J.; Angeli, P. (2002): "Scale-down studies on the hydrodynamics of two-liquid phase biocatalytic reactors", *Bioprocess and Biosystem Engineering* 25, S. 143-153

Davies, J.T. (1987): "A physical interpretation of drop sizes in homogenizers and agitated tanks, including the dispersion of viscous oil", *Chemical Engineering Science* 42, S. 1671-1676

Deisenhofer, J. Und Istvan, E.S. (2001): *Structural Mechanism for Statin Inhibition of HMG-CoA Reductase*, *Science* Vol. 292 (No. 5519), S. 1160 - 1164

Deziel, E.; Comeau, Y.; Villemur, R. (1999): "Two-liquid-phase bioreactors for enhanced degradation of hydrophobic/toxic compounds", *Biodegradation* 10, S. 219-233

Doulah, M.S. (1975): "An effect of hold-up on drop sizes in liquid-liquid dispersions", *Industrial and Engineering Chemistry Fundamentals* 14, S. 137-138

Dörffler, H.D. (1994): *Grenzflächen- und Kolloidchemie*, Wiley-VCH, Weinheim, S. 13-37

Economist (2002): "Telling right from left", *Science - Technology Quarterly*, www.economist.com, Sept. 19th 2002

Enders, D. und Steinbusch, D. (2003): „An Efficient Asymmetric Synthesis of *Tarchonanthuslactone*", *European Journal of Organic Chemistry*, S. 4450-4454

Endo, A. und Hasumi, K. (1993): "HMG-CoA reductase inhibitors", *Natural Product Reports* 10, S. 541-550

Engelking, H. (2004): "Reaktionstechnische Untersuchungen zur asymmetrischen Reduktion von β -Ketoestern mit rekombinanten Hefen", Dissertation an der Technischen Universität München

Faber, K. (1997): "Biotransformation s of non-natural compounds: state of the art and future development", *Pure and Applied Chemistry* Vol. 69, No. 8, S. 1613-1632

U.S. Food and Drug Administration (1992): "FDA's statement for the development of new stereoisomeric drugs", *Chirality* 4, S.338-340

Fernandes, P.; Cabral, J.M.S.; Pinheiro, H.M. (1995): „Bioconversion of a hydrocortisone derivative in an organic-aqueous two-liquid-phase-system“, *Enzyme and Microbial Technology* 17, S. 163-167

Fernandes, P.; Cabral, J.M.S.; Pinheiro, H.M. (1998): "Influence of some operational parameters on the bioconversion of sitosterol with immobilized whole cells in organic medium", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 5, S. 307-310

Goetschel, R. und Bar, R. (1991): „Dehydrogenation of hydrocortisone by *Arthrobacter simplex* in a liposomal medium“, *Enzyme and Microbial Technology* 13, S. 245-251

Green, K.D.; Gill, I.S.; Khan, J.A.; Vulfson, E.N. (1996): "Microencapsulation of Yeast Cells and Their Use as Biocatalyst in Organic Solvents", *Biotechnology and Bioengineering* 49, S. 535-543

Haberland, J. (2003): "Verfahrensentwicklung zur Darstellung von (2R,5S)-Hexandiol mit *Lactobacillus kefir* DSM20587", Dissertation an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn

Haberland, J.; Kriegesmann, A.; Wolfram, E.; Hummel, W.; Liese, A. (2002): „Diastereoselective synthesis of optically active (2R,5R)-Hexandiol“, *Applied Microbiology and Biotechnology* 58, S. 595-599

Hellander, I.M. und Mattila-Sandholm, T. (2000): „Fluorometric assessment of Gram-negative bacterial permeabilization“ *Journal of Applied Microbiology* 88, S. 213-219

Hinze, J.O. (1955): „Fundamentals of the hydrodynamic mechanism of splitting in dispersion processes“, *AIChE Journal* 1, S. 289-295

Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Williams, S.T. (Editors) (1994): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Williams and Wilkins

Holtzhauer, M. (Editor) (1997): *Biochemische Labormethoden*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 3. Auflage, S.191-203

Hummel, W. (1990): „Reduction of acetophenone to R(+)-phenylethanol by a new alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus kefir*“, Applied Microbiology and Biotechnology 34, S. 15-19

Hummel, W. (1999): "Large-scale applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases: recent developments", Trends in Biotechnology Vol. 17, Iss. 12, S. 487-492

Hummel, W. und Kula, M.-R. (1989): „Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds“, European Journal of Biochemistry 184, S. 1-13

Hummel, W. und Riebel, B. (2000): „Alcohol dehydrogenase and its use for the enzymatic production of chiral hydroxy compounds“, United States Patent US6037158

Hünnekes, E. (1994): "Untersuchungen an Biorührkesselreaktoren hinsichtlich der Stoffaustauschleistung", Studienarbeit am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen

IMS Health (2004): *IMS Retail Drug Monitor – 12 months to February 2004*; www.imshealth.com

Inoue, A. und Horikoshi, K. (1991): „Estimation of Solvent-Tolerance of Bacteria by the Solvent Parameter Log P“, Journal of Fermentation and Bioengineering Vol. 71, No. 3, S. 194-196

Inoue, K.; Kondo, T.; Ueyama, N.; Kizaki, N.; Mitsuda, M.; Miyazaki, M.; Nishiyama, A.; Yasohara, Y. (Kanegafuchi Chemical Ind.) (2002): "Process for the preparation of optically active 2-[6-(Hydroxymethyl)-1,3-Dioxan-4-yl]Acetic Acid Derivatives", European Patent EP1024139

Isken, S. und de Bont, A.M. (1998): „Bacteria tolerant to organic solvent“, Extremophiles 2, S. 229-238

Jadoun, J. und Bar, R. (1993): „Microbial transformation in a cyclodextrin medium. Part 4. Enzyme vs. microbial oxidation of cholesterol“, Applied Microbiology and Biotechnology 40, S. 477-482

Jer. Y.H. und Jia, S.L. (2003): „Applying slow-release biocatalysis to the asymmetric reduction of ethyl 4-chloroacetoacetate“, Biotechnology Letters 25, S. 17-21

Kandler, O. und Kunath, P. (1983): „*Lactobacillus kefir sp. nov., a Component of the Microflora of Kefir*“, Systematic and Applied Microbiology 4, S. 286-294

Kaneka (2004): Kaneka Fine Chemicals Products List, www.kaneka.co.jp

Kierkels, J.G.T.; Vleugels, L.W.F.; Gelade, E.T.F.; Vermeulen, D.P.; Kamphuis, J.; Wandrey, C.; van den Tweel, W.J.J. (1994): „*Pseudomonas fluorescens lipase adsorption and the kinetics of hydrolysis in a dynamic emulsion system*“, Enzyme and Microbial Technology 16, S. 513-521

Kitamura, M.; Ohkuma, T.; Takaya, H.; Noyori, R. (1988): "A practical asymmetric synthesis of carnitine", Tetrahedron Letters 29, S. 1555-1556

Kizaki, N.; Yasohara, Y.; Hasegawa, J.; Wada, M.; Kataoka, M.; Shimizu, S. (2001): "Synthesis of optically pure ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate by *Escherichia coli* transformant cells coexpressing the carbonyl reductase and glucose dehydrogenase genes", Applied Microbiology and Biotechnology 55, S. 590-595

Kleemann, A. und Engel, J. (1999) Pharmaceutical Substances: Synthesis, Patents, Applications; Thieme Verlag, Stuttgart (3rd Edition), S. 133 - 137

Kollmer, A.; Schmid, A.; von Rohr, Ph.R.; Sonnleitner, B. (1999): „On liquid-liquid mass transfer in two-liquid-phase fermentations“, Bioprocess Engineering 20, S. 441-448

Kolmogorov, A.N. (1958): Sammelband zur statistischen Theorie der Turbulenz, Akademie-Verlag, Berlin, S. 71-81

Kometani, T.; Yoshii, H.; Kitatsuji, E.; Nishimura, H.; Matsuno, R. (1993): „Large-scale preparation of (S)-ethyl 3-hydroxybutanoate with a high enantiomeric excess through baker's yeast-mediated bioreduction“, Journal of Fermentation and Bioengineering 76, S. 33-37

Kula, M.-R. und Hummel, W. (1993): „Phenylethanol dehydrogenase capable of reducing acetophenone to R(+)-phenylethanol“, United States Patent US5200335

Kula, M.-R. und Kragl, U. (2000): „Dehydrogenases in the Synthesis of Chiral Compounds“, Stereoselectiv Biocatalysis, Patel, R. (Editor), Marcel Dekker Verlag, New York, S. 839-866

Lagaly, G.; Schulz, O.; Zimehl, R. (Editors) (1997): Dispersionen und Emulsionen, Steinkopf Verlag, Darmstadt, S. 279-318

Leon, R.; Fernandes, P.; Pinheiro, H.M.; Cabral, J.M.S. (1998): „*Whole-cell biocatalysis in organic media*“, *Enzyme and Microbial Technology* 23, S. 483-500

Liese, A.; Seelbach, K.; Wandrey, C. (Editors) (2000): *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH Verlag, S. 119-120

Lin, M. und Schweiss, D. (Warner Lambert Co.) (1997): „*Novel Process For The Production of Amorphous [R-(R*,R*)]-2-(4-Fluorophenyl)-beta,delta-Dihydroxy-5-(1-Methylethyl)-3-Phenyl-4-[(Phenylamino)Carbonyl]-1H-Pyrrole-1-Heptanoic Acid Calcium Salt (2:1)*“, World Patent WO9703960

Liu Y.; Hama, H.; Fujita, Y.; Kondo, A.; Inoue, Y.; Kimura, A.; Fukuda, H. (1999): „*Production of S-Lactoylglutathione by High Activity Whole Cell Biocatalysts Prepared by Permeabilization of Recombinant Saccharomyces cerevisiae with Alcohols*“, *Biotechnology and Bioengineering* Vol. 64, No. 1, S. 54-60

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 and Microbial Technology* 19. S. 250-255

Manzoni, M. und Rollini, M. (2002): *Biosynthesis and biotechnological production of statines by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs*, *Applied Microbiology and Biotechnology* 58, S. 555-564

Mersmann, A. und Grossmann, H. (1980): „*Dispergieren im flüssigen Zweiphasensystem*“, *Chemie Ingenieur Technik* 52, No. 8, S. 621-628

Nakamura, K.; Higaki, M.; Ushio, K.; Oka, K.; Ohno, A. (1985): „*Stereochemical control of microbial reduction. 2. Reduction of β -keto esters by immobilized baker's yeast*“, *Tetrahedron Letters* 26, S. 4213-4216

Nakamura, K.; Inoue, K.; Ushio, K.; Oka, K.; Ohno, A. (1987): „*Effect of allyl alcohol on reduction of β -keto esters by baker's yeast*“, *Chemistry Letters* 9, S. 679-682

Nielsen, J. und Viladsen, J. (1994): *Bioreaction Engineering Principles*, Plenum Press, New York, London, S. 9-19

Novak, L. und Loubiere, P. (2000): „*The Metabolic Network of Lactococcus lactis: Distribution of 14C-Labeled Substrates Between Catabolic and Anabolic Pathways*“, Journal of Bacteriology 182, S. 1136-1143

Oguni, N. und Ohkawa, Y. (1988): „*Complete Stereoselective Synthesis of Chiral Intermediates for Thienamycin and Related Antibiotics*“, Journal of the Chemical Society: Chemical Communications, S. 1376-1377

Ohkuma, T.; Ooka, H.; Hashiguchi, S.; Ikariya, T.; Noyori, R. (1994): "Practical Enantioselective Hydrogenation of Aromatic Ketones", Journal of the American Chemical Society 117, S. 2675-2676

Osborne, S.J.; Leaver, J.; Turner, M.K.; Dunnill, P. (1990): "Correlation of biocatalytic activity in an organic-aqueous two-liquid phase system with solvent concentration in the cell membrane", Enzyme and Microbial Technology 12, S. 281-291

Panke, S.; Wubbolts, M.G.; Schmid, A.; Witholt, B. (2000): „*Production of Enantiopure Styrene Oxide by Recombinant Escherichia coli Synthesizing a Two-Component Styrene Monooxygenase*“, Biotechnology and Bioengineering Vol. 69, No. 1, S. 91-100

Patel, R.N. (2002): *Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals*, Enzyme and Microbial Technology 31, S. 804 – 826

Paul, E.L.; Atiemo-Obeng, V.A.; Kresta, S. (2004): Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice, Wiley Interscience, Hoboken, New Jersey, S. 187-256, S. 639-753

Peters, J. (1998): "Dehydrogenases – Characteristics, Design of Reaction Conditions, and Application", Biotechnology Vol. 8a: Biotransformations I, Kelly, D.R. (Editor), Wiley VCH, S. 391-474

Prazeres, D.M.F. und Cabral, J.M.S. (1994): "Enzymatic membrane bioreactors and their application", Enzyme and Microbial Technology 16, S. 738-750

Reid, R.C.; Prausnitz, J.M.; Poling, B.E. (Editors) (1988): The Properties of Gases and Liquids, McGraw-Hill Book Company, Fourth Edition, S. 577-631

Riebel, B. (1997): "Biochemische und molekularbiologische Charakterisierung neuer mikrobieller NAD(P)-abhängiger Alkoholdehydrogenasen", Deutsche Hochschulschriften 2478, Hänsel-Hohenhausen Verlag, Egelsbach, Frankfurt, Washington

Ritter, J. und Kraume, M. (2000): „On-line Measurement Technique for Drop Size Distributions in Liquid/Liquid Systems at High Dispersed Phase Fractions“, Chemical Engineering Technology 23, No. 7, S. 579-581

Roth, B.D. (Warner-Lambert Company) (1987): "Trans-6-[2-(3- or 4-carboxamido-substituted pyrrol-1-yl)alkyl]-4-hydroxypyran-2-one inhibitors of cholesterol synthesis", United States Patent US4681893

Saier, M.H.; Ye, J.-J.; Klinke, S.; Nino, E. (1996): „Identification of an Anaerobically Induced Phosphoenolpyruvate-Dependent Fructose-Specific Phosphotransferase System and Evidence for the Embden-Meyerhof Glycolytic Pathway in the Heterofermentative bacterium *Lactobacillus brevis*“, Journal of Bacteriology Vol. 178, No. 1, S. 314-316

Saito, T.; Sayo, N.; Noyori, R.; Takaya, H.; Akutagawa, S.; Kumobayashi, H.K. (Takasago International Corp.) (1993): "Process of preparing optically active alcohol" Deutsches Patent DE387462T

Sato, T. und Fujisawa, T. (1989): "Stereocontrol in Baker's Yeast Reduction Leading to Natural Product Synthesis", Biocatalysis Vol. 3, S. 1-15

Schlee, D. und Kleber, H.-P. (Editors) (1991): Biotechnologie, Gustav Fischer Verlag, Jena

Seebach, D.; Sutter, M.A.; Weber, R.H.; Züger, M.F. (1985): „Yeast reduction of ethyl acetoacetate: (S)-(+)-Ethyl-3-hydroxybutanoate“, Organic Syntheses 63, S. 1-9

Sekelsky, A.M. und Schreve, G.S. (1999): „Kinetic Model of Biosurfactant-Enhanced Hexadecane Biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*“, Biotechnology and Bioengineering Vol. 63, No. 4, S. 401-409

Shao, L.; Kawano, H.; Saburi, M.; Uchida, Y. (1993): "Asymmetric Hydrogenation of 3,5-Dioxoesters Catalyzed by Ru-binap Complex: A Short Step Asymmetric Synthesis of 6-substituted 5,6-dihydro-2-pyrones", Tetrahedron Vol. 49, No. 10, S. 1997-2010

Sherwood, T.K.; Pigford, R.L.; Wilke, C.R. (Editors) (1975): Mass Transfer, McGraw-Hill chemical engineering series, S. 8-53

Shieh, W.-R.; Gopalan, A.S.; Shih, C.J. (1985): "Stereochemical control of yeast reductions. 5. Characterization of the oxidoreductases involved in the reduction of β -keto esters", Journal of the American Chemical Society 107, S. 2993-2994

Shimizu, S. und Kataoka, M. (1999): „Production of Chiral C3- und C4-Units by Microbial Enzymes“, Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology Vol. 63, Scheper, T. (Editor), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, S.109-123

Sikkema J.; Weber, F.J.; Heipieper, H.J.; de Bont, J.A.M. (1994): "Cellular Toxicity of Lipophilic Compounds: Mechanisms, Implications, and Adaptations", Biocatalysis 10, S. 113-122

Simonett, A. (2003): "Aufbau und Etablierung der Meß- und Regeltechnik am Bioreaktor KLF2000", Semesterarbeit am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München

Skelland, A.H.P. und Kanel, J.S. (1992): „Simulation of Mass Transfer in a Batch Agitated Liquid-Liquid Dispersion“, Industrial and Engineering Chemistry Research 31, S. 908-920

Stark, H. (2003): Wirkmechanismus von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren - Medizinisch-chemische Aspekte von Statinen, Pharmazie Unserer Zeit Nr. 6, S. 464 - 470

Stewart, J.D. (2001): „Dehydrogenases and transaminases in asymmetric synthesis“, Current Opinion in Chemical Biology 5, S. 120-129

Stillger, T; Bönitz, M.; Villela, M.; Liese, A. (2002): „Überwindung von thermodynamischen Limitierungen in substratgekoppelten Cofaktorregenerierungsverfahren“, Chemie Ingenieur Technik 74, S. 1035-1039

Stinson, S.C. (2001): "Chiral Pharmaceuticals", CENEAR, Vol. 79, No. 40, S.79-97

Sybesma, W.F.H.; Straathof, A.J.J.; Jongejan, J.A.; Pronk, J.T.; Heijnen, J.J. (1998): „Reductions of 3-oxo esters by baker's yeast: current status“, Biocatalysis and Biotransformation 16, S. 95-134

Thottathil, J.K.; Pendri, Y.; Li, W.-S.; Kronenthal, D. (Squibb and Sons Inc.) (1994): "Process for the preparation of 1,3-dioxane derivatives useful in the preparation of HMG-CoA reductase inhibitors", United States Patent US5278313

Tischkov, V.I.; Galkin, A.G.; Fedorchuk, V.V.; Savitsky, P.A.; Rojkova, A.M.; Gierem, H.; Kula, M.-R. (1999): "Pilot Scale Production and Isolation of Recombinant NAD⁺- and NADP⁺-Specific Formate Dehydrogenase", Biotechnology and Bioengineering Vol. 64, No. 2, S. 187-193

Uhlenbrock, K. (1994): "Methoden zur reaktionstechnischen Optimierung enzymatischer Synthesen – dargestellt am Beispiel der enantioselektiven Reduktion von *p*-Chloracetophenon im organisch-wässrigen Zwei-Phasen-System", Dissertation an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn

Uko, M.; Azuma, H.; Sakai, T.; Tsuboi, S. (1991): "Optically active Hydroxyketo Ester and its Production", Japan Patent JP3048641

Van der Werf; M.J.; Hartmans, S.; van den Tweel, W.J.J. (1995): „Permeabilization and lysis of *Pseudomonas alcaligenes* cells by Triton X-100 for efficient production of D-Malat“, Applied Microbiology and Biotechnology 43, S. 590-594

Vicario, J.L.; Job, A.; Wolberg, M.; Müller, M.; Enders, D. (2002): „Asymmetric Total Synthesis of (-)-Callystatin A Employing the SAMP/RAMP Hydrazone Alkylation Methodology“, Organic Letters Vol. 4, No. 6, S. 1023-1026

Villela F., M. (2003): "Enantioselective Reduction of Hydrophobic Keto Compounds in Multiphase Bioreactor", Dissertation an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn

Wang, C.Y. und Calabrese, R.V. (1986): "Drop breakup in turbulent stirred-tank contactors: II. Relative influence of viscosity and interfacial tension", AIChE Journal 32, No. 4, S. 667-676

Weihs, C.; Jessenberger, J.; Grize, Y.-L. (1999): Statistische Methoden zur Qualitätssicherung und -optimierung, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, S. 102-133

Wess, G.; Kessler, K.; Baader, E.; Bartmann, W.; Beck, G.; Bergmann, A.; Jendralla, H.; Bock, K.; Holzstein, G.; Schnierer, M. (1990): „Stereoselective Synthesis of HR 780 A Highly New Potent HMG-CoA Reductase Inhibitor“, Tetrahedron Letters Vol. 31, No. 18, S. 2545-2548

Westgate, S.; Vaidya, A.M.; Bell, G.; Halling, P.J. (1998): "High specific activity of whole cells in an aqueous-organic two-phase membrane bioreactor", *Enzyme and Microbial Technology* 22, S. 575-577

Weuster-Botz (2000): "Experimental Design for Fermentation Media Development: Statistical Design or Global Random Search?", *Journal of Bioscience and Bioengineering* Vol. 90, No. 5, S. 473-483

Weuster-Botz, D.; Paschold, H.; Gieren, H.; Kula, M.-R.; Wandrey, C. (1994): „Continuous computer controlled production of formate dehydrogenase (FDH) and isolation on a pilot scale“, *Chemical Engineering Technology* 17, S. 131-137

Wolberg, M. (2001): "Chemoenzymatische Synthese optisch aktiver β - δ -Dihydroxyester", Dissertation an der Carl von Ossietzky Universität, Oldenburg

Wolberg, M.; Hummel, W.; Müller, M. (2001): „Biocatalytic reduction of β - δ -Diketo Esters: A Highly Stereoselective Approach to All Four Stereoisomers of a Chlorinated β - δ -Dihydroxy Hexanoate“, *Chemistry – A European Journal* Vol. 7 (21), S. 4562-4571

Wolberg, M.; Hummel, W.; Wandrey, C.; Müller, M. (2000): „Highly Regio- and Enantioselective Reduction of 3,5-Dioxocarboxylates“, *Angewandte Chemie* 112, Nr. 23, S. 4476-4478

Wolberg, M.; Müller, M.; Hummel, W. (2000): „Verfahren zur enantioselektiven Reduktion von 3,5-Dioxocarbonsäuren und deren Ester“, Deutsches Patent DE19857302

Wolf, K.-H. (1994): Aufgaben zur Bioreaktionstechnik, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 54-56

Wong, C.-H. und Drueckhammer, D.G. (1985): *Bio/Technology* 3, S. 649-651

Wong, C.H. und Whitesides, G.M. (1981): "Enzyme-catalyzed organic synthesis: NAD(P)H cofactor regeneration by using glucose-6-phosphate and the glucose-6-phosphat-dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*", *Journal of the American Chemical Society* 103, S. 4890-4899

Yamaguchi, M.; Shibato, K.; Nakashima, H.; Minami, T. (1988): "Synthesis of phenols by the intramolecular condensation of beta, beta', delta, delta'-tetraoxoalkanediolates a novel BF₃-promoted claisen condensation of acetoacetate dianion with esters and amides", *Tetrahedron* 44, S. 4767-4775

Yasohara, Y.; Kizaki, N.; Hasegawa, J.; Takahashi, S.; Wada, M.; Kataoka, M.; Shimizu, S. (1999): "*Synthesis of optically active ethyl-4-chloro-3-hydroxybutanoate by microbial reduction*", Applied Microbiology and Biotechnology 51, S. 847-851

Zelinski, T. und Kula, M.-R. (1997): "*Asymmetric enzymatic reduction of lipophilic ketones in aqueous solution containing cyclodextrins*", Biocatalysis and Biotransformation 15, S. 57-74

Zhao, Y. und DeLancey, G.B. (1999): "*Transmembrane Distribution of Substrate and Product During the Bioreduction of Acetophenone with Resting Cells of Saccharomyces cerevisiae*", Biotechnology and Bioengineering Vol. 64, No. 4, S. 434-441

Zhou, G. und Kresta, S.M. (1998): "*Evolution of drop size distribution in liquid-liquid dispersions for various impellers*", Chemical Engineering Science Vol. 53, No. 11, S. 2099-2113

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

Abkürzungsverzeichnis**Abkürzungen chemischer Formeln bzw. Namen**

Acetonid-DHHB	Acetonid-Derivat des (3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-Dihydroxyhexansäure- <i>tert</i> -Butylesters
ADH	Alkoholdehydrogenase
ADP	Adenosin Diphosphat
ATP	Adenosin Triphosphat
Äq.	Äquivalente
BEt ₃	Triethylboran
(<i>S</i>)-CHBE	4-Cl-3-(<i>S</i>)-Hydroxybuttersäure-Ethylester
4-Cl-ACE	Ethyl-4-Cl-Acetoacetat
4-Cl-AP	4-Cl-Acetophenon
1-(<i>R</i>)-4-Cl-PE	1-(<i>R</i>)-(4-Cl-Phenyl)-Ethanol
CP-Puffer	Citrat-Phosphat-Puffer
3-D-ORM	Dreidimensionale optische Rückreflexionsmessung
DH	Dehydrogenase
DHHB	6-Cl-Dihydroxyhexansäure- <i>tert</i> -Butylester (alle Enantiomere)
(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-DHHB	6-Cl-(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-Dihydroxyhexansäure- <i>tert</i> -Butylester
DOHTB	6-Cl-3,5-Dioxohexansäure- <i>tert</i> -Butylester
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
FDA	United States Food and Drug Administration
FDH	Formiat Dehydrogenase
GC	Gaschromatographie
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HMP	4-Hydroxy-4-Methyl-2-Pentanon
HOHB	6-Cl-5-Hydroxy-3-Oxohexansäure- <i>tert</i> -Butylester (Racemat)
5-(<i>R</i>)-HOHB	6-Cl-5-(<i>R</i>)-Hydroxy-3-Oxohexansäure- <i>tert</i> -Butylester

5-(S)-HOHB	6-Cl-5-(S)-Hydroxy-3-Oxohexansäure- <i>tert</i> -Butylester
HPLC	Hochdruck Flüssigkeitschromatographie
KPi-Puffer	Kalium-Phosphat-Puffer
LB-ADH	Phenyl-Ethanol Alkoholdehydrogenase aus <i>Lactobacillus brevis</i>
LiH	Lithiumhydrid
LK-ADH ₁	Phenyl-Ethanol Alkoholdehydrogenase aus <i>Lactobacillus kefir</i>
LK-ADH ₂	Hydroxy-Keton Alkoholdehydrogenase aus <i>Lactobacillus kefir</i>
NaBH ₄	Natriumborhydrid
NAD(P) ⁺	Nikotinamid Adenin Dinukleotid (Phosphat)
NAD(P)H	reduzierte Form des Nikotinamid Adenin Dinukleotids (Phosphat)
nBuLi	n-Butyllithium
ODFA	<i>tert</i> -Butyl-(4-Oxo-4,5-Dihydrofuran-2-yl)-Acetat
PEP	Phosphoenolpyruvat
PTS	Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-System
Ru-BINAP	Ruthenium-2,2'-Bis(diphenylphosphino)-1,1'-Binaphthyl
THF	Tetrahydrofuran
t _R	Retentionszeit

Größen zur Beschreibung der Biotransformation und des Zellwachstums

B	[-]	Bestimmtheitsmaß
c _P	[mol L ⁻¹]	Produktkonzentration
c _x	[g L ⁻¹]	Biotrockenmassekonzentration
de	[%]	Diastereomerenüberschuss
dr _{s:a}	[-]	Mengenverhältnis der <i>syn</i> - zur <i>anti</i> - Form der Diastereomere
ee	[%]	Enantiomerenüberschuss
EUR	[mol L ⁻¹ h ⁻¹]	Edukt-Aufnahmerate
F	[mol L ⁻¹ h ⁻¹]	Zudosierungsrate

FQS	Quadrat der y-Koordinate	Fehlerquadratsumme
K	[-]	Verteilungskoeffizient
k_d	$[h^{-1}]$	Zerfallskonstante
k_1	$[h^{-1}]$	Deaktivierungskonstante des Biokatalysators (Reaktion 1. Ordnung)
K_i	$[mol L^{-1}]$	Inhibierungskonstante
K_m	$[mol L^{-1}]$	Michaelis-Menten Konstante
$\log P_{o/w}$	[-]	Verteilungskonstante in <i>n</i> -Octanol und Wasser
M	$[mol L^{-1}]$	Molarität
MG	$[g mol^{-1}]$	Molekulargewicht
OD_{660}	[-]	optische Dichte bei $\lambda=660$ nm
OTR	$[mol L^{-1} h^{-1}]$	Sauerstofftransportrate
OUR	$[mol L^{-1} h^{-1}]$	Sauerstoffaufnahme
P	$[N m s^{-1}]$	Leistungseintrag
$[P]/c_x$	$[mol g^{-1}]$	spezifische Produktbildungskapazität
pO_2	[%]	gelöste Sauerstoffkonzentration in Sättigungsprozenten
RZA	$[mol L^{-1} h^{-1}]$	Raum-Zeit-Ausbeute
T	[K]	Temperatur
$t_{1/2}$	[h]	Halbwertszeit des Biokatalysators
ttn	$[mol mol^{-1}]$	Wechselzahl bei enzymkatalysierten Reaktionen mit Cofaktor-Zugabe (auch als "total turnover number" bekannt)
v_i	$[mol L^{-1} h^{-1}]$	Produktbildungsrate der Komponente i
$v_{i,max}$	$[mol L^{-1} h^{-1}]$	maximale Produktbildungsrate der Komponente i
\dot{V}	$[m^3 h^{-1}]$	Volumenstrom
V_R	[L]	Reaktionsvolumen
x	[-]	Molenbruch
$Y_{x,s}$	$[g g^{-1}]$	Ertragskoeffizient

μ_{\max}	$[\text{h}^{-1}]$	maximale spezifische Wachstumsrate
μ	$[\text{h}^{-1}]$	spezifische Wachstumsrate

Größen zur Beschreibung der Tropfenbildung und des Stofftransports

a	$[\text{m}^2 \text{m}^{-3}]$	Volumenbezogene Phasengrenzfläche
C_1 bis C_5	$[-]$	Korrelationskonstante zur Berechnung der Tropfengröße
c_E	$[\text{mol L}^{-1}]$	Eduktkonzentration
$c_{E,0}$	$[\text{mol L}^{-1}]$	Konzentration des reinen Edukts
c_E^*	$[\text{mol L}^{-1}]$	Sättigungskonzentration des Edukts in der wässrigen Phase
$C_{E,w\infty}$	$[\text{mol L}^{-1}]$	Gelöste Eduktkonzentration in der wässrigen Phase
D	$[\text{cm}^2 \text{s}^{-1}]$	Diffusionskoeffizient
d	$[\text{m}]$	Tropfendurchmesser
d_{10}	$[\text{m}]$	Durchmesser, bei dem 10% des Gesamtvolumens der Tropfen kleiner sind als dieser Durchmesser (bei einer Volumenverteilung)
d_{32}	$[\text{m}]$	Mittlerer Sauterdurchmesser
d_{50}	$[\text{m}]$	Durchmesser, bei dem 50% des Gesamtvolumens der Tropfen kleiner sind als dieser Durchmesser (bei einer Volumenverteilung)
d_{90}	$[\text{m}]$	Durchmesser, bei dem 90% des Gesamtvolumens der Tropfen kleiner sind als dieser Durchmesser (bei einer Volumenverteilung)
d_i	$[\text{m}]$	Tropfendurchmesser der Fraktion i
d_{\max}	$[\text{m}]$	Maximaler Tropfendurchmesser
D_R	$[\text{m}]$	Durchmesser des Rührkesselreaktors
d_R	$[\text{m}]$	Rührerdurchmesser
ETR	$[\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}]$	Edukt-Transportrate
F	$[-]$	Korrekturfaktor für die Grenzflächenspannungsmessung
Fr	$[-]$	Froude-Zahl
g	$[\text{m s}^{-2}]$	Gravitationskonstante $[9.81 \text{ m s}^{-2}]$

H	[m]	Höhe des Rührkesselreaktors
h	[m]	Einbauhöhe des Rührers vom Reaktorboden
H _C	[-]	Hagenbach-Couette Korrektion zur Bestimmung der kinematischen Viskosität
K _F	[-]	Korrekturfaktor zur Berechnung der kinematischen Viskosität
l	[m]	Kolmogoroff-Turbulenzwirbel
N	[min ⁻¹]	Drehzahl des gerührten Systems
Ne	[-]	Leistungskennzahl
n _i	[-]	Anzahl der Tropfen in der Fraktion i
P	[N m s ⁻¹]	Leistungseintrag
Q	[-]	Gasdurchsatzzahl
q _{x(d)}	[-]	Verteilungsdichte
Q _{x(d)}	[-]	Verteilungssumme
Re	[-]	Reynoldszahl
Sc	[-]	Schmidzahl
Sh	[-]	Sherwoodzahl
V _A bzw. V _B	[cm ³ mol ⁻¹]	Molares Volumen der Komponente A bzw. B
V _i	[-]	Viskositätskennzahl
We	[-]	Weber-Zahl
Δρ	[kg m ⁻³]	Dichtedifferenz der dispersen und der kontinuierlichen Phase
Φ	[-]	Assoziationsparameter
β	[m s ⁻¹]	Stoffüberganskoeffizient
ε	[m ² s ⁻³]	Energiedissipationsdichte
η	[Pa s]	Dynamische Viskosität
φ _G	[-]	Phasenanteil der Gasphase
φ _V	[-]	Phasenanteil der dispersen Phase

ν	$[\text{m}^2 \text{s}^{-1}]$	kinematische Viskosität
ρ	$[\text{kg m}^{-3}]$	Dichte
ρ_d	$[\text{kg m}^{-3}]$	Dichte der dispersen Phase
ρ_k	$[\text{kg m}^{-3}]$	Dichte der kontinuierlichen Phase
σ	$[\text{N m}^{-1}]$	Grenzflächenspannung
σ_0	$[\text{N m}^{-1}]$	Oberflächenspannung
τ_d	$[\text{N m}^{-2}]$	Viskositätskraft
τ_k	$[\text{N m}^{-2}]$	Scherkraft
τ_o	$[\text{N m}^{-2}]$	Oberflächenspannungskraft

Indizes

d	disperse Phase
G	Gasphase
i	Fraktion i bzw. Komponente i
k	kontinuierliche Phase
P	Produkt
R	Rührer
E	Edukt
O ₂	Sauerstoff
0	reine Phase

Erklärung zu den Einheiten

L	Im biotechnologischen Sprachgebrauch wird die Einheit Liter mit großem L geschrieben, wobei dieses ebenfalls für die Einheit mL verwendet wird. Dieses ist im Allgemeinen so üblich und findet auch in biotechnologischen Fachzeitschriften Anwendung.
% v/v	Für Löslichkeitsvermittler, Alkohole und organische Lösungsmittel ist es üblich den Phasenanteil in Volumenanteilen anzugeben.
[X]	Die eckige Klammer um den Namen der Komponente X ist das Symbol für die Konzentration.
D, V_A bzw. V_B	Statt der SI-Einheiten wurden die in der Fachliteratur gängigen Einheiten verwendet, welche auch für die Berechnungen eingesetzt werden müssen
h^{-1}	Bei den Größen ETR, EUR, RZA, v_i wird für die Zeiteinheit pro Stunde statt pro Sekunde (SI-Einheit) verwendet, da dieses der Geschwindigkeit von mikrobiellen Umsetzungen eher entspricht.
min^{-1}	Für die Rührerdrehzahl bzw. Schüttelgeschwindigkeit biotechnologischer Reaktoren ist die Angabe der Rührerdrehzahl bzw. der Schüttelfrequenz in Umdrehungen pro Minute statt der SI-Einheit pro Sekunde üblich.
Units	Für die Enzymaktivität wird die Einheit Units statt der SI-Einheit Katal verwendet. 1 Katal ist definiert als die Menge Enzym, die 1 Mol Edukt pro Sekunde unter Standardbedingungen (optimale Temperatur, optimaler pH und Edukt-Sättigung) umsetzt. Die Einheit Units wird dagegen für kommerzielle Enzyme verwendet. 1 Unit entspricht dabei 16.67×10^9 Katal.

Anhang A: Material und Methoden

Anhang A-I: Liste der verwendeten Geräte

Gerät / Materialien	Typ	Firma	Verwendung
Tragbares Dichtemessgerät	DMA 35n	Anton Paar	Dichtebestimmung
Digital Tensiometer	K10T		
Platin-Platte	PL21	Krüss	Oberflächen- bzw. Grenzflächenspannungs- bestimmung
Platin-Ring	RI22		
Ubbelohde Kapillarviskosimeter	Kapillare Nr. 1c		
ViscoSystem	AVS 310	Schott-Geräte	Bestimmung der kinematischen Viskosität
Durchsicht-Thermostat	CT 1650		
Analytische Waage Explorer (5 g – 832 kg)	E1M213	Ohaus	
Analytische Waage Explorer (10 mg – 8210 g)	E121245	Ohaus	Einwaage der Chemikalien, gravimetrische BTM- bestimmung
Analytische Waage (0.01/0.1 mg – 81/210 mg)	AG 285	Mettler-Toledo	
pH-Messgerät	Typ CG 843	Schott-Geräte	Messung des pH
Einstrahlphotometer	Genesys 20	Thermo Spectronics	Bestimmung der OD ₆₆₀
Trockenschrank		Binder	gravimetrische BTM- Bestimmung
Tischzentrifuge	Mikro 20	Hettich	
Tischzentrifuge (kühlbar)	Biofuge Stratos	Kendro-Heraeus	BTM-Bestimmung, Probenaufbereitung, Vorbereitung der Zellen
Standzentrifuge	Rotixa 50 RS	Hettich	
Standard Probengeber			
Quartenäre Pumpe	Serie 1100		
Vakuumentgaser		Agilent	
ChemStation Auswertesoftware	Rev. A.08.03		
Analytische Säule	Aminex HPX-87H	Bio-Rad	HPLC-Analytik
Säulenofen	S4110	Sykam	
UV-Vis-Detektor	SPD-6A	Shimadzu	
RI-Detektor	A0298	Knauer	
Blutzuckermessgerät	AccuTrend®		
Sensorstäbchen	Accu-Chek® Comfort	Roche	Glukose-Bestimmung

Anhang A-I

Gerät	Typ	Firma	Verwendung
Mikrotiterplattenphotometer	Fluostar Galaxy	BMG Labtechnologies	Enzymatische Tests, Enzymaktivitätsbestimmung, Bestimmung der Membranintegrität
Merckoquant®-Teststäbchen	1.10011.0001 1.10081.0001	VWR (Merck)	Peroxid-Test
Schwingmühle	MM200	Retsch	
Glasperlen	0.18-0.2 mm Durchmesser	B.Braun Biotech	Zellaufschluss
Thermomixer Comfort		Eppendorf	Zellaufschluss, Biotransformationen
Mehrfachrührplatte	Variomag Poly 15	H + P	parallele Biotransformationen

Anhang A-II: Liste der verwendeten Chemikalien**Pufferlösungen (Biotransformationen und Zellaufschluss)**

Chemikalie		Reinheitsgrad	Firma	Produktnummer
di-Kaliumhydrogenphosphat	K_2HPO_4	p.a.	VWR (Merck)	105104
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	p.a., ISO	VWR (Merck)	104871
Zitronensäure-Monohydrat	$C_6H_8O_4 \cdot H_2O$	p.a., ACS, ISO, $\geq 99.5\%$	Roth	5110
di-Natriumhydrogenphosphat	NaH_2PO_4	p.a.	VWR (Merck)	106586
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	p.a.	VWR (Merck)	105833

HPLC-Standards und -Analytik

Chemikalie		Reinheitsgrad	Firma	Produktnummer
Schwefelsäure	H_2SO_4	30%	VWR (Merck)	100731
D-Glukose Monohydrat	$C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$	für die Mikrobiologie	VWR (Merck)	108342
L-(+)-Milchsäure Lithiumsalz	$C_3H_5LiO_3$	p.s., >98%	VWR (Merck)	822084
Essigsäure	CH_3COOH	p.a., 100%	VWR (Merck)	100063
Ethanol	C_2H_5OH	p.a., >99.8%	Roth	3050
Aceton	C_3H_6O	p.s., $\geq 99\%$	VWR (Merck)	822251
2-Propanol	C_3H_8O	p.s., $\geq 99\%$	VWR (Merck)	818766

Edukte und Produkte, Cosubstrate, Lösungsmittel, GC-Analytik

Chemikalie		Reinheitsgrad	Firma	Produktnummer
Acetophenon	C_8H_8O	p.s., >98%	VWR (Merck)	800028
4'-Chloracetophenon	C_8H_7ClO	p.s., >98%	VWR (Merck)	802605
1-(4-Chlorphenyl)-ethanol	C_8H_9ClO	p.s., >97%	VWR (Merck)	814834
Trifluoressigsäureanhydrid	$C_4F_6O_3$	p.a., >99%	Fluka Chemika	91719
Pyridin	C_5H_5N	p.a., >99.8%	Fluka Chemika	82702
Kaliumcarbonat	K_2CO_3	reinst	VWR (Merck)	104924
Ethylacetat	$CH_3CO_2CH_2CH_3$	p.a., >99.8%	neoLaB	4405
Ethyl-4-Cl-Acetoacetat	$C_6H_9ClO_3$	p.s., >98%	VWR (Merck)	818711
Ethyl-(R)-(+)-4-Chlor-3-Hydroxybutyrat		97%	Aldrich	46,051-6

Anhang A-II

Chemikalie		Reinheitsgrad	Firma	Produktnummer
Ethyl-(S)-(+)-4-Chlor-3-Hydroxybutyrat		97%	Aldrich	46,052-4
D-Glukose Monohydrat	$C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$	für die Mikrobiologie	VWR (Merck)	108342
4-Hydroxy-4-Methyl-2-Pentanon	$C_6H_{12}O_2$	p.s.	VWR (Merck)	804512
2-Propanol	C_3H_8O	p.s., $\geq 99\%$	VWR (Merck)	818766
1,4-Butandiol	$C_4H_{10}O_2$	p.s., $>99\%$	VWR (Merck)	801532
2-Butanol	$C_4H_{10}O$	p.a., $>99.5\%$	VWR (Merck)	109630
<i>tert</i> -Butanol	$(CH_3)_3COH$	p.a., $>99.5\%$	VWR (Merck)	109629
Triton X-100	---	p.a.	VWR (Merck)	108603
n-Propanol	C_3H_8O	p.a.	VWR (Merck)	100997
n-Butanol	$C_4H_{10}O$	p.a.	VWR (Merck)	101990
Diethylether	$(C_2H_5)_2O$	p.a., $>99.5\%$	VWR (Merck)	100921
Toluen	C_7H_8	p.a.	VWR (Merck)	108325
Butyl-Acetat	$CH_3COO(CH_2)_3CH_3$	p.a., $>99.5\%$	VWR (Merck)	109652
Dimethylsulfoxid	$C_2H_6O_5$	p.s.	VWR (Merck)	802912

Edukte und Produkte für die GC-Analytik der DHHB-Synthese

Chemikalie	Reinheitsgrad	Firma
6-Cl-3,5-Dioxohexansäure- <i>tert</i> -Butylester	80%	
6-Cl-5-(<i>R</i>)-Hydroxy-3-Oxohexansäure- <i>tert</i> -Butylester	$> 99\%$	FZ Jülich (AG Bioorganik)
6-Cl-(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-Dihydroxyhexansäure- <i>tert</i> -Butylester	$> 99\%$	Jülich Fine Chemicals
6-Cl-(3 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-Dihydroxyhexansäure- <i>tert</i> -Butylester	$> 99\%$	

Lactobacillus kefir-Herstellung

Chemikalie		Reinheitsgrad	Firma	Produktnummer
Clerol FAB 256	---	---	Cognis	---
Clerol FAB 3107	---	---	Cognis	---
D-Glukose Monohydrat	$C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$	für die Mikrobiologie	VWR (Merck)	108342
di-Ammoniumhydrogencitrat	$C_6H_{14}N_2O_7$	reinst	VWR (Merck)	101155
di-Kaliumhydrogenphosphat	K_2HPO_4	p.a.	VWR (Merck)	105104
Glycerin	$C_3H_8O_3$	87%	VWR (Merck)	104091

Anhang A-II

Chemikalie		Reinheitsgrad	Firma	Produktnummer
Hefeextrakt	---	für biologische Zwecke	VWR (Merck)	2363
Hefeextrakt (OHLY-KAT)	---	technisch	Deutsche Hefewerke	Charge 253-3
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	MgSO ₄ *7H ₂ O	p.a.	VWR (Merck)	105886
Mangansulfat-Monohydrat	MnSO ₄ *H ₂ O	p.a., ACS	VWR (Merck)	105941
Natriumacetat	CH ₃ COONa	Fractopur®	VWR (Merck)	116100
Natriumhydroxid	NaOH	≥99%	Roth	9356
Tween® 80	Polysorbat	Ph Eur, NF	VWR (Merck)	817061

Sonstige Chemikalien

Chemikalie		Reinheitsgrad	Firma	Produktnummer
Natriumchlorid	NaCl	p.a., ACS, ISO	VWR (Merck)	106404
NADPH		Tetrasodiumsalz, 98%	Calbiochem	481973
Natriumhydroxid	NaOH	p.a., ISO	VWR (Merck)	106498
Wasserstoffperoxid	H ₂ O ₂	30%	Sigma	H1009

Anhang A-III: Zusammensetzung der verwendeten Umsetzungspuffer
Kalium-Phosphat-Puffer

Molarität	pH	K ₂ HPO ₄ [g L ⁻¹]	KH ₂ PO ₄ [g L ⁻¹]
0.1	6.5	5.7	9.2
	7.5	14.6	2.2
0.2	6.5	16.2	14.5
0.5	6.5	37.9	38.5
0.6	6.5	48.7	43.6
0.8	6.5	63.8	59.0
1	6.5	81.2	72.7
2	6.5	162.3	145.3

Citrat-Phosphat-Puffer

Molarität	pH	C ₆ H ₈ O ₄ *H ₂ O [g L ⁻¹]	NaH ₂ PO ₄ [g L ⁻¹]
0.2 M	4.0	13.2	10.5
	4.5	11.9	12.2
	5.0	10.7	14.0
	5.5	9.3	15.8
	6.0	8.0	17.6
	6.5	6.5	19.7
0.6 M	6.5	19.5	59.1
1 M	6.5	32.5	98.5
2 M	6.5	65	197

Anhang A-IV: Pipettierschemata der enzymatischen Tests im Mikrotiterplattenformat

Glukose

Vorverdünnung der Lösungen:

Lösung 1 (Triethanolamin-Puffer, NADP, ATP, MgSO ₄)	unverdünnt
Suspension 2 (Hexokinase und Glukose-6-P-DH)	1:20 (mit Lösung 1)

Zu pipettierende Volumina:

Lösung 1: 50 µL; VE-H₂O: 60 µL; Probe: 20 µL; Suspension 2: 20 µL

L-Milchsäure

Vorverdünnung der Lösungen:

Lösung 1 (Glycylglycin-Puffer, L-Glutaminsäure)	unverdünnt
Lösung 2 (NAD)	unverdünnt
Suspension 3 (Glutamat-Pyruvat-Transaminase)	1:10 (mit Lösung 1)
Lösung 4 (D-Lactat-Dehydrogenase)	nicht verwendet
Lösung 5 (L-Lactat-Dehydrogenase)	1:10 (mit Lösung 1)

Zu pipettierende Volumina:

Lösung 1: 65 µL; Lösung 2: 20 µL; Suspension 3: 20 µL; Probe: 100 µL; VE-H₂O: - (für die Blindprobe 100 µL); Lösung 4: 20 µL

Acetat

Vorverdünnung der Lösungen:

Lösung 1 (Triethanolamin-Puffer, L-Malat, MgCl ₂)	unverdünnt
Lösung 2 (ATP, CoA, NAD)	unverdünnt
Suspension 3 (L-Malat-Dehydrogenase, Citrat-Synthase)	1:50
Lösung 4 (Acetyl-CoA-Synthetase)	1:25

Zu pipettierende Volumina:

Lösung 1: 100 µL; Lösung 2: 20 µL; Probe: 20 µL; VE-H₂O: 75 µL;

Suspension 3: 50 µL; Lösung 4: 50 µL

Ethanol

Vorverdünnung der Lösungen:

Reaktionsgemisch 2 (Kaliumdiphosphat-Puffer, NAD, Aldehyd-Dehydrogenase)	unverdünnt
Suspension 3 (ADH)	1:8 (mit Reaktionsgemisch 2)

Zu pipettierende Volumina:

Reaktionsgemisch 2: 140 μL ; VE-H₂O: - (für die Blindprobe 20 μL); Probe: 20 μL ;
Suspension 3: 20 μL

Anhang A-V: Allgemeine Spezifikationen und Einstellungen der GC-Analytik

Spezifikationen der verwendeten Trennsäulen:

Säule	Hersteller	Länge	ID	Filmdicke
CP-Sil 8CB-MS Chrompack	Varian	30 m	0.32 mm	1 µm
BGB-174	BGB-Analytik	30 m	0.25 mm	0.25 µm
ChiralDEX-GTA	Astech	20 m	0.25 mm	k.A.
Vorsäule	SGE	12 m	0.53 mm	---

Spezifikationen des CP-3800 (Varian) und des Probengebers :

Gaschromatograph

Injektor	: 1079 PTV (temperaturprogrammierbar)
Splitregelung	: Elektronische Flusskontrolle (EFC)
Detektor	: FID
Trägergas	: Helium
Brenngas	: Luft und Wasserstoff
Make-up Gas	: Helium

Probengeber (CombiPal, Fa. CTC Analytics)

Waschgänge vor der Injektion	: 2 x Ethylacetat, 1 x Probe (jeweils 10 µL)
Füllstöße	: 3
Viskositätsverzögerung	: 3 Sekunden
Injektionsgeschwindigkeit	: 100 µL s ⁻¹
Verweilzeit der Spritze im Injektor	: 25 Sekunden
Waschgänge nach der Injektion	: 2 x Ethylacetat (jeweils 10 µL)

Verwendete Gase:

Gas	Reinheit	Hersteller
Helium	99.999% v/v	Messer-Griesheim
Wasserstoff	99.999% v/v	Messer-Griesheim
Luft	vorgefilterte Luft	Hausleitung

Retentionszeiten für die Analytik 4.3.11 (achirale Bestimmung):

Acetophenon	: 6.33 min
HOHB	: 14.34 min
DOHTB	: 15.50 min
Furanon	: 15.58 min
DHHB	: 19.13 min

Retentionszeiten für die Analytik 4.3.11 (Bestimmung des de):

<i>syn</i> -(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-DHHB	: 22.45 min
<i>anti</i> -(3 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-DHHB	: 22.63 min

Retentionszeiten für die Analytik 4.3.12 (achirale Bestimmung):

Acetophenon	: 7.76 min
4-Cl-ACE	: 8.59 min
CHBE (Racemat)	: 9.37 min

Retentionszeiten für die Analytik 4.3.12 (chirale Bestimmung):

Acetophenon	: 6.829 min
4-Cl-ACE	: 9.300 min
S-CHBE	: 9.734 min
R-CHBE	: 10.124 min

Retentionszeiten für die Analytik 4.3.13 (chirale Bestimmung):

Acetophenon	: 9.58 min
4-Cl-AP	: 20.61 min
1-R-4-Cl-PE	: 25.91 min
1-S-4-Cl-PE	: 26.28 min

Anhang A-VI: Spezifikationen der Komponenten des Laborfermentersystems Labfors® (Fa. INFORS)

Sonden:

pH-Sonde (autoklavierbar)	: Mettler-Toledo 405-DPAS-SC-K8S/325
pO ₂ -Sonde (autoklavierbar)	: Mettler-Toledo InPro 6000
Antischaum-Sonde	: Infors, Typ Russel

Abgasanalytik (Fa. ABB): ABB Automation Serie

Gasanalysator	: Exhaust Gas Analyzer Easy Line IR
Messgasfördereinheit	: Sample Gas Delivery Unit Advance SCC-F
Messgaskühler	: Sample Gas Cooler Advance SCC-C

Waagen (Fa. Sartorius):

Waage für den Reaktor	: Sartorius QC35EDE-S
Waage für Zudosierungsoption	: Sartorius IP65

Externe Pumpen (Fa. Ismatec)

Peristaltische Pumpe	: BVP Standard
Pumpenkopf	: Easy-Load MF 0313/738

**Anhang A-VII: Spezifikationen der Komponenten des Fermentersystems
Techfors® (Fa. INFORS) und der Filtrationseinheit**

Sonden:

pH-Sonde (autoklavierbar)	: Mettler-Toledo 405-DPAS-SC-K8S/325
pO ₂ -Sonde (autoklavierbar)	: Mettler-Toledo InPro 6000
Antischaum-Sonde	: Infors, Typ Russel
Druck-Sonde	: Kessler Druckmesstechnik, PR-25HT/8931A

Abgasanalytik (Fa. ABB): ABB Automation Serie

Gasanalysator	: Exhaust Gas Analyzer Easy Line IR
Messgasfördereinheit	: Sample Gas Delivery Unit Advance SCC-F
Messgaskühler	: Sample Gas Cooler Advance SCC-C

Waagen:

Waage für Titrationsmittel	: Sartorius F61S
Waage für Zudosierungsoption	: Ohaus CD-11

Externe Pumpen (Fa. Ismatec)

Peristaltische Pumpe	: Ecoline VC
----------------------	--------------

Kennlinie für das Zulaufmedium:

Dichte	: 1174 g L ⁻¹
Pumpenschlauch	: Marprene2-Schlauch (Fa. Watson-Marlow), Ø _{innen} = 1.6 mm, Wandstärke 1.6 mm

$$\text{Zulauf [g h}^{-1}\text{]} = 104.2 * \% \text{-P-Pumpe}$$

Reindampfgenerator	: Fa. Stritzel, PS100
---------------------------	-----------------------

Filtrationseinheit:

Filtermodul	: UFP-500-E-65MSM, Fa. Schleicher & Schuell
Kreiskolbenpumpe	: JEC 225-052-08, Fa. Flowtech Pumpen JEB
Drucksensor	: Kessler Druckmesstechnik, PR-25HT/8931A

Anhang A-VIII: Spezifikationen des Profors/fedbatch-pro Systems

PROFORS-System (Fa. Infors):

Inkubationsschrank	: Infors
Durchflussmesser	: Vögtlin, Typ V100-80.09 (0-65 NL h ⁻¹)

Dosierstrecken:

pH-Verstärker	: Dasgip
Kolbenpumpen 1	: Metrohm, Dosimat 765 (5 mL Bürette)
Kolbenpumpen 2	: Metrohm, Dosimat 665 (20 mL Bürette)
Multiventilmodul 1	: Dasgip, mit Teflonmembranventilen
Multiventilmodul 2	: Dasgip, mit Schlauchquetschventilen

Sonden:

pH-Sonde (autoklavierbar)	: Mettler-Toledo 405-DPAS-SC-K8S/120
pO ₂ -Sonde (autoklavierbar)	: Mettler-Toledo InPro6100/120

Andere verwendete Komponenten:

Mehrstelliger Magnetrührer	: H+P Labortechnik, POLY 15
Mehrkanalkassettenpumpe	: Watson-Marlow, 205 U
Pumpenschlauch	: Ismatec, Tygon MH 2075, $\varnothing_{\text{innen}}$ 0.38 mm

Anhang A-IX: Leistungseintragsverläufe für die gerührte Blasensäule und den KLF 2000

Leistungseintrag für die gerührte Blasensäule (siehe Kapitel 4.5.3)

Die Messungen des Leistungseintrags für die gerührte Blasensäule wurden für Wasser mit $0.5 \text{ Na}_2\text{SO}_4$, einem Füllvolumen von 200 mL und ohne Begasung des Systems durchgeführt. Der Leistungseintrag wurde potentiometrisch bestimmt. Als Leerleistung wurde die Leistungsaufnahme mit einer minimalen Menge an Wasser als Gleitschicht gemessen.

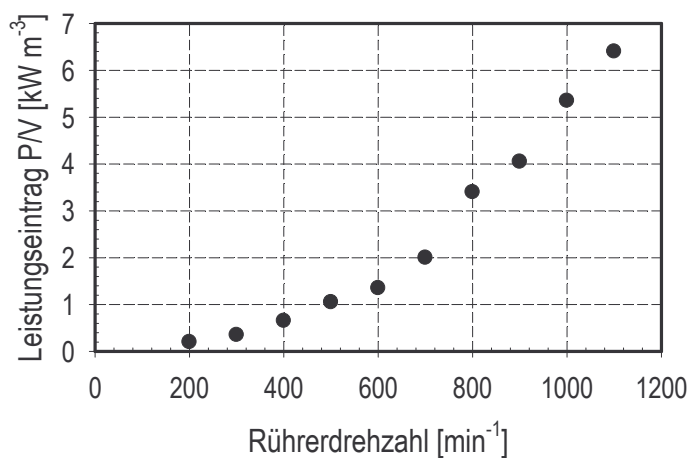


Abb. IX-1 Leistungseintragsverlauf in Abhängigkeit von der Drehzahl für die gerührte Blasensäule ($V_R = 200 \text{ mL}$, ohne Begasung)

Leistungseintrag für den KLF 2000

Die Berechnung des Leistungseintrags [W m^{-3}] für den Rührkesselreaktor KLF 2000 wurde nach der ermittelten Korrelation nach Hünnekes (1994) ohne Berücksichtigung der Begasung durchgeführt:

$$\frac{P}{V} = 0.54 \cdot \text{Re}^{1.07} \cdot \text{Fr}^{-0.007} \cdot \left(\frac{\rho \cdot d_R^5 \cdot n^3}{V} \right) \quad (1)$$

Dazu wurden folgende Stoff- bzw. Systemdaten verwendet:

$$\begin{aligned} d_R &= 40 \text{ mm} \\ \rho_{\text{H}_2\text{O},30^\circ\text{C}} &= 995.6 \text{ kg m}^{-3} \\ \eta_{\text{H}_2\text{O},30^\circ\text{C}} &= 0.8 \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1} \end{aligned}$$

Die Stoffdaten von Wasser stammen aus dem VDI-Wärmeatlas (7.Auflage, 1997)

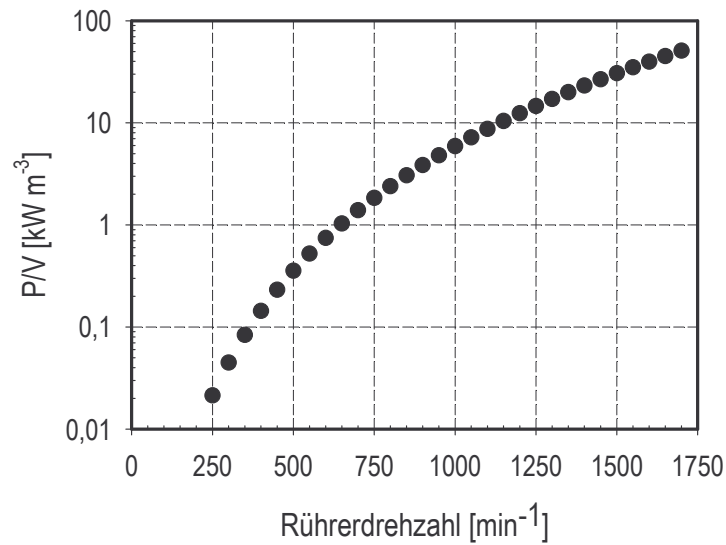


Abb. IX-2 Leistungseintragsverlauf in Abhängigkeit von der Drehzahl für den KLF ($V_R = 1.7 \text{ L}$, ohne Begasung)

N [min ⁻¹]	Re	Fr	P/V [kW m ⁻³]
250	8,3	47	0,021
300	10,0	68	0,045
350	11,7	93	0,084
400	13,3	121	0,144
450	15,0	153	0,232
500	16,7	189	0,356
550	18,3	229	0,524
600	20,0	272	0,746
650	21,7	320	1,032
700	23,3	371	1,393
750	25,0	426	1,843
800	26,6	484	2,395
850	28,3	547	3,062
900	30,0	613	3,861
950	31,6	683	4,808
1000	33,3	756	5,920
1050	35,0	834	7,215
1100	36,6	915	8,714
1150	38,3	1000	10,435
1200	40,0	1089	12,401
1250	41,6	1182	14,635
1300	43,3	1278	17,158
1350	45,0	1379	19,996
1400	46,6	1483	23,174

Anhang A-IX

N [min-1]	Re	Fr	P/V [kW m⁻³]
1450	48,3	1590	26,719
1500	50,0	1702	30,658
1550	51,6	1817	35,019
1600	53,3	1937	39,831
1650	55,0	2060	45,126
1700	56,6	2186	50,935

Anhang A-X: Spezifikationen des Laborrührkesselreaktors KLF 2000

Sonden:

pH-Sonde (autoklavierbar)	: Mettler-Toledo 405-DPAS-SC-K8S/325
pO ₂ -Sonde (autoklavierbar)	: Ingold 322756702 5187030
Antischaum-Sonde	: Bioengineering, 30275.1

Abgasanalytik (Fa. ABB): ABB Automation Serie

Gasanalysator	: Exhaust Gas Analyzer Easy Line IR
Messgasfördereinheit	: Sample Gas Delivery Unit Advance SCC-F
Messgaskühler	: Sample Gas Cooler Advance SCC-C

Externe Pumpen (Fa. Ismatec)

Peristaltische Pumpe Säure	: Watson-Marlow, 501 U (max. 50 rpm)
Peristaltische Pumpe Lauge	: Watson-Marlow, 501 U (max. 50 rpm)
Peristaltische Pumpe Zulauf (Edukt)	: Watson-Marlow, 205 U

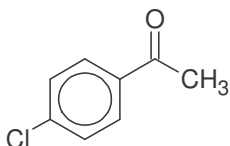
Andere verwendete Komponenten:

Pumpenschlauch	: Ismatec, Tygon MH 2075, $\varnothing_{\text{innen}}$ 0.38 mm
PCI-Karte für Messwerterfassung	: National Instruments PCI 6024E

Anhang B: Ergebnisse

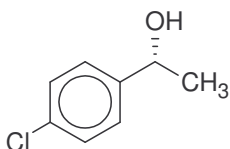
Anhang B-I: Zusammenfassung der physikalischen Stoffdaten

Stoffdaten für 4-Chloracetophenon (CAS 99-91-2)

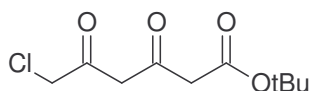


				Quelle
Molekulargewicht		154.6	[g mol ⁻¹]	ACD/I-Lab
Dichte (30°C)	ρ	1.18	[g cm ⁻³]	experimentell
Kinematische Viskosität (30°C)	ν	2.29 · 10 ⁻⁶	[m ² s ⁻¹]	experimentell
Dynamische Viskosität (30°C)	η	2.73	[mPa s]	kalkuliert aus ν
Oberflächenspannung (30°C)	σ_0	14.5	[mN m ⁻¹]	experimentell
Grenzflächenspannung (4-Cl-AP/KPi-Puffer, 30°C)	σ	24.4 ^k	[mN m ⁻¹]	kalkuliert
Molares Volumen	V	132.9 ± 3	[cm ³ mol ⁻¹]	ACD/I-Lab
Parachor		328.3 ± 4	[cm ³]	ACD/I-Lab
Löslichkeit in H ₂ O (30°C, pH 6.5)		1.2	[g L ⁻¹]	experimentell
Siedepunkt		230-232	[°C]	ACD/I-Lab
log P (o/w)		2,6	[-]	ACD/I-Lab

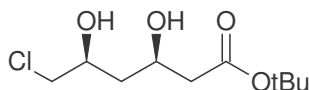
Stoffdaten für 1-(4-Chlorphenyl)-Ethanol (CAS 3391-10-4)



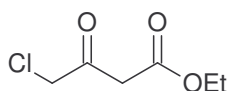
				Quelle
Molekulargewicht		156.6	[g mol ⁻¹]	ACD/I-Lab
Dichte (20°C)	ρ	1.17	[g cm ⁻³]	ACD/I-Lab
Löslichkeit in H ₂ O (25°C, pH 6.0)		1.42	[g L ⁻¹]	ACD/I-Lab
Siedepunkt		80-82	[°C]	ACD/I-Lab

Stoffdaten für 6-Cl-3,5-Dioxohexansäure-tert-Butylester (80% Reinheit)

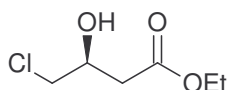
				Quelle
Molekulargewicht		234.68	[g mol ⁻¹]	ACD/I-Lab
Dichte (30°C)	ρ	1.157 ± 0.06	[g cm ⁻³]	experimentell
Kinematische Viskosität (30°C)	ν	2.3	[m ² s ⁻¹]	experimentell
Dynamische Viskosität (30°C)	η	56.1	[mPa s]	kalkuliert aus ν
Oberflächenspannung (30°C)	σ_0	24.5	[mN m ⁻¹]	experimentell
Grenzflächenspannung (Dioxoh./H ₂ O, 30°C)	σ	12.7	[mN m ⁻¹]	kalkuliert
Molares Volumen	V	202.7 ± 3	[cm ³ mol ⁻¹]	ACD/I-Lab
Parachor		498.3 ± 4	[cm ³]	ACD/I-Lab
Löslichkeit in H ₂ O (25°C, pH 6.0)		0.13	[g L ⁻¹]	ACD/I-Lab
Siedepunkt		313.3 ± 22	[°C]	ACD/I-Lab
log P (o/w)		3.39 ± 0.54	[-]	ACD/I-Lab

Stoffdaten für 6-Cl-(3R,5S)-Dihydroxyhexansäure-tert-Butylester

				Quelle
Molekulargewicht		238.7	[g mol ⁻¹]	ACD/I-Lab
Dichte (25°C)	ρ	1.17 ± 0.06	[g cm ⁻³]	ACD/I-Lab
Löslichkeit in H ₂ O (25°C, pH 6.0)		6.9	[g L ⁻¹]	ACD/I-Lab

Stoffdaten für Ethyl-4-Chloracetoacetat (CAS 638-07-3)

				Quelle
Molekulargewicht		164.6	[g mol ⁻¹]	ACD/I-Lab
Dichte (30°C)	ρ	1.21	[g cm ⁻³]	Datenblatt
Dynamische Viskosität (20°C)	η	4.72	[mPa s]	Datenblatt
Kinematische Viskosität (20°C)	ν	3.9 · 10 ⁻⁶	[m ² s ⁻¹]	kalkuliert aus η
Oberflächenspannung (20°C)	σ_0	34.8 ± 3	[mN m ⁻¹]	ACD/I-Lab
Grenzflächenspannung (4-Cl-ACE/H ₂ O, 20°C)	σ	6.4	[mN m ⁻¹]	kalkuliert
Molares Volumen	V	140.3 ± 3	[cm ³ mol ⁻¹]	ACD/I-Lab
Parachor		348.1 ± 4	[cm ³]	ACD/I-Lab
Löslichkeit in H ₂ O (30°C, pH 6.5)		47	[g L ⁻¹]	Datenblatt
Siedepunkt		220	[°C]	Datenblatt
log P (o/w)		0.05	[-]	Datenblatt

Stoffdaten für 4-Chlor-3-(S)-Hydroxybuttersäure-Ethylester (CAS 86728-85-0)

				Quelle
Molekulargewicht		166.6	[g mol ⁻¹]	ACD/I-Lab
Dichte (20°C)	ρ	1.19	[g cm ⁻³]	Datenblatt
Löslichkeit in H ₂ O (25°C, pH 0 - 9.0)		125.4	[g L ⁻¹]	ACD/I-Lab
Siedepunkt		93-95	[°C]	Datenblatt

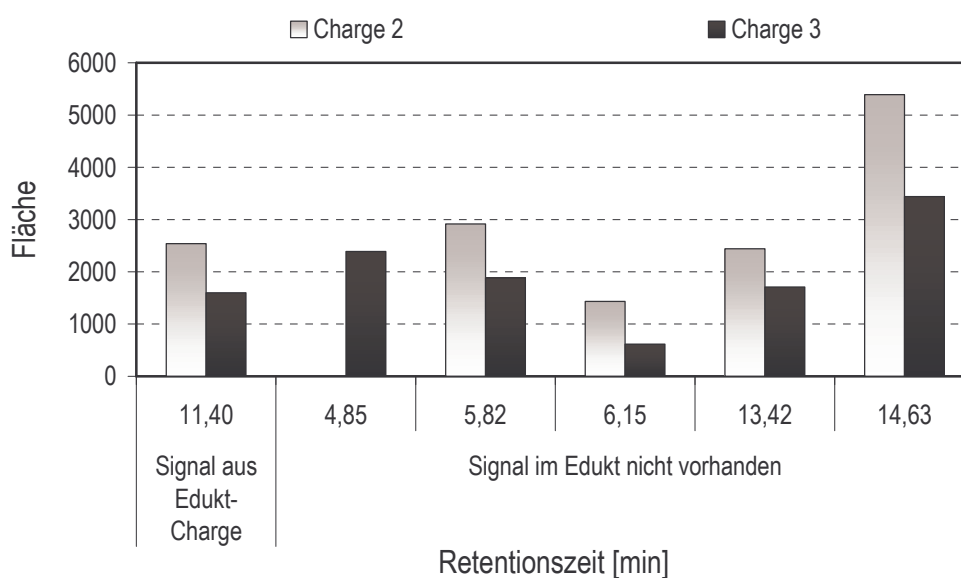
Anhang B-II: Auflistung der Reaktorkultivierungen von *L. kefir*

Kultivierung	Maßstab	pH	pO ₂ [%]	OTRmittel [mmol L ⁻¹ h ⁻¹]	Glk-/Hefe- Zud.	BTM [g L ⁻¹]	Y _{X,S} [-]	EA _{spez} [U g ⁻¹]	EA _{vol} [U L ⁻¹]
1	5 L	6.0	0 (ungeregelt)	1.2	+ / - (exponentiell)	3.68	0.036	1387	5104
2	5 L	6.0	0 - 3 (geregelt)	4.6	+ / + (linear)	14.2	0.057	850	11900
3	5 L	6.0	0 - 3 (geregelt)	10.2	+ / - (exponentiell)	15.76	0.170	172	2710
4	150 L	6.0	0 - 3 (geregelt)	14.5	+ / + (linear)	14.7	0.06	119	1749
5	150 L	6.0	0 - 3 (geregelt)	7.6	+ / + (linear)	10.8	0.05	844	9115

Anhang B-III: Zusammenstellung der verwendeten DOHTB-Chargen

Bezeichnung	Synthese	Einsatz in Versuchen aus Kapitel
Charge 1	FZ Jülich / AG Bioorganik	5.3.2, 5.3.3, 5.3.6
Charge 2	FZ Jülich / AG Bioorganik	5.3.4, 5.3.5, 5.3.6
Charge 3	Jülich Fine Chemicals	5.3.4, 5.3.5, 5.3.6

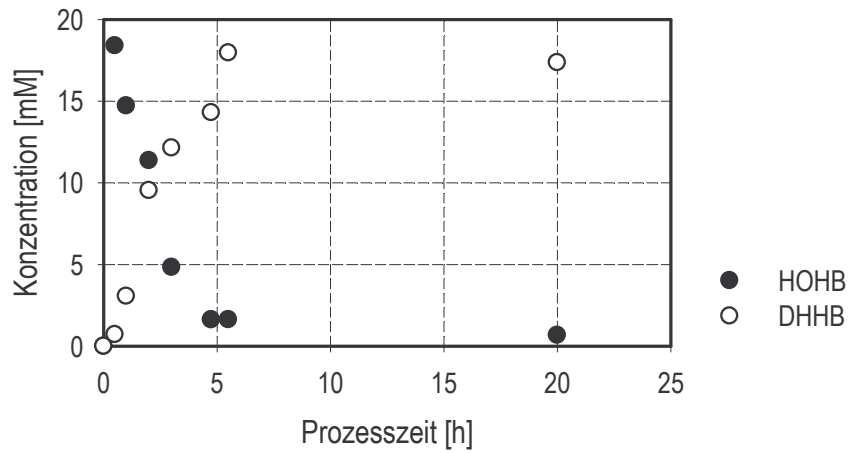
Vergleich der Zusammensetzung der unbekannt Nebenprodukte (siehe Kapitel 5.3.5)



50 mM DOHTB (12.6 mmol L⁻¹ h⁻¹ über 4 h), 100 mM Glukose, 0.2 M KPi-Puffer, pH 6.5, 22°C, 24 h, Stickstoff überlagert

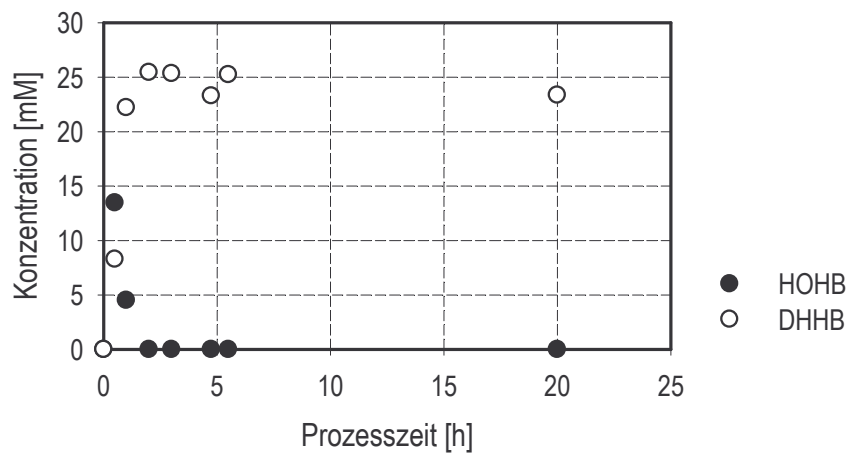
Anhang B-IV: Exemplarische Konzentrationsverläufe der Biotransformationen zur DHHB-Synthese

Prozess I: Batch – CP-Puffer, 22°C

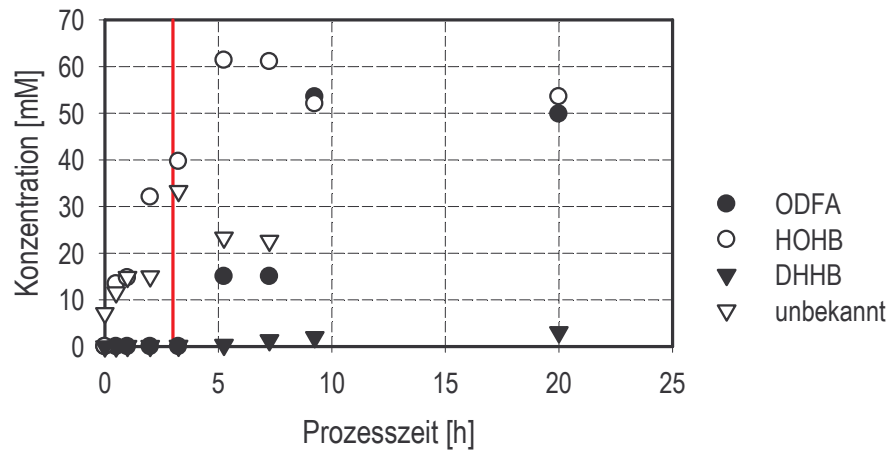


DOHTB-Gesamtkonz. : 25 mM
 Glukose : 50 mM
 Puffer : 0.2 M CP-Puffer, pH 6.5
 Temperatur : 22°C
 DOHTB-Charge : Charge 1
 Erreichte DHHB-Konz. : 17.4 mM (nach 5.5 h)

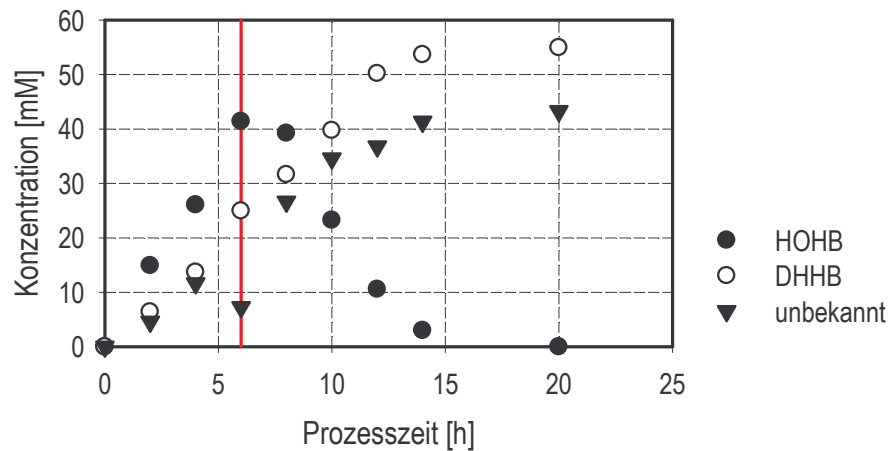
Prozess II: Batch – KPi-Puffer, 22°C



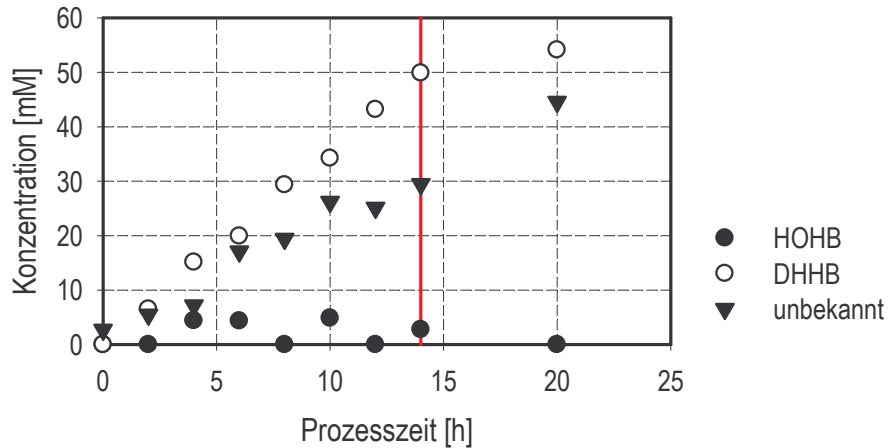
DOHTB-Gesamtkonz. : 25 mM
 Glukose : 50 mM
 Puffer : 0.2 M KPi-Puffer, pH 6.5
 Temperatur : 22°C
 DOHTB-Charge : Charge 1
 Erreichte DHHB-Konz. : 25 mM (nach 5.5 h)

Prozess III: Intermittierend, CP-Puffer, 4 x 25 mM / h

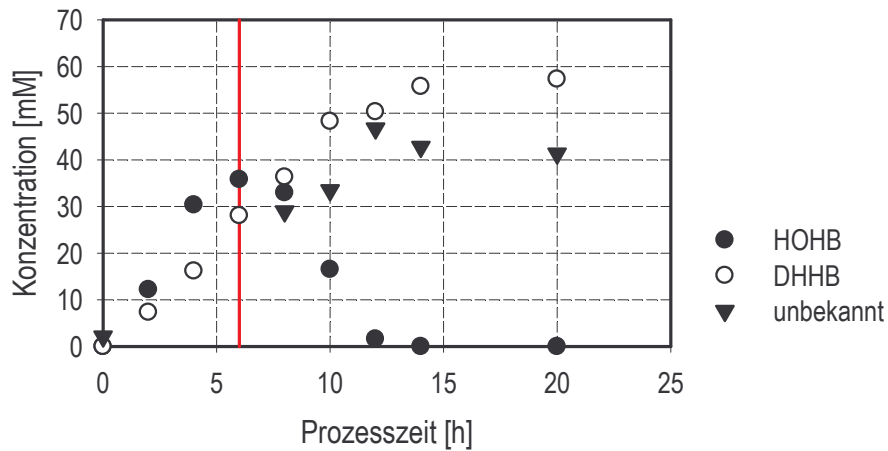
DOHTB-Gesamtkonz. : 100 mM
 Glukose : 200 mM (4 x 50 mM / h)
 Puffer : 0.2 M CP-Puffer, pH 6.5
 Temperatur : 22°C
 Begasung : Stickstoff überlagert
 DOHTB-Charge : Charge 1
 Erreichte DHHB-Konz. : 3.05 mM (nach 20 h)

Prozess IV: Intermittierend, CP-Puffer, 4 x 25 mM / 2 h

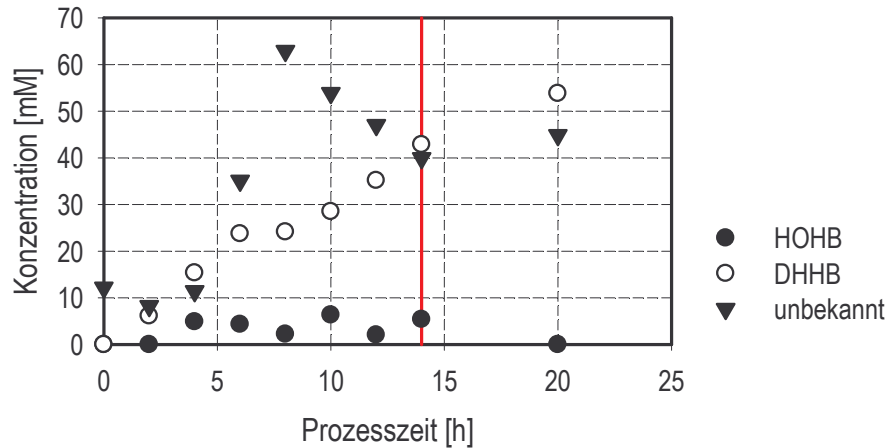
DOHTB-Gesamtkonz. : 100 mM
 Glukose : 200 mM (4 x 50 mM / 2h)
 Puffer : 0.2 M CP-Puffer, pH 6.5
 Temperatur : 22°C
 Begasung : Stickstoff überlagert
 DOHTB-Charge : Charge 1
 Erreichte DHHB-Konz. : 53.7 mM (nach 14 h)

Prozess V: Intermittierend, CP-Puffer, 8 x 12.5 mM / 2 h

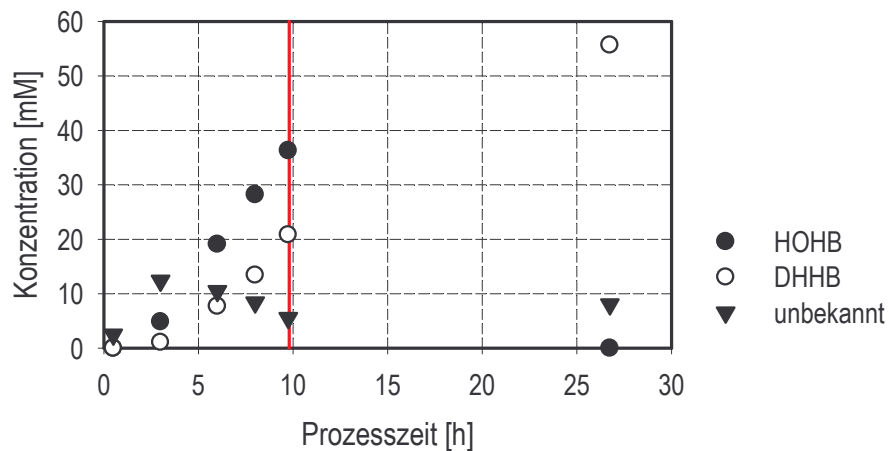
DOHTB-Gesamtkonz. : 100 mM
 Glukose : 200 mM (4 x 50 mM / 2h)
 Puffer : 0.2 M CP-Puffer, pH 6.5
 Temperatur : 22°C
 Begasung : Stickstoff überlagert
 DOHTB-Charge : Charge 1
 Erreichte DHHB-Konz. : 54 mM (nach 20 h)

Prozess VI: Intermittierend, KPi-Puffer, 4 x 25 mM / 2 h

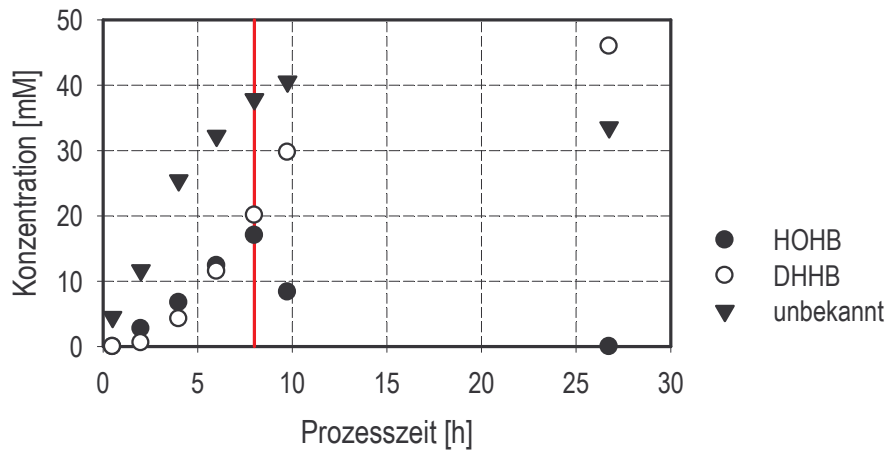
DOHTB-Gesamtkonz. : 100 mM
 Glukose : 200 mM (4 x 50 mM / 2h)
 Puffer : 0.2 M KPi-Puffer, pH 6.5
 Temperatur : 22°C
 Begasung : Stickstoff überlagert
 DOHTB-Charge : Charge 1
 Erreichte DHHB-Konz. : 55.7 mM (nach 14 h)

Prozess VII: Intermittierend, KPi-Puffer, 8 x 12.5 mM / 2 h

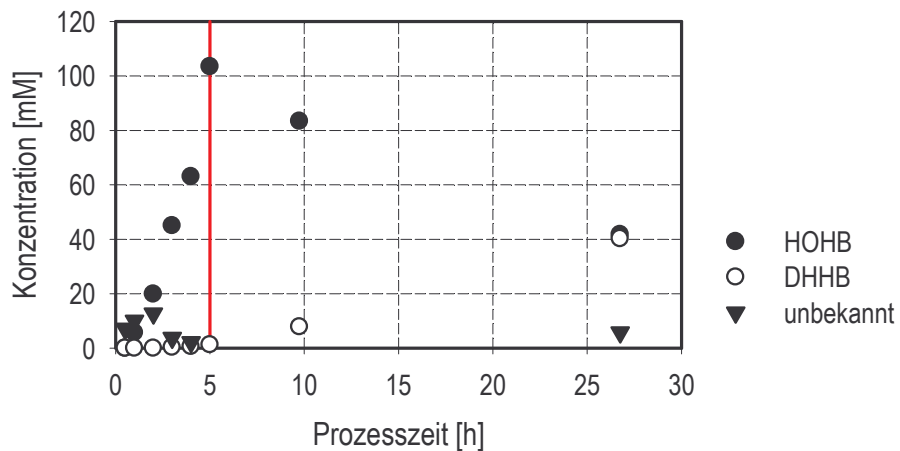
DOHTB-Gesamtkonz. : 100 mM
 Glukose : 200 mM (8 x 25 mM / 2h)
 Puffer : 0.2 M KPi-Puffer, pH 6.5
 Temperatur : 22°C
 Begasung : Stickstoff überlagert
 DOHTB-Charge : Charge 1
 Erreichte DHHB-Konz. : 53.8 mM (nach 20 h)

Prozess VIII: Linear, 6.7 mmol L⁻¹ h⁻¹ x 9.75 h

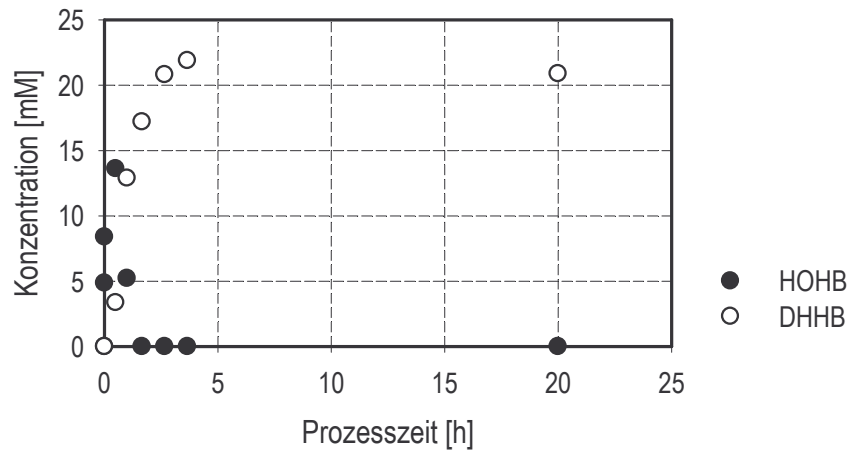
DOHTB-Gesamtkonz. : 65.5 mM
 Glukose : 200 mM
 Puffer : 0.2 M KPi-Puffer, pH 6.5
 Temperatur : 22°C
 Begasung : Stickstoff überlagert
 DOHTB-Charge : Charge 3
 Erreichte DHHB-Konz. : 55.67 mM (nach 26.75 h)

Prozess IX: Linear, 10 mmol L⁻¹ h⁻¹ x 8 h

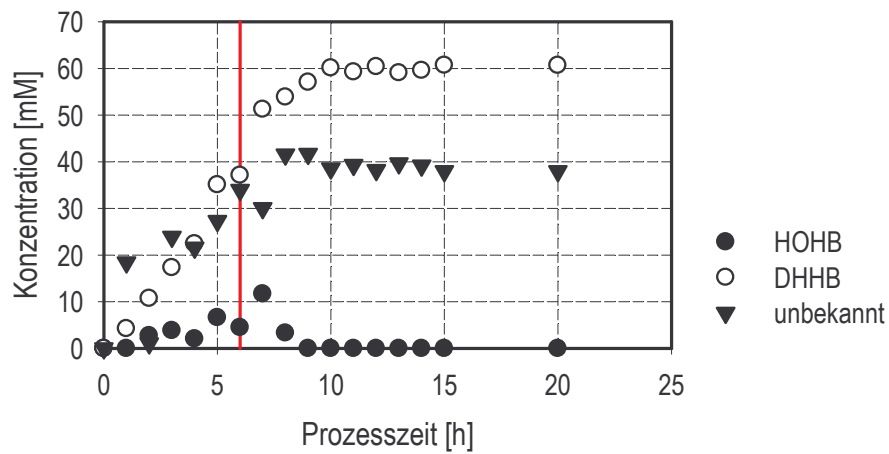
DOHTB-Gesamtkonz. : 80 mM
 Glukose : 200 mM
 Puffer : 0.2 M KPi-Puffer, pH 6.5
 Temperatur : 22°C
 Begasung : Stickstoff überlagert
 DOHTB-Charge : Charge 3
 Erreichte DHHB-Konz. : 45.98 mM (nach 26.75 h)

Prozess X: Linear, 20 mmol L⁻¹ h⁻¹ x 5 h

DOHTB-Gesamtkonz. : 100 mM
 Glukose : 200 mM
 Puffer : 0.2 M KPi-Puffer, pH 6.5
 Temperatur : 22°C
 Begasung : Stickstoff überlagert
 DOHTB-Charge : Charge 3
 Erreichte DHHB-Konz. : 40.22 mM (nach 26.75 h)

Prozess XI: Batch – KPi-Puffer (25°C)

DOHTB-Gesamtkonz. : 25 mM
 Glukose : 50 mM
 Puffer : 0.2 M KPi-Puffer, pH 6.5
 Temperatur : 25°C
 DOHTB-Charge : Charge 1
 Erreichte DHHB-Konz. : 21.9 mM (nach 3.7 h)

Prozess XII: Intermittierend – KPi-Puffer, 4 x 25 mM / 2 h (25°C)

DOHTB-Gesamtkonz. : 100 mM
 Glukose : 200 mM
 Puffer : 0.2 M KPi-Puffer, pH 6.5
 Temperatur : 25°C
 DOHTB-Charge : Charge 1
 Erreichte DHHB-Konz. : 60 mM (nach 10 h)

Anhang B-V: Modellbasierte Bestimmung der kinetischen Parameter

Für die Ansätze im Satz-Verfahren, bei denen keine Bilanzlücke mit unbekanntem Nebenprodukten festzustellen war, wurde dabei die Zerfallsgeschwindigkeit v_2 bei der Parameteranpassung gleich 0 gesetzt. Die Reaktionsbedingungen wurden dabei auf eine Biokatalysatorkonzentration von 50 g L^{-1} , eine Puffermolarität von 0.2 M und $\text{pH } 6.5$ festgelegt. Die Versuche zur Parameteridentifikation wurden bei 22°C durchgeführt. Zur Parameterverifizierung wurden Versuche mit intermittierender DOHTB-Zudosierung bei 22°C und 25°C herangezogen. Dabei wurde eine vergleichbare Endzusammensetzung als Voraussetzung genommen.

(A) Verwendete Ansätze zur Parameterbestimmung

Prozess	Puffer	DOHTB-Zudosierung
I	CP-Puffer	Batch, 25 mM
II	KPi-Puffer	Batch, 25 mM
IV	CP-Puffer	Intermittierend, 4 x 25 mM / 2h
VI	KPi-Puffer	Intermittierend, 4 x 25 mM / 2h
VII	KPi-Puffer	Intermittierend, 8 x 12.5 mM / 2h
VIII	KPi-Puffer	Linear, $8.4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1} \times 9.8 \text{ h}$

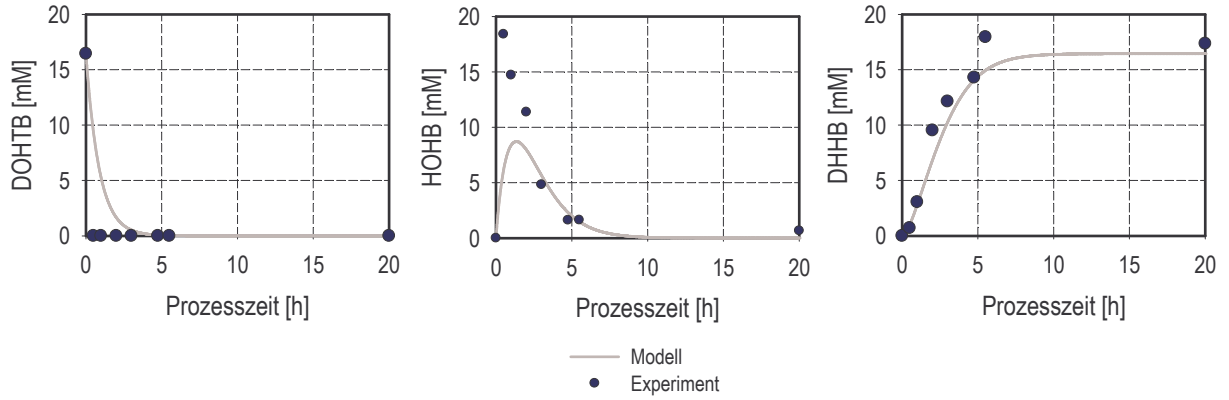
(B) Verwendete Ansätze zur Verifizierung

Prozess	Puffer	DOHTB-Zudosierung
V	CP-Puffer	Intermittierend, 8 x 12.5 mM / 2h
IX	KPi-Puffer	Linear, $12.6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1} \times 8 \text{ h}$
XI	KPi-Puffer	Batch, 25 mM (25°C)
XII	KPi-Puffer	Intermittierend, 4 x 25 mM / 2h (25°C)

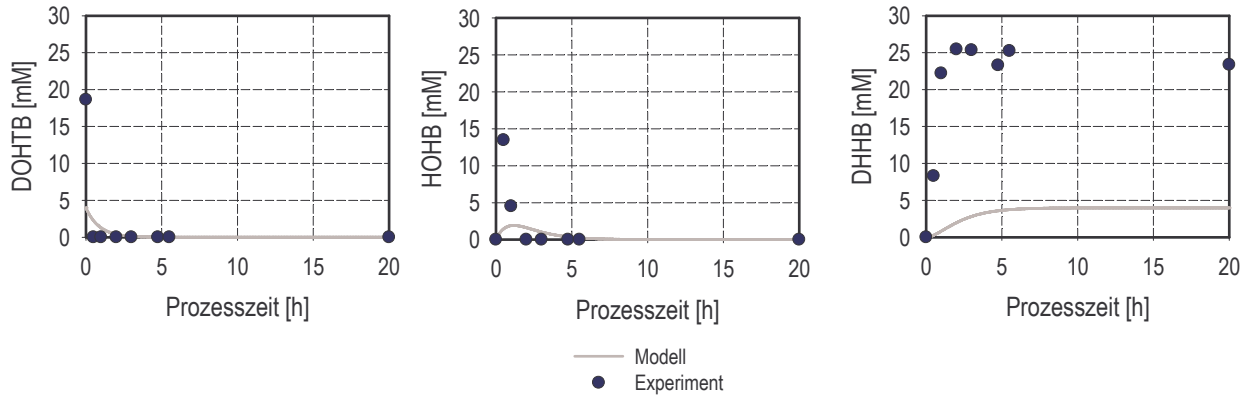
Vergleich der modellierten Verläufe und der experimentellen Daten

(A) Parameteridentifikation

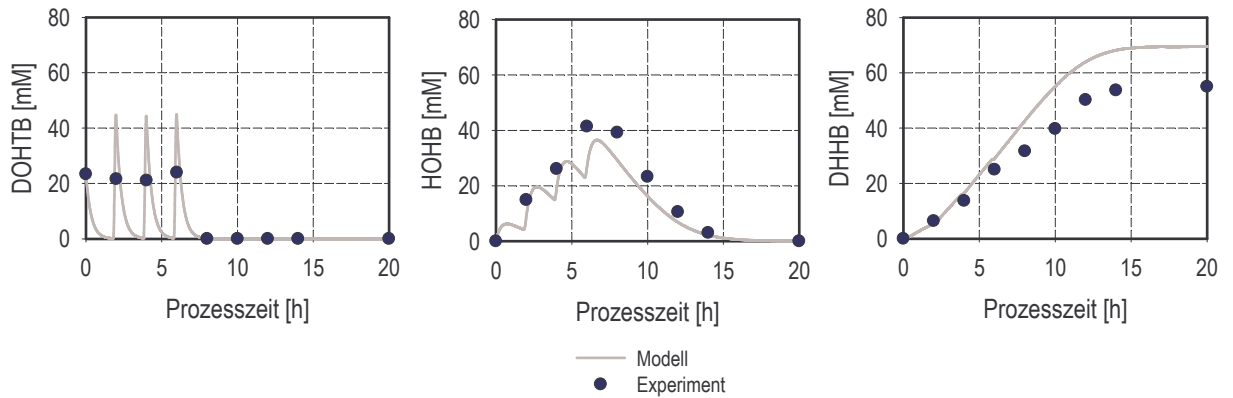
Prozess I



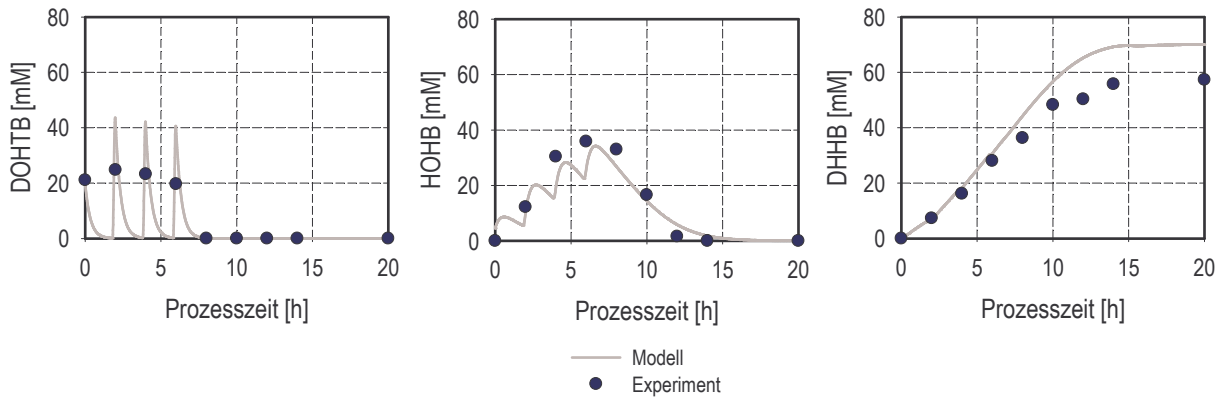
Prozess II



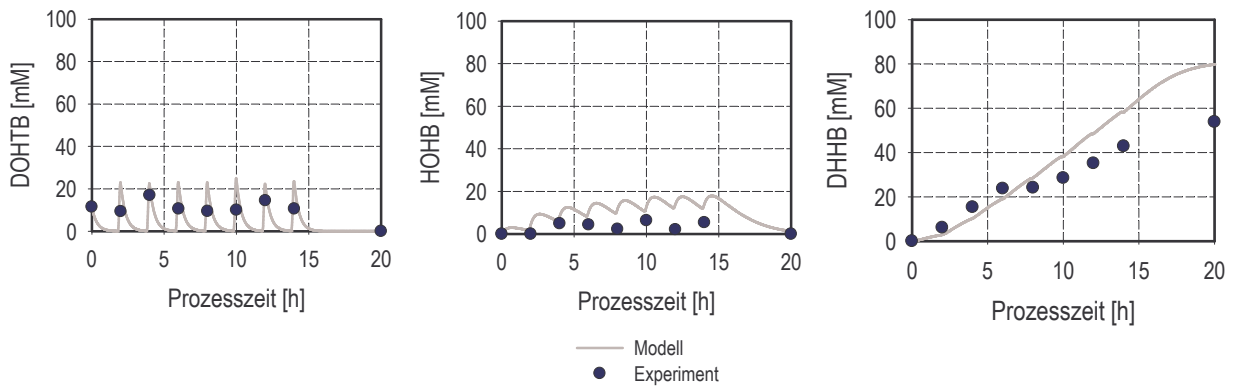
Prozess IV



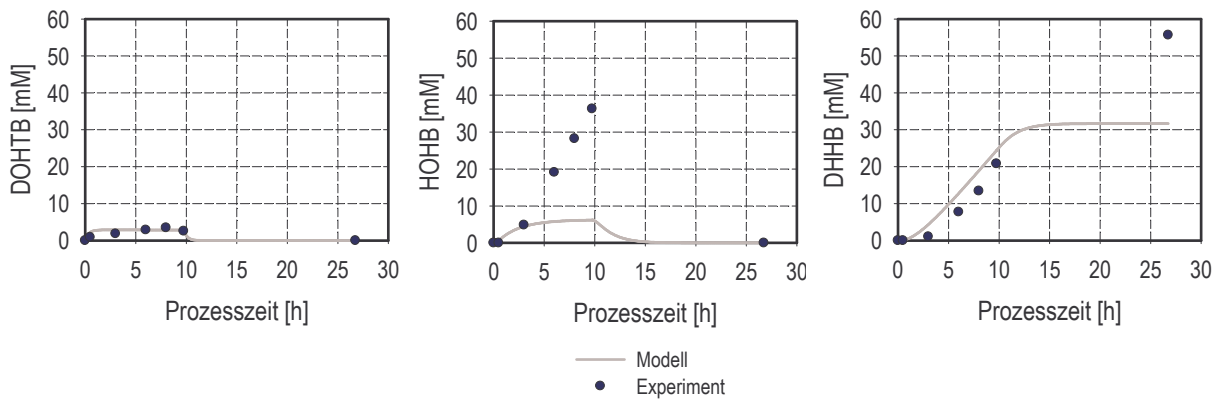
Prozess VI



Prozess VII

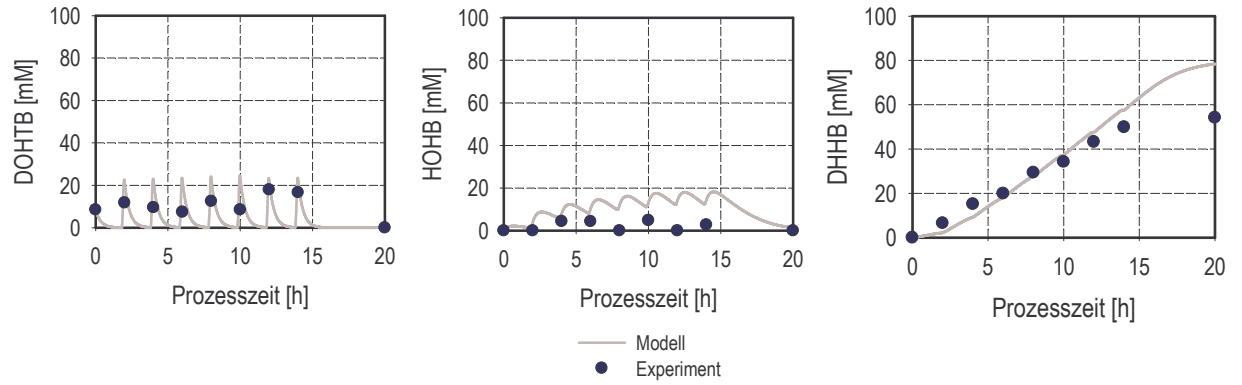


Prozess VIII

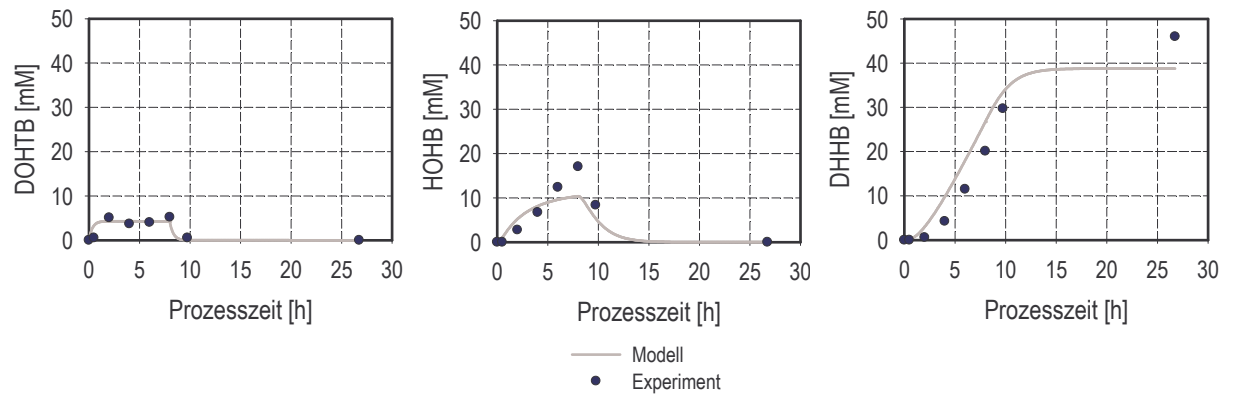


(B) Parameter-Verifizierung

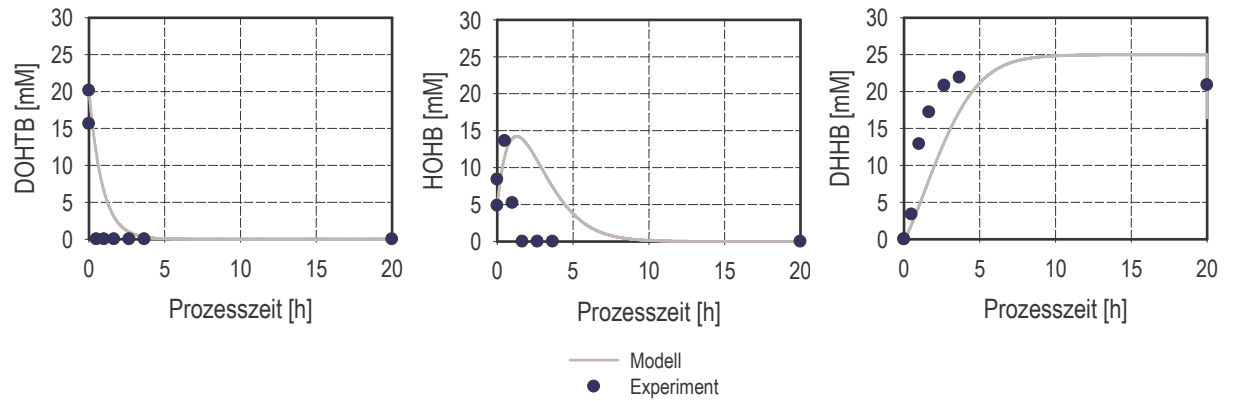
Prozess V



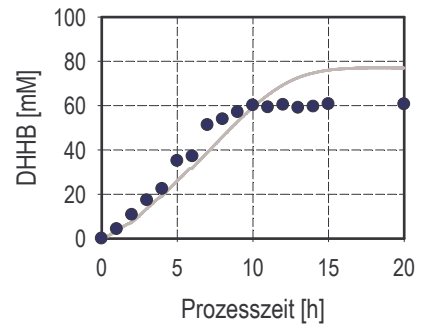
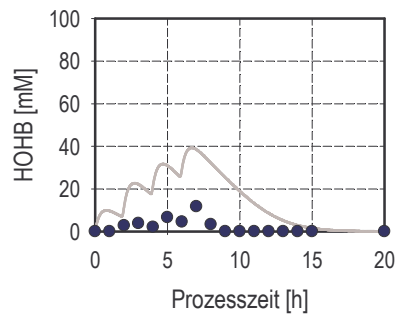
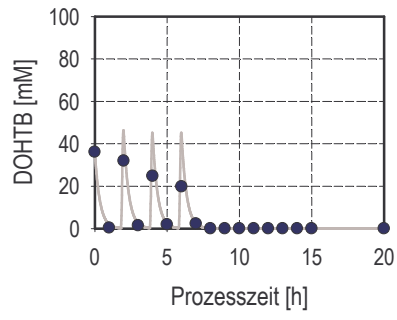
Prozess IX



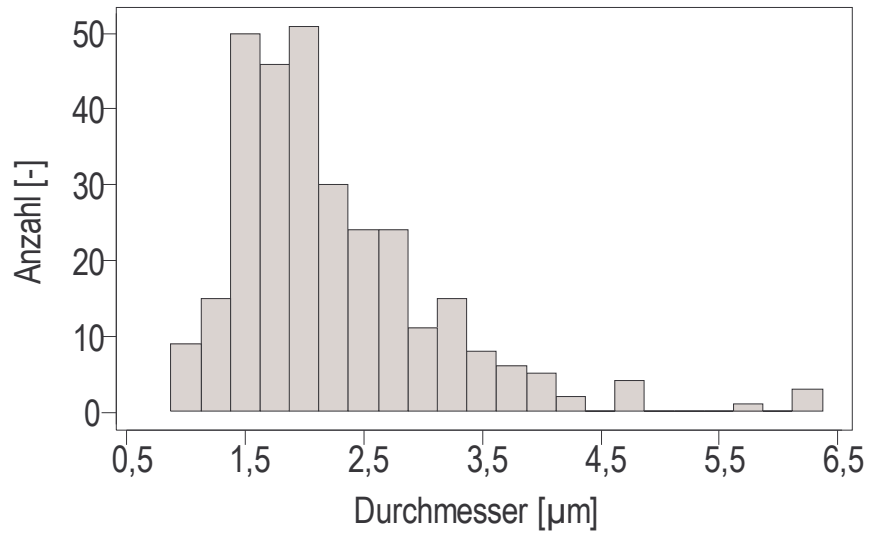
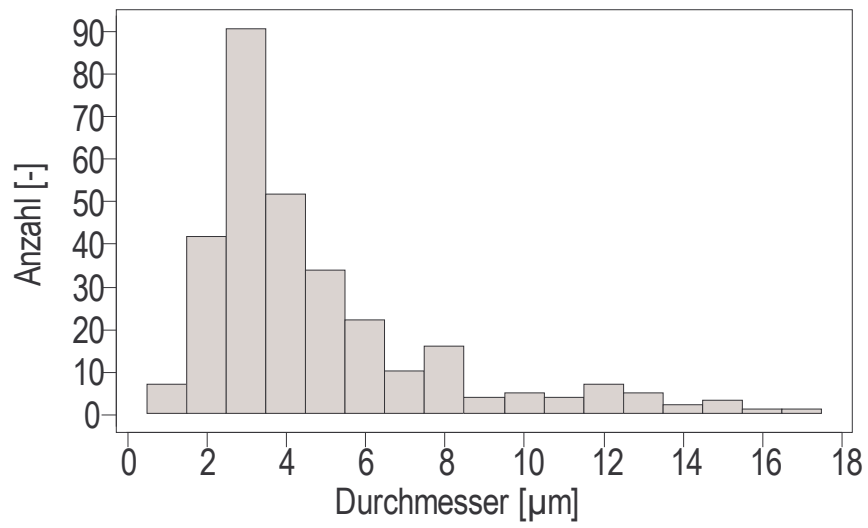
Prozess XI

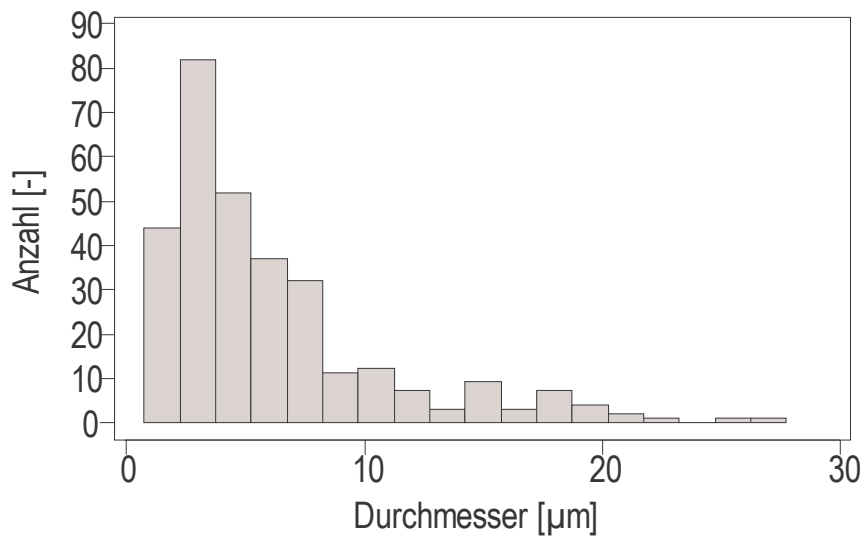


Prozess XII



— Modell
● Experiment

Anhang B-VI: Untersuchungen zur Tropfengröße in zellhaltigen Systemen**4-Cl-Acetophenon (25 mM)****4-Cl-Acetophenon (50 mM)**



6-Cl-3,5-Dioxohexansäure-*tert*-Butylester (25 mM)