

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

**Ganzzell-Biokatalyse in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten  
mit rekombinanten *Escherichia coli***

**Stefan Bräutigam**

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. Harald Klein

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz
2. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Kai-Olaf Hinrichsen

Die Dissertation wurde am 17.09.2008 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen  
am 03.12.2008 angenommen.



*Nur wer nicht sucht,  
ist vor Irrtum sicher.*

*(Albert Einstein)*







## Vorwort

Die vorliegende Dissertation fasst die Ergebnisse meiner Arbeiten am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München zusammen. Während meiner praktischen Tätigkeit von November 2004 bis April 2008 stand mir die hervorragende technische Ausstattung der Labore und des Technikums zur Verfügung. Das erstklassige Arbeitsklima und die fachübergreifende Zusammenarbeit sowohl mit Kollegen als auch technischen Mitarbeitern garantierten ideale Rahmenbedingungen.

Zum Erfolg dieser Arbeit haben viele Personen auf unterschiedliche Weise beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken möchte:

Bei Herrn Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz für das Vertrauen und die Möglichkeit an seinem Lehrstuhl promovieren zu dürfen. Seine Ratschläge, Informationen und Diskussionen waren für meine Arbeit sehr hilfreich. Darüber hinaus bin ich ihm sehr dankbar, in gesundheitlich schwierigen Zeiten seine volle Unterstützung erfahren zu haben.

Beim Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) für die Teilfinanzierung dieses Projekts PraktiBiokat (03X2011A).

Bei Frau Dr. Bringer-Meyer (Institut für Biotechnologie I, Forschungszentrum Jülich) für die Bereitstellung von *E.coli* BL21 LB-ADH MV-FDH und die vielen hilfreichen Informationen.

Bei Herrn Dr. Daußmann, Herrn Dr. Hennemann, Frau Dr. Schürmann und Herrn Dr. Lutje Spelberg (Julich Chiral Solutions, Codexis) für die Bereitstellung von *E.coli* LB-ADH BS-GDH, *E.coli* BL21 LB-ADH LM-G6PDH, *E.coli* BL21 LB-ADH CB-FDH und die fruchtbaren Diskussionen.

Bei Herrn Dr. Welz-Biermann und Herrn Dr. Pitner (Merck, Darmstadt) für die Bereitstellung der ionischen Flüssigkeiten.

Bei Herrn Prof. Thöming, Herrn Dr. Ranke, Herrn Dipl.-Ing Waterkamp und Herrn M.Sc. Fernández (UFT, Bremen) für die zahlreichen Gespräche und Hilfestellungen.

Bei allen (ehemaligen) Kollegen am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik – Irma Einsle, Markus Amann, Karl-Heinz Zacher, Norbert Werth, Georg Kojro, Dr. rer. Nat. Jan Havel, Dr.-Ing. Maya Tiemeyer, Dr.-Ing. Robert Puskeiler, Dr.-Ing. Bettina Knorr, Juniorprof. Dr.-Ing. Ezequiel Franco-Lara, Dr.-Ing. Julia Hiller, Dr.-Ing. Dariusch Hekmat, Dr.-Ing. Armin Tiemeyer, Dr.-Ing. Andreas Knepper, Dr.-Ing. Andreas Kusterer, Dominik Maslak, Michael Hofinger, Andrea Vester, Gabi Gebhardt, Tanja Kurzrock, Michael Finke, Stefanie Brüning, Ralf Hortsch, Clara Delhomme, Christoph Bendig, Torben Höfel, Martin Demler, Peter Riedlberger, Michael Braun, Bernd Anselment – für die wunderbare Zusammenarbeit.

Bei allen meinen Studenten – Apostolos Georgiadis, Barbara Santos Gomes, Zhao Zhen, Michael Finke, Zhen Hou, Long Jiang – für ihren Einsatz und ihre tatkräftige Unterstützung.

Bei Oytun Yavuz für die zahlreichen motivierenden Gespräche.

Bei Kathrin Hölsch und Hannes Link für die ausgiebigen Diskussionen.

Bei Danielle Dennewald für die großartige Hilfestellung während der letzten Monate.

Bei Dr.-Ing. Holger Pfründer für die hervorragende Einarbeitung in die biotechnologische Laborarbeit.

Bei meinen Geschwistern und meinen Eltern für die Unterstützung in allen Lebenslagen.

Bei meiner Verlobten für das Wichtigste überhaupt.

Herzlichen Dank!

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Problemstellung und Zielsetzung</b> .....	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b> .....	<b>7</b>
<b>3.1</b>	<b>Ionische Flüssigkeiten</b> .....	<b>7</b>
3.1.1	Historie der ionischen Flüssigkeiten .....	7
3.1.2	Eigenschaften ionischer Flüssigkeiten .....	8
3.1.3	Einsatzgebiete ionischer Flüssigkeiten in der Biokatalyse.....	13
<b>3.2</b>	<b>Ganzzell-Biokatalyse</b> .....	<b>16</b>
3.2.1	Einsatzgebiete der Ganzzell-Biokatalyse .....	17
3.2.2	Stofftransport und reaktionstechnische Grundlagen.....	17
3.2.3	Prozessgrößen der Ganzzell-Biokatalyse.....	23
3.2.4	Herstellung chiraler Alkohole mittels ADH-aktiver Mikroorganismen ...	24
3.2.5	Prozesstechnische Ansätze zur Durchführung der Ganzzell-Katalyse	27
<b>3.3</b>	<b><i>Escherichia coli</i></b> .....	<b>29</b>
3.3.1	Allgemeine Grundlagen.....	29
3.3.2	Energetische Verwertung von Glukose und Glycerin .....	30
3.3.3	Zellmembran und Zellwand.....	34
<b>3.4</b>	<b>Heterolog exprimierte Enzyme</b> .....	<b>35</b>
3.4.1	<i>Lactobacillus brevis</i> Alkoholdehydrogenase.....	35
3.4.2	<i>Bacillus subtilis</i> Glukosedehydrogenase .....	36
3.4.3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> Glukose-6-Phosphatdehydrogenase .....	37
3.4.4	<i>Mycobacterium vaccae</i> N10 Formiatdehydrogenase.....	37
3.4.5	<i>Candida boidinii</i> Formiatdehydrogenase .....	37

---

<b>3.5</b>	<b>Herstellung von Zellen für den Einsatz als Biokatalysator .....</b>	<b>38</b>
3.5.1	Mikrobielles Wachstum .....	38
3.5.2	Kultivierung im Satzverfahren.....	41
3.5.3	Kultivierung im Zulaufverfahren.....	42
3.5.4	Optimierung der Biokatalysatorherstellung .....	43
<b>3.6</b>	<b>Charakterisierung von Flüssig-Flüssig-Dispersionen.....</b>	<b>44</b>
3.6.1	Tropfenbildung in gerührten Systemen.....	44
3.6.2	Berechnung des Stofftransports .....	46
3.6.3	Verteilungskoeffizient gelöster Stoffe .....	50
<b>4</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>51</b>
<b>4.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>51</b>
<b>4.2</b>	<b>Allgemeine Labormethoden.....</b>	<b>51</b>
4.2.1	pH-Messung.....	51
4.2.2	Herstellung von Pufferlösungen .....	51
4.2.3	Glukoseanalytik.....	52
4.2.4	Bestimmung der optischen Dichte .....	52
4.2.5	Bestimmung der Biotrockenmasse .....	53
4.2.6	Herstellung von kompetenten Zellen .....	53
4.2.7	Plasmid-Transformation .....	54
<b>4.3</b>	<b>Aufbau und Konstruktion der <i>Escherichia coli</i>-Stämme.....</b>	<b>54</b>
4.3.1	<i>Escherichia coli</i> BL21 LB-ADH BS-GDH .....	54
4.3.2	<i>Escherichia coli</i> BL21 LB-ADH LM-G6PDH.....	54
4.3.3	<i>Escherichia coli</i> BL21 LB-ADH MV-FDH .....	55
4.3.4	<i>Escherichia coli</i> BL21 LB-ADH CB-FDH.....	55
<b>4.4</b>	<b>Kultivierung der <i>Escherichia coli</i>-Stämme .....</b>	<b>56</b>
4.4.1	Stammhaltung .....	56
4.4.2	Kultivierung im Schüttelkolben .....	56
4.4.3	Kultivierung im 7,5 L-Rührkesselreaktor im Satzverfahren .....	56
4.4.4	Kultivierung im 7,5 L-Rührkesselreaktor im Zulaufverfahren.....	58
<b>4.5</b>	<b>Charakterisierung der Biokatalysatoren .....</b>	<b>59</b>
4.5.1	Zellaufschluss .....	59
4.5.2	Photometrische Bestimmung der Enzym-Aktivitäten .....	59
4.5.3	Membranintegritätstests für Bakterien (Viabilität) .....	61

---

---

<b>4.6</b>	<b>Charakterisierung der Lösungsmittel.....</b>	<b>62</b>
4.6.1	Bestimmung der Löslichkeit von Ketonen und Alkoholen im Puffer .....	62
4.6.2	Bestimmung der Löslichkeit von Ketonen und Alkoholen in der IL .....	63
4.6.3	Bestimmung der Verteilungskoeffizienten von Ketonen und Alkoholen zwischen IL und Puffer bzw. zwischen IL und Hexan .....	63
<b>4.7</b>	<b>Durchführung der Ganzzell-Biokatalyse .....</b>	<b>65</b>
4.7.1	Vorbereitung der Biokatalysatoren .....	65
4.7.2	Gerührte Glasgefäße im 1,4 mL-Maßstab .....	65
4.7.3	Rührkesselreaktor im 200 mL-Maßstab .....	66
<b>4.8</b>	<b>Gaschromatographische Analytik .....</b>	<b>67</b>
4.8.1	Probenvorbereitung für die Gaschromatographie.....	67
4.8.2	Chirale GC-Analytik von AP und PE.....	68
4.8.3	Chirale GC-Analytik von PP-ON und PP-OH.....	68
4.8.4	Chirale GC-Analytik von 4-Cl-AP und 4-Cl-PE .....	69
4.8.5	Chirale GC-Analytik von $\alpha$ -Cl-AP und $\alpha$ -Cl-PE.....	69
4.8.6	Chirale GC-Analytik von 4-Cl-ACE und 4-Cl-HBE .....	69
4.8.7	Chirale GC-Analytik von 2-Oktanon und 2-Oktanol .....	70
<b>4.9</b>	<b>Modellierung der zweiphasigen Ganzzell-Biotransformation .....</b>	<b>70</b>
<b>5</b>	<b>Prozessentwicklung zur Biokatalysator-Herstellung .....</b>	<b>75</b>
<b>5.1</b>	<b>Herstellung von <i>Escherichia coli</i> BL21 LB-ADH MV-FDH.....</b>	<b>75</b>
5.1.1	Herstellung im Satzverfahren .....	75
5.1.2	Diskussion .....	80
<b>5.2</b>	<b>Herstellung von <i>Escherichia coli</i> BL21 LB-ADH BS-GDH .....</b>	<b>83</b>
5.2.1	Herstellung im Satzverfahren .....	83
5.2.2	Diskussion .....	86
<b>5.3</b>	<b>Herstellung von <i>Escherichia coli</i> BL21 LB-ADH LM-G6PDH.....</b>	<b>89</b>
5.3.1	Herstellung im Satzverfahren .....	89
5.3.2	Diskussion .....	91
<b>5.4</b>	<b>Herstellung von <i>Escherichia coli</i> BL21 LB-ADH CB-FDH.....</b>	<b>92</b>
5.4.1	Herstellung im Satzverfahren .....	92
5.4.2	Herstellung im Zulaufverfahren .....	94
5.4.3	Diskussion .....	97

---

---

<b>6</b>	<b>Untersuchungen zur Biokompatibilität von ionischen Flüssigkeiten</b> .....	
	mit <i>E. coli</i> BL21 LB-ADH BS-GDH .....	<b>99</b>
<b>6.1</b>	<b>Viabilitätstests mit dem LIVE/DEAD® BacLight™-Kit</b> .....	<b>99</b>
<b>6.2</b>	<b>Membranintegritätstest über die GDH-Aktivität</b> .....	<b>101</b>
<b>6.3</b>	<b>Zellmembranschädigung bei Biotransformationen</b> .....	<b>102</b>
6.3.1	Löslichkeiten von Edukt und Produkt.....	103
6.3.2	Verteilungskoeffizienten von Edukt und Produkt.....	104
6.3.3	Umsetzungen im 1,4 ml-Maßstab.....	105
<b>6.4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>106</b>
<b>7</b>	<b>Asymmetrische Synthesen mit <i>E. coli</i> BL21 LB-ADH LM-G6PDH</b> .....	<b>107</b>
<b>7.1</b>	<b>Synthese von (R)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol</b> .....	<b>107</b>
7.1.1	Löslichkeiten von Edukt und Produkt.....	108
7.1.2	Verteilungskoeffizienten von Edukt und Produkt.....	108
7.1.3	Umsetzungen im 1,4 ml-Maßstab.....	109
<b>7.2</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>111</b>
<b>8</b>	<b>Asymmetrische Synthesen mit <i>E. coli</i> BL21 LB-ADH MV-FDH</b> .....	<b>112</b>
<b>8.1</b>	<b>Synthese von (R)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol</b> .....	<b>112</b>
8.1.1	Löslichkeiten von Edukt und Produkt.....	113
8.1.2	Verteilungskoeffizienten von Edukt und Produkt.....	113
8.1.3	Umsetzungen im 1,4 ml-Maßstab.....	114
<b>8.2</b>	<b>Synthese von (S)-<math>\alpha</math>-Chlor-1-Phenylethanol</b> .....	<b>115</b>
8.2.1	Löslichkeiten von Edukt und Produkt.....	115
8.2.2	Verteilungskoeffizienten von Edukt und Produkt.....	116
8.2.3	Umsetzungen im 1,4 ml-Maßstab.....	116
<b>8.3</b>	<b>Synthese von (R)-1-Phenylethanol</b> .....	<b>118</b>
8.3.1	Löslichkeiten von Edukt und Produkt.....	118
8.3.2	Verteilungskoeffizienten von Edukt und Produkt.....	119
8.3.3	Umsetzungen im 1,4 ml-Maßstab.....	119
<b>8.4</b>	<b>Synthese von (R)-1-Phenyl-1-Propanol</b> .....	<b>121</b>
8.4.1	Löslichkeiten von Edukt und Produkt.....	121
8.4.2	Verteilungskoeffizienten von Edukt und Produkt.....	122

---

---

8.4.3	Umsetzungen im 1,4 ml-Maßstab .....	122
<b>8.5</b>	<b>Synthese von (S)-4-Chlor-3-Hydroxybuttersäureethylester .....</b>	<b>124</b>
8.5.1	Löslichkeiten von Edukt und Produkt .....	124
8.5.2	Verteilungskoeffizienten von Edukt und Produkt .....	125
8.5.3	Umsetzungen im 1,4 ml-Maßstab .....	125
<b>8.6</b>	<b>Synthese von (R)-2-Oktanol .....</b>	<b>127</b>
8.6.1	Löslichkeiten von Edukt und Produkt .....	127
8.6.2	Verteilungskoeffizienten von Edukt und Produkt .....	128
8.6.3	Umsetzungen im 1,4 ml-Maßstab .....	128
<b>8.7</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>129</b>
<b>9</b>	<b>Asymmetrische Synthesen mit <i>E. coli</i> BL21 LB-ADH CB-FDH .....</b>	<b>130</b>
<b>9.1</b>	<b>Synthese von (R)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol.....</b>	<b>130</b>
9.1.1	Löslichkeiten von Edukt und Produkt .....	131
9.1.2	Verteilungskoeffizienten von Edukt und Produkt .....	131
9.1.3	Umsetzungen im 1,4 ml-Maßstab .....	132
<b>9.2</b>	<b>Synthese von (R)-2-Oktanol .....</b>	<b>133</b>
9.2.1	Löslichkeiten von Edukt und Produkt .....	133
9.2.2	Verteilungskoeffizienten von Edukt und Produkt .....	134
9.2.3	Umsetzungen im 1,4 ml-Maßstab .....	134
<b>9.3</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>136</b>
<b>10</b>	<b>Asymmetrische Synthesen im 200 ml-Maßstab .....</b>	<b>137</b>
<b>10.1</b>	<b>Synthese von (R)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol.....</b>	
	<b>mit <i>E. coli</i> BL21 LB-ADH MV-FDH .....</b>	<b>137</b>
<b>10.2</b>	<b>Synthese von (R)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol.....</b>	
	<b>mit <i>E. coli</i> BL21 LB-ADH CB-FDH .....</b>	<b>140</b>
<b>10.3</b>	<b>Synthese von (R)-2-Oktanol .....</b>	
	<b>mit <i>E. coli</i> BL21 LB-ADH CB-FDH .....</b>	<b>142</b>
<b>10.4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>144</b>
<b>11</b>	<b>Ansätze zur Optimierung der zweiphasig geführten.....</b>	
	<b>Ganzzell-Biotransformation .....</b>	<b>145</b>

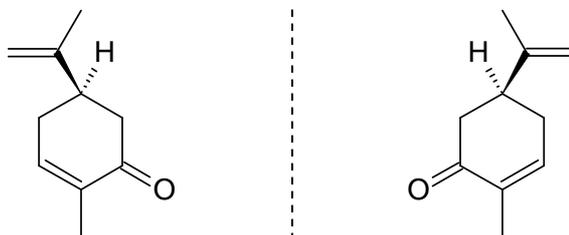
---

---

<b>11.1 Abschätzung der Stofftransportprozesse und Modellierung.....</b>	<b>145</b>
<b>11.2 Simulation von extra- und intrazellulären Parametern .....</b>	<b>147</b>
11.2.1 Verlauf der Edukt- und Produktkonzentration .....	147
11.2.2 Vergleich der Stofftransportgeschwindigkeit mit der Enzym-Kinetik..	149
<b>11.3 Simulation von Optimierungsparametern.....</b>	<b>150</b>
11.3.1 Einfluss des Verteilungskoeffizienten .....	151
11.3.2 Einfluss der Eduktstartkonzentration .....	153
11.3.3 Einfluss des IL-Phasenverhältnisses .....	155
11.3.4 Einfluss der Biokatalysator-Konzentration .....	158
<b>11.4 Diskussion.....</b>	<b>160</b>
<b>12 Leitlinien zur Auswahl geeigneter ionischer Flüssigkeiten .....</b>	<b>161</b>
<b>    für die Ganzzell-Biokatalyse .....</b>	<b>161</b>
<b>13 Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>164</b>
<b>14 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>170</b>
<b>15 Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>181</b>
<b>16 Anhang.....</b>	<b>190</b>
<b>16.1 Geräte, Chemikalien und Kultivierungsmedien.....</b>	<b>190</b>
16.1.1 Geräte.....	190
16.1.2 Chemikalien .....	192
16.1.3 Eigenschaften der eingesetzten Ketone und Alkohole.....	195
16.1.4 Kultivierungsmedien.....	199
<b>16.2 Eigenschaften ionischer Flüssigkeiten.....</b>	<b>203</b>
16.2.1 Stoffdaten ionischer Flüssigkeiten.....	203
16.2.2 Verteilungskoeffizienten von Ketonen und Alkoholen .....	204

## 1 Einleitung

Spiegelbildlich aufgebaute Moleküle, die sich nicht durch Drehung zur Deckung bringen lassen, verhalten sich hinsichtlich ihrer räumlichen Struktur wie rechte Hand zur linken Hand (Abbildung 1.1). Aufgrund dieses kennzeichnenden Merkmals werden derartige Substanzen, abgeleitet vom griechischen Wort für „Hand“, *cheir*, als *chiral* bezeichnet. Beide sogenannten Enantiomere besitzen nahezu dieselben physikalischen sowie chemischen Eigenschaften und unterscheiden sich nur in ihrer Fähigkeit linear polarisiertes Licht unterschiedlich zu drehen. Die Trennung eines Racemats, welches jeweils zu gleichen Anteilen aus den korrespondierenden Enantiomeren besteht, gestaltet sich daher auch als besonders schwierig und aufwändig.



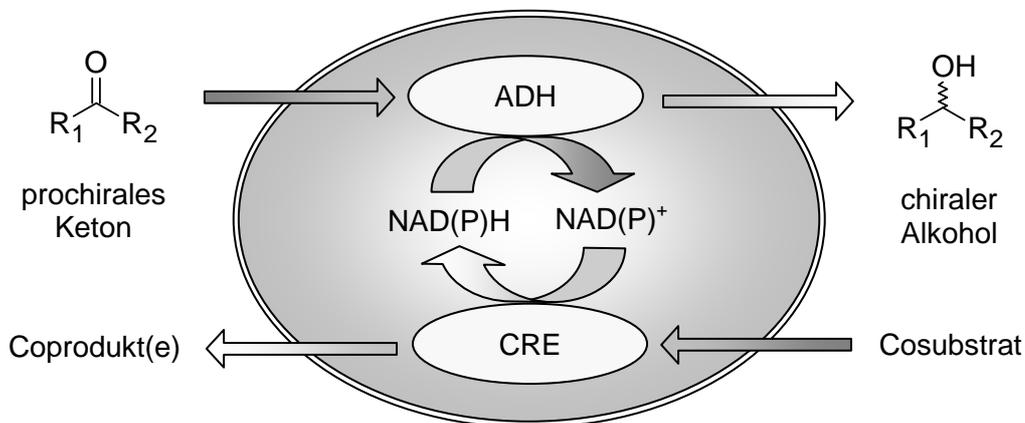
**Abbildung 1.1** Spiegelbildlicher Aufbau von (*R*)-Carvon und (*S*)-Carvon.

Trotz ihrer Ähnlichkeit im Aufbau und fast identischen Eigenschaften zeigen Enantiomere gegenüber biologischen Systemen oftmals völlig unterschiedliche Wechselwirkungen. So wird zum Beispiel (*S*)-Carvon von den menschlichen Geruchsrezeptoren als Kümmel-Duft identifiziert, während dagegen (*R*)-Carvon als Pfefferminz-Aroma wahrgenommen wird (Vollhardt und Shore 2000). In das Bewusstsein der breiten Öffentlichkeit gelangte die unterschiedliche Wirkungsweise von chiralen Molekülen aber erst mit dem Contergan<sup>®</sup>-Skandal. Das zwischen 1958 bis 1962 als Racemat verkaufte Schlafmittel besaß neben dem gewünschten beruhigenden Effekt, zusätzlich eine teratogene Wirkung durch das gleichzeitig mitverabreichte (*S*)-Enantiomer. Unter dem Eindruck dieses Unglücks, welches Tausende schwer missgebildete Neugeborene zur Folge hatte, sind die Anforderungen an

die Untersuchung chiraler Arzneimittel und deren enantiomerenreinen Herstellung schließlich stark gestiegen (Food and Drug Administration 1992).

Als geeignete Methode zur asymmetrischen Herstellung von chiralen Substanzen haben sich biotechnologische Verfahren erwiesen (Honda *et al.* 2006). Unter Ausnutzung der biokatalytischen regio- und stereoselektiven Syntheseleistung von Enzymen kann aufgrund hoher Enantiomerenreinheiten eine aufwändige Aufarbeitung des chiralen Produkts vermieden werden. Die Enzyme liegen während der chemischen Reaktion entweder innerhalb von biologischen Zellen vor oder werden in aufgereinigter Form eingesetzt.

Finden Oxidoreduktasen wie zum Beispiel Alkoholdehydrogenasen (ADH) Verwendung bei Biotransformationen, erfolgt die Redox-Reaktion unter stöchiometrischen Verbrauch eines Wasserstoff transportierenden Cofaktors, wie beispielsweise Nikotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH), welcher anschließend einer Regenerierung bedarf. Die Ganzzell-Biokatalyse bietet hierbei gegenüber der rein-enzymatischen Katalyse den Vorteil einer intrazellulären Cofaktorregenerierung (Abbildung 1.1) und erfordert daher keine zusätzliche Zugabe von teuren Cofaktoren. Ein weiterer Vorteil des Ganzzell-Biokatalysators besteht in der vergleichsweise einfachen Herstellung, da die kostenintensiven Aufreinigungsschritte zur Gewinnung der reinen Enzyme entfallen.



**Abbildung 1.1** Schematische Darstellung der intrazellulären Cofaktorregenerierung durch ein cofaktorregenerierendes Enzym (CRE) am Beispiel der asymmetrischen Reduktion eines prochiralen Ketons zum chiralen Alkohol mit Hilfe einer Alkoholdehydrogenase (ADH) in einem Ganzzell-Biokatalysator.

Durch die heterologe Expression artfremder Enzyme in Mikroorganismen wie *Escherichia coli* lässt sich die biokatalytische Aktivität des Ganzzell-Biokatalysators deutlich verbessern.

Wird neben dem produzierenden Enzym zusätzlich noch ein weiteres Enzym exprimiert, welches die Regenerierung des verbrauchten Cofaktors sicherstellt, kann von noch höheren Reaktionsgeschwindigkeiten profitiert werden (Ernst *et al.* 2005, Gröger *et al.* 2006). Für die Konstruktion derartiger rekombinanter Mikroorganismen stehen der Biotechnologie neben der großen Anzahl natürlicher Enzyme die modernen Methoden der Gentechnik und des evolutionären sowie rationalen Designs von Enzymen zur Verfügung (Robertson *et al.* 2004). Der Biokatalysator kann somit gezielt nach den Vorgaben der gewünschten Reaktion gestaltet werden.

Der Anteil biotechnologischer Verfahren bei der Herstellung von Chemieprodukten betrug im Jahr 2004 gemessen am Umsatz lediglich 3 %. Schätzungen zur Folge soll sich dieser Anteil bis 2015 aber verfünffachen und dann bereits 15 % sämtlicher Umsätze ausmachen. Bezogen auf den Bereich der Feinchemikalien käme die „Weiße Biotechnologie“ dann auf einen Anteil von 50% (Struhalla und Fietz 2004). Diese Prognosen können allerdings nur eingehalten werden, wenn es gelingt, die bisherigen Probleme bei der Anwendung biotechnologischer Methoden zu beseitigen und die Effizienz, im Vergleich zur klassischen Chemie, durch neue Verfahren deutlich zu verbessern.

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

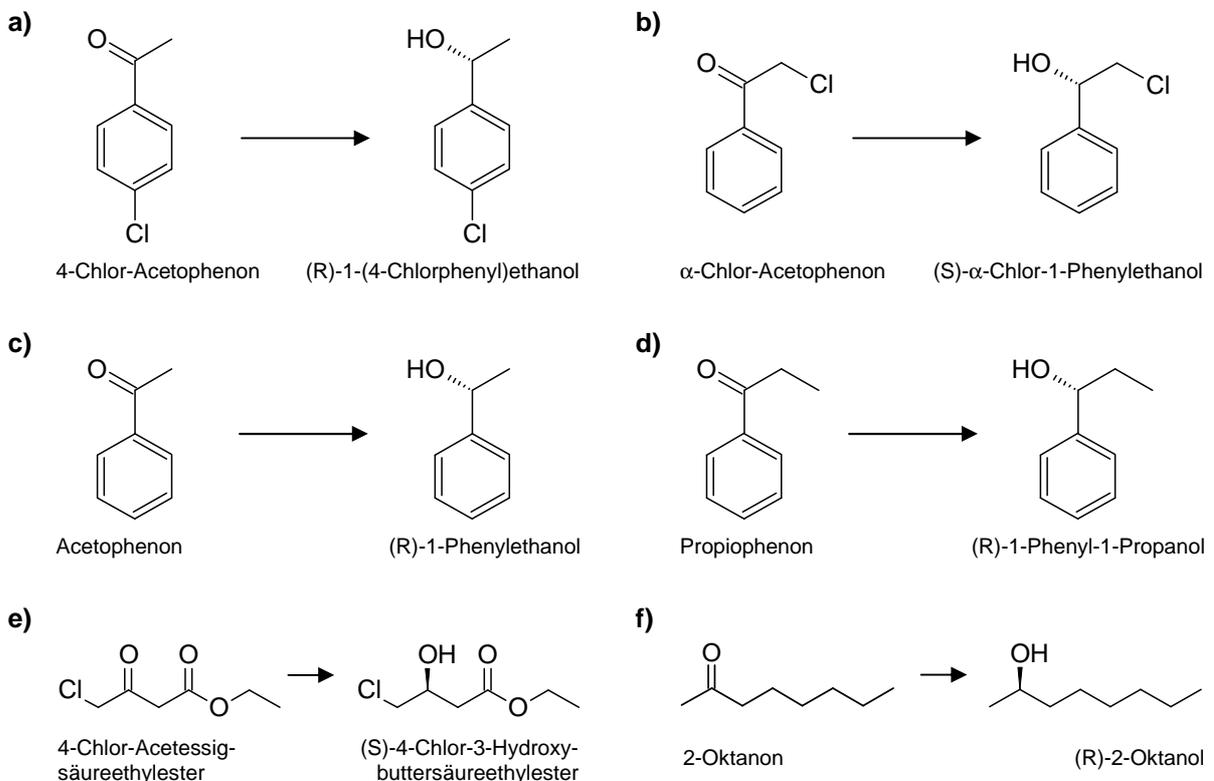
Chirale Alkohole besitzen als Zwischenprodukte eine wichtige Schlüsselposition bei der Entwicklung und Herstellung von Pharmazeutika, Aromastoffen, Agrochemikalien und Katalysatoren. Die Herstellung dieser Feinchemikalien über eine asymmetrische Ganzzell-Biokatalyse kann den hohen Anforderungen an die Enantiomerenreinheit auf besonders ökonomische und effektive Weise gerecht werden. In vielen Fällen wird die Effizienz dieser Prozesse aber durch die geringe Wasserlöslichkeit, Instabilität oder die Toxizität der Edukte und Produkte gegenüber dem Biokatalysator herabgesetzt.

Zur Lösung des Problems bietet sich hier eine zweiphasige Prozessführung unter Einsatz einer nicht mit Wasser mischbaren Flüssigkeit an, die als Eduktreservoir und *in-situ*-Extraktionsmittel für das Produkt fungiert. Auf diese Weise kann die Eduktverfügbarkeit erhöht, die Instabilität von Edukt bzw. Produkt verringert und zudem deren schädigende Wirkung auf den Biokatalysator minimiert werden. Nicht mit Wasser mischbare ionische Flüssigkeiten haben sich hierbei als besonders interessante Alternative zu den üblicher Weise als zweite Phase eingesetzten organischen Lösungsmitteln erwiesen (Pfründer *et al.* 2004). Es handelt sich hierbei um synthetisch hergestellte Salze, die bereits bei Raumtemperatur vielfach im flüssigen Aggregatzustand vorliegen. Sie sind weniger toxisch gegenüber den Zellen, erlauben aufgrund ihres verschwindend geringen Dampfdrucks eine leichte destillative Abtrennung des Produkts und sind nicht brennbar.

Da bisher nur eine geringe Anzahl an nicht mit Wasser mischbaren ionischen Flüssigkeiten hinsichtlich ihres Potentials zur Steigerung der Effizienz der Ganzzell-Biokatalyse untersucht worden ist, soll das Ziel dieser Arbeit sein, weitere geeignete ionische Flüssigkeiten zu identifizieren und den unterschiedlichen Einfluss ihrer Anionen und Kationen auf die Ganzzell-Biokatalyse abzuschätzen. Zudem soll eine exemplarische Modellierung einer zweiphasig, im Satzverfahren durchgeführten Ganzzell-Biotransformation erste Optimierungsansätze hinsichtlich der Verteilungskoeffizienten, der Eduktkonzentration, des Phasenverhältnisses und hinsichtlich der Biokatalysatorkonzentration liefern.

Die modernen Methoden der Gentechnik erlauben die Konstruktion neuartiger Ganzzell-Biokatalysatoren, die eine gegenüber dem Wildtyp deutlich gesteigerte Aktivität aufweisen. Von den hohen Reaktionsgeschwindigkeiten heterolog exprimierter Oxidoreduktasen kann allerdings nur profitiert werden, wenn gleichzeitig auch ein cofaktorregenerierendes Enzym exprimiert wird. Ob das Cofaktorregenerierungssystem aber auch bei Ganzzell-Biotransformationen mit ionischen Flüssigkeiten seine Funktionsfähigkeit behält, ist bisher noch nicht untersucht worden. Daher soll ein weiteres Ziel dieser Arbeit sein, dies anhand von vier rekombinanten *Escherichia coli*-Stämmen zu untersuchen, die neben einer *Lactobacillus brevis* Alkoholdehydrogenase (LB-ADH) für die eigentliche Biokatalyse zusätzlich eine *Bacillus subtilis* Glukosedehydrogenase (BS-GDH), eine *Leuconostoc mesenteroides* Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (LM-G6PDH), eine *Mycobacterium vaccae* Formiatdehydrogenase (MV-FDH) oder eine *Candida boidinii* Formiatdehydrogenase (CB-FDH) coexprimieren.

Anhand sechs verschiedener asymmetrischer Reduktionen von prochiralen Ketonen zu chiralen Alkoholen soll exemplarisch die generelle Eignung der Ganzzell-Biokatalysatoren für Biotransformationen mit ionischen Flüssigkeiten belegt werden. Eine schematische Darstellung der Reaktionen erfolgt in Abbildung 2.1.



**Abbildung 2.1** Schematische Darstellung der zu untersuchenden Reaktionssysteme

Zur Erreichung dieser Zielsetzung sind folgende Arbeitsschritte geplant:

- Entwicklung effizienter Verfahren zur Herstellung der rekombinanten Ganzzell-Biokatalysatoren bis in den 5 L-Maßstab für
  - *E.coli* BL21 LB-ADH BS-GDH,
  - *E.coli* BL21 LB-ADH LM-G6PDH,
  - *E.coli* BL21 LB-ADH MV-FDH,
  - *E.coli* BL21 LB-ADH CB-FDH.
  
- Durchführung von asymmetrischen Ketonreduktionen in Gegenwart nicht mit Wasser mischbarer ionischer Flüssigkeiten in Parallelansätzen im Milliliter-Maßstab. Hierbei gilt es folgende Aspekte zu berücksichtigen:
  - Bestimmung der Biokompatibilität von 21 ionischen Flüssigkeiten durch Messung der schädigenden Effekte auf die eingesetzten Ganzzell-Biokatalysatoren.
  - Ermittlung der Löslichkeiten von Edukt und Produkt in den ionischen Flüssigkeiten, sowie im Umsetzungspuffer.
  - Bestimmung der Verteilungskoeffizienten von Edukt und Produkt zwischen ionischen Flüssigkeiten und wässriger Pufferlösung.
  - Messung von Ausbeute und Enantiomerenreinheit im einfachen Satzverfahren.
  - Beurteilung des jeweiligen Cofaktorregenerierungssystems.
  
- Übertragung ausgewählter Syntheseprozesse in den 200 mL-Maßstab.
  
- Reaktionstechnische Analyse und Modellierung einer ausgewählten, im Satzverfahren durchgeführten Ganzzell-Biotransformation zur Beurteilung der Optimierungspotentiale hinsichtlich
  - Verteilungskoeffizient der ionischen Flüssigkeit,
  - Eduktkonzentration,
  - Phasenverhältnis zwischen ionischer Flüssigkeit und Umsetzungspuffer,
  - Biokatalysatorkonzentration.

## 3 Theoretische Grundlagen

Im folgenden Kapitel werden die theoretischen Grundlagen hinsichtlich der in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Verfahren dargestellt, wie auch der auf den relevanten Gebieten aktuelle Stand von Wissenschaft und Technik.

### 3.1 Ionische Flüssigkeiten

Ionische Flüssigkeiten (IL) sind synthetisch hergestellte Salze, die wie die in der Natur vorkommenden Salze aus Anionen und Kationen bestehen. Da ihr Schmelzpunkt aber im Vergleich zu diesen deutlich niedriger liegt, bildet diese Eigenschaft ein kennzeichnendes Charakteristikum. Im Allgemeinen weisen alle ionischen Flüssigkeiten Schmelzpunkte von unter 100°C auf. Aber nur die sogenannten RT-ILs, die bereits bei Raumtemperatur im flüssigen Aggregatzustand vorliegen, sind für die Biokatalyse von besonderer Bedeutung.

#### 3.1.1 Historie der ionischen Flüssigkeiten

Bereits 1914 wurde vom deutsch-lettischen Chemiker Paul Walden mit Ethylammoniumnitrat die erste ionische Flüssigkeit synthetisiert (Walden 1914). Erstmaligen Einsatz in einem technischen Prozess fanden ionische Flüssigkeiten aber erst 1948 als Badflüssigkeit zum Elektroplatinieren von Aluminium. Die hierbei eingesetzten Chloroaluminatschmelzen wurden Ende der siebziger Jahre erneut aufgegriffen. Dabei gelang es zum ersten Mal ILs mit Chloraluminat-Ionen herzustellen, die auch bei Raumtemperatur im flüssigen Zustand vorliegen (Robinson *et al.* 1979). Als nicht wässrige, polare Lösungsmittel dienten diese in den nachfolgenden Jahren zur Untersuchung von Übergangsmetallkomplexen. Ende der achtziger Jahre erkannte man dann auch die besondere Eignung von Chloraluminatschmelzen als Friedel-Crafts-Katalysatoren (Boon *et al.* 1986) und als Reaktionsmedien in nucleophilen aromatischen Substitutionsreaktionen (Fry *et al.* 1985).

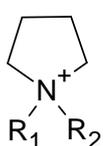
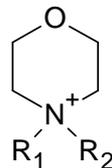
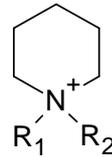
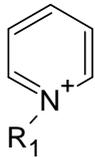
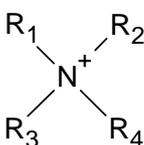
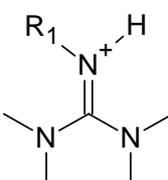
Aufgrund ihrer besonderen Bedeutung und ihrer Eigenschaften, die sie von den später entwickelten ILs abgrenzen, werden Chloraluminatschmelzen auch als ionische Flüssigkeiten der ersten Generation bezeichnet. Die fehlende Hydrolysestabilität und die hohe Reaktivität schränkte ihr Einsatzgebiet aber erheblich ein. Erst mit der Entwicklung von deutlich stabileren ionischen Flüssigkeiten mit halogeniertem Anion, wie zum Beispiel Tetrafluoroborat (Wilkes *et al.* 1992), eröffneten sich zahlreiche neue Anwendungsgebiete. Diese ILs werden daher auch als ionische Flüssigkeiten der zweiten Generation bezeichnet. In Abhängigkeit von den Einsatzbedingungen kann es aber auch bei diesen ILs zur Hydrolyse und somit zu einer Entstehung von reaktiven Spaltprodukten wie Salz- oder Flusssäure kommen. Aus diesem Grund gilt der Entwicklung einer dritten Generation halogenfreier ionischer Flüssigkeiten ein großes Interesse. Bisher sind als halogenfreie ILs Nitrat-, Nitrit-, Sulfat- und Benzolsulfonatschmelzen bekannt, welche allerdings einen Schmelzpunkt aufweisen, der oberhalb der Raumtemperatur liegt. Als Alternative werden daher von Wasserscheid *et al.* (2003) ionische Flüssigkeiten vorgeschlagen, die auf einem R-O-SO<sub>3</sub>- oder R-SO<sub>3</sub>-Anion basieren.

### 3.1.2 Eigenschaften ionischer Flüssigkeiten

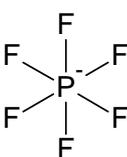
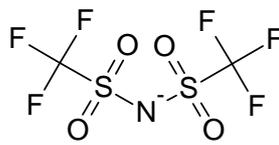
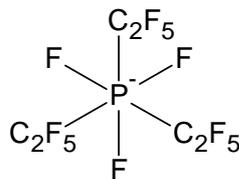
Die Eigenschaften von ionischen Flüssigkeiten lassen sich nicht nur über die Kombination verschiedener Anionen und Kationen gezielt beeinflussen, sondern auch über die Kombination mehrerer ionischer Flüssigkeiten. Zur Zeit sind theoretisch etwa  $10^6$  ionische Flüssigkeiten im Labor herstellbar, aus denen sich  $10^{12}$  binäre Kombinationen und  $10^{18}$  ternäre Systeme ergeben (Seddon 1999). Berücksichtigt man auch die Tatsache, dass die Eigenschaften der IL-Mischungen zudem von dem jeweiligen Mischungsverhältnis der ionischen Flüssigkeiten abhängig sind, eröffnen sich sogar unendlich viele Kombinationsmöglichkeiten. Verglichen mit den 600 aktuell in der Industrie verwendeten Lösungsmitteln (Rogers *et al.* 2003) wird deutlich, warum ionische Flüssigkeiten daher als „Designer-Lösungsmittel“ gelten, die sich für jeden Einsatzbereich optimal auslegen lassen.

Zu den Eigenschaften, die sämtliche ionische Flüssigkeiten miteinander teilen, gehören der verschwindend geringe Dampfdruck, die Nichtbrennbarkeit, der weite Flüssigkeitsbereich, das große elektrochemische Fenster und die gute Eignung als Lösungsmittel. Die Kationen von ILs sind ausschließlich organischer Natur, die Anionen meist anorganischer. Die Grundstruktur der Kationen und Anionen der in dieser Arbeit verwendeten ionischen Flüssigkeiten sind in Tabelle 3.1 und 3.2 dargestellt, die Eigenschaften der jeweiligen IL in Kapitel 16.2.

**Tabelle 3.1** Grundstruktur der Kationen der in dieser Arbeit verwendeten ionischen Flüssigkeiten

Kationen			
<b>Imidazolium [-IM]</b>	<b>Pyrrolidinium [-PL]</b>	<b>Morpholinium [-MO]</b>	<b>Piperidinium [-PI]</b>
			
<b>Pyridinium [-PYR]</b>	<b>Ammonium [N-]</b>	<b>Guanidinium [-G]</b>	
			

**Tabelle 3.2** Struktur der Anionen der in dieser Arbeit verwendeten ionischen Flüssigkeiten

Anionen		
<b>Hexafluorphosphat</b>	<b>Bis(trisfluormethansulfon)imid</b>	<b>Tris(pentafluorethyl)trifluorphosphat</b>
<b>[PF6]</b>	<b>[NTF]</b>	<b>[FAP]</b>
		

Nachfolgend wird auf die für diese Arbeit wichtigsten chemischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften ionischer Flüssigkeiten näher eingegangen (Wasserscheid *et al.* 2003, Meindersma *et al.* 2007).

### *Schmelzpunkt*

Im Gegensatz zum Flüssigkeitsbereich, der für sämtliche ILs bis mindestens 200°C reicht, bildet der Schmelzpunkt ein wichtiges Charakteristikum, da dieser festlegt, ob die jeweilige ionische Flüssigkeit für eine Anwendung bei Raumtemperatur überhaupt in Frage kommt. Der Schmelzpunkt wird hierbei sowohl durch das Anion, als auch das Kation beeinflusst. Im Allgemeinen verringert sich dieser mit der Größe des Anions durch die reduzierten Coulombkräfte (Wasserscheid *et al.* 2000). Bei Kationen bewirkt die zunehmende Länge der Alkylseitenketten dagegen generell eine Schmelzpunkterhöhung. Eine Ausnahme liefern allerdings 1-Alkyl-3-Methylimidazolium-Kationen, da hier der Schmelzpunkt mit der Anzahl der Kohlenstoffatome zunächst sinkt, um dann erst ab dem achten wieder anzusteigen. Die Größe des Kations wirkt sich ähnlich aus wie die des Anions. Ebenso resultiert eine zunehmende asymmetrische Substitution des Kations in einem verringerten Schmelzpunkt (Holbrey *et al.* 2003). Einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss besitzen zudem Van-der-Waals-Kräfte und eventuell auftretende Wasserstoffbrückenbindungen.

### *Viskosität*

Die Viskosität von ionischen Flüssigkeiten ist von besonderer Bedeutung für die Handhabung wie auch für die Beherrschung von Stofftransport-Limitierungen. Sämtliche bisher untersuchten ILs verhalten sich wie Newtonsche Fluide. Mit Werten von 10 mPa s bis 1000 mPa s liegt die dynamische Viskosität von ionischen Flüssigkeiten bei Raumtemperatur höher als die von organischen Lösungsmitteln. Aufgrund der starken Temperaturabhängigkeit kann diese aber durch leichte Erwärmung der IL deutlich verringert werden. So weist zum Beispiel [BMIM][PF<sub>6</sub>] bei 25°C eine gegenüber 20°C um 37 % verringerte Viskosität auf.

Die Viskosität wird vor allem durch Van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen bestimmt. Die Van-der-Waals-Kräfte zwischen den Kationen sind dafür verantwortlich, dass mit zunehmender Alkylkettenlänge auch die Viskosität der ionischen Flüssigkeit steigt (Bonhôte *et al.* 1996). Die Anionen erhöhen diese dagegen durch den Aufbau von Wasserstoffbrückenbindungen (Suarez *et al.* 1998). Verunreinigungen mit Chlor oder Wasser können darüber hinaus ebenfalls deutliche Viskositätsänderungen bewirken. Während allerdings die Anwesenheit von Chlor die Viskosität der ionischen Flüssigkeit erhöht, hat Wasser einen gegenteiligen Effekt.

### *Dichte*

Die Dichte von ionischen Flüssigkeiten bestimmt in Zweiphasensystemen die Geschwindigkeit der Phasentrennung. Im Allgemeinen steigt die Dichte mit der Molekularmasse des Anions, während sich die Größe des Kations entgegengesetzt auswirkt. Die Abhängigkeit von der Temperatur und der Konzentration potentieller Verunreinigungen ist im Vergleich zur Viskosität vernachlässigbar. Für die meisten ionischen Flüssigkeiten liegt die Dichte in einem Bereich zwischen  $1,05 \text{ g mL}^{-1}$  bis  $2,4 \text{ g mL}^{-1}$ .

### *Löslichkeiten*

Werden ionische Flüssigkeiten in Zweiphasensystemen als Alternative zu organischen Lösungsmitteln eingesetzt, ist nicht nur die Löslichkeit der Substrate bzw. Produkte in der IL von Interesse, sondern auch die Löslichkeit der IL in der wässrigen Phase. Im Allgemeinen weisen ionische Flüssigkeiten ähnliche Lösungsmiteigenschaften auf wie kurzkettige Alkohole und dipolare, aprotische Lösungsmittel. Die Lipophilität der IL steigt mit zunehmender Alkylkettenlänge des Kations. Hydrophile und geladene Moleküle sind nur in ionischen Flüssigkeiten mit weniger lipophilen Seitenketten löslich. Alkane und andere nicht-polare organische Lösungsmittel sind in den meisten Fällen nicht mit ILs mischbar.

Die Ausbildung einer ausgeprägten Mischungslücke zwischen ionischer Flüssigkeit und einer wässrigen Phase, bei gleichzeitig niedriger Löslichkeit der IL in der wässrigen Phase, ist neben der Alkylkettenlänge des Kations auch stark von dem Anion abhängig. So nimmt die Löslichkeit der ILs in Wasser in der Reihenfolge der Anionen [PF6], [NTF], [FAP] signifikant ab. In Kombination mit [HMIM] als Kation liegen diese zum Beispiel bei  $7,7 \text{ g L}^{-1}$  ([PF6]),  $1,7 \text{ g L}^{-1}$  ([NTF]) und  $0,04 \text{ g L}^{-1}$  ([FAP]) (Ranke 2007). Eine Erweiterung der Alkylkette von [BMIM][PF6] um zwei Kohlenstoffatome bewirkt eine Verringerung der Löslichkeit von  $19,3 \text{ g L}^{-1}$  auf  $7,7 \text{ g L}^{-1}$ .

Die Löslichkeit von ionischen Flüssigkeiten in Wasser ist aber nicht nur von den Anionen und Kationen abhängig, sondern auch von der Temperatur. So zeigen zum Beispiel die für [BMIM][PF6] bei  $25^\circ\text{C}$ ,  $35^\circ\text{C}$  und  $50^\circ\text{C}$  ermittelten Löslichkeiten von  $20 \text{ g L}^{-1}$ ,  $22 \text{ g L}^{-1}$  und  $27 \text{ g L}^{-1}$ , dass mit zunehmender Temperatur auch mit einer erhöhten Wasserlöslichkeit zu rechnen ist (Anthony *et al.* 2001). Damit ist auch zu vermuten, dass die Temperatur zudem einen Einfluss auf die Löslichkeit von Substanzen in der IL besitzt. Dieser Zusammenhang ist bisher allerdings noch nicht ausreichend untersucht worden.

Eine zuverlässige Methode, die Wasserlöslichkeit von ionischen Flüssigkeiten zu berechnen, wurde erstmalig von Ranke *et al.* (2008) präsentiert. Die Berechnung erfolgt über Kation-spezifische Hydrophobizitätsparameter  $k_{0,c}$  und Anion-spezifische Hydrophobizitätskonstanten  $c_a$ . Sind diese bekannt, lässt sich die Wasserlöslichkeit von beliebigen Anion-Kation-Kombinationen ermitteln. Der Hydrophobizitätsparameter des Kations entspricht hierbei dem charakteristischen Kapazitätsfaktor und lässt sich über die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) als Verhältnis der Aufenthaltszeiten des Kations in stationärer und mobiler Phase bestimmen. Die Hydrophobizitätskonstante  $c_a$  ergibt sich aus dem Vergleich der Wasserlöslichkeiten von ionischen Flüssigkeiten mit gleichem Anion aber unterschiedlichem Kation. Eine ausführlichere Darstellung der Vorgehensweise zur Ermittlung der Hydrophobizitätsparameter erfolgt in Ranke *et al.* (2007).

### *Polarität*

Die Polarität von Lösungsmitteln wirkt sich nicht nur auf die Lösungseigenschaften aus, sondern besitzt auch einen erheblichen Einfluss auf den Verlauf und das Gleichgewicht chemischer Reaktionen. Ionische Flüssigkeiten sind polare Lösungsmittel, deren Polarität zwischen Wasser und chlorierten Lösungsmitteln liegt (Aki *et al.* 2001). Die Polaritäten der auf 1,3-Dialkyl-imidazolium basierenden ILs können mit denen von kurzkettigen, primären Alkoholen und anderen polaren, aprotischen Lösungsmitteln verglichen werden (Muldoon *et al.* 2001). Lediglich Tetraalkylammonium-ILs sind relativ unpolar.

### *Toxizität*

Die Toxizität von ionischen Flüssigkeiten besitzt eine große Relevanz für deren Handhabung und deren Einsatz bei biokatalytischen Prozessen. Entgegen der weit verbreiteten Meinung, dass organische Lösungsmittel mit zunehmenden  $\log P$  (Verteilungskoeffizient des betreffenden Lösungsmittels zwischen Oktanol und Wasser) eine verminderte Toxizität gegenüber Bakterien aufweisen (Laane *et al.* 1986), lässt sich die Toxizität von ionischen Flüssigkeiten nicht von diesem Wert ableiten. Aufgrund ihres sich mit zunehmender Alkylkettenlänge verstärkenden Tensid-Charakters, und dem damit verbundenen Zellmembranpermeabilisierungspotential, weisen ionische Flüssigkeiten mit längerer Alkylkette, trotz höherem  $\log P$ , eine höhere Toxizität bezüglich aquatischer Organismen auf (Cross 1994, Ranke *et al.* 2004, Swatlowski *et al.* 2004).

Zur besseren und schnelleren Abschätzung der Toxizität von ILs kann der Hydrophobizitätsparameter  $k_{0,c}$  ebenfalls herangezogen werden (Ranke *et al.* 2007). Ausgiebige Unter-

suchungen hinsichtlich der Cytotoxizität (Stolte *et al.* 2007<sup>a</sup>) und der aquatischen Toxizität (Stolte *et al.* 2007<sup>b</sup>) von ionischen Flüssigkeiten konnten einen linearen Zusammenhang zwischen dem logarithmierten Hydrophobizitätsparameter  $\log k_{o,c}$  und der logarithmierten effektiven Konzentration  $\log EC_{50}$  aufzeigen ( $EC_{50}$  - Konzentration eines Stoffes, die bei 50 % einer Zellpopulation eine definierte Wirkung auslöst). Demnach nimmt die Toxizität mit der Hydrophobizität der IL zu. Den größten Einfluss auf die Hydrophobizität und Cytotoxizität besitzen hierbei die Seitenketten des Kations, während die Kopfgruppen eine eher untergeordnete Rolle spielen. Auch bezüglich der aquatischen Toxizität gegenüber *Vibrio fischeri*, *Lemna minor* und *Scenedesmus vacuolatus* wirkt sich die Hydrophobizität der Kationen-Kopfgruppen weniger stark aus, wie die der Alkylseitenketten. Funktionalisierte kurze Seitenketten können die Toxizität aber um bis zu sechs Zehnerpotenzen gegenüber nicht polaren Alkylketten senken. Die geringste Kopfgruppen-Toxizität zeigen die Morpholinium-ILs. Der Einfluss des Anions ist bisher noch wenig untersucht. Für hohe  $\log k_o$  wird die Cytotoxizität der ionischen Flüssigkeit aber von dem Kation dominiert.

### 3.1.3 Einsatzgebiete ionischer Flüssigkeiten in der Biokatalyse

Mit der Entwicklung deutlich hydrolysestabilerer ILs und dem ersten erfolgreichen Einsatz von ILs in einer enzymatischen Reaktion im Jahr 2000 (Erbeldinger *et al.* 2000) gewannen ionische Flüssigkeiten als Ersatz für organische Lösungsmittel schlagartig auch für die Biokatalyse an Bedeutung (Gordon 2001, Sheldon *et al.* 2002, Kragl *et al.* 2002, Park *et al.* 2003, van-Rantwijk *et al.* 2003, Pfründer *et al.* 2004, Yang *et al.* 2005). Sämtliche in Kombination mit ionischen Flüssigkeiten durchgeführten Biotransformationen lassen sich hierbei in vier unterschiedliche Kategorien einteilen:

#### *Rein-enzymatische Biokatalyse in reiner IL*

Die Durchführung von Biotransformationen in einer ionischen Flüssigkeit unter Verwendung eines aufgereinigten Enzyms setzt eine ausreichende Enzymstabilität in der jeweiligen IL voraus. Im Allgemeinen zeigen nur diejenigen Enzyme eine katalytische Aktivität, die sich nicht in der ionischen Flüssigkeit lösen, während die löslichen von dieser inaktiviert werden. Als Ursache hierfür wird vermutet, dass das IL-Kation bzw. -Anion mit den geladenen Gruppen des Enzyms interagiert und dadurch eine Strukturänderung des Enzyms bewirkt (Yang *et al.* 2005). Von entscheidender Bedeutung für die Enzymaktivität scheint aber das Anion der IL zu sein: In ionischen Flüssigkeiten, die [BF<sub>4</sub>]-, [PF<sub>6</sub>]- oder [NTF]-Anionen aufweisen, bleiben die Enzyme aktiv (Lozano1 *et al.* 2001), wohingegen [NO<sub>3</sub>]-, [CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>]-,

[CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>]- und [CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]-Anionen eine vollständige Inaktivierung der Enzyme bewirken (Kaar *et al.* 2003).

Die Synthese des Dipeptids Z-Aspartam unter Verwendung der Protease Thermolysin war die erste Biokatalyse, die erfolgreich in einer mit Puffer gesättigten ionischen Flüssigkeit durchgeführt wurde (Erbeldinger *et al.* 2000). Die Reaktionsgeschwindigkeit war hierbei vergleichbar mit denen in organischen Lösungsmitteln bei gleichzeitig erhöhter Enzymstabilität. Mit der *Candida antarctica* Lipase B erfolgte der erste erfolgreiche Einsatz einer Lipase (Lau *et al.* 2000). Auch hier ließ sich die Enzymstabilität durch die Verwendung von ILs anstelle von organischen Lösungsmitteln deutlich verbessern. Mittlerweile existieren eine Vielzahl von Veröffentlichungen, die die katalytische Aktivität von Lipasen in ionischen Flüssigkeiten bei Veresterungen, Umesterungen, Perhydrolysen, Ammonolysen und bei enzymatischen Trennungen racemischer Gemische belegen (Lau *et al.* 2000, Park *et al.* 2001, Lozano *et al.* 2001, Kim *et al.* 2001, Schöfer *et al.* 2001). Der Einsatz von ILs wirkte sich hierbei nicht nur positiv auf die Enzymstabilität aus, sondern verbesserte vielfach auch die Reaktionsgeschwindigkeit, die Regioselektivität und die Enantioselektivität.

#### *Rein-enzymatische Biokatalyse in einer wässrigen Phase mit IL als Co-Lösungsmittel*

Benötigt das eingesetzte Enzym zur Entfaltung seiner katalytischen Aktivität eine wässrige Umgebung, kann eine niedrige Wasserlöslichkeit der umzusetzenden Edukte die Reaktionsgeschwindigkeit negativ beeinflussen. Diesem Problem wird entgegengewirkt, wenn wasserlösliche ionische Flüssigkeiten als Löslichkeitsvermittler eingesetzt werden. So kann zum Beispiel durch Zugabe von 40 % v/v [MMIM][MeSO<sub>4</sub>] die Löslichkeit von Acetophenon in der wässrigen Phase um das zehnfache erhöht werden (Kragl *et al.* 2002). Grundvoraussetzung ist allerdings, dass die eingesetzte IL die Aktivität des Enzyms nicht signifikant mindert.

Ein weiterer Vorteil der Verwendung von ionischen Flüssigkeiten als Co-Lösungsmittel liegt in der Möglichkeit, unerwünschte Nebenreaktionen zu unterdrücken. So kommt es zum Beispiel in einem rein wässrigen Medium bei der Synthese von N-Acetyllaktosamin mit Hilfe der  $\beta$ -Galaktosidase von *Bacillus circulans* zu einer Sekundärhydrolyse des Produkts, wodurch die chemische Ausbeute stark gemindert wird. Findet die Biokatalyse allerdings in einer wässrigen Lösung mit 25 % v/v [MMIM][MeSO<sub>4</sub>] statt, lässt sich die unerwünschte Hydrolyse des Produkts unterdrücken und die Ausbeute auf 60% verdoppeln (Kaftzik *et al.* 2002).

### *Rein-enzymatische Biokatalyse in einem zweiphasigen IL/Wasser-System*

Ist das Enzym weder in der reinen ionischen Flüssigkeit, noch in einer wässrigen IL-Lösung stabil, bietet sich eine zweiphasige Reaktionsführung unter Verwendung einer nicht mit Wasser mischbaren IL an. Erstmalige Anwendung fand dieses Konzept bei der enantioselektiven Reduktion von 2-Oktanon zu (R)-2-Oktanol mit Hilfe einer Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (Eckstein *et al.* 2004). Die hier eingesetzte IL [BMIM][NTF] diente als Substrat-Reservoir und *in-situ*-Extraktionsmittel. Die Cofaktorregenerierung von NADP<sup>+</sup> wurde über seinen Substrat-gekoppelten Ansatz mit 2-Propanol als Cosubstrat sichergestellt (siehe auch Kapitel 3.2.4). Das als Coprodukt entstehende Aceton ließ sich aufgrund des im Vergleich zu 2-Propanol höheren Verteilungskoeffizienten bevorzugt aus der wässrigen Umgebung des Enzyms extrahieren, während die Konzentration an 2-Propanol in der wässrigen Phase ausreichend hoch blieb. Auf diese Weise wurde nicht nur die Gefahr einer durch Aceton bedingten Inhibierung der Cofaktorregenerierung vermieden, sondern auch gewährleistet, dass das Gleichgewicht der cofaktorregenerierenden Reaktion auf der Seite des Coprodukts lag. Durch die Verwendung von [BMIM][NTF] ließ sich – im Vergleich zu einem zweiphasigen System mit MTBE – die Reaktionsgeschwindigkeit somit deutlich verbessern.

### *Ganzzell-Biokatalyse in einem zweiphasigen IL/Wasser-System*

Die Ganzzell-Biokatalyse ist vor allem für Anwendungen interessant, bei denen das zelleigene Cofaktorregenerierungssystem ausgenutzt werden soll, wie zum Beispiel bei asymmetrischen Synthesen mit Oxidoreduktasen. Durch den Einsatz der ganzen Zelle kann nicht nur auf die kostenintensive Aufreinigung der gewünschten Enzyme verzichtet werden, sondern – wenn die Zellmembran während der gesamten Biokatalyse intakt bleibt – auch auf die Zugabe von teuren Cofaktoren wie NAD(P)H. Die integrale Zelle erfüllt dann als eine in sich geschlossene Einheit die Funktion eines „Enzymreaktors im nL-Maßstab“ (Weuster-Botz 2007).

Sind Edukt und Produkt schlecht wasserlöslich oder in der wässrigen Phase nicht ausreichend stabil, bedingt dies eine zweiphasige Prozessführung. Als Substrat-Reservoir und *in-situ*-Extraktionsmittel besteht aber die Hauptaufgabe des nicht mit Wasser mischbaren Lösungsmittels darin, über hohe Verteilungskoeffizienten die Konzentration von Edukt und Produkt in der wässrigen Phase soweit abzusenken, dass es zu keiner Schädigung der Zellmembran und somit auch zu keinem Cofaktor-Verlust über die Zellmembran kommt.

Das Ziel, eine Beeinträchtigung der Zellmembran während der Biokatalyse zu vermeiden, kann allerdings nur erreicht werden, wenn auch das Lösungsmittel seinerseits keinen negativen Einfluss auf den Ganzzell-Biokatalysator besitzt und dementsprechend eine ausreichende Verträglichkeit (Biokompatibilität) aufweist.

Cull *et al.* (2000) berichteten erstmalig über die Verwendung einer ionischen Flüssigkeit anstelle von organischen Lösungsmitteln in einer zweiphasig geführten Ganzzell-Biotransformation, ohne allerdings eine Verbesserung der Reaktionsgeschwindigkeit bzw. Ausbeute aufzeigen zu können. Howarth *et al.* (2001) verwendeten in einem zweiphasigen Umsetzungsmedium mit [BMIM][PF<sub>6</sub>] immobilisierte Bäckerhefe als Biokatalysator für die Reduktion verschiedener Ketone. Eine Verbesserung durch die Verwendung der IL konnte aber auch hier nicht evident nachgewiesen werden. Dieser Nachweis gelang erst Pfründer *et al.* (2004) anhand der asymmetrischen Reduktion von 4-Chloracetophenon zu (R)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol mit *Lactobacillus kefir*-Zellen. In zweiphasigen geführten Reaktionen konnten mit drei verschiedenen ionischen Flüssigkeiten unter Ausnutzung des zelleigenen Cofaktorregenerierungssystems, im Vergleich zur Verwendung von MTBE, zwanzigfach höhere Ausbeuten bei gleichzeitig sehr hohen Produktkonzentrationen erzielt werden. Trotz des hier aufgezeigten großen Potentials wurde aber erst in sechs weiteren Veröffentlichungen über eine erfolgreiche Anwendung von Ganzzell-Biotransformationen mit ionischen Flüssigkeiten berichtet (Baumann *et al.* 2005, Pfründer *et al.* 2006, Matsuda *et al.* 2006, Lou *et al.* 2006, Schroer *et al.* 2007, Cornmell *et al.* 2008).

## 3.2 Ganzzell-Biokatalyse

Die Ganzzell-Biokatalyse nutzt die katalytische Aktivität von Enzymen, die während der chemischen Reaktion innerhalb von integralen biologischen Zellen vorliegen. Gegenüber der enzymatischen Katalyse profitiert diese von einer einfachen Katalysatorherstellung und kommt ohne kostenintensive Aufreinigungsschritte aus. Im Falle von Redox-Reaktionen, die von teuren Cofaktoren wie Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD), Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADP) oder Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) abhängig sind, kann bei der Ganzzell-Biokatalyse zudem das zelleigene Cofaktorregenerierungssystem genutzt werden und erfordert somit keine zusätzliche Zugabe von Cofaktoren und Cofaktorregenerierungsenzymen.

### 3.2.1 Einsatzgebiete der Ganzzell-Biokatalyse

Die Ganzzell-Biokatalyse findet eine immer größere Bedeutung bei der Herstellung von Feinchemikalien für die Agro-, Nahrungsmittel- und Pharmaindustrie (Faber 1997, Liese *et al.* 2000<sup>a</sup>, Liese *et al.* 2000<sup>b</sup>, Patel 2002, Schmid *et al.* 2001, Straathof *et al.* 2002, Goldberg *et al.* 2007). Mit ihrer Hilfe können Reaktionen im Gegensatz zur chemischen Synthese unter deutlich milderen Bedingungen durchgeführt werden. Ihre hohe Enantio- und Regioselektivität bietet darüber hinaus den Vorteil auf spezielle Schutzgruppen verzichten zu können (Bertau *et al.* 2002, Nakamura 2003, Bommarius *et al.* 2004). Dies verringert nicht nur die Menge an unerwünschten Nebenprodukten, sondern vereinfacht zudem die oftmals sehr aufwendige und kostenintensive Produktaufreinigung. Ein weiterer Vorteil der Biokatalyse besteht darin, dass teilweise Umsetzungen durchgeführt werden können, die in der chemischen Synthese nicht möglich sind oder aber mehrere Reaktionsschritte erfordern würden. Mit der unendlichen Anzahl an Mikroorganismen steht hierfür eine fast unbegrenzte Auswahl an unterschiedlichen Biokatalysatoren zur Verfügung. Die modernen Methoden der Gentechnik und des evolutionären oder rationalen Designs von Enzymen eröffnen darüber hinaus große Potentiale den idealen Biokatalysator für eine gewünschte Reaktion zu finden (Robertson *et al.* 2004). Neue katalytische Biomoleküle wie zum Beispiel Ribonukleinsäuren, Antikörper oder modifizierte Cyclodextrine erweitern das unbegrenzte Angebot an Biokatalysatoren (Singh *et al.* 2002).

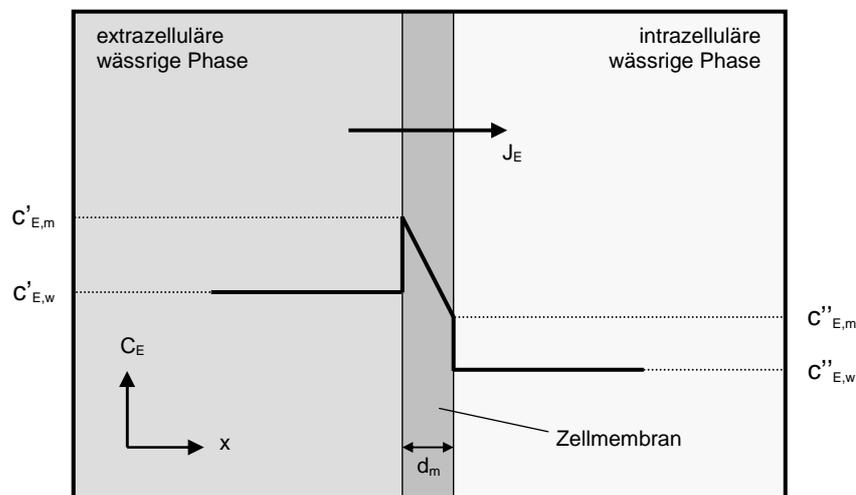
### Stofftransport und reaktionstechnische Grundlagen

Werden integrale Mikroorganismen als Biokatalysator verwendet, muss das in der wässrigen Phase vorliegende Edukt zunächst die Zellmembran passieren. In den meisten Fällen erfolgt dies durch einen passiven Transport, bei dem der Konzentrationsgradient zwischen dem umgebenden Medium und dem intrazellulären Raum die treibende Kraft darstellt. Ermöglicht wird dies durch die Permeabilität (Durchlässigkeit) der Zellmembran gegenüber kleinen Molekülen (wie zum Beispiel Wasser, Ethanol, Ammoniak, Sauerstoff, usw.) und hydrophoben Molekülen (wie zum Beispiel aromatische Aminosäuren, Fettsäuren, usw.). Für große polare Moleküle und Ionen ist die Zellmembran hingegen im Allgemeinen nicht permeabel. Diese müssen aktiv durch Proteinkanäle und spezielle Trägermoleküle in die Zelle transportiert werden.

Der Stofftransport eines lipophilen Edukts aus der wässrigen Phase durch die Zellmembran in eine Zelle kann näherungsweise durch folgende Annahmen beschrieben werden:

- a) Die Membran lässt sich als homogener Flüssigkeitsfilm betrachten. Das Edukt besitzt einen ortsunabhängigen Verteilungskoeffizienten  $K_E$  und einen ortsunabhängigen Diffusionskoeffizienten  $D_{E,m}$  in der Membran.
- b) Der Austausch von Edukt zwischen der Zellmembran und der wässrigen Phase erfolgt so schnell, dass an der Phasengrenzfläche stets ein Verteilungsgleichgewicht vorliegt.

Unter diesen Bedingungen stellt sich im stationären Zustand in der Membran ein linearer Konzentrationsverlauf ein (Abbildung 3.1)



**Abbildung 3.1** Schematische Darstellung des Konzentrationsprofils bei der Diffusion eines lipophilen Edukts aus der wässrigen extrazellulären Phase durch die Zellmembran in die biologische Zelle.  $c'_{E,w}$ ,  $c''_{E,w}$  Konzentration des Edukts in der extra- bzw. intrazellulären Kernphase.  $c'_{E,m}$ ,  $c''_{E,m}$  Gleichgewichtskonzentration des Edukts an der Zellmembran in der extra- bzw. intrazellulären Phase.

Ist also nur die Diffusion durch die Zellmembran geschwindigkeitsbestimmend, lässt sich der Stoffübergang des Edukts durch die Permeations-Flußdichte  $J_E$  beschreiben:

**Gleichung 3.1** 
$$J_E = \frac{\dot{n}_E}{A} = -D_{E,m} \cdot \frac{dc_{E,m}}{dx} = -D_{E,m} \cdot \frac{c'_{E,m} - c''_{E,m}}{d_m}$$

mit	$J_E$	Permeations-Flußdichte des Edukts, $\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$
	$\dot{n}_E$	Stoffstrom des Edukts, $\text{mol s}^{-1}$
	$A$	Zellmembranoberfläche, $\text{cm}^2$
	$D_{E,m}$	Diffusionskoeffizient des Edukts in der Zellmembran, $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$

$c'_{E,m}$	intrazelluläre Gleichgewichtskonzentration des Edukts an der Zellmembran, mol cm <sup>-3</sup>
$c'_{E,w}$	extrazelluläre Gleichgewichtskonzentration des Edukts an der Zellmembran, mol cm <sup>-3</sup>
$d_m$	Dicke der Zellmembran, cm.

Unter Einbeziehung des Edukt-spezifischen Verteilungskoeffizienten  $K_E$

**Gleichung 3.2** 
$$K_E = \frac{c'_{E,m}}{c'_{E,w}} = \frac{c''_{E,m}}{c''_{E,w}}$$

mit	$c'_{E,w}$	Konzentration des Edukts in der extrazellulären Kernphase, mol cm <sup>-3</sup>
	$c''_{E,w}$	Konzentration des Edukts in der intrazellulären Kernphase, mol cm <sup>-3</sup>

und des Permeabilitätskoeffizienten  $P_{E,d}$

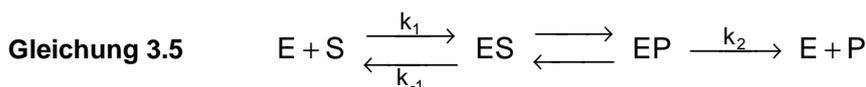
**Gleichung 3.3** 
$$P_{E,d} = \frac{K_E \cdot D_{E,m}}{d}$$

mit	$P_{E,d}$	Permeabilitätskoeffizient der Membran für das Edukt, cm s <sup>-1</sup>
-----	-----------	---

kann die Permeations-Flußdichte aus Gleichung 3.1 als Funktion der Konzentrationsdifferenz zwischen extra- und intrazellulärer Kernphase dargestellt werden:

**Gleichung 3.4** 
$$J_E = \frac{K_E \cdot D_{E,m}}{d} \cdot (c'_{E,w} - c''_{E,w}) = P_{E,d} \cdot (c'_{E,w} - c''_{E,w})$$

Hat das Edukt die Zellmembran schließlich überwunden, kann mit Hilfe der intrazellulär vorliegenden Enzyme die biokatalytische Umsetzung erfolgen. Zur Beschreibung der Enzymkinetik einer 1-Substrat-1-Produkt-Reaktion wurde von Michaelis und Menten (1913) ein hypothetisches Reaktionsschema postuliert:



mit	E	Enzym
	S	Substrat
	P	Produkt
	$k_i$	Geschwindigkeitskonstante, s <sup>-1</sup> .

Dieser Reaktionsmechanismus basiert auf folgenden drei grundlegenden Annahmen:

- Ein Enzymmolekül und ein Substratmolekül bilden einen aktivierten Enzym-Substrat-Komplex (ES).
- Der aktivierte ES-Komplex befindet sich im Fließgleichgewicht der Gesamtreaktion ( $\frac{dc_{ES}}{dt} = 0$ ).
- Die Reaktion verläuft weit entfernt vom thermodynamischen Gleichgewicht, so dass eine Rückwärtsreaktion des letzten Reaktionsschritts vernachlässigt werden kann ( $c_P \approx 0$ ).

Unter Berücksichtigung dieser Annahmen lässt sich für die Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  die in Gleichung 3.6 dargestellte klassische Michaelis-Menten-Kinetik herleiten:

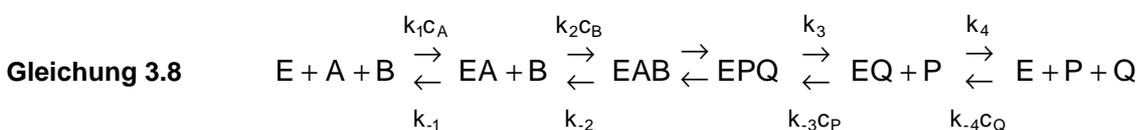
**Gleichung 3.6** 
$$v = v_{\max} \cdot \frac{c_S}{K_m + c_S}$$

mit	$v$	Reaktionsgeschwindigkeit, mol s <sup>-1</sup>
	$v_{\max}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit, mol s <sup>-1</sup>
	$c_S$	Konzentration des Substrats, mol L <sup>-1</sup>
	$K_m$	Halbsättigungskonzentration, mol L <sup>-1</sup> .

Die Halbsättigungskonzentration  $K_m$  ist über die Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Reaktionsschritte definiert (Gleichung 3.7) und kennzeichnet die Substrat-Konzentration, bei der die Reaktion halb-maximal abläuft.

**Gleichung 3.7** 
$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$$

Wird von dem Enzym aber nicht nur ein Edukt umgesetzt, sondern erfolgt eine Umsetzung von zwei verschiedenen Substraten A und B zu zwei verschiedenen Produkten P und Q („*Bi-Bi*“-Mechanismus) und werden die Substrate bzw. Produkte in einer definierten Reihenfolge angelagert bzw. freigesetzt („*Ordered Bi-Bi*“-Mechanismus), ergibt sich das in Gleichung 3.8 dargestellte Reaktionsschema (Bisswanger 2000):



mit	E	Enzym
	A	Substrat 1
	B	Substrat 2
	P	Produkt 2
	Q	Produkt 1
	$k_i$	Geschwindigkeitskonstante, $s^{-1}$ .

Viele Alkoholdehydrogenasen, wie zum Beispiel die Pferdeleber-ADH (Plapp *et al.* 1973), die *Saccharomyces cerevisiae*-ADH (Ganzhorn *et al.* 1987) oder auch die von *Rhodococcus ruber* (Kosjek *et al.* 2004), weisen eine Enzymkinetik nach diesem Mechanismus auf (Bränden *et al.* 1975). Hierbei bindet zunächst der Cofaktor NADPH (Substrat 1) an das aktive Zentrum der Alkoholdehydrogenase. Erst danach kann das umzusetzende Keton (Substrat 2) ebenfalls von dem Enzym-Substrat1-Komplex aufgenommen werden. Sind die Substrate schließlich im Enzymkomplex zu den Produkten umgesetzt, erfolgt zuerst die Freisetzung von dem Alkohol (Produkt 2) und anschließend die von  $NADP^+$  (Produkt 1).

Die *Candida boidinii* Formiatdehydrogenase weist ebenfalls eine Enzymkinetik entsprechend dem *Ordered Bi-Bi*-Mechanismus auf (Kato *et al.* 1979). Auch bei diesem Enzym muss zunächst der Cofaktor  $NAD^+$  gebunden sein, bevor Formiat aufgenommen werden kann. Nach der Umsetzung zu den Produkten wird als erstes Kohlendioxid und danach NADH freigesetzt.

Unter Berücksichtigung des in Gleichung 3.8 dargestellten Reaktionsschemas kann die Kinetik nach dem *Ordered Bi-Bi*-Mechanismus mit Gleichung 3.9 beschrieben werden (Bisswanger 2000):

**Gleichung 3.9**

$$v = \frac{V_1 V_2 \cdot \left( c_A c_B - \frac{c_P c_Q}{K_g} \right)}{K_{iA} K_{mB} V_2 + K_{mB} V_2 c_A + K_{mA} V_2 c_B + \frac{K_{mQ} V_1 c_P}{K_g} + \frac{K_{mP} V_1 c_Q}{K_g} + V_2 c_A c_B + \frac{K_{mQ} V_1 c_A c_P}{K_{iA} K_g} + \frac{K_{mA} V_2 c_B c_Q}{K_{iQ}} + \frac{V_1 c_P c_Q}{K_g} + \frac{V_2 c_A c_B c_P}{K_{iP}} + \frac{V_1 c_B c_P c_Q}{K_{iB} K_g}}$$

mit  $V_1 = \frac{k_3 k_4 c_{E_0}}{k_3 + k_4}$ ,  $V_2 = \frac{k_{-1} k_{-2} c_{E_0}}{k_{-1} + k_{-2}}$ ,

$$K_{mA} = \frac{k_3 k_4}{k_1 \cdot (k_3 + k_4)}, \quad K_{mB} = \frac{k_4 (k_{-2} + k_3)}{k_2 \cdot (k_3 + k_4)},$$

$$K_{mP} = \frac{k_{-1} (k_{-2} + k_3)}{k_{-3} \cdot (k_{-1} + k_{-2})}, \quad K_{mQ} = \frac{k_{-1} k_{-2}}{k_{-4} \cdot (k_{-1} + k_{-2})},$$

$$K_{iA} = \frac{k_{-1}}{k_1}, \quad K_{iB} = \frac{k_{-1} + k_{-2}}{k_2},$$

$$K_{iQ} = \frac{k_4}{k_{-4}}, \quad K_{iP} = \frac{k_3 + k_4}{k_{-3}},$$

$$K_g = \frac{k_1 k_2 k_3 k_4}{k_{-1} k_{-2} k_{-3} k_{-4}}$$

$c_A$	Konzentration von Substrat 1, mol L <sup>-1</sup>
$c_B$	Konzentration von Substrat 2, mol L <sup>-1</sup>
$c_P$	Konzentration von Produkt 2, mol L <sup>-1</sup>
$c_Q$	Konzentration von Produkt 1, mol L <sup>-1</sup>
$V_1$	Maximalgeschwindigkeit der Hinreaktion, mol s <sup>-1</sup>
$V_2$	Maximalgeschwindigkeit der Rückreaktion, mol s <sup>-1</sup>
$K_{m-}$	Halbsättigungskonzentrationen, mol L <sup>-1</sup>
$K_{i-}$	Dissoziations- bzw. Hemmkonstanten, mol L <sup>-1</sup>
$K_g$	Gleichgewichtskonstante der Reaktion, - .

Liegt zu Beginn der Reaktion weder Produkt 1 ( $c_Q \approx 0$ ) noch Produkt 2 ( $c_P \approx 0$ ) vor, ergibt sich aus Gleichung 3.9 für die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit:

**Gleichung 3.10** 
$$v = \frac{V_1 c_A c_B}{K_{iA} K_B + K_B c_A + K_A c_B + c_A c_B} .$$

Nach der Umsetzung des Edukts zum gewünschten Produkt, diffundiert das Produkt über die Zellmembran in die wässrige Phase. Der Stoffübergang kann hierbei analog zu dem des Edukts definiert werden:

**Gleichung 3.11** 
$$J_P = P_{P,d} \cdot (c'_{P,w} - c''_{P,w}) .$$

Anhand dieser Gleichung wird auch deutlich, dass ein Stoffübergang nur dann erfolgen kann, wenn die intrazelluläre Produktkonzentration höher als in der wässrigen Phase ist.

### 3.2.3 Prozessgrößen der Ganzzell-Biokatalyse

Die in dieser Arbeit für die Charakterisierung der biokatalytischen Prozesse mit ganzen Zellen benötigten Größen werden nachfolgend näher dargestellt.

Der Umsatz  $X_E$  bezeichnet den prozentualen Anteil an verbrauchtem Produkt:

**Gleichung 3.12** 
$$X_E = \frac{n_{E,0} - n_E}{n_{E,0}} \cdot 100\%$$

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

Die chemische Ausbeute  $\eta_P$  ist ein Maß für die Effektivität einer katalysierten Reaktion. Sie ist definiert als prozentualer Anteil des gebildeten Produkts am eingesetzten Edukt, korrigiert durch das stöchiometrische Verhältnis. Im Falle von chiralen Produkten findet nur das gewünschte Enantiomer als Produkt Berücksichtigung. Im Gegensatz zur Prozessausbeute, die den gesamten Prozess berücksichtigt und somit die Menge des Produkts, die – zum Beispiel durch Extraktion – auch tatsächlich in reiner Form gewonnen werden kann, bezieht sich die chemische Ausbeute nur auf die chemische Reaktion an sich.

**Gleichung 3.13** 
$$\eta_P = \frac{n_P - n_{P,0}}{n_{E,0}} \cdot \frac{|v_E|}{|v_P|} 100\%$$

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

Aufgrund der hohen Kosten, die eine Aufreinigung von Enantiomeren verursacht, ist der prozentuale Enantiomerenüberschuss  $ee$  (*enantiomeric excess*) ein wichtiges Maß für die Reinheit von chiralen Produkten.

**Gleichung 3.14** 
$$ee = \frac{n_{(R)} - n_{(S)}}{n_{(R)} + n_{(S)}} \cdot 100\%$$

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

Um die Effizienz und Produktivität eines Prozesses beurteilen zu können, wird als Maß die Raum-Zeit-Ausbeute RZA herangezogen.

**Gleichung 3.15** 
$$RZA = \frac{m_P}{t \cdot V_R}$$

mit	RZA	Raum-Zeit-Ausbeute, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
	$m_P$	Masse des gewonnenen Produkts, g
	t	Reaktionszeit, h
	$V_R$	Reaktionsvolumen, L.

Die Produktbildungskapazität PBK gibt die Leistungsfähigkeit des Biokatalysators wieder und ist definiert als Quotient aus Menge des gebildeten Produkts und Menge des eingesetzten Biokatalysators.

**Gleichung 3.16** 
$$PBK = \frac{n_P - n_{P,0}}{m_x}$$

mit	PBK	Produktbildungskapazität des Biokatalysators, $\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$
	$m_x$	Biotrockenmasse des eingesetzten Biokatalysators, $\text{g}_{\text{BTM}}$

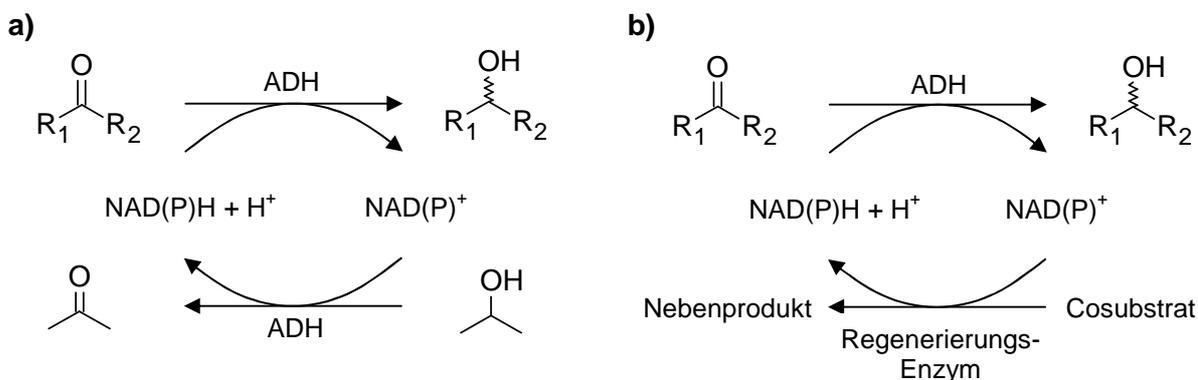
### 3.2.4 Herstellung chiraler Alkohole mittels ADH-aktiver Mikroorganismen

Chirale Alkohole besitzen als Zwischenprodukte eine wichtige Schlüsselposition bei der Entwicklung neuer Pharmazeutika, Agrochemikalien und Katalysatoren (Rosen und Daußmann 2004). Sie sind zudem wichtige Bausteine bei der Herstellung von Antidepressiva und HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine). Die chemische Synthese dieser Enantiomere erfolgt in der Regel über eine asymmetrische Hydrierung von prochiralen Ketonen unter Verwendung von boranbasierter Katalysatoren, von Platin-Cinchona-Alkaloiden oder durch Einsatz von Übergangsmetallkomplexen wie Ruthenium-BINAP (Himeda *et al.* 2003, Ohkuma *et al.* 2003, Rautenstrauch *et al.* 2003, Wills und Hannedouche 2003, Breuer *et al.* 2004). Trotz hoher Produktreinheiten sind aber oftmals zusätzliche Aufreinigungsschritte notwendig, die die Produktionskosten der chiralen Alkohole signifikant erhöhen.

Als interessante Alternative zur chemischen Synthese bietet sich die Biokatalyse an (Hage *et al.* 2001, Nakamura *et al.* 2003, Honda *et al.* 2006). Die asymmetrische Reduktion der prochiralen Ketone erfolgt hierbei durch Alkoholdehydrogenasen (ADH, EC 1.1.1.1 bzw. EC 1.1.1.2), die entweder in isolierter Form oder als Ganzzell-Biokatalysator eingesetzt werden.

Da die Alkoholdehydrogenasen zur Entfaltung ihrer katalytischen Eigenschaften aber teure Cofaktoren wie NADH (EC 1.1.1.1) und NADPH (EC 1.1.1.2) im stöchiometrischen Verhältnis zum Edukt benötigen, ist in der Regel eine Regenerierung des Cofaktors erforderlich. Die einfachste Möglichkeit bietet ein substratgekoppelter Ansatz (Abbildung 3.2a). Die cofaktorregenerierende Reaktion wird hierbei von derselben Alkoholdehydrogenase katalysiert, durch die auch die Reduktion des Ketons erfolgt. Als Cosubstrat wird in den meisten Fällen 2-Propanol verwendet. Da die Reaktion aber thermodynamisch limitiert ist und das dabei entstehende Aceton zudem toxische und inhibierende Effekte für die Biokatalyse aufweist, ist eine gleichzeitige Abtrennung des Nebenprodukts notwendig. Eine zweiphasige Prozessführung unter Verwendung eines nicht mit Wasser mischbaren Lösungsmittels hat sich hierbei als geeignete Methode erwiesen (Schroer *et al.* 2007). Als Alternative zu Aceton als Cosubstrat wird von Gupta *et al.* (2007) eine Mischung aus 4-Methyl-2-pentanol, 5-Methyl-2-hexanol und/oder 2-Heptanol vorgeschlagen. Der besondere Vorteil dieser Cosubstrate besteht darin, dass kein weiteres Lösungsmittel benötigt wird, da diese selbst die zweite nicht mit Wasser mischbare Phase bilden.

Eine weitere Möglichkeit der Cofaktorregenerierung stellt der in Abbildung 3.2b dargestellte enzymgekoppelte Ansatz dar. Die Regenerierung des Cofaktors erfolgt hierbei nicht durch die Alkoholdehydrogenase, sondern durch ein zweites Enzym. Dieser Ansatz ist allerdings nur vorteilhaft, wenn das entsprechende Regenerierungsenzym in isolierter Form günstig zur Verfügung steht, oder aber dessen kostenintensive Aufreinigung dadurch umgangen werden kann, dass in einem Ganzzell-Biokatalysator das zelleigene Regenerierungssystem genutzt wird.



**Abbildung 3.2** Schematische Darstellung der Cofaktorregenerierung am Beispiel der ADH-katalysierten Reduktion eines Ketons: a) substratgekoppelter Ansatz, b) enzymgekoppelter Ansatz.

Neben der Möglichkeit das zelleigene Cofaktorregenerierungssystem nutzen zu können, bieten Ganzzellbiokatalysatoren auch den Vorteil, dass auf die externe Zugabe von Cofaktoren ganz verzichtet werden kann. Dies setzt aber voraus, dass die Zellmembran während der Biokatalyse intakt bleibt und somit eine Freisetzung und Verdünnung der Cofaktoren vermieden wird. Der substratgekoppelte Ansatz kann in Kombination mit ganzen Zellen sinnvoll sein, wenn dadurch ein höherer Enantiomerenüberschuss erzielt wird.

Als Wildtyp-Ganzzell-Biokatalysatoren sind bei der Reduktion von Ketonen neben den bekanntesten Mikroorganismen *Saccharomyces cerevisiae* (Bertau und Burli 2000, Chin-Joe *et al.* 2002) und *Lactobacillus kefir* (Haberland *et al.* 2002, Amidjojo und Weuster-Botz 2005, Tan *et al.* 2006), auch *Neurospora crassa* (Liese *et al.* 2000), *Zygosaccharomyces rouxii* (Liese *et al.* 2000<sup>a</sup>), *Pichia mentholica* (Nanduri *et al.* 2001) und *Geotrichum candidum*

**Tabelle 3.3** Ausgewählte asymmetrische Ketonreduktionen mit rekombinanten *E.coli* (CR - Carbonylreduktase, ADH - Alkoholdehydrogenase, GDH - Glukosedehydrogenase, FDH - Formiatdehydrogenase)

Produkt	rekombinante Enzyme	Ergebnisse
(S)-4-Chlor-3-Hydroxybutyrat (Kizaki <i>et al.</i> 2001) (mit NADP <sup>+</sup> )	CR ( <i>Candida magnolia</i> ) GDH ( <i>Bacillus megaterium</i> )	ee: 99 %, Umsatz: 89 %, RZA: 150 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>
(R)-2-Methylhydroxybutyrat (Ernst <i>et al.</i> 2005)	ADH ( <i>Lactobacillus brevis</i> ) FDH ( <i>Mycobacterium vaccae</i> )	ee: 99 %, Umsatz: > 99 %, RZA: 4 g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
(S)-1-(4-Chlor-Phenyl)-Ethanol (Gröger <i>et al.</i> 2006)	ADH ( <i>Rh. Erythropolis</i> ) GDH ( <i>Bacillus subtilis</i> )	ee: 99,8 %, Umsatz: 94 %, RZA: 120 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>
(R)-1-(4-Phenoxyphenyl)-Ethanol (Gröger <i>et al.</i> 2006),	ADH ( <i>Lactobacillus kefir</i> ) GDH ( <i>Thermopl. acidophilum</i> )	ee: 99,4 %, Umsatz 95 %, RZA: 200 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>

(Patel *et al.* 1992) eingesetzt worden. Das Vorhandensein mehrerer Oxidoreduktasen mit unterschiedlichen Stereoselektivitäten limitierte aber vielfach die maximal erreichbare optische Reinheit der Produkte. Durch gezielte Überexpression gewünschter und Deletion unerwünschter Reduktasen in *Saccharomyces cerevisiae* (Rodriguez *et al.* 2001), sowie die Expression von artfremden Alkoholdehydrogenasen in Mikroorganismen wie *Escherichia coli* konnte der Enantiomerenüberschuss der chiralen Alkohole im Vergleich zu Wildtyp-Zellen deutlich verbessert werden. Die gleichzeitige Expression eines cofaktorregenerierenden Enzyms stellte eine weitere Verbesserung der rekombinanten Ganzzell-Biokatalysatoren dar. Tabelle 3.3 zeigt exemplarisch eine Auswahl von asymmetrischen Ketonreduk-

tionen mit rekombinanten *Escherichia coli*, die neben einer ADH bzw. Carbonylreduktase (CR) zusätzlich eine Formiat- bzw. Glukosedehydrogenase (FDH bzw. GDH) exprimierten. Eine ausführliche Auflistung der industriell eingesetzten Ganzzell-Biokatalysatoren findet sich in Ishige et al. (2005).

### **3.2.5 Prozesstechnische Ansätze zur Durchführung der Ganzzell-Biokatalyse**

Die Ganzzell-Biokatalyse schlecht wasserlöslicher, toxischer und instabiler Edukte in einem rein wässrigen Medium ist oftmals durch eine niedrige Effizienz gekennzeichnet. Der Einsatz von Löslichkeitsvermittlern wie kurzkettige Alkohole kann zwar die Konzentration von Edukt und Produkt in der wässrigen Phase erhöhen (Lorraine *et al.* 1996, Nakamura *et al.* 2002), aber die molekulare Toxizität und Instabilität der Substanzen nicht reduzieren. Zudem sind die verwendeten Alkohole vielfach ebenfalls toxisch für die Zelle. Zyklische Oligosaccharide (Cyclodextrine) (Singh *et al.* 2002) und selbstorganisierende Mono- und Disaccharide (Bertau und Jörg 2004) weisen diese Nachteile dagegen nicht auf. Aufgrund ihrer lipophilen Kavität können sie hydrophobe Edukte und Produkte speichern und somit die Konzentration im Reaktionsmedium verringern. Probleme bereiten hier allerdings Stoffaustausch-Limitierungen, bedingt durch die starke Edukt-Bindung im Cyclodextrin, und die unerwünschte Verstoffwechslung der Mono- und Disaccharide.

Die Adsorption von Edukt und Substrat an Harzen wie Amberlite XAD (Anderson et al. 1995) oder die Immobilisierung des Biokatalysators mit Calciumalginat und Polyamid-Mikrokapseln (Green *et al.* 1996, Fernandes *et al.* 1998, Buque *et al.* 2002) erhöht zwar die Eduktverfügbarkeit, limitiert aber auch hier den Stoffübergang. Der Versuch das Problem der niedrigen Edukt-Wasserlöslichkeit durch die Verwendung von inertem Gas zu umgehen, welches anstelle der wässrigen Phase die Zuführung des Edukts und den Abtransport des Produkts sicherstellt, scheitert ebenfalls an der niedrigen Effizienz (Maugard *et al.* 2001).

Eine Alternative zu den bereits genannten Ansätzen bietet die zweiphasige Prozessführung unter Verwendung eines nicht mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittels. Aufgrund der guten Lösungseigenschaften bezüglich hydrophober Substanzen kann die organische Lösungsmittelphase deren wässrige Konzentration herabsetzen und somit als Eduktreservoir und *In-situ*-Extraktionsmittel für das Produkt fungieren. Gleichzeitig wird dadurch eine Verminderung der Toxizität auf die Zellen erwirkt, sowie eine Verbesserung der Substrat-Stabilität (Leon *et al.* 1998, Matsumoto *et al.* 2001). Zudem bietet sich die Möglichkeit, höhere Edukt-Konzentrationen vorlegen zu können. Damit aber der Stoffüber-

gang über die Phasengrenzfläche nicht limitiert wird, muss über einen erhöhten Leistungseintrag eine ausreichende Dispergierung der organischen Lösungsmittelphase sichergestellt werden.

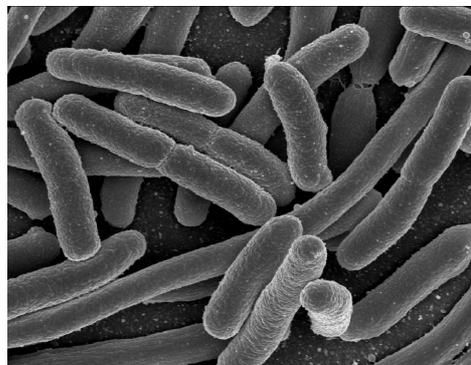
Grundvoraussetzung für die Auswahl eines organischen Lösungsmittels ist eine möglichst geringe molekulare Toxizität. Diese lässt sich über den Lösungsmittel spezifischen, logarithmierten dekadischen Verteilungskoeffizienten  $\log P$  zwischen Wasser und 1-Oktanol abschätzen (Laane *et al.* 1987). Nach Laane kann für jeden Mikroorganismus ein kritischer  $\log P$  definiert werden, den die Lösungsmittel mindestens aufweisen müssen, um nicht toxisch auf die Zellen zu wirken. Lösungsmittel mit einem  $\log P$  unterhalb des kritischen Wertes zerstören dagegen die semipermeable Barrierefunktion der Zellmembran und inaktivieren bzw. denaturieren membrangebundene Enzyme. Die Verwendung von Mikroorganismen, die von Natur aus eine besonders hohe Lösungsmittel-Toleranz aufweisen bietet eine Möglichkeit das Problem der molekularen Toxizität zu minimieren (Matsumoto *et al.* 2001, Hahn und Botzenhart 2004, Sardessai und Bhosle 2004). Da es sich bei diesen Bakterien-Stämmen aber in der Regel um keine Plattformorganismen handelt und in der Industrie zudem vermehrt rekombinante Mikroorganismen eingesetzt werden, die im Vergleich zu den Wild-Stämmen eine noch höhere Empfindlichkeit besitzen, muss die Lösung des Problems über die Auswahl eines biokompatibleren Lösungsmittels erfolgen. Als Alternative zu den organischen Lösungsmitteln bieten sich hier neben überkritischen Fluiden (Matsuda *et al.* 2000) vor allem ionische Flüssigkeiten an (Cull *et al.* 2000, Howarth *et al.* 2001, Pfründer *et al.* 2004). Zur Beurteilung der Toxizität von ionischen Flüssigkeiten kann aufgrund ihres Tensidcharakters der spezifische  $\log P$  aber nicht herangezogen werden. Im Gegensatz zu organischen Lösungsmitteln steigt nämlich im Allgemeinen die Toxizität von ILs mit dem  $\log P$ . Um sich von der für organische Lösungsmittel geltenden  $\log P$ -Theorie von Laane *et al.* (1987) abzugrenzen, wurde daher von Ranke *et al.* (2007) für die Abschätzung der molekularen Toxizität von ILs der über HPLC leicht ermittelbare Hydrophobizitätsparameter  $\log k_0$  eingeführt (Kapitel 3.1.2).

### 3.3 *Escherichia coli*

Da in dieser Arbeit als Biokatalysatoren rekombinante *Escherichia coli* Verwendung finden, soll nachfolgend eine kurze Darstellung allgemeiner Grundlagen erfolgen. Von besonderer Bedeutung für die spätere Anwendung sind zudem die Glykolyse, wie auch der Aufbau der Zellmembran und Zellwand.

#### 3.3.1 Allgemeine Grundlagen

*Escherichia coli* (*E.coli*) wurden 1885 von Theodor Escherich entdeckt und 1919 nach ihrem Entdecker benannt. Als Darmbakterien zählen sie zur Familie der Enterobacteriaceae. Sie sind stäbchenförmig (Abbildung 3.3), Gram-negativ und bilden keine Sporen. Ihre peritriche Begeißelung ermöglicht es ihnen, sich gezielt in Richtung von Nährstoff-Anhäufungen zu bewegen oder hohen Salz- bzw. Säurekonzentrationen auszuweichen. Da sie fakultativ anaerob sind, können sie die benötigte Energie sowohl durch Atmung als auch durch gemischte Säuregärung gewinnen. Sie wachsen auf Komplexmedien, wie auch auf synthetischen Minimalmedien.



**Abbildung 3.3** Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Escherichia coli* (Techalive)

*E.coli* gehört zu den am besten untersuchten Mikroorganismen und wird daher auch als „Haustier“ der Mikro- und Molekularbiologen bezeichnet. Durch die einfache Kultivierung, das schnelle Wachstum und die genetische Manipulierbarkeit hat *E.coli* in der Gentechnik den Status eines Modellorganismus erreicht. Sein Genom ist mit ca.  $4,6 \cdot 10^6$  Basenpaaren relativ klein und besteht aus ca. 4300 Genen (Blattner *et al.* 1997). Es gehörte daher auch zu denjenigen Genomen, die als erste vollständig entschlüsselt werden konnten.

Die Geschichte der modernen Biotechnologie ist ebenfalls eng mit *Escherichia coli* verknüpft. Sie begann im Jahre 1977 mit dem erstmaligen Einsatz von gentechnisch veränderten *E.coli* zur Herstellung von menschlichem Somatostatin (Itakura *et al.* 1977). 1982 folgte die erste gentechnische Produktion von Insulin, welches zuvor nur über die Extraktion von tierischem Pankreasgewebe gewonnen werden konnte. Die Übereinstimmung mit dem menschlichen Insulin, sowie die Vermeidung von Infektionsrisiken stellten entscheidende Vorteile dar, die die Attraktivität der Biotechnologie gegenüber klassischen Produktionsverfahren in den Blickpunkt rückten. Gleichzeitig wurde damit auch der Grundstein gelegt für die Entwicklung der Biotechnologie zu einer Schlüsseltechnologie des 21. Jahrhunderts.

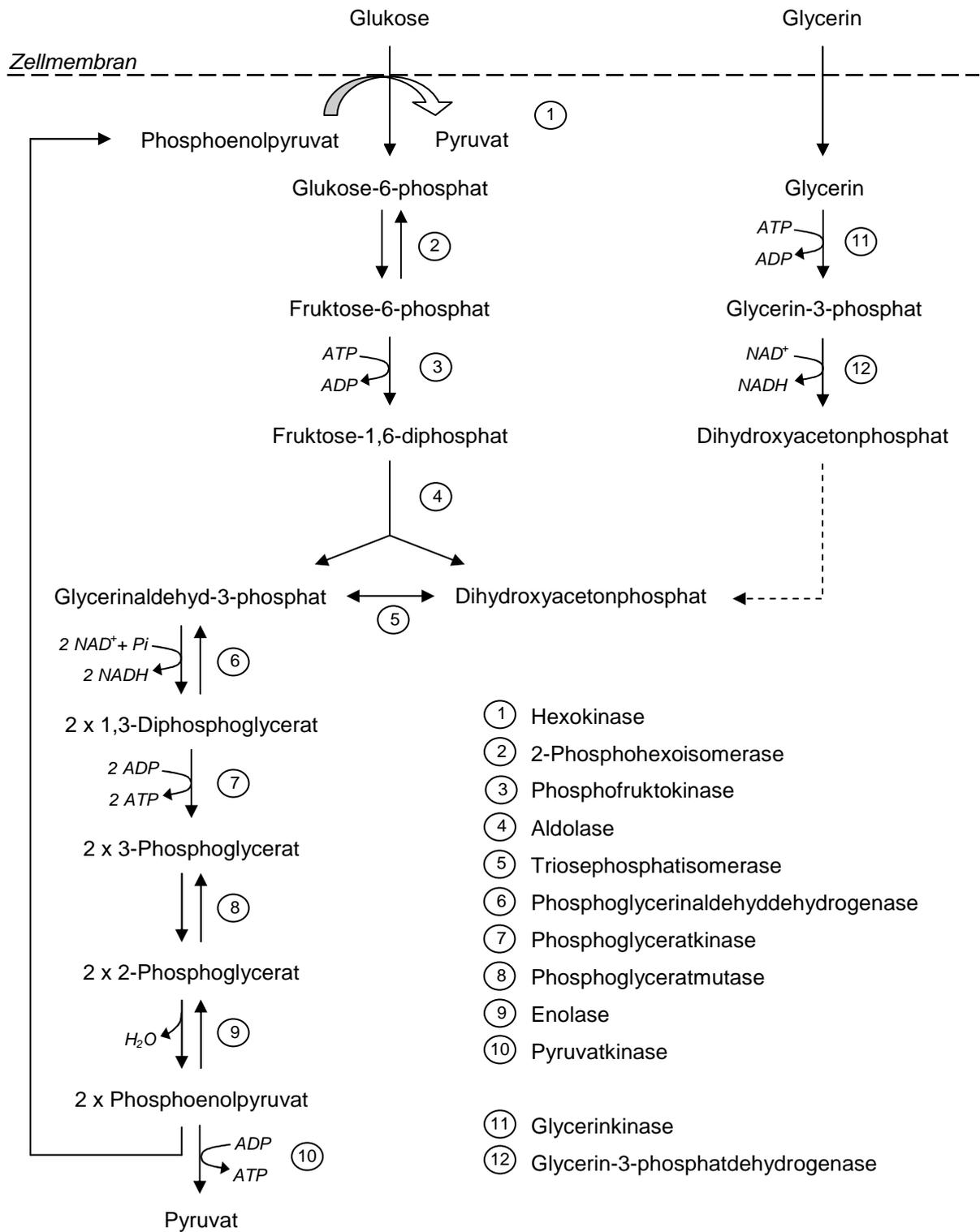
In dieser Arbeit sollen rekombinante *E.coli* als Ganzzell-Biokatalysator für die heterologe Expression von ADHs eingesetzt werden. Da sie im Gegensatz zu Hefen nur eine sehr niedrige ADH-Aktivität homologer Enzyme aufweisen (Hildebrandt *et al.* 2002), können mit ihnen deutlich höhere Enantiomerenreinheiten erzielt werden.

### **3.3.2 Energetische Verwertung von Glukose und Glycerin**

Jeder Mikroorganismus benötigt für die innerhalb der Zelle ablaufenden biochemischen Vorgänge laufend Energie in Form von ATP. Da die Synthese der Energieträgermoleküle aber selbst Energie benötigt, muss diese über den Abbau einer Kohlenstoffquelle wie Glukose oder Glycerin bereitgestellt werden.

Die energetische Verwertung von Glukose erfolgt in vier wesentlichen Schritten. In der Glykolyse (Abbildung 3.4) wird Glukose zunächst in einfachere Verbindungen abgebaut. Dazu wird bei *Escherichia coli* das Glukosemolekül mit Hilfe eines Phosphoenolpyruvat-abhängigen Phosphotransferase-Systems (PTS) in der Zellmembran phosphoryliert und gleichzeitig in die Zelle transportiert. Anschließend erfolgt ein mehrstufiger Abbau zu zwei Pyruvat-Molekülen. Die gesamte Glykolyse liefert zwei ATP, zwei NADH, benötigt keinen Sauerstoff und kann daher auch anaerob erfolgen.

Steht Glycerin als Kohlenstoffquelle zur Verfügung kann dieses, ohne Verbrauch von Phosphoenolpyruvat, über einen nicht selektiven Transporttunnel (Facilitator) in die Zelle eingeschleust werden (Maurel *et al.* 1994). Anschließend erfolgt eine zweistufige Umsetzung zu Dihydroxyacetonphosphat, welches dann über den zweiten Teil der Glykolyse weiter abgebaut wird. Auf diese Weise kann mit Glycerin ebenfalls eine ausreichende Versorgung der Zelle mit Pyruvat gewährleistet werden.



**Abbildung 3.4** Stoffwechselwege der Glykolyse und der Glycerin-Verwertung, sowie direkt beteiligte Enzyme bei *Escherichia coli* (Chemgapedia, Lengeler et al. 1999)

Bei der oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat erfolgt dann eine Abspaltung von Kohlendioxid. Das dabei entstehende Acetat wird an das Coenzym A (CoA) gebunden. Insgesamt entstehen somit aus zwei Pyruvat-Molekülen zwei Acetyl-CoA und zwei NADH.

Im Zitronensäurezyklus wird das Acetyl-CoA über mehrere Reaktionsschritte schließlich zu  $\text{CO}_2$  abgebaut. Hierzu bindet das im letzten Schritt entstehende Oxalacetat unter Aufnahme von  $\text{H}_2\text{O}$  an Acetyl-CoA. Unter Abspaltung von CoA bildet sich dann Zitronensäure, welche im Zyklus wieder zu Oxalacetat abgebaut wird. Der sich auf diese Weise schließende Kreislauf generiert aus zwei Acetyl-CoA sechs NADH, zwei  $\text{FADH}_2$  und zwei GTP.

In der nachfolgenden Atmungskette werden die bei der Glykolyse, der oxidativen Decarboxylierung und im Citratzyklus entstandenen zehn NADH, zwei  $\text{FADH}_2$  und  $12 \text{ H}^+$  zur oxidativen Phosphorylierung von ADP verwendet. Die dafür benötigte Energie wird durch Oxidation des Wasserstoffs mit elementarem Sauerstoff bereitgestellt. Entsprechend der in Tabelle 3.4 dargestellten Auflistung kann die aerobe Verstoffwechslung somit aus einem Glukose-Molekül insgesamt 38 ATP generieren.

**Tabelle 3.4** Energiebilanz bei der Verstoffwechslung von 1 mol Glukose: Ausbeute an Coenzym,  $\text{H}^+$  und ATP (Lengeler et al.1999).

	1 mol Glukose	
	Coenzym / $\text{H}^+$	ATP / GTP
Glykolyse	2 NADH + 2 $\text{H}^+$	2
ox. Decarboxylierung	2 NADH + 2 $\text{H}^+$	
Zitronensäurezyklus	6 NADH + 6 $\text{H}^+$ 2 $\text{FADH}_2$ + 2 $\text{H}^+$	2
Atmungskette		34
<b>Summe</b>		<b>38</b>

Steht den Zellen kein Sauerstoff für einen aeroben Abbau von Pyruvat zur Verfügung, erfolgt die Energiegewinnung ausschließlich über die Glykolyse. Da hierfür allerdings kein  $\text{NAD}^+$  mehr aus der Atmungskette genutzt werden kann, muss dieses durch eine Gärung regeneriert werden. Hierbei wird unter Verbrauch von NADH das Pyruvat zu Produkten wie Acetat oder Ethanol umgewandelt und aus der Zelle ausgeschleust. Das gleichzeitig gebildete  $\text{NAD}^+$  kann dann wieder für die Glykolyse genutzt werden.

Anhand dieses Zusammenhangs wird auch deutlich, dass zur Aufrechterhaltung oxidativer katabolischer Vorgänge das Verhältnis von  $[\text{NADH}]$  zu  $[\text{NAD}^+]$  niedrig gehalten werden

muss. Nach Lengeler *et al.* (1999) werden daher die Cofaktor-Konzentrationen in lebenden Zellen, entsprechend Gleichung 3.11, auf ein konstant niedriges Verhältnis geregelt:

**Gleichung 3.17** 
$$\frac{[\text{NADH}]}{[\text{NAD}^+] + [\text{NADH}]} \approx \frac{1}{20}$$

mit  $[\text{NADH}]$  Konzentration von NADH, mol L<sup>-1</sup>  
 $[\text{NAD}^+]$  Konzentration von NAD<sup>+</sup>, mol L<sup>-1</sup>.

Für anabolische Vorgänge gelten entgegengesetzte Anforderungen. Das für reduktive Biosynthesen benötigte NADPH sollte in einer höheren Konzentration vorliegen, um eine ausreichende Energieversorgung sicherstellen zu können. Dementsprechend wird nach Lengeler *et al.* (1999) in lebenden Zellen das [NADPH]/[NADP<sup>+</sup>]-Verhältnis auf einem höheren Niveau gehalten:

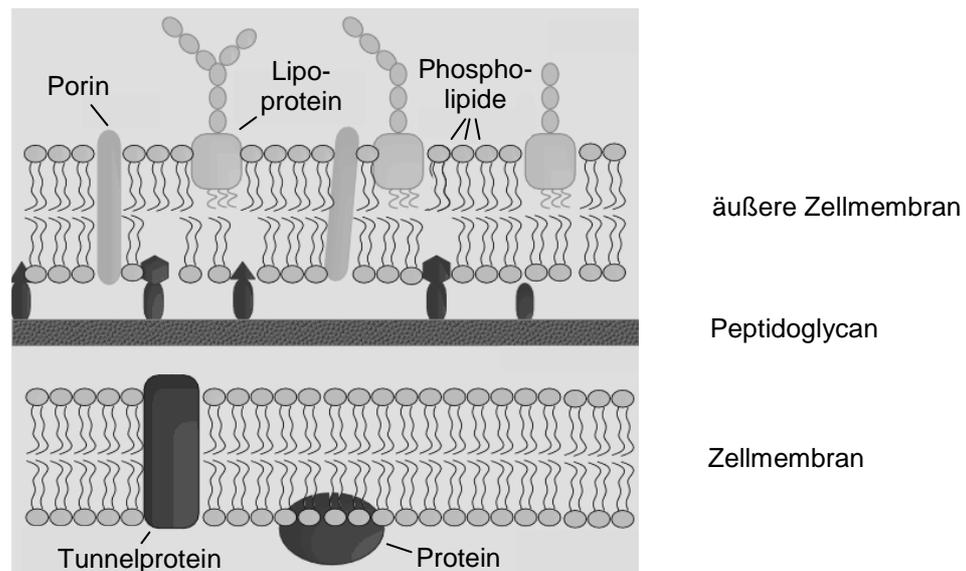
**Gleichung 3.18** 
$$\frac{[\text{NADPH}]}{[\text{NADP}^+] + [\text{NADPH}]} \approx \frac{1}{2}$$

mit  $[\text{NADPH}]$  Konzentration von NADPH, mol L<sup>-1</sup>  
 $[\text{NADP}^+]$  Konzentration von NADP<sup>+</sup>, mol L<sup>-1</sup>.

Auf diese Weise kann innerhalb der Zelle der gleichzeitige Ablauf sowohl von katabolischen als auch anabolischen Vorgängen gewährleistet werden.

### 3.3.3 Zellmembran und Zellwand

Sollen Mikroorganismen als Ganzzell-Biokatalysator eingesetzt werden, ist es von entscheidender Bedeutung, dass die Prozessbedingungen der Biotransformation so gestaltet werden, dass eine Schädigung der Cytoplasmamembran und ein damit verbundener Cofaktor-Verlust vermieden werden. Um die Ursachen einer Schädigung aber identifizieren zu können, erfordert dies auch ein Verständnis des Aufbaus von Zellmembran und Zellwand.



**Abbildung 3.5** Schematische Darstellung von Zellmembran und Zellwand bei *E. coli*  
[http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/images/book\\_4/chapter\\_2/2-43.gif](http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/images/book_4/chapter_2/2-43.gif)

Das Cytoplasma einer Zelle wird nach außen durch eine Plasmamembran abgegrenzt. Bei allen Mikroorganismen besteht diese, wie in Abbildung 3.5 dargestellt, aus einer semi-permeablen Lipiddoppelschicht, in die Proteine integriert sind. Die hydrophoben Seitenketten der Phospholipide gewährleisten hierbei eine sehr gute Permeabilität für hydrophobe unpolare Moleküle ( $O_2$ , Benzol) und eine gute Durchlässigkeit für kleine, ungeladene polare Moleküle ( $H_2O$ ,  $CO_2$ , Glycerin, Alkohole). Für große, ungeladene polare Moleküle (Zucker), für Ionen und große geladene Moleküle ist sie dagegen undurchlässig. Diese müssen daher über die in der Membran eingelagerten Transporterproteine in die Zelle eingeschleust werden. Das in *Escherichia coli* am häufigsten vorkommende Lipid ist das Phosphatidylethanolamin. Phosphatidylglycerol und Diphosphatidylglycerol sind dagegen nur in geringen Anteilen vertreten.

Die Zellwand von Gram-negativen Bakterien wie *E.coli* besteht aus einem sehr dünnen, einschichtigen Mureinnetz (Peptidoglycan). Als Sieb lässt sie die meisten Salze und niedermolekulare Substanzen passieren, gewisse Antibiotika dagegen nicht. Da diese dünne Zellwand allerdings nur einen geringen Schutz vor mechanischer Beschädigung bietet, ist dieser noch eine zweite Lipiddoppelschicht aufgelagert, die sich aber im Aufbau von der Cytoplasmamembran unterscheidet. Sie durchziehen porenformende Transmembranproteine (Porine), die dem Stofftransport von niedermolekularen Substanzen dienen. Desweiteren besteht sie aus Lipopolysacchariden, weshalb sie auch als Lipopolysaccharidschicht bezeichnet wird.

### 3.4 Heterolog exprimierte Enzyme

Durch die Expression von artfremden Alkoholdehydrogenasen in Mikroorganismen, deren homologen Enzyme eine deutlich niedrigere ADH-Aktivität aufweisen, wie zum Beispiel *Escherichia coli*, kann bei Ganzzell-Biotransformationen der Enantiomerenüberschuss der chiralen Alkohole im Vergleich zu Wildtyp-Zellen deutlich verbessert werden. Von hohen Reaktionsgeschwindigkeiten lässt sich bei der Ganzzell-Biokatalyse allerdings nur profitieren, wenn neben der ADH zusätzlich ein cofaktorregenerierendes Enzym exprimiert wird.

Die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten *Escherichia coli*-Stämme coexprimieren neben einer Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (LB-ADH) vier verschiedene Cofaktorregenerierungsenzyme. Darunter befindet sich eine Glukosedehydrogenase aus *Bacillus subtilis* (BS-GDH), eine Glukose-6-Phosphatdehydrogenase aus *Leuconostoc mesenteroides* (LM-G6PDH) sowie zwei Formiatdehydrogenasen aus *Mycobacterium vaccae* (MV-FDH) und *Candida boidinii* (CB-FDH).

#### 3.4.1 *Lactobacillus brevis* Alkoholdehydrogenase

Die *Lactobacillus brevis* Alkoholdehydrogenase gehört zur Gruppe der kurzkettigen Alkoholdehydrogenasen (EC 1.1.1.2). Sie besitzt ein Molekulargewicht von 106,4 kDA und ist ein Tetramer aus vier identischen Untereinheiten, welche aus jeweils 251 Aminosäuren bestehen (Niefind *et al.* 2003). Als (R)-spezifische Oxidoreduktase gehört sie zu den wenigen Alkoholdehydrogenasen, die das Keton nach der anti-Prelog-Regel von der *si*-Seite angreifen. Dementsprechend werden in erster Linie (R)-Alkohole gebildet (Hummel

und Riebel 2000). Zur Entfaltung ihrer Aktivität benötigt die LB-ADH  $Mg^{2+}$ . Sie akzeptiert Ketoester, aliphatische, offenkettige und zyklische Ketone, sowie Ketone mit sperrigen Seitenketten. Gegenüber Acetophenon als Substrat weist sie eine spezifische Aktivität von  $500 \text{ U mg}^{-1}$  auf. Die Eignung von anderen prochiralen Ketonen lässt sich über die in Tabelle 3.5 auf Acetophenon bezogene relative Aktivität abschätzen.

**Tabelle 3.5** Relative Aktivität von LB-ADH bezüglich verschiedener Substrate, bezogen auf Acetophenon. (Hummel und Riebel 2000)

Substrat	relative Aktivität
Acetophenon (AP)	100 %
4-Cl-Acetophenon (4-Cl-AP)	203 %
4-Cl-Acetessigsäureethylester (4-Cl-ACE)	93 %
Propiophenon (PP-ON)	17 %

Für Reduktionsreaktionen liegt der optimale pH bei 7, für oxidative Umsetzungen bei pH 8. Ihre höchste Aktivität entfaltet die LB-ADH für eine Temperatur von  $55^{\circ}\text{C}$  bei gleichzeitig ausgezeichneter Stabilität.  $Mg^{2+}$  bzw.  $Mn^{2+}$  ist essentiell für die Enzymaktivität und sollte daher in ausreichender Konzentration zur Verfügung stehen. Hinsichtlich der Cofaktor-Spezifität zeigt die LB-ADH eine Präferenz für NADPH, akzeptiert mit einer zehnfach geringeren Aktivität aber auch NADH (Ernst *et al.* 2005). Somit können zur Cofaktorerregenerierung sowohl  $NAD^{+}$ - als auch  $NADP^{+}$ -spezifische Enzyme Verwendung finden.

### 3.4.2 *Bacillus subtilis* Glukosedehydrogenase

Die *Bacillus subtilis* Glukosedehydrogenase (EC 1.1.1.47) ist ebenfalls ein Tetramer aus vier Untereinheiten und besitzt ein Molekulargewicht von 126 kDa (Lampel *et al.* 1986). Es katalysiert die Oxidation von Glukose zu Glukonolacton, bei gleichzeitiger Reduktion von  $NAD(P)^{+}$  zu  $NAD(P)H$  (Yasutaro *et al.* 1977). Im pH-Optimum von 8 liegt die GDH-Aktivität für  $NAD^{+}$  30 % höher als für  $NADP^{+}$ . Das aufgereinigte Protein zeigt bei  $37^{\circ}\text{C}$  und pH 8 eine auf  $NAD^{+}$  bezogene spezifische Aktivität von ca.  $1300 \text{ U mg}^{-1}$  (Lampel *et al.* 1986). Bei diesem pH liegt die Halbsättigungskonzentration  $K_m$  für das Substrat Glukose bei ca. 12,5 mM. Ein niedrigerer pH von 6 reduziert sowohl die spezifische Aktivität auf ca.  $350 \text{ U mg}^{-1}$  als auch den  $K_m$  auf etwa 3 mM (Ramaley und Vasantha 1983).

### 3.4.3 *Leuconostoc mesenteroides* Glukose-6-Phosphatdehydrogenase

Die Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (EC 1.1.1.49) ist ein Dimer aus zwei Untereinheiten und besitzt ein Molekulargewicht von 103,7 kDa (Olive and Levy 1971<sup>a</sup>). Es katalysiert die Oxidation von Glukose-6-Phosphat zu 6-Phosphoglucono- $\delta$ -laktone, bei gleichzeitiger Reduktion von NAD(P)<sup>+</sup> zu NAD(P)H (Rowland et al. 1994). Hinsichtlich der Cofaktor-Spezifität zeigt die LM-G6PDH eine Präferenz für NAD<sup>+</sup>, akzeptiert mit einer halb so hohen Aktivität aber auch NADP<sup>+</sup> (Adams et al. 1993). Die maximale NAD<sup>+</sup> bezogene spezifische Aktivität liegt bei etwa 400 U mg<sup>-1</sup>. Die K<sub>m</sub> für das Substrat Glukose-6-Phosphat betragen in einem Tris-HCl-Puffer bezogen auf NAD<sup>+</sup> 52,7  $\mu$ mol (pH 7,8) und bezogen auf NADP<sup>+</sup> 81  $\mu$ mol (pH 7,2) (Olive and Levy 1971<sup>b</sup>).

### 3.4.4 *Mycobacterium vaccae* N10 Formiatdehydrogenase

Die *Mycobacterium vaccae* N10 Formiatdehydrogenase (EC 1.2.1.2) ist ein Dimer aus zwei Untereinheiten und besitzt ein Molekulargewicht von 88 kDa (Popov und Lamzin 1994). Es katalysiert die irreversible Oxidation von Formiat zu Kohlendioxid, was sich positiv auf das thermodynamische Gleichgewicht auswirkt. Bei dieser Reaktion wird ausschließlich NAD<sup>+</sup> zu NADH reduziert. Die spezifische Aktivität von Formiatdehydrogenasen, sowie K<sub>m</sub> sind im Allgemeinen vom pH relativ unabhängig (Tishkov und Popov 2004). Bei einer Temperatur von 37°C beträgt die spezifische Aktivität der MV-FDH 14 U mg<sup>-1</sup> und mit einem K<sub>m</sub> von 6 mM (Galkin et al. 1995). Der optimale pH-Bereich liegt zwischen 6 und 9.

### 3.4.5 *Candida boidinii* Formiatdehydrogenase

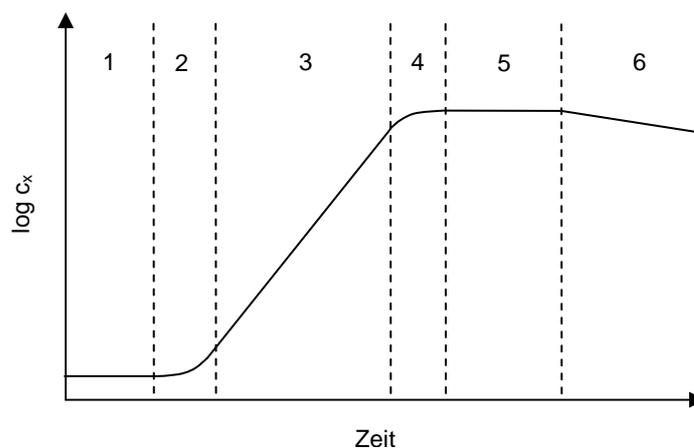
Die *Candida boidinii* Formiatdehydrogenase (EC 1.2.1.2) ist ein Dimer aus zwei Untereinheiten und besitzt ein Molekulargewicht von 88 kDa (Popov und Lamzin 1994). Das pH-Optimum liegt in einem Bereich zwischen 7 und 9 (Labrou und Rigden 2001). Bei einer Temperatur von 30°C beträgt die spezifische Aktivität der CB-FDH 6 U mg<sup>-1</sup> und der K<sub>m</sub> 5,6 mM (Tishkov und Popov 2004). Erweiterte Untersuchungen von Labrou und Rigden (2001) lieferten dagegen nur einen halb so hohen K<sub>m</sub> von 2,4 mM.

### 3.5 Herstellung von Zellen für den Einsatz als Biokatalysator

Eine möglichst effiziente Herstellung von Mikroorganismen für den Einsatz als Biokatalysator erfordert ein Verständnis der Stoffwechselfvorgänge und Modelle zur Beschreibung des Zellpopulations-Wachstums, die dann als Grundlage für die Entwicklung von verfahrenstechnischen Methoden dienen können.

#### 3.5.1 Mikrobielles Wachstum

Im Gegensatz zu autotrophen Bakterien, die ohne organische Fremdstoffen auskommen, benötigen heterotrophe Mikroorganismen für ihr Wachstum organische Kohlenstoffverbindungen, Stickstoffquellen, Mineralsalze und eventuell Vitamine. Die Medien, die für die Anzucht von heterotrophen Bakterien eingesetzt werden, lassen sich daher in zwei grundlegende Gruppen aufteilen: Minimalmedien und Komplexmedien. Ein Minimalmedium enthält die benötigten Verbindungen – wie zum Beispiel Glukose als Kohlenstoffquelle, Ammonium als Stickstoffquelle, Salze und Vitamine – in genau definierten Konzentrationen und erlaubt so einfache Elementbilanzen und reproduzierbare Kultivierungen. Im Gegensatz dazu liegen in einem Komplexmedium die essentiellen Nährstoffe als verwertbare, nicht definierte, komplexe Bestandteile in Form von Hefeextrakt, Pepton, Melasse oder Maisquellwasser vor, welche als Nebenprodukte der Lebensmittelindustrie häufig günstig zur Verfügung stehen.



**Abbildung 3.6** Wachstumsphasen einer Zellpopulation im Verlauf einer Kultivierung im Satzverfahren. 1: Adaptionphase, 2: Übergangsphase I, 3: exponentielle Phase, 4: Übergangsphase II, 5: stationäre Phase, 6: Absterbephase.

Mikroorganismen, die in einem Satzverfahren im idealen Rührkessel unter begrenzten Nährstoffbedingungen ohne limitierende Einflüsse heranwachsen, zeigen einen in Abbildung 3.6 dargestellten typischen Wachstumsverlauf. Nachdem sich die Zellen in der Adaptionsphase an die Kultivierungsbedingungen angepasst haben, setzt in der Übergangsphase ein erstes Wachstum ein. Mit Beginn des exponentiellen Wachstums hat die Zellpopulation dann eine konstante Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  erreicht, die wie folgt definiert ist:

**Gleichung 3.19** 
$$\mu \equiv \frac{1}{c_x} \cdot \frac{dc_x}{dt}$$

mit  $\mu$  Wachstumsrate,  $h^{-1}$   
 $c_x$  Konzentration der Biotrockenmasse,  $g_{\text{BTM}} L^{-1}$   
 $t$  Zeit, h.

Unter der Voraussetzung, dass die Zellmasse mit der Anzahl der Zellen korreliert, lässt sich in der exponentiellen Wachstumsphase durch Integration von Gleichung 3.19 die Entwicklung der Gesamtzellmasse als Funktion der Zeit  $t$  beschreiben:

**Gleichung 3.20** 
$$m_{x,i}(t_i) = m_{x,0} \cdot e^{\mu_{\max} \cdot t_i}$$

mit  $m_{x,i}$  Biotrockenmasse zum Zeitpunkt  $t_i$ ,  $g_{\text{BTM}}$   
 $m_{x,0}$  Biotrockenmasse zum Zeitpunkt  $t_0 = 0$ ,  $g_{\text{BTM}}$

Die Verdopplungszeit  $t_d$  einer Zellpopulation, die sich durch Teilung oder Sprossung vermehrt, ergibt sich dann durch:

**Gleichung 3.21** 
$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Ist die Konzentration eines oder mehrerer Substrate im Medium soweit abgesunken, dass das Wachstum der Kultur limitiert wird, beginnt die zweite Übergangsphase, die daher auch als Substratlimitierungsphase bezeichnet wird. Der sich auf die Wachstumsrate  $\mu$  auswirkende limitierende Einfluss eines Substrates  $S$  lässt sich hierbei durch einen formal-kinetischen Ansatz nach Monod (1949) beschreiben:

**Gleichung 3.22** 
$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_s}{K_s + c_s}$$

mit	$\mu_{\max}$	Wachstumsrate unter nicht limitierenden Bedingungen, $\text{h}^{-1}$
	$c_s$	Konzentration des limitierenden Substrats, $\text{mol L}^{-1}$
	$K_s$	Sättigungskonstante des limitierenden Substrats, $\text{mol L}^{-1}$ .

Wirken sich zwei Substrate limitierend auf das Wachstum aus und soll zusätzlich auch die Substrataufnahme für den Erhaltungsstoffwechsel  $q_{S,m}$  Berücksichtigung finden, erweitert sich Gleichung 3.22 zu:

**Gleichung 3.23** 
$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_{S_1}}{K_{S_1} + c_{S_1}} \cdot \frac{c_{S_2}}{K_{S_2} + c_{S_2}} - q_{S,m} \cdot Y_{XS,\mu}$$

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

Die spezifische Substrataufnahme  $q_s$  ist analog zur Wachstumsrate definiert:

**Gleichung 3.24** 
$$q_s \equiv \frac{1}{c_x} \cdot \frac{dc_s}{dt}$$

Der Ertragskoeffizient  $Y_{XS,\mu}$  gibt den Zusammenhang zwischen Zuwachsgeschwindigkeit der Mikroorganismen und Abbaugeschwindigkeit des Substrates wieder:

**Gleichung 3.25** 
$$Y_{XS,\mu} \equiv \frac{dc_x}{dc_s}$$

Ist das Zellwachstum durch fehlendes Substrat und eventuell durch Akkumulation von toxischen Nebenprodukten soweit abgesunken, dass sich Wachstums- und Absterberate ausgleichen, ist die stationäre Phase erreicht. In der sich anschließenden Absterbephase überwiegt dann schließlich die Absterberate.

### 3.5.2 Kultivierung im Satzverfahren

Kultivierungen im Satzverfahren sind dadurch gekennzeichnet, dass sämtliche zum Wachstum benötigten Nährstoffe zu Beginn der Kultivierung im Medium vorliegen. Titrationsmittel, zur Kontrolle des pHs und Sauerstoff sind die einzigen Substanzen, die während der Kultivierung dem Medium zugeführt werden müssen. Da die Mengen an zugegebener Base bzw. Säure im Vergleich zum Gesamtvolumen verhältnismäßig gering sind und in der Regel entsprechend Wasser durch Verdunstung verloren geht, kann näherungsweise von einem konstanten Reaktionsvolumen im Rührkesselreaktor ausgegangen werden. Damit lässt sich Gleichung 3.20 (Stoffbilanz für Biomasse) auch auf die Biotrockenmasse-Konzentration beziehen:

**Gleichung 3.26** 
$$c_X(t) = c_{X,0} \cdot e^{\mu_{\max} \cdot t}$$

mit  $c_{X,0}$  Konzentration der Biotrockenmasse zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase zum Zeitpunkt  $t_0 = 0$ ,  $g_{\text{BTM}} L^{-1}$ .

Für die Substratkonzentration im Medium ergibt sich aus der Stoffbilanzgleichung für das limitierende Substrat in Abhängigkeit von der Zeit:

**Gleichung 3.27** 
$$c_S(t) = c_{S,0} - \frac{c_{X,0}}{Y_{XS,\mu}} \cdot (e^{\mu_{\max} \cdot t} - 1).$$

Im Gegensatz zum Substrat wird dem Reaktor kontinuierlich Sauerstoff zugeführt. Unter der Annahme einer idealen Rückvermischung sowohl von Flüssig- als auch Gasphase lässt sich die Sauerstoffkonzentration im Medium mit folgender Gleichung beschreiben:

**Gleichung 3.28** 
$$\frac{dc_{O_2}}{dt} = \text{OTR} - \text{OUR} = k_L a \cdot (c_{O_2}^* - c_{O_2}) - \frac{\mu}{Y_{XO,\mu}} \cdot c_X$$

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

Liegt im Medium eine konstante Sauerstoffkonzentration vor, wird demnach genau so viel Sauerstoff zugeführt, wie von den Mikroorganismen verbraucht wird. Zudem verdeutlicht Gleichung 3.28, dass der Verbrauch an Sauerstoff über dessen Eintrag gezielt eingestellt werden kann. Die Sauerstoff-Aufnahmerate lässt sich aus den Messwerten der Abgasanalytik berechnen:

**Gleichung 3.29**      
$$\text{OUR} = \left( \dot{V}_{\text{Luft,ein}} \cdot x_{\text{O}_2,\text{ein}} - \dot{V}_{\text{Luft,aus}} \cdot x_{\text{O}_2,\text{aus}} \right) \cdot \frac{V_{\text{mol}}}{V_{\text{R}}}$$

mit	$\dot{V}_{\text{Luft,ein}}$	Gasvolumenstrom, der dem Reaktor zugeführt wird, $\text{L h}^{-1}$
	$\dot{V}_{\text{Luft,aus}}$	Gasvolumenstrom, der den Reaktor verlässt, $\text{L h}^{-1}$
	$x_{\text{O}_2,\text{ein}}$	Sauerstoff-Anteil in der Zuluft, %
	$x_{\text{O}_2,\text{aus}}$	Sauerstoff-Anteil im Abgas, %
	$V_{\text{R}}$	Volumen des Reaktor, L
	$V_{\text{mol}}$	Molvolumen idealer Gase ( $22,414 \text{ L mol}^{-1}$ ), $\text{L mol}^{-1}$ .

Der Gasvolumenstrom aus dem Reaktor kann hierbei näherungsweise mit dem Gasvolumenstrom gleichgesetzt werden, der dem Reaktor zugeführt wird.

### 3.5.3 Kultivierung im Zulaufverfahren

Wenn hohe Wachstumsraten über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten werden sollen, dies aber aufgrund einer Substratinhibierung oder eines Überschussmetabolismus nicht möglich ist, werden Mikroorganismen im Zulaufverfahren kultiviert. Die kontinuierliche und bedarfsgerechte Zuführung von Substrat ermöglicht es hierbei, die Konzentration im Medium niedrig zu halten und somit negative Effekte hoher Konzentrationen zu vermeiden. Zudem können im Vergleich zum Satzverfahren deutlich höhere Zelldichten erzielt werden.

Unter Einbeziehung der Substratzuführung lassen sich die Biomassekonzentration und die Substratkonzentration im idealen Rührkesselreaktor mit folgenden Stoffbilanz-Gleichungen beschreiben:

**Gleichung 3.30**      
$$\frac{dc_x}{dt} = -\frac{\dot{V}_{\text{S,ein}}}{V_{\text{R}}} \cdot c_x + \mu \cdot c_x$$

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

**Gleichung 3.31** 
$$\frac{dc_s}{dt} = \frac{\dot{V}_{S,\text{ein}}}{V_R} \cdot (c_{S,0} - c_s) - q_{S,\mu} \cdot c_x$$

mit  $c_{S,0}$  Substratkonzentration im Zulaufmedium,  $\text{g L}^{-1}$ .

Ist die Substratkonzentration im Reaktor im Vergleich zu der des Zulaufmediums vernachlässigbar gering und kann zudem auf die Berücksichtigung der Volumenzunahme verzichtet werden, lässt sich der für eine konstante Wachstumsrate benötigte Zulaufvolumenstrom über Gleichung 3.32 ermitteln:

**Gleichung 3.32** 
$$\dot{V}_{S,\text{ein}} = V_R \cdot \frac{c_{X,0}}{c_{S,0}} \cdot \frac{\mu}{Y_{XS}} \cdot e^{\mu \cdot t}$$

Die konstante Wachstumsrate kann allerdings nur so lange aufrecht erhalten werden, wie keine Produktinhibierung auftritt und sämtliche zum Wachstum benötigten Substanzen in ausreichenden Mengen zur Verfügung stehen. Da aber bei sehr hohen Zelldichten der Sauerstoffeintrag die limitierende Größe darstellt, werden in der Praxis ab einer zuvor festgelegten Zelldichte häufig lineare oder konstante Zulaufprofile angelegt. Auf diese Weise kann dann zwar eine Sauerstofflimitierung umgangen werden, was aber gleichzeitig auch zur Folge hat, dass die Wachstumsrate mit der Kultivierungsdauer sinkt.

### 3.5.4 Optimierung der Biokatalysatorherstellung

Die Optimierung der Biokatalysatorherstellung orientiert sich an der Zielsetzung. Werden Mikroorganismen allein zur Produktion von Enzymen kultiviert, ist die Raumzeitausbeute der Enzymmenge ( $RZA_{EA}$ ) die maßgebende Zielgröße:

**Gleichung 3.33** 
$$RZA_{EA} = \frac{EA_x \cdot c_x}{t}$$

mit  $RZA_{EA}$  Raum-Zeit-Ausbeute der Enzymmenge,  $\text{U L}^{-1} \text{h}^{-1}$ .

Sollen die Zellen aber als Ganzzell-Biokatalysator Verwendung finden, ist zu berücksichtigen, dass sehr häufig nicht die Aktivität des Produktions-/Regenerierungsenzyms die limitierende Größe der Biokatalyse darstellt, sondern der Stofftransport der Edukte und/oder Cosubstrate über die Zellmembran. In diesem Fall sollte dann eine Optimierung auch auf eine möglichst hohe Biomasse-Raum-Zeit-Ausbeute abzielen. Erfolgt allerdings ein aktiver

Transport der Edukte/Cosubstrate in die Zelle, müssten die Kultivierungsbedingungen so eingestellt werden, dass mehr Transporter für die entsprechenden Substanzen gebildet werden.

### 3.6 Charakterisierung von Flüssig-Flüssig-Dispersionen

Flüssig-Flüssig-Dispersionen sind Mischungen zweier Flüssigkeiten, die sich nicht ineinander lösen. Die Flüssigkeit, die in der anderen fein verteilt vorliegt, wird im Allgemeinen als disperse Phase bezeichnet, die andere als kontinuierliche Phase. Eine Trennung beider Phasen lässt sich durch physikalische Methoden meist leicht herbeiführen.

Unter der Annahme, dass die disperse Phase als kugelförmige Tröpfchen vorliegt, kann über die Bestimmung der Tropfengrößenverteilung und die Beschreibung der Stofftransportprozesse eine kinetische Charakterisierung der in Flüssig-Flüssig-Dispersionen oft stofftransportlimitierten Reaktion vorgenommen werden. Aufgrund der zahlreichen und teilweise nicht bestimmbar Einflussfaktoren ist dies in der Ganzzell-Biokatalyse allerdings nicht exakt möglich. Nachfolgend werden daher nur die Grundlagen beschrieben, die zu einer brauchbaren Abschätzung führen.

Der Verteilungskoeffizient eines Stoffes zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Flüssigkeiten ist eine weitere wichtige Größe. Sie gibt Aufschluss darüber, inwieweit das entsprechende Lösungsmittel als Eduktreservoir und *In-situ*-Extraktionsmittel geeignet ist.

#### 3.6.1 Tropfenbildung in gerührten Systemen

Die Tropfenbildung wird in einem zweiphasigen System durch das Vorhandensein von Scherkräften hervorgerufen, die ausreichend groß sind, die disperse Phase zu zerteilen. Der dafür erforderliche Energieeintrag erfolgt in Rührreaktoren über das Rührorgan. Aufgrund der gegenläufigen Prozesse von Tropfenzerteilung und Tropfenvereinigung durch Kollision stellt sich im dynamischen Gleichgewichtszustand keine einheitliche Tropfengröße ein, sondern eine Tropfengrößenverteilung. Diese lässt sich über den mittleren Sauterdurchmesser  $d_{32}$  charakterisieren:

**Gleichung 3.34** 
$$d_{32} = \frac{\sum_{i=1}^m n_i \cdot d_i^3}{\sum_{i=1}^m n_i \cdot d_i^2}$$

mit	$d_{32}$	Sauterdurchmesser, m
	$n_i$	Anzahl der Tropfen mit dem Durchmesser $d_i$ , -
	$d_i$	Tropfendurchmesser der Klasse $i$ ( $0 \leq i \leq m$ ), m.

Für Rührkessel mit identischen Geometrieverhältnissen ist der mittlere Sauterdurchmesser nur von den Eigenschaften der dispersen und kontinuierlichen Phase, sowie von der Rührcharakteristik des Reaktors abhängig (Paul *et al.* 2004):

**Gleichung 3.35**  $d_{32} = f(d_R, \rho_d, \rho_k, \eta_d, \eta_k, \sigma_{d,k}, \varphi_d, g \cdot \Delta\rho, N_R)$

mit	$d_R$	Rührerdurchmesser, m
	$\rho$	Dichte, $\text{kg m}^{-3}$
	$\eta$	dynamische Viskosität, $\text{Pa s} = \text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$
	$\sigma_{d,k}$	Grenzflächenspannung disperse/kontinuierliche Phase, $\text{N m}^{-1} = \text{kg s}^{-2}$
	$g$	Erdbeschleunigung ( $9,81 \text{ m s}^{-2}$ ), $\text{m s}^{-2}$
	$N_R$	Rührerdrehzahl, $\text{s}^{-1}$ .

Obwohl der Theorie nach, bei dispersen Phasen mit Viskositäten größer  $10 \text{ mPa s}$ , die Viskositätskraft innerhalb des Tropfens bei der mathematischen Bestimmung des mittleren Sauterdurchmessers Berücksichtigung finden müsste, hat Pfründer (2005) zeigen können, dass für ionische Flüssigkeiten ein vereinfachter Ansatz ausreichend ist:

**Gleichung 3.36**  $\frac{d_{32}}{d_R} = 0,053 \cdot (1 + 3 \cdot \varphi_d) \cdot We^{-0,6}$

mit	$We$	Weberzahl, - .
-----	------	----------------

Diese Gleichung ist für Phasenanteile  $\varphi_d > 0,05$  jedoch nur gültig, wenn die disperse Phase keine starke Koaleszenz aufzeigt und die Phasentrennung länger als eine Minute benötigt. Erfolgt eine schnellere Phasentrennung muss die Koaleszenz empirisch berücksichtigt werden.

Die Weberzahl  $We$  beschreibt das Verhältnis der disruptiven Trägheitskraft zur kohäsiven Oberflächenkraft und lässt sich über folgende Gleichung bestimmen:

**Gleichung 3.37**  $We = \frac{\rho_k \cdot N_R^2 \cdot d_R^3}{\sigma_{d,k}}$

Die Grenzflächenspannung  $\sigma_{d,k}$  ist nach Dörfler (1994) von der Oberflächenspannung der einzelnen Phasen und den Dispersionskräften entlang der Grenzschicht abhängig. Bei organisch/wässrigen Dispersionen liegt sie im Allgemeinen zwischen den Werten für die Oberflächenspannungen der reinen Phasen.

Soll der mittlere Sauterdurchmesser experimentell bestimmt werden und sind die zu untersuchenden Dispersionen stabil, kann dies entweder über die Messung der Lichtabsorption/Lichtstreuung oder aber über eine mikrofotographische bzw. röntgenmikroskopische Untersuchung erfolgen. Instabile Dispersionen lassen sich dagegen experimentell nur unter Einsatz der Phasendoppler-Anemometrie oder der dreidimensionalen optischen Laserrückreflexionsmessung analysieren.

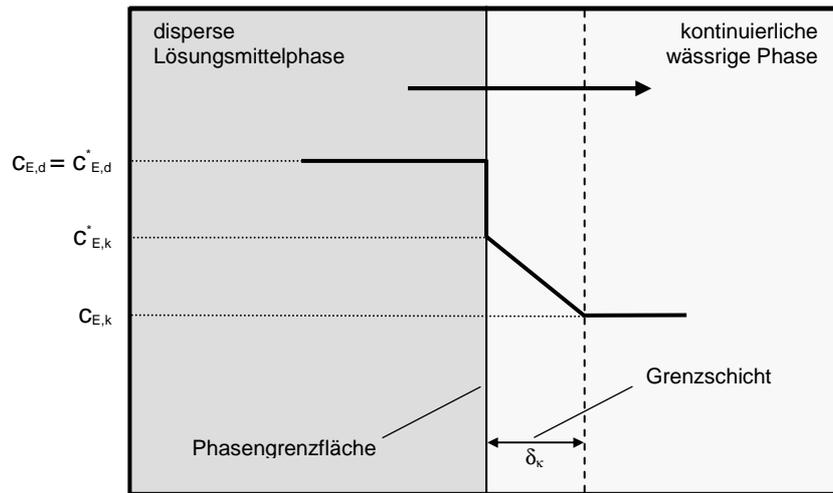
### **3.6.2 Berechnung des Stofftransports**

Zur Beschreibung des Stoffübergangs zwischen zwei Flüssigkeiten sind eine Reihe von Modellen entwickelt worden. Die beiden wichtigsten sind das Penetrationsmodell und das Filmmodell. Das Penetrationsmodell erklärt den Stoffübergang durch einen instationären konvektiven Stofftransport, bei dem die Grenzschicht kontinuierlich durch Wirbel ersetzt wird. Diese Vorstellung gilt daher vor allem für Vorgänge bei denen sich eine neue Phasengrenzfläche bildet. Das Filmmodell postuliert dagegen die Existenz von Regionen nahe der Grenzfläche, in denen ein diffusiver Stofftransport geschwindigkeitsbestimmend ist. Damit bietet es sich für Systeme mit Phasengrenzflächen an, die nicht gerade erst gebildet wurden.

In den Untersuchungen von Pfründer (2005) lieferte das Filmmodell zufriedenstellende Ergebnisse für die Abschätzung des Stofftransports zwischen einer ionischen Flüssigkeit (disperse Phase) und Puffer (kontinuierliche Phase). Daher beschränkt sich die Betrachtung im Folgenden nur auf dieses Modell.

Unter der Annahme, dass der Stofftransport in den kleinen Tropfen ( $< 2,5$  mm) der disperse Phase ausschließlich diffusiv erfolgt (Zlokarnik 1999), reduziert sich die Betrachtung des Stoffübergangs auf die Vorgänge an der Phasengrenzfläche. In der Phasengrenzfläche selbst liegt ein thermodynamisches Gleichgewicht vor, da davon ausgegangen wird, dass der Stofftransportwiderstand der Phasengrenzfläche im Vergleich zu den Widerständen in den Grenzschichten vernachlässigbar ist (Schügerl 1994). Da sich der Filmtheorie nach diese dünnen Grenzschichten auf beiden Seiten der Phasengrenzfläche ausbilden (Zweifilmmodell), müssen somit die Grenzschicht-Widerstände sowohl in der

dispersen Phase, als auch in der kontinuierlichen Phase Berücksichtigung finden. Besitzt der gelöst vorliegende Stoff allerdings einen großen Verteilungskoeffizient ( $\log D \gg 0$ ), kann der Stofftransportwiderstand in der dispersen Phase gegenüber der kontinuierlichen Phase vernachlässigt werden. Damit reduziert sich dann auch das Zweifilmmodell zu einem Einfilmmodell (Abbildung 3.7).



**Abbildung 3.7** Einfilmmodell des Edukts-Übergangs in Flüssig-Flüssig-Dispersionen.  $c_{E,k}^*$ ,  $c_{E,d}^*$  Gleichgewichtskonzentration des Edukts an der Phasengrenzfläche in der kontinuierlichen bzw. dispersen Phase.  $c_{E,k}$ ,  $c_{E,d}$  Konzentration des Edukts in der kontinuierlichen bzw. dispersen Kernphase.

Für den Übergang von Edukt aus der dispersen Phase in die kontinuierliche wässrige Phase lässt sich dann die maximale Edukttransfertrate  $ETR_{\max}$  ermitteln:

**Gleichung 3.38** 
$$ETR_{\max} = \beta_E \cdot a_d \cdot (c_{E,k}^* - c_{E,k})$$

- mit
- $ETR_{\max}$  Edukttransfertrate,  $\text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1}$
  - $\beta_E$  Stoffübergangskoeffizient des Edukts,  $\text{m s}^{-1}$
  - $a_d$  Phasengrenzfläche auf Volumen der dispersen Phase bezogen,  $\text{m}^2 \text{m}^{-3}$
  - $c_{E,k}^*$  Konzentration des Edukts an der Phasengrenzfläche auf Seiten der kontinuierlichen Phase (entspricht der Sättigungskonzentration),  $\text{mol L}^{-1}$
  - $c_{E,k}$  Konzentration des Edukts in der kontinuierlichen Phase,  $\text{mol L}^{-1}$ .

Hierbei gilt zu beachten, dass die Sättigungskonzentration an der Phasengrenze auf Seiten der wässrigen Phase keinesfalls eine Konstante ist, sondern sich über die spezifische Verteilung des gelösten Stoffes ( $\log D$ ) mit der Abnahme der Eduktkonzentration in der dispersen Phase ebenfalls verringert.

Die spezifische Phasengrenzfläche  $a_d$  lässt sich aus dem mittleren Sauterdurchmesser  $d_{32}$  und dem Phasenanteil der dispersen Phase  $\varphi_d$  berechnen:

$$\text{Gleichung 3.39} \quad a_d \equiv \frac{A}{V_d} = \frac{6 \cdot \varphi_d}{d_{32}}$$

mit  $a_d$  spezifische Phasengrenzfläche,  $\text{m}^2 \text{m}^{-3}$   
 $A$  Phasengrenzfläche,  $\text{m}^2$   
 $V_d$  Volumen der dispersen Phase,  $\text{m}^3$ .

Der Stoffübergangskoeffizient  $\beta_E$  kann über die Definition der Sherwoodzahl:

$$\text{Gleichung 3.40} \quad \text{Sh} \equiv \frac{\beta_E \cdot d_{32}}{D_{E,k}}$$

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

in Kombination mit einer empirischen Beziehung für die Sherwoodzahl abgeschätzt werden:

$$\text{Gleichung 3.41} \quad \text{Sh} = 1,237 \cdot 10^{-5} \cdot \frac{\text{Sc}^{1/3} \cdot \text{Re}^{2/3}}{\text{Fr}^{-5/12}} \cdot \left(\frac{d_R}{d_{32}}\right)^2 \cdot \left(\frac{d_{32}}{D_R}\right)^{1/2} \cdot \left(\frac{\rho_d \cdot d_{32} \cdot g}{\sigma_{d,k}}\right)^{5/4} \cdot \varphi_d^{-1/2}$$

mit  $\text{Sc}_k = \frac{\eta_k}{\rho_k \cdot D_{E,k}}$  Schmidtzahl

$\text{Fr} = \frac{N_R^2 \cdot d_R}{g}$  Froudezahl

$\text{Re} = \frac{d_R^2 \cdot N_R \cdot \bar{\rho}}{\bar{\eta}}$  Reynoldszahl.

Liegt der Phasenanteil der dispersen Phase zwischen 0,01 und 0,3 muss die Reynoldszahl unter Verwendung der kombinierten Dichte (Gleichung 3.42) und der kombinierten Visko-

sität (Gleichung 3.43 bzw. Gleichung 3.44) ermittelt werden (Kneule 1986):

**Gleichung 3.42**       $\bar{\rho} = \rho_k \cdot (1 - \varphi_d) + \rho_d \cdot \varphi_d$

**Gleichung 3.43**       $\bar{\eta} = \frac{\eta_k}{1 - \varphi_d} \cdot \left( 1 + \frac{1,5 \cdot \eta_d \cdot (1 - \varphi_d)}{\eta_d - \eta_k} \right)$

**Gleichung 3.44**       $\bar{\eta} = \eta_d^{\varphi_d} \cdot \eta_k^{(1 - \varphi_d)}$  .

Pfründer (2005) weist allerdings daraufhin, dass die Verwendung der oben genannten Formeln zur Berechnung der kombinierten Viskosität für zweiphasige Systeme mit ionischen Flüssigkeiten zu keinen zufriedenstellenden Ergebnissen führt. Er vermutet, dass die tatsächliche Viskosität aufgrund des in der IL gelöst vorliegenden Edukts/Produkts wahrscheinlich deutlich niedriger liegt und verwendet daher anstelle der kombinierten Viskosität die von Wasser.

Zur Berechnung des Diffusionskoeffizienten  $D_{E,k}$  des Edukts für die kontinuierlichen Phase hat sich das Modell nach Wilke-Chang (Sherwood *et al.* 1975, Reid *et al.* 1988) als geeignet erwiesen:

**Gleichung 3.45**       $D_{E,k} = 7,4 \cdot 10^{-8} \cdot \frac{(\Phi_k \cdot MG_k)^{1/2} \cdot T}{\eta_k \cdot MV_E^{0,6}}$

- mit
- $\Phi_k$       Assoziationskoeffizient der kontinuierlichen Phase (für Wasser = 2,6), -
  - $MG_k$       Molekulargewicht der kontinuierlichen Phase, g mol<sup>-1</sup>
  - $T$       absolute Temperatur, K
  - $MV_E$       molares Volumen des Edukts, cm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup>.

Mit Hilfe der oben dargestellten Beziehungen lässt sich nun abschließend die maximale Edukttransferate  $ETR_{max}$  bestimmen und somit der Stofftransport in einer Flüssig-Flüssig-Dispersion abschätzen.

### 3.6.3 Verteilungskoeffizient gelöster Stoffe

Das Konzentrationsverhältnis eines Stoffes zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Phasen, die sich im Gleichgewicht befinden, ist entsprechend dem Verteilungssatz von Nernst (1891) bei gegebenen Druck und Temperatur konstant und unabhängig von den absoluten Konzentrationen. Der für ein Stoffsystem charakteristische Verteilungskoeffizient wird daher über dieses Konzentrationsverhältnis definiert:

**Gleichung 3.46**      
$$D_{1/2} = \frac{c_{\text{Phase 1}}}{c_{\text{Phase 2}}}$$

mit       $c_i$       Konzentration des gelösten Stoffes in Phase  $i$ , mol L<sup>-1</sup>.

Nachfolgend wird der dekadische Logarithmus des Verteilungskoeffizienten  $\log D$  verwendet.

## **4 Material und Methoden**

In diesem Kapitel werden sowohl die verwendeten Materialien dargestellt als auch die angewandten Methoden beschrieben, die für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen benötigt wurden.

### **4.1 Material**

Eine Auflistung und ausführlichere Charakterisierung der verwendeten Laborgeräte erfolgt in Kapitel 16.1.1. Die eingesetzten Chemikalien sind in Kapitel 16.1.2 aufgeführt.

### **4.2 Allgemeine Labormethoden**

Im Folgenden werden die verwendeten Labormethoden beschrieben, die für ein biotechnologisches Labor typisch sind.

#### **4.2.1 pH-Messung**

Die Messung des pHs wässriger Lösungen erfolgte mit dem Messgerät CG 843 der Firma Schott. Die Zweipunktkalibrierung der pH-Elektrode wurde bei pH 4,0 und 7,0 durchgeführt.

#### **4.2.2 Herstellung von Pufferlösungen**

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Pufferlösungen handelt es sich ausschließlich um Kaliumphosphat-Puffer. Die in Abhängigkeit des pHs und der Molarität benötigten Puffer-salzmengen wurden nach Gleichung 4.1 und Gleichung 4.2 berechnet (Holtzhauer 1997). Die Herstellung der Pufferlösung erfolgte unter Verwendung von VE-Wasser. Ergab die anschließende Kontrolle des pHs eine Abweichung vom gewünschten Wert, wurde dieser mit 10 %iger HCl oder 10 M NaOH korrigiert.

**Gleichung 4.1**  $m_{\text{K}_2\text{HPO}_4} = \text{MG}_{\text{K}_2\text{HPO}_4} \cdot M \cdot x$

**Gleichung 4.2**  $m_{\text{KH}_2\text{PO}_4} = \text{MG}_{\text{KH}_2\text{PO}_4} \cdot M \cdot (1 - x)$

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

### 4.2.3 Glukoseanalytik

Die Ermittlung der Glukose-Konzentration in wässrigen Lösungen erfolgte mit Hilfe des Blutzuckermessgeräts Accu-Chek®. Lag die zu erwartende Konzentration außerhalb des Messbereichs von 0,1 bis 6,0 g L<sup>-1</sup>, wurde die Probe mit einem Puffer entsprechend verdünnt.

### 4.2.4 Bestimmung der optischen Dichte

Die Messung der optischen Dichte (OD) von Zellsuspensionen erfolgte mit einem Einstrahl-photospektrometer bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem OD-Linearitätsbereich zwischen 0,05 und 0,3. Die dafür erforderlichen Vorverdünnungen wurden mit KPi-Puffer hergestellt. Mit den für die einzelnen *E.coli*-Stämme experimentell bestimmten Korrelationsfaktoren  $f_x$ , dargestellt in Tabelle 4.1, konnte nach Gleichung 4.3 aus der optischen Dichte die Biotrockenmasse-Konzentration berechnet werden.

**Tabelle 4.1** Korrelationsfaktoren zur Bestimmung der Biotrockenmasse aus der optischen Dichte für verschiedene *E.coli*-Stämme

Mikroorganismus	Korrelationsfaktor $f_x$ $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1} \text{OD}^{-1}$
<i>Escherichia coli</i> BL21 LB-ADH BS-GDH	0,66
<i>Escherichia coli</i> BL21 LB-ADH LM-G6PDH	0,47
<i>Escherichia coli</i> BL21 LB-ADH MV-FDH	0,40
<i>Escherichia coli</i> BL21 LB-ADH CB-FDH	0,54

**Gleichung 4.3**  $c_x = \text{OD} \cdot f_x$

#### 4.2.5 Bestimmung der Biotrockenmasse

Die für die gravimetrische Bestimmung der Biotrockenmasse benötigten Probengefäße wurden vor ihrer Verwendung für mindestens 10 Tage bei 80°C getrocknet, anschließend ausgewogen und mit genau 1 mL Zellsuspension versehen. In einer Tischzentrifuge (13000 min<sup>-1</sup>, RT, 5 min) erfolgte dann die Pelletierung der Zellen. Der Überstand wurde verworfen und die Probengefäße mit den Zellpellets nochmals für mindestens 10 Tage bei 80°C getrocknet. Nach erneutem Auswiegen dieser getrockneten Probengefäße ließ sich die Biotrockenmasse-Konzentration nach Gleichung 4.4 berechnen.

**Gleichung 4.4**      
$$c_x = \frac{(m_{\text{voll}} - m_{\text{leer}})}{V}$$

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

#### 4.2.6 Herstellung von kompetenten Zellen

Die für eine spätere Plasmid-Transformation benötigten kompetenten Zellen wurden aus einer *E.coli* BL21-Kultur hergestellt, die in 100 mL LB-Medium (Tabelle 16.8) bei einer Temperatur von 37°C auf eine OD<sub>650</sub> von 1 herangewachsen war und sich somit in der exponentiellen Wachstumsphase befand. Nach Zugabe von 4 mL sterilfiltrierter 1M MgCl<sub>2</sub>-Lösung und kurzer Inkubation im Schüttelinkubator (200 min<sup>-1</sup>, 37°C, 10 min) wurde diese dann für 60 min auf Eis gekühlt. Mit Hilfe einer auf 4°C vorgekühlten Standzentrifuge (4500 min<sup>-1</sup>, 4°C, 5 min) erfolgte dann anschließend die Abtrennung der Zellen. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets durch vorsichtiges Aufspritzen in insgesamt 20 mL einer vorbereiteten Lösung resuspendiert. Ein Liter dieser Lösung setzte sich aus 13,35 mL 3M Natriumacetat-Lösung (pH 5,5, autoklaviert), 100 mL 1M CaCl<sub>2</sub>-Lösung (pH 5,5, autoklaviert), 25 mL 2,8M MgCl<sub>2</sub>-Lösung (sterilfiltriert) und aus 861,7 mL VE-Wasser (autoklaviert) zusammen. Nach einer weiteren 60 minütigen Kühlphase auf Eis, wurden die Zellen anschließend nochmals abzentrifugiert (3000 min<sup>-1</sup>, 4°C, 5 min), der Überstand verworfen und das Zellpellet vorsichtig in 4 mL einer weiteren Lösung resuspendiert, die aus 3,4 mL der oben genannten Lösung und 0,6 mL Glycerin (autoklaviert) bestand. Diese Zellsuspension wurde dann in 200 µl-Portionen auf sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße aufgeteilt, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

### 4.2.7 Plasmid-Transformation

Für die Plasmid-Transformation wurden 20  $\mu\text{L}$  auf Eis aufgetauter kompetenter Zellen in vorgekühlte sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben, mit 0,5 bis 1  $\mu\text{L}$  Plasmid-DNA versetzt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach einem genau 30 sekündigen Hitzeschock in einem auf 42°C temperierten Wasserbad folgte dann eine erneute Inkubation auf Eis für 2 min. Anschließend wurde 80  $\mu\text{L}$  ungekühltes LB-Medium (mit 20 mM Glukose) hinzugegeben und die Zellen eine Stunde im Schüttler bei 250  $\text{min}^{-1}$  und 37°C inkubiert. Auf Agar-Platten, die das entsprechende selektierende Antibiotikum enthielten, wurden dann jeweils 10  $\mu\text{L}$  der transformierten Zellen zusammen mit 90  $\mu\text{L}$  zusätzlichem LB-Medium ausgestrichen. Nach Übernacht-Inkubation bei 37°C konnten die Platten anschließend bei 4°C für mindestens 4 Wochen gelagert werden.

## 4.3 Aufbau und Konstruktion der *Escherichia coli*-Stämme

In den nachfolgenden Kapiteln wird der Plasmid-Aufbau der verwendeten rekombinanten *E.coli*-Stämme beschrieben, sowie die Vorgehensweise zur Konstruktion eines mit LB-ADH und MV-FDH ausgestatteten *E.colis* dargestellt.

### 4.3.1 *Escherichia coli* BL21 LB-ADH BS-GDH

Der *Escherichia coli* BL21 LB-ADH BS-GDH wurde von der Firma Jülich Chiral Solutions (Jülich, Deutschland) als flüssige Aktivkultur zur Verfügung gestellt. Dieser war mit einer *Lactobacillus brevis* Alkoholdehydrogenase, einer *Bacillus subtilis* Glukosedehydrogenase und einer Ampicillin-Resistenz ausgestattet. Bei dem in diesem *E.coli* vorliegenden Plasmid pW33 (PD Dr. Hummel, Universität Düsseldorf) handelte es sich um einen von pBTAC1 abgeleiteten Tandemvektor. Die Gene für die LB-ADH und BS-GDH befanden sich beide hintereinander unter der gemeinsamen Kontrolle eines tac-Promotors. Die gleichzeitige Expression beider Dehydrogenasen wurde durch Laktose bzw. IPTG induziert.

### 4.3.2 *Escherichia coli* BL21 LB-ADH LM-G6PDH

Der *Escherichia coli* BL21 LB-ADH LM-G6PDH wurde von der Firma Jülich Chiral Solutions (Jülich, Deutschland) als flüssige Aktivkultur zur Verfügung gestellt. Dieser war mit einer *Lactobacillus brevis* Alkoholdehydrogenase, einer *Leuconostoc mesenteroides* Glukose-6-

Phosphatdehydrogenase und einer Kanamycin-Resistenz ausgestattet. Damit beide Gene für LB-ADH und LM-G6PDH vom gleichen Promotor aus als Operon exprimiert werden konnten, war das mit einer Ribosombindestelle versehende G6PDH-Gen hinter das Stop-Codon der LB-ADH und vor den Terminator des pET24a-Vektors kloniert worden. Die Expression der beiden Gene war durch Laktose bzw. IPTG induzierbar.

#### **4.3.3 *Escherichia coli* BL21 LB-ADH MV-FDH**

Für die Konstruktion des *Escherichia coli* BL21 LB-ADH MV-FDH wurden vom Institut für Biotechnologie des Forschungszentrums Jülich zwei Plasmide zur Verfügung gestellt. Das mit einer Kanamycin-Resistenz und einem *lacI* Operon ausgestattete Plasmid pBBR1-MCS2*fdh* trug hierbei das Gen für die Formiatdehydrogenase aus *Mycobacterium vaccae* N10, während das zweite Plasmid pBtacLB-ADH mit einer Carbenicillin-Resistenz und dem Gen für die Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* versehen war (Ernst *et al.* 2005). Um beide Plasmide gleichzeitig im *E.coli* vorliegen zu haben, war eine zweistufige Plasmid-Transformation erforderlich. Dazu wurden nach Kapitel 4.2.6 zunächst kompetente Zellen von *E.coli* BL21 (DE3) hergestellt. Unter Verwendung derer erfolgte dann die Transformation (Kapitel 4.2.7) des ersten Plasmids pBtacLB-ADH. War die Transformation erfolgreich, wurden von dem Transformanten erneut kompetente Zellen hergestellt. Diese dienten dann zur anschließenden Transformation des zweiten Plasmids pBBR1MCS2*fdh*.

#### **4.3.4 *Escherichia coli* BL21 LB-ADH CB-FDH**

Der *Escherichia coli* BL21 LB-ADH CB-FDH wurde von der Firma Jülich Chiral Solutions (Jülich, Deutschland) als flüssige Aktivkultur zur Verfügung gestellt. Dieser war mit einer *Lactobacillus brevis* Alkoholdehydrogenase, einer *Candida boidinii* Formiatdehydrogenase und einer Kanamycin-Resistenz ausgestattet. Damit beide Gene für LB-ADH und CB-FDH vom gleichen Promotor aus als Operon exprimiert werden konnten, war das mit einer Ribosombindestelle versehende FDH-Gen hinter das Stop-Codon der LB-ADH und vor den Terminator des pET24a-Vektors kloniert worden. Die Expression der beiden Gene war durch Laktose bzw. IPTG induzierbar.

## 4.4 Kultivierung der *Escherichia coli*-Stämme

### 4.4.1 Stammhaltung

Von sämtlichen *Escherichia coli*-Stämmen wurde eine Zellbank angelegt. Dazu wurde der jeweilige Stamm nach Kapitel 4.4.2 im Schüttelkolben unter Verwendung von LB-Medium (Tabelle 16.8) angezogen. Dieses enthielt das zur Selektion erforderliche Antibiotikum in einer Konzentration von  $50 \text{ mg L}^{-1}$ . In der exponentiellen Wachstumsphase bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 1,0 bis 1,5 wurde die Zellsuspension im Verhältnis 2:1 mit sterilem Glycerin (87% v/v) vermischt, in sterile 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung dieser Glycerin-Zellbank erfolgte bei  $-80^\circ\text{C}$ .

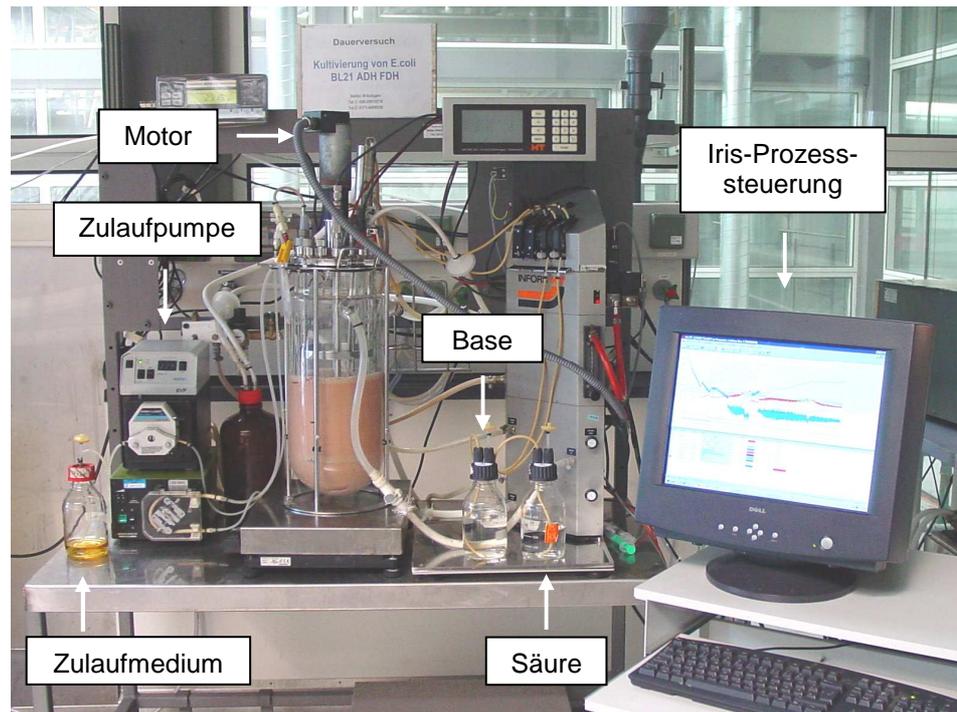
Aufgrund der eingeschränkten Stabilität der *Escherichia coli* BL21 LB-ADH MV-FDH Zellbank wurde dieser Stamm zusätzlich auf Agar-Platten bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert. Diese ließen sich maximal vier Wochen verwenden, bis dann eine erneute Transformation erforderlich wurde.

### 4.4.2 Kultivierung im Schüttelkolben

Die Kultivierung erfolgte in Schüttelkolben ohne Schikanen. Diese wurden zu 20 % des Nominalvolumens mit Antibiotika ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) versetztem Autoinduktionsmedium (Tabelle 16.10) befüllt und mit Alukappen als Sterilbarriere verschlossen. Das Animpfen erfolgte entweder mit 0,2 % v/v Zellsuspension aus der der Zellbank oder mit einem Impfösenabstrich von der Agar-Platte. Die Inkubation wurde in einem Schüttelinkubator mit 5 cm Exzentrizität bei wahlweise  $30^\circ\text{C}$  oder  $37^\circ\text{C}$  und  $250 \text{ min}^{-1}$  durchgeführt. Erreichten die jeweiligen Enzymaktivitäten (Kapitel 4.5.2) in einem  $\text{OD}_{600}$ -Bereich von 4 bis 8 die stationäre Phase, erfolgte die Ernte des Ganzzell-Biokatalysators.

### 4.4.3 Kultivierung im 7,5 L-Rührkesselreaktor im Satzverfahren

Für Kultivierungen im 4 bis 6 L-Maßstab wurde ein Labfors-Labor-Rührkesselreaktor der Firma Infors (Abbildung 4.1) mit einem Nominalvolumen von 7,5 L verwendet. Die Kultivierungen erfolgten hierbei sowohl unter Verwendung eines Komplexmediums nach Weuster-Botz *et al.* 2005 (Tabelle 16.9), als auch unter Einsatz eines modifizierten Autoinduktionsmediums (Tabelle 16.11). Nach Befüllen des Rührkesselreaktors mit der erforderlichen Menge an Grundmedium, wurde dieser autoklaviert. Die noch fehlenden Mediumbestandteile wurden als konzentrierte Lösungen ebenfalls autoklaviert (bzw. sterilgefiltert)



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

und anschließend entweder durch Einsatz einer Schlauchpumpe in den Rührkessel gefördert, oder aber mit Hilfe von Spritzen über eine sterile Anstechvorrichtung dem Grundmedium zugegeben. Nach Kalibrierung der  $pO_2$ -Elektrode und Einstellung einer Kultivierungstemperatur von  $30^\circ C$  wurde der Rührkesselreaktor mit 0,1 % v/v Zellsuspension aus der Zellbank angeimpft. Erfolgte das Animpfen mit Zellkolonien von der Agar-Platte, wurden diese zuvor in sterilem LB-Medium resuspendiert. Der pH wurde durch automatische Zugabe von 12,5 % HCl bzw. 16 %  $NH_4OH$  auf einen Wert von 6,8 geregelt. Die Begasungsrate betrug  $6 \text{ L min}^{-1}$ . Eine Regelungssequenz regelte den  $pO_2$  über die Rührerdrehzahl auf den gewünschten Wert. Bei Verwendung von LB-Medium wurde die Induktion nach vollständiger Verstoffwechslung der vorgelegten Glukose durch Zugabe von 1 mM IPTG gestartet. Die während des Prozesses entnommenen Proben wurden auf optische Dichte, Enzymaktivität und Glukose untersucht.

Bei zufriedenstellenden Enzymaktivitäten erfolgte die Ernte der Zellen. Dazu wurde die Zellsuspension aus dem Rührkesselreaktor in sterile 50 mL Falcons bzw. 1 L Zentrifugenbecher überführt und in einer Standzentrifuge ( $4500 \text{ min}^{-1}$ ,  $4^\circ C$ , 15 min) zentrifugiert. Bis zu ihrer Verwendung als Biokatalysator wurden die Zellen dann mit Überstand bei  $4^\circ C$  gelagert.

#### 4.4.4 Kultivierung im 7,5 L-Rührkesselreaktor im Zulaufverfahren

Die Kultivierung im Zulaufverfahren erfolgte analog zum Satzverfahren, allerdings unter Verwendung eines Komplexmediums mit  $6 \text{ g L}^{-1}$  Glukose (Tabelle 16.12). Zur Vereinfachung der Biokatalysator-Anzucht wurden parametergesteuerte Regelsequenzen programmiert, die es erlaubten, das Zulaufverfahren in Abhängigkeit der unterschiedlichen Anzuchtphasen automatisch zu steuern und zu regeln. Lediglich der Austausch des Zulaufmediums und die Zugabe von IPTG erforderten manuelle Eingriffe in die Kultivierung.

Um die Gesamtkultivierungsdauer zu verringern, wurden die Zellen nach dem Animpfen von 4 L Medium mit 50 mL einer Schüttelkolben-Übernachtskultur ( $\text{OD}_{600} \sim 1,5$ ) zunächst bei  $37^\circ\text{C}$  angezogen. War der Sauerstoffbedarf der Kultur so weit angestiegen, dass der  $\text{pO}_2$  unter 60 % sank, wurde die Mediumtemperatur automatisch auf  $30^\circ\text{C}$  abgesenkt. Der  $\text{pO}_2$  wurde anschließend über die Rührerdrehzahl auf einen Wert zwischen 25 % und 35 % geregelt, ohne allerdings eine minimale Drehzahl von  $600 \text{ min}^{-1}$  zu unterschreiten. Zum Ende der Satzphase, als die gesamte, im Medium vorgelegte Glukose von den Zellen aufgebraucht war und erstmals eine größere Mengen an HCl zur Aufrechterhaltung des konstanten pHs zudosiert werden musste – aufgrund der nun einsetzenden Verstoffwechslung von Acetat – wurde die Sequenz für den exponentiellen Zulauf des Glukose-Zulaufmediums (Tabelle 16.13) gestartet. Die Berechnung des Zulauf-Volumenstroms erfolgte hierbei über Gleichung 3.21 unter Vernachlässigung des Erhaltungsstoffwechsels und der Volumenzunahme. Um eine Acetat-Bildung während der Zufütterung von Glukose zu vermeiden, wurde die Wachstumsrate  $\mu$  konstant bei  $0,10 \text{ h}^{-1}$  bis  $0,12 \text{ h}^{-1}$  gehalten und somit unterhalb eines kritischen Werts von  $0,17 \text{ h}^{-1}$  (Korz *et al.* 1995). Zusätzlich wurde zur Vermeidung einer Sauerstofflimitierung die Begasungsrate mit Beginn der Zufütterung auf  $10 \text{ L min}^{-1}$  angehoben. Nachdem die Zelldichte eine  $\text{OD}_{600}$  von 40 bis 50 erreicht hatte, erfolgte dann ein Austausch des Glukose-Zulaufmediums gegen ein Glycerin-Zulaufmedium (Tabelle 16.14). Gleichzeitig wurde die Zufütterung entsprechend einer Wachstumsrate von  $0,6 \text{ h}^{-1}$  bis  $0,8 \text{ h}^{-1}$  vermindert. Die Regelung des  $\text{pO}_2$  erfolgte nun auf Werte zwischen 5 % und 15 %. Durch Zugabe von 1 mM IPTG wurde anschließend die Expression der gewünschten Enzyme induziert.

Bei zufriedenstellenden Enzymaktivitäten erfolgte die Ernte der Zellen, sowie deren Lagerung, analog zu der in Kapitel 4.4.3 beschriebenen Vorgehensweise.

## 4.5 Charakterisierung der Biokatalysatoren

### 4.5.1 Zellaufschluss

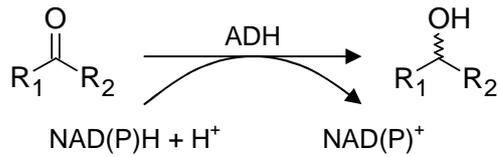
Der Zellaufschluss erfolgte unter Verwendung von PopCulture™ Reagenz, einer gepufferten Mischung aus konzentrierten Detergenzien, die die Zellmembran von *E.coli* perforiert ohne die löslichen Proteine zu denaturieren. Je nach zu erwartender Aktivität wurde die aufzuschließende Zellsuspension mit Kaliumphosphat-Puffer (0,1M, pH 6,5) auf eine OD<sub>600</sub> von 1 bis 3 verdünnt. Erst dann erfolgte die Zugabe und Vermischung mit 10 % v/v PopCulture™. Nach einer Einwirkzeit von 15 min waren die Zellen vollständig aufgeschlossen und konnten hinsichtlich ihrer Enzymaktivitäten untersucht werden.

### 4.5.2 Photometrische Bestimmung der Enzym-Aktivitäten

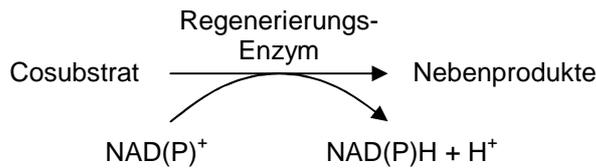
Die Aktivität eines Enzyms, das von dem Cofaktor NAD(P)<sup>+</sup> bzw. NAD(P)H abhängig ist, lässt sich bei einer katalytischen Reaktion über die zeitliche Änderung der NAD(P)H-Konzentration bestimmen. Da die Konzentrationsänderung aber nicht direkt ermittelt werden kann, wurde diese mit Hilfe eines Photometers über die Absorption von NAD(P)H bei 340 nm verfolgt. Nach Vereinigung der in Tabelle 4.2 zusammengefassten Lösungen in eine Flachboden-Mikrotiterplatte ließ sich die Abnahme bzw. Zunahme der NAD(P)H-Absorption als Funktion der Zeit aufnehmen, unabhängig davon, ob es sich bei dem Enzym um eine ADH handelte, die bei der Reduktion eines Ketons NAD(P)H zu NAD(P)<sup>+</sup> oxidiert (Abbildung 4.2), oder um ein Cofaktor-Regenerierungsenzym, welches NAD(P)<sup>+</sup> wieder zu NAD(P)H reduziert (Abbildung 4.3). Die Berechnung der spezifischen Aktivität erfolgte aus

**Tabelle 4.2** Pipettierschema zur Bestimmung der Aktivitäten ausgewählter Enzyme

	LB-ADH	LB-ADH	BS-GDH	LM-G6PDH	MV-FDH	CB-FDH
Cofaktor (6,4 g L <sup>-1</sup> )	20 µL NADH	40 µL NADPH	40 µL NAD(P)	40 µL NAD(P)	20 µL NAD	20 µL NAD
KPi-Puffer (0,1 M)	140 µL pH 7	200 µL pH 7	200 µL pH 8	200 µL pH 7,6	140 µL pH 8	140 µL pH 8
Cosubstrat	20 µL 50 mM Acetophenon	40 µL 50 mM Acetophenon	40 µL 200 mM Glukose	40 µL 200 mM Glukose	20 µL 800 mM Na-Formiat	20 µL 800 mM Na-Formiat
Zellextrakt	20 µL (OD <sub>600</sub> =3)	20 µL (OD <sub>600</sub> =1)	20 µL (OD <sub>600</sub> =1)	20 µL (OD <sub>600</sub> =1)	20 µL (OD <sub>600</sub> =3)	20 µL (OD <sub>600</sub> =3)



**Abbildung 4.2** Schematische Darstellung der ADH-katalysierten Reduktion eines Ketons bei gleichzeitiger Oxidation von NAD(P)H



**Abbildung 4.3** Schematische Darstellung der Reduktion von NAD(P)<sup>+</sup> zu NAD(P)H durch ein Cofaktor-Regenerierungsenzym

der linearen Änderung der Absorption unter Verwendung des Lambert-Beer'schen-Gesetzes nach Gleichung 4.5. Für die Blindproben wurde das Zellextraktvolumen durch den jeweiligen KPi-Puffer ersetzt.

**Gleichung 4.5**

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

mit	$EA_x$	spezifische Enzymaktivität, U g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup>
	$\frac{\Delta A_{340}}{\Delta t}$	Änderung der Absorption bei 340 nm über die Zeit, min <sup>-1</sup>
	$\epsilon_{\text{NAD(P)H}}$	molarer Extinktionskoeffizient für NADH (623 L mol <sup>-1</sup> mm <sup>-1</sup> ) und NADPH (630 L mol <sup>-1</sup> mm <sup>-1</sup> )
	b	Länge des Lichtweges, mm (hier 5,3 mm)
	$V_R$	Reaktionsvolumen, µL (hier 200 µL bzw. 300 µL)
	$V_x$	Zellextraktvolumen, µL (hier 20 µL)
	$c_x$	Biotrockenmasse-Konzentration des Zellextrakts, g <sub>BTM</sub> L <sup>-1</sup>

### 4.5.3 Membranintegritätstests für Bakterien (Viabilität)

Die Beurteilung der Viabilität von Bakterien erfolgte mit Hilfe zweier, parallel durchgeführter Membranintegritätstests, die nachfolgend näher erläutert werden.

#### *LIVE/DEAD<sup>(R)</sup> BacLight<sup>TM</sup> Viabilitätstest*

Das zugrunde liegende Messprinzip des LIVE/DEAD<sup>(R)</sup> BacLight<sup>TM</sup> Viabilitätstest von Molecular Probes beruht auf der Fluoreszenzmessung zweier DNA-Marker – SYTO<sup>®</sup>9 (3,34 mM in DMSO) und Propidiumiodid (20 mM in DMSO) - die sich in ihrer Fähigkeit unterscheiden, intakte bakterielle Zellmembranen zu überwinden. Da SYTO<sup>®</sup>9 als einziger der beiden Farbstoffe die Zellmembran passieren kann, färbt es sämtliche Zellen, sowohl mit beschädigter als auch mit intakter Zellmembran, grün fluoreszierend an. Das rot fluoreszierende Propidiumiodid gelangt dagegen nur in Zellen mit beschädigter Zellmembran, konkurriert dort mit SYTO<sup>®</sup>9 und bewirkt so eine Reduktion der grünen Fluoreszenz.

Vor der Durchführung der Membranintegritätstests wurde eine ausreichende Menge an Farbstofflösung hergestellt, um zu garantieren, dass sich bei einer Wiederholung der Messung das Verhältnis der beiden Farbstoffe zueinander im Vergleich zu dem vorherigen nicht unterscheidet. Für die Herstellung der Farbstofflösung wurden je 3 µL der beiden Stammlösungen gemeinsam mit 1 mL VE-Wasser verdünnt. Nach Vereinigung von 100 µL dieser Farbstofflösung mit 100 µL Zellsuspension ( $OD_{600}=0,05$ ) in einer Flachboden-Mikrotiterplatte erfolgte bei Raumtemperatur eine 15 minütige Inkubation im Dunkeln. Die Proben wurden dann anschließend im Fluoreszenzphotometer Infinite M200 der Firma Tecan unter Verwendung einer Anregungswellenlänge von 485 nm bei 530 nm (SYTO<sup>®</sup>9) und 630 nm (Propidiumiodid) ausgelesen. Das Verhältnis der beiden Fluoreszenzintensitäten diente als Kriterium für die Beurteilung des Verhältnisses von integral vorliegenden Zellen zu permeabilisierten.

Die Kalibrierung erfolgte über definierte Mischungen von frischen, ungeschädigten Bakterien mit Zellen, die durch einstündige Inkubation mit 70 % v/v Isopropanol permeabilisiert worden waren. Die Kalibrierproben wurden zusammen mit den experimentellen Proben untersucht, da durch die von dem Photometer für beide Fluoreszenzen automatisch ermittelten optimalen Verstärkungsfaktoren keine Vergleichbarkeit zweier Messdurchgänge gewährleistet werden konnte.

### *Membranintegritätstest über die GDH-Aktivität*

Als Alternative zum LIVE/DEAD<sup>(R)</sup> BacLight<sup>TM</sup> Viabilitätstest wurde zur qualitativen Beurteilung der Membranintegrität von *E.colis*, die einem definierten äußeren Stress – zum Beispiel durch Inkubation mit ionischen Flüssigkeiten – ausgesetzt werden, ein *E.coli*-Stamm verwendet, der eine *Bacillus subtilis* Glukosedehydrogenase exprimiert. Bei diesem *E.coli* ließ sich von der Tatsache profitieren, dass eine GDH nur dann aktiv sein kann, wenn es der Glukose gelingt, die Zellmembran zu überwinden. Da Glukose aber an der Zellmembran zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert wird und daher nur bei geschädigten Zellen die GDH erreicht, konnte die photometrisch bestimmte Zunahme an NADPH – bei Vorlage von NADP im Überschuss – als Indiz für die Permeabilisierung der Zellmembran herangezogen werden.

Die Herstellung der Zellen erfolgte im Schüttelkolben unter Verwendung von Autoinduktionsmedium. Nachdem die Zellen eine zufriedenstellende GDH-Aktivität erreicht hatten, wurden sie in einer Standzentrifuge abzentrifugiert ( $4500 \text{ min}^{-1}$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 15 min), in Umsetzungspuffer resuspendiert und dann für 5 h mit ionischen Flüssigkeiten inkubiert. Die anschließende Überprüfung der GDH-Aktivität, diente zur Beurteilung der Zugänglichkeit der GDH. Die Vorgehensweise zur Ermittlung der Aktivität war hierbei identisch zu der in Kapitel 4.5.2 beschriebenen, mit dem einzigen Unterschied, dass diese Zellsuspensionen nicht mit PopCulture aufgeschlossen wurden. Über einen Vergleich der durch die Inkubation mit IL bedingten GDH-Aktivität mit der maximalen Aktivität, die bei vollständigem Aufschluss mit PopCulture erreicht wurde, konnte dann anschließend die prozentuale Schädigung der Zellen qualitativ abgeschätzt werden.

## **4.6 Charakterisierung der Lösungsmittel**

### **4.6.1 Bestimmung der Löslichkeit von Ketonen und Alkoholen im Puffer**

Zur Bestimmung der Löslichkeit von Ketonen und Alkoholen im Puffer wurden die jeweiligen Umsetzungspuffer im Überschuss mit den einzelnen Substanzen versetzt und die sich daraus ergebenden zweiphasigen Lösungsmittelsysteme dann für 30 min bei  $1800 \text{ min}^{-1}$  in der Schwingarmmühle geschüttelt. Nach der Phasentrennung in der Standzentrifuge ( $4500 \text{ min}^{-1}$ , RT, 15 min) wurde die wässrige Phase anschließend mit Ethylacetat extrahiert und die dann in Ethylacetat vorliegende Edukt- und Produkt-Konzentrationen mit Hilfe des Gaschromatographen (GC) ermittelt.

#### 4.6.2 Bestimmung der Löslichkeit von Ketonen und Alkoholen in der IL

Aufgrund der allgemein sehr hohen Löslichkeit der Ketone und Alkohole in den verwendeten ionischen Flüssigkeiten und der im Hinblick auf die Biotransformation praktikablen Konzentrationen in der IL wurde auf eine quantitative Analyse verzichtet und nur überprüft, ob sich diese bis zu einer maximalen Konzentration von 600 mM in den ILs lösen lassen.

#### 4.6.3 Bestimmung der Verteilungskoeffizienten von Ketonen und Alkoholen zwischen IL und Puffer bzw. zwischen IL und Hexan

Die Bestimmung der Verteilungskoeffizienten erfolgte in drei aufeinander aufbauenden Extraktionsschritten. Zu Beginn wurde sowohl das Keton als auch der Alkohol in einer Konzentration von 150 mM bis 300 mM in n-Hexan vorgelegt und dann im Verhältnis 4:1 mit der jeweiligen IL in der Schwingarmmühle (1800 min<sup>-1</sup>, RT, 30 min) extrahiert. Die Startkonzentration im Hexan wurde dabei immer so gewählt, dass nach Einstellung des Gleichgewichts beide Substanzen in der jeweiligen IL, entsprechend der standardmäßigen Verhältnisse bei den Biotransformationen, in einer Konzentration von ca. 200 mM bis 300 mM vorlagen. Nach der Phasentrennung in der Standzentrifuge (4500 min<sup>-1</sup>, RT, 15 min) erfolgte eine erneute GC-Analyse der nun abgereicherten Hexan-Phase. Aus der Differenz der Konzentrationen vor und nach der Extraktion ergab sich dann nach Gleichung 4.6 die Konzentration in der IL.

**Gleichung 4.6**      
$$c_{(IL)} = (\varphi_d^{-1} - 1) \cdot (c_{(Hex),0} - c_{(Hex)})$$

mit	$c_{(IL)}$	Konzentration der Substanz in der IL nach der Extraktion mit Hexan, mol L <sup>-1</sup>
	$c_{(Hex),0}$	Anfangskonzentration der Substanz im Hexan, mol L <sup>-1</sup>
	$c_{(Hex)}$	Gleichgewichtskonzentration der Substanz im Hexan nach der Extraktion, mol L <sup>-1</sup>
	$\varphi_d$	Phasenanteil der ionischen Flüssigkeit, -

Die direkte Vorlage der Substanzen in der IL wäre mit einem größeren Fehler behaftet gewesen, da eine direkte Analyse der Konzentrationen in der IL nicht möglich war und somit Pipettierungenauigkeiten, aufgrund der geringen Keton- und Alkohol-Volumina, auch nicht hätten berücksichtigt werden können. Eine Vorlage in Hexan ermöglichte aber

dagegen die direkte Analyse der Start- und Gleichgewichtskonzentration und mit Kenntnis dieser konnte dann die tatsächliche Konzentration in der IL mit einer hohen Genauigkeit ermittelt werden.

Die mit Keton und Alkohol beladene IL wurde anschließend im Verhältnis 1:4 mit dem jeweiligen Umsetzungspuffer versetzt und ebenfalls in der Schwingarmmühle (1800 min<sup>-1</sup>, RT, 30 min) extrahiert. Nach erneuter Phasentrennung in der Standzentrifuge (4500 min<sup>-1</sup>, RT, 15 min), wurde die wässrige Phase entsprechend Kapitel 4.8.1 mit Hilfe der GC analysiert. Anschließend konnte dann mit Kenntnis der Konzentrationen im Umsetzungspuffer nach Gleichung 4.7 der dekadische Logarithmus der Verteilungskoeffizienten  $\log D$  berechnet werden.

**Gleichung 4.7**      
$$\log D_{IL/UP} = \log_{10} \frac{c_{(IL)} - (\varphi_d^{-1} - 1) \cdot c_{(UP)}}{c_{(UP)}}$$

mit       $\log D_{IL/UP}$       dekadischer Logarithmus des Verteilungskoeffizienten einer Substanz zwischen IL und Umsetzungspuffer

$c_{(UP)}$       Gleichgewichtskonzentration der Substanz im Umsetzungspuffer nach der Extraktion, mol L<sup>-1</sup>

Im letzten Extraktionsschritt wurde dieselbe IL nochmals im Verhältnis 1:4 mit reinem n-Hexan extrahiert. Die Prozedur war identisch mit der oben bereits beschriebenen. Nach Analyse der nun von der IL angereicherten Hexan-Phase konnte dann für beide Substanzen der logarithmierte Verteilungskoeffizient zwischen der mit Umsetzungspuffer gesättigten IL und Hexan nach Gleichung 4.8 ermittelt werden.

**Gleichung 4.8**      
$$\log D_{IL/Hex} = \log_{10} \frac{(c_{(IL)} - (\varphi_d^{-1} - 1) \cdot c_{(UP)}) - (\varphi_d^{-1} - 1) \cdot c_{(Hex)}}{c_{(Hex)}}$$

mit       $\log D_{IL/Hex}$       dekadischer Logarithmus des Verteilungskoeffizienten einer Substanz zwischen IL und Hexan

Der letzte Extraktionsschritt war nötig, da sich gezeigt hatte, dass der aus dem ersten Extraktionsschritt zwischen reiner IL und reinem Hexan ermittelte Verteilungskoeffizient sich deutlich von dem mit Umsetzungspuffer gesättigter IL unterschieden hat. Der Wasseranteil in einer IL scheint somit einen deutlichen Einfluss auf die Verteilung von Ketonen und Alkoholen zu haben und darf daher nicht vernachlässigt werden.

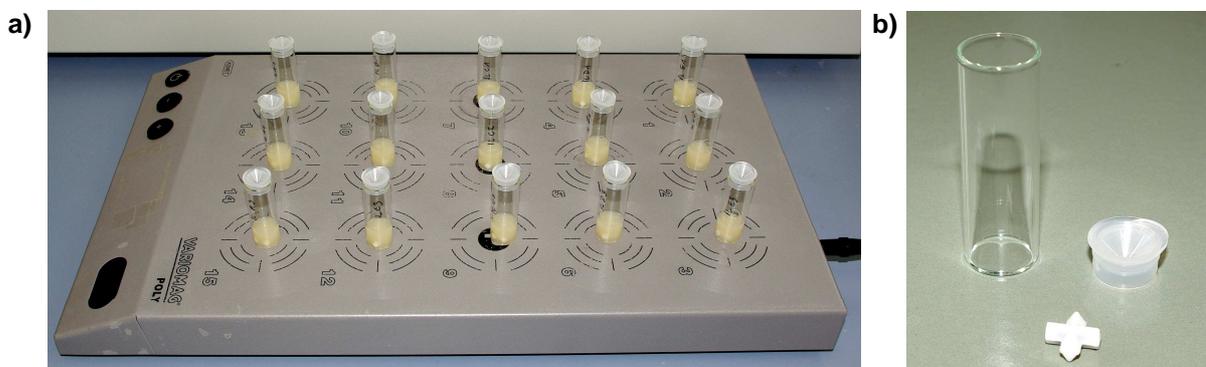
## 4.7 Durchführung der Ganzzell-Biokatalyse

### 4.7.1 Vorbereitung der Biokatalysatoren

Zur Vorbereitung des Biokatalysators für die anstehende Biotransformation wurde zunächst der Überstand der abzentrifugierten und bei 4°C gelagerten Zellen verworfen. Nach Zugabe der für die Einstellung der gewünschten Biomassenkonzentration benötigten Menge an Umsetzungspuffer (GDH-/G6PDH-*E.colis*: 100 mM KPi, 200 mM Glukose, pH 6,5; FDH-*E.colis*: 500 mM KPi, 1000 mM Natriumformiat, pH 6,5), erfolgte die Resuspendierung. Auf ein Waschen der Zellen mit Kaliumphosphatpuffer wurde verzichtet, da sich gezeigt hatte, dass sich dies negativ auf die Kondition der Zellen auswirkt. Anschließend wurde die OD<sub>600</sub> kontrolliert und bei Bedarf durch zusätzliche Zugabe von Zellen oder Puffer auf den gewünschten Wert eingestellt.

### 4.7.2 Gerührte Glasgefäße im 1,4 mL-Maßstab

Als Reaktionsgefäße für die Biotransformationen im 1,4 mL-Maßstab dienten zylindrische Glasgefäße mit einem Nominalvolumen von 4 mL. Die ausreichende Dispergierung der ionischen Flüssigkeit gewährleistete der Einsatz von Kreuzmagnetrührern, die von einer Mehrfachrührplatte angetrieben wurden (Abbildung 4.4). Zur Vermeidung von kritischen Eduktkonzentrationen in der wässrigen Phase, die die Zellen schädigen könnten, wurde zunächst nur die ionische Flüssigkeit vorgelegt und in dieser die gewünschte Menge an Edukt gelöst. Der Anteil der Lösungsmittelphase am späteren Gesamtvolumen betrug hierbei 20 %. Erst danach wurde durch Zugabe der resuspendierten Zellen die Reaktion gestartet. In rein wässrigen Ansätzen wurde dieselbe Eduktmenge zugegeben, wie bei



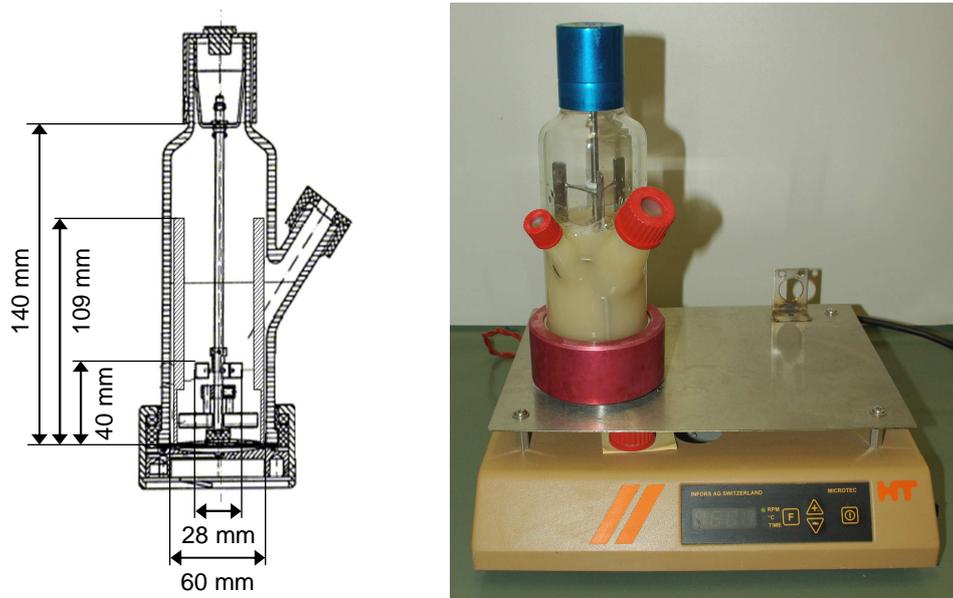
**Abbildung 4.4** a) Aufbau des mL-Reaktorsystems auf dem Mehrfachrührplatz. b) Als mL-Reaktor verwendetes Glasgefäß mit Kreuzmagnetrührer und Deckel

zweiphasigen Umsetzungen, so dass die auf die wässrige Phase bezogene theoretische Eduktkonzentration bei allen Ansätzen identisch war.

Alle Biotransformationen wurden im Lösungsmittelabzug bei Raumtemperatur durchgeführt. Um Verluste durch Verdampfung zu vermeiden, wurden die Reaktionsgefäße mit Deckeln verschlossen. Bei starker Gasentwicklung erfolgte bei Bedarf eine manuelle Entlüftung mit Hilfe einer Injektionsnadel. Die Rührgeschwindigkeit wurde zur Beschleunigung der IL-Dispergierung zunächst für 5 min auf  $900 \text{ min}^{-1}$  gesetzt. Anschließend erfolgte eine Reduktion auf  $350 \text{ min}^{-1}$ . Auf diese Weise konnte nicht nur eine nennenswerte Erhöhung der Mediumtemperatur vermieden werden, sondern auch eine eventuelle Schädigung der Zellen durch die dabei sonst auftretenden hohen Scherkräfte. Die Probenahme erfolgte mit Hilfe einer Pipette.

#### 4.7.3 Rührkesselreaktor im 200 mL-Maßstab

Bei dem verwendeten Rührkesselreaktor handelte es sich um eine modifizierte gerührte Blasensäule mit einem Nominalvolumen von 400 mL (Weuster Botz *et al.* 2002, Abbildung 4.5). Diese ist mit drei Strömungsbrechern mit einer Breite von je 15 mm und einem magnetisch angetriebenen 6-Blatt-Scheibenrührer ausgestattet. Die Scheibenblätter haben die Maße 8 mm x 8 mm. Die nicht benötigte Sinterplatte wurde durch eine Edelstahlplatte ersetzt.



**Abbildung 4.5** a) Schematische Darstellung des 200 mL-Rührkesselreaktors „Rührfors“. b) Aufbau des 200 mL-Rührkesselreaktors „Rührfors“.

Die Vorbereitung der Biotransformation wurde entsprechend Kapitel 4.7.2 durchgeführt. Die standardmäßig eingestellte Rührgeschwindigkeit betrug  $600 \text{ min}^{-1}$ . Das größere Volumen des Reaktors ermöglichte die Entnahme beliebig vieler Proben und somit die Aufnahme des zeitlichen Edukt- und Produkt-Konzentrationsverlaufs. Um die Reaktion möglichst schnell abzustoppen, wurden die Proben direkt nach der Entnahme in einer Tischzentrifuge ( $13000 \text{ min}^{-1}$ , RT, 5 min) zentrifugiert und dann entsprechend für die Analyse aufbereitet (Kapitel 4.8.1).

## **4.8 Gaschromatographische Analytik**

Die chirale Analytik der bei der Biokatalyse eingesetzten Ketone und der dabei gewonnenen chiralen Alkohole erfolgte mit dem Gaschromatograph CP-3800 unter Verwendung verschiedener Trennsäulen. Kalibrierstandards und interne Standards aus Acetophenon bzw. 2-Oktanon ermöglichten hierbei die genaue Quantifizierung. Die erforderliche Aufbereitung der Proben, sowie die für die Analyse der einzelnen Reaktionssysteme verwendeten Trennmethode werden im Folgenden näher dargestellt.

### **4.8.1 Probenvorbereitung für die Gaschromatographie**

Um eine ausreichende Phasentrennung sicherzustellen, wurden die zweiphasigen Proben, bestehend aus Puffer und IL, zunächst in einer Tischzentrifuge ( $13000 \text{ min}^{-1}$ , RT, 5 min) separiert. Anschließend mussten sowohl die wässrige Phase, als auch die ionische Flüssigkeit mit einem entsprechenden organischen Lösungsmittel extrahiert werden, da die Trennsäulen eine Sensibilität gegenüber Wasser aufwiesen und zudem die Gefahr einer Akkumulation von ionischer Flüssigkeit innerhalb der Trennsäule bestand.

Für die wässrige Phase wurde Ethylacetat in einem Verhältnis von 1:1 als Extraktionsmittel verwendet, in welchem zuvor 36 mM Acetophenon bzw. 2-Oktanon als interner Standard vorgelegt worden war. Die für die Extraktion erforderliche Durchmischung beider Phasen erfolgte in einem Thermomixer ( $1400 \text{ min}^{-1}$ , RT, 15 min). Nach anschließender Phasentrennung in der Tischzentrifuge ( $13000 \text{ min}^{-1}$ , RT, 5 min) wurde die organische Phase mit Kaliumcarbonat-getrocknetem Ethylacetat im Verhältnis 1:4 verdünnt und bis zur Analyse bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

Die Extraktion der ionischen Flüssigkeit erfolgte im Verhältnis 1:4 mit n-Hexan. Aufgrund der deutlich höheren Viskosität der IL-Proben und der damit erschwerten Dispergierung wurden beide Phasen in einer Schwingarm-Mühle ( $1800 \text{ min}^{-1}$ , RT, 30 min) vermischt. Nach der Phasentrennung in einer Standzentrifuge ( $4500 \text{ min}^{-1}$ , RT, 15 min) wurde die Hexanphase im Verhältnis 1:3:1 mit Kaliumcarbonat-getrocknetem Ethylacetat und mit internem Standard versetztem Ethylacetat verdünnt. Die Lagerung dieser GC-Proben erfolgte ebenfalls bei  $-20^\circ\text{C}$ .

Abweichend von der oben beschriebenen Vorgehensweise für zweiphasige Ansätze wurden Proben rein wässriger Ansätze, ohne vorherige Abtrennung der Zellen, direkt mit Ethylacetat (36 mM Acetophenon / 2-Oktanon) extrahiert. Fand anstelle der IL ein organisches Lösungsmittel als zweite Phase Verwendung, wurde diese direkt nach der Zentrifugation mit Ethylacetat verdünnt und analysiert.

#### 4.8.2 Chirale GC-Analytik von AP und PE

Acetophenon (AP) und 1-Phenylethanol (PE) wurden mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule:	BGB-174
Probeninjektion:	1 $\mu\text{l}$ ; Split 40
Säulenströmung:	7,0 ml $\text{min}^{-1}$ Helium 5.0
Ofentemperatur:	80°C für 0 min; mit $1,5^\circ\text{C min}^{-1}$ auf 112°C für 1 min; mit $15^\circ\text{C min}^{-1}$ auf 150°C für 2 min
Retentionszeiten:	2-Oktanon: 7,71; AP: 10,55 min; R-/S-PEOH: 17,06 min / 18,09 min .

#### 4.8.3 Chirale GC-Analytik von PP-ON und PP-OH

Propiophenon (PP) und 1-Phenylpropanol (PPOH) wurden mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule:	BGB-174
Probeninjektion:	1 $\mu\text{l}$ ; Split 40
Säulenströmung:	7,0 ml $\text{min}^{-1}$ Helium 5.0
Ofentemperatur:	80°C für 0 min; mit $1,5^\circ\text{C min}^{-1}$ auf 112°C für 1 min; mit $15^\circ\text{C min}^{-1}$ auf 150°C für 2 min
Retentionszeiten:	AP: 10,61 min; PP: 14,58 min; R-/S-PPOH: 18,71 min / 19,49 min .

#### 4.8.4 Chirale GC-Analytik von 4-Cl-AP und 4-Cl-PE

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

Trennsäule:	BGB-174
Probeninjektion:	1 µl; Split 40
Säulenströmung:	9,0 ml min <sup>-1</sup> Helium 5.0
Ofentemperatur:	75°C für 0 min; mit 2,5°C min <sup>-1</sup> auf 140°C für 1 min; mit 15°C min <sup>-1</sup> auf 150°C für 2 min
Retentionszeiten:	AP: 9,10 min; 4-Cl-AP: 20,58 min; (R/S)-4-Cl-PE: 25,65 min / 26,19 min .

#### 4.8.5 Chirale GC-Analytik von α-Cl-AP und α-Cl-PE

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

Trennsäule:	BGB-174
Probeninjektion:	1 µl; Split 40
Säulenströmung:	9,0 ml min <sup>-1</sup> Helium 5.0
Ofentemperatur:	75°C für 0 min; mit 2,5°C min <sup>-1</sup> auf 140°C für 1 min; mit 15°C min <sup>-1</sup> auf 150°C für 2 min
Retentionszeiten:	AP: 9,46 min; α-Cl-AP: 23,72 min; (R/S)-α-Cl-PE: 24,60 min / 25,21 min.

#### 4.8.6 Chirale GC-Analytik von 4-Cl-ACE und 4-Cl-HBE

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

Trennsäule:	Lipodex E
Probeninjektion:	1 µl; Split 50
Säulenströmung:	4 ml min <sup>-1</sup> Helium 5.0
Ofentemperatur:	105°C für 8 min
Retentionszeiten:	AP: 2,49 min; 4-Cl-ACE: 4,48 min; R-/S-4-Cl-HBE: 6,24 min / 6,73 min .

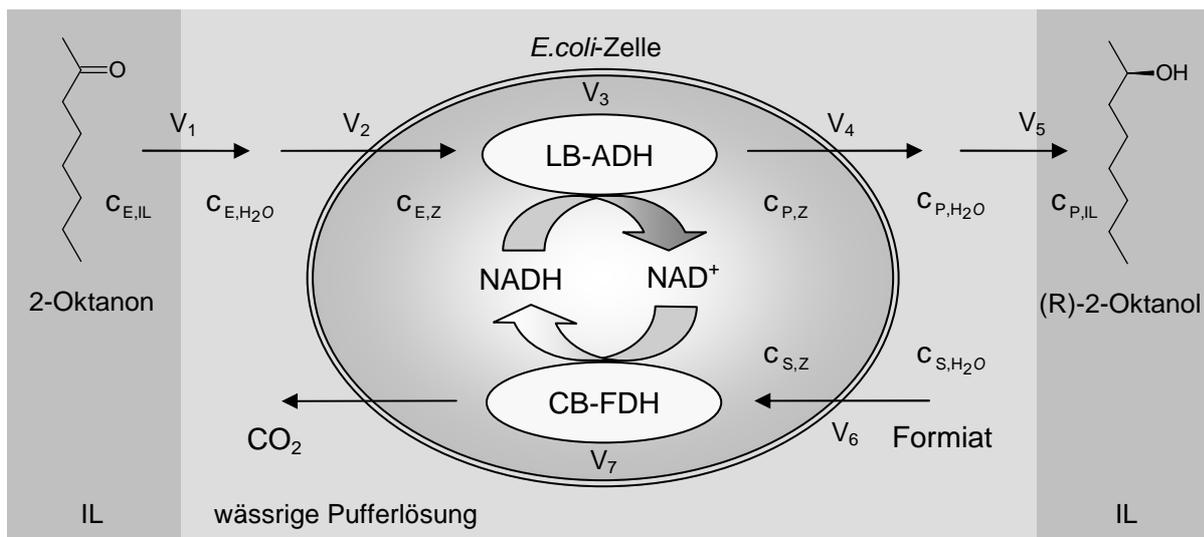
#### 4.8.7 Chirale GC-Analytik von 2-Oktanon und 2-Oktanol

2-Oktanon und 2-Oktanol wurden mit folgender Methode analysiert:

Trennsäule:	BGB-175
Probeninjektion:	1 $\mu\text{l}$ ; Split 40
Säulenströmung:	2,5 ml $\text{min}^{-1}$ Helium 5.0
Ofentemperatur:	50°C für 44 min; mit 6°C $\text{min}^{-1}$ auf 150°C für 1 min
Retentionszeiten:	2-Oktanon: 32,43 min; S-/R-2-Oktanol: 36,01 min / 37,53 min; AP: 53,24 min .

#### 4.9 Modellierung der zweiphasigen Ganzzell-Biotransformation

Zur Identifikation von Optimierungspotentialen der zweiphasig geführten Ganzzell-Biotransformation im Satzverfahren sollte eine Modellierung der Stofftransportvorgänge und der intrazellulären Reaktion am Beispiel der Umsetzung von 2-Oktanon zu (R)-2-Oktanol erfolgen. In Abbildung 4.6 sind die zu berücksichtigenden Teilschritte schematisch dargestellt. Die Geschwindigkeit  $v_1$  entspricht der Edukttransferrate aus der ionischen Flüssigkeit in die wässrige Pufferlösung (Kapitel 3.6.2). Im Falle einer hier vorliegenden Stofftransportlimitierung ließ sich durch eine Erhöhung der Rührerdrehzahl bzw. Energieeintrags eine gesteigerte Produktbildungsrate beobachten. War der Stoffübergang aus der IL jedoch nicht



**Abbildung 4.6** Schematische Darstellung der Stofftransportvorgänge bei der asymmetrischen Ganzzell-Biotransformation von 2-Oktanon zu (R)-2-Oktanol.

limitierend für den Gesamtprozess, konnte vereinfachend ein thermodynamisches Gleichgewicht beim Übergang von Edukt aus der IL in die wässrige Phase angenommen werden, so dass sich in der wässrigen Phase eine Edukt-Konzentration entsprechend des Verteilungskoeffizienten einstellt, die sich demnach für den Zeitpunkt  $t_i$  über Gleichung 4.9 berechnen lässt. Für Verteilungskoeffizienten  $\gg 500$  kann bei diesem Berechnungsschritt vernachlässigt werden, dass sich infolge des Stoffübergangs auch die Edukt-Konzentration in der ionischen Flüssigkeit ändert, da der daraus resultierende Fehler weit unter 1 % liegt.

**Gleichung 4.9** 
$$c_{E,H_2O}(t_i) = \frac{c_{E,IL}(t_i)}{D_{E-IL/H_2O}}$$

mit	$c_{E,H_2O}$	Konzentration von Edukt in der wässrigen Phase, mol L <sup>-1</sup>
	$c_{E,IL}$	Konzentration von Edukt in der IL, mol L <sup>-1</sup>
	$D_{E-IL/H_2O}$	Verteilungskoeffizient von Edukt zwischen IL und wässriger Phase, -
	$t_i$	Zeit zu Beginn eines Zeitintervalls, s .

Die auf diese Weise berechnete Edukt-Konzentration  $c_{E,H_2O}$  lässt sich dann für die Berechnung der Zellmembran-bezogenen Permeations-Flußdichte verwenden (Gleichung 3.4). Da aber weder der Permeabilitätskoeffizient der Membran  $P_{E,d}$ , noch die für die Berechnung der insgesamt übergehenden Stoffmenge benötigte Zellmembranfläche bekannt ist, wird in Gleichung 3.1 die Membranoberfläche  $A$  durch

**Gleichung 4.10** 
$$A = a_x \cdot c_x \cdot V_{H_2O}$$

mit	$a_x$	spezifische Zellmembranfläche, dm <sup>2</sup> g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup>
	$c_x$	Konzentration der Biotrockenmasse, g <sub>BTM</sub> L <sup>-1</sup>
	$V_{H_2O}$	Volumen der wässrigen Phase (H <sub>2</sub> O + Zellen) , L.

ersetzt und eine modifizierte Definition der Permeations-Flußdichte  $J_{E,BTM}$  in Abhängigkeit der verwendeten Biotrockenmasse-Konzentration eingeführt:

**Gleichung 4.11** 
$$\begin{aligned} J_{E,BTM}(t_i) &\equiv J_E(t_i) \cdot a_x = \frac{\dot{n}_E(t_i)}{c_x \cdot V_{H_2O}} = P_{E,d} \cdot a_x \cdot (c_{E,H_2O}(t_i) - c_{E,Z}(t_i)) \\ &= P_{E,BTM} \cdot (c_{E,H_2O}(t_i) - c_{E,Z}(t_i)) \end{aligned}$$

mit	$J_{E,BTM}$	Permeations-Flußdichte des Edukts bezogen auf die Biotrockenmasse, mol g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>
-----	-------------	---

$P_{E,BTM}$  Permeabilitätskoeffizient für das Edukt bezogen auf die Konzentration der Biotrockenmasse,  $L \text{ g}_{BTM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

Der nicht bekannte Permeabilitätskoeffizient  $P_{E,BTM}$  lässt sich später anhand einer exemplarischen Biotransformation im 200 mL-Maßstab durch eine Parameteridentifikation mit Microsoft Excel unter Verwendung der Fehlerquadratsumme als Optimierungskriterium bestimmen.

Das Volumen der wässrigen Phase (mit Biokatalysator) lässt sich mit Gleichung 4.12 in Abhängigkeit des Phasenanteils der ionischen Flüssigkeit ermitteln:

**Gleichung 4.12**  $V_{H_2O} = V_G \cdot (1 - \varphi_d)$

mit  $V_G$  Gesamt-Reaktionsvolumen ( $H_2O + IL + Zellen$ ), L  
 $\varphi_d$  Phasenanteil der ionischen Flüssigkeit, - .

Ist das spezifische Volumen  $v_X$  des Biokatalysators *E.coli* bekannt, kann unter Berücksichtigung der eindiffundierenden Eduktmenge dann über eine numerische Integration mit Hilfe des Euler-Verfahrens (Gleichung 4.13):

**Gleichung 4.13**  $\frac{dc}{dt} \approx \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{c(t_{i+1}) - c(t_i)}{t_{i+1} - t_i} = \frac{J_{E,BTM}(t_i)}{v_X}$

die theoretische intrazelluläre Edukt-Konzentration abgeschätzt werden, die sich zum Zeitpunkt  $t_{i+1}$  unter Vernachlässigung der Reaktion ergeben würde (Gleichung 4.14):

**Gleichung 4.14**  $c_{E,Z(\text{Theorie})}(t_{i+1}) = c_{E,Z}(t_i) + J_{E,BTM}(t_i) \cdot \frac{1}{v_X} \cdot (t_{i+1} - t_i)$

mit  $c_{E,Z(\text{Theorie})}$  theoretische intrazelluläre Eduktkonzentration unter Vernachlässigung der Reaktion,  $\text{mol L}^{-1}$   
 $v_X$  spezifisches Volumen des Biokatalysators ( $= 2,33 \cdot 10^{-3} \text{ L g}_{BTM}^{-1}$ ),  $L \text{ g}_{BTM}^{-1}$   
 $t_{i+1} - t_i$  Schrittweite, s

Die Berechnung erfolgt mit einer Schrittweite von 6 s. Als Startwert für die intrazelluläre Edukt-Konzentration wird  $c_{E,Z}(t_0) = 0 \text{ mol L}^{-1}$  verwendet.

Da die katalytische Aktivität des Enzyms, parallel zur Diffusion von Edukt in die Zelle, auch

eine Umsetzung von Edukt bewirkt, liegt die reale intrazelluläre Konzentration aber unter der theoretischen. Für die spätere Abschätzung der Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms wird daher nach Gleichung 4.15 in erster Näherung der arithmetische Mittelwert aus den intrazellulären Edukt-Konzentrationen  $c_{E,Z}(t_i)$  und  $c_{E,Z(\text{Theorie})}(t_{i+1})$  ermittelt:

**Gleichung 4.15** 
$$c_{E,Z}(t_{i/i+1}) = \frac{c_{E,Z}(t_i) + c_{E,Z(\text{Theorie})}(t_{i+1})}{2}$$

mit  $c_{E,Z}(t_{i/i+1})$  gemittelte intrazelluläre Edukt-Konzentration, mol L<sup>-1</sup>.

Diese Vorgehensweise ermöglicht eine hinreichend genaue Abschätzung der Reaktionsgeschwindigkeit. Unter der Annahme, dass von der Formiatdehydrogenase eine ausreichend hohe, nicht limitierende intrazelluläre NADH-Konzentration bereitgestellt wird, kann der Einfluss der FDH-Enzymkinetik auf die Produktbildungsgeschwindigkeit  $v_3$  (siehe Abbildung 4.6) vernachlässigt werden. Unter dieser Voraussetzung ist die alleinige Berücksichtigung der Kinetik der ADH ausreichend. Da es sich hierbei um eine 2-Substrat-2-Produkt-Reaktion handelt, müsste – wenn angenommen werden kann, dass es sich hier wie bei vielen Alkoholdehydrogenasen um einen *ordered Bi-Bi*-Mechanismus (Kapitel 3.2.2) handelt und die Enzymkinetik weder einer Edukt- noch Produktinhibierung unterliegt – Gleichung 3.9 zur exakten Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit herangezogen werden. Da aber die dafür benötigten Parameter in der Literatur bisher noch nicht beschrieben worden sind und eine Ermittlung derer mehrere Monate in Anspruch nehmen würde, findet vereinfachend die in Gleichung 4.16 dargestellte 1-Substrat-1-Produkt-Kinetik Verwendung (Kapitel 3.2.2), unter der Annahme, dass allein die intrazelluläre Edukt-Konzentration limitierend für die Reaktion ist und NADH in ausreichender Menge durch das Regenerierungsenzym FDH nachgeliefert wird.

**Gleichung 4.16** 
$$v_{3,\text{BTM}}(t_{i/i+1}) = v_{\text{max,BTM}} \cdot \frac{c_{E,Z}(t_{i/i+1})}{K_m + c_{E,Z}(t_{i/i+1})}$$

mit  $v_{3,\text{BTM}}(t_{i/i+1})$  gemittelte Reaktionsgeschwindigkeit der ADH bezogen auf die Biotrockenmasse, mol s<sup>-1</sup> g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup>

$K_m$  Halbsättigungskonzentration (2-Oktanon: 0,04492 mmol L<sup>-1</sup> (Kohlmann *et al.* 2008)), mol L<sup>-1</sup>.

Über eine Stoffbilanz kann dann unter Berücksichtigung der eindiffundierenden und abreagierenden Eduktmenge nun die Berechnung der intrazellulären Edukt-Konzentration zum Zeitpunkt  $t_{i+1}$  erfolgen.

$$\text{Gleichung 4.17} \quad c_{E,Z}(t_{i+1}) = c_{E,Z}(t_i) + J_{E,BTM}(t_i) \cdot \frac{1}{V_X} \cdot (t_{i+1} - t_i) - \frac{v_{3,BTM}(t_{i+1})}{V_X \cdot c_X \cdot V_{H_2O}} \cdot (t_{i+1} - t_i)$$

Die intrazelluläre Produkt-Konzentration lässt sich analog zur Edukt-Konzentration über Gleichung 4.18 ermitteln:

$$\text{Gleichung 4.18} \quad c_{P,Z}(t_{i+1}) = c_{P,Z}(t_i) + J_{P,BTM}(t_i) \cdot \frac{1}{V_X} \cdot (t_{i+1} - t_i) + \frac{v_{3,BTM}(t_{i+1})}{V_X \cdot c_X \cdot V_{H_2O}} \cdot (t_{i+1} - t_i).$$

Der nicht bekannte Permeabilitätskoeffizient  $P_{P,BTM}$  lässt sich ebenfalls anhand einer exemplarischen Biotransformation im 200 mL-Maßstab durch eine Parameteridentifikation bestimmen. Die Berücksichtigung des Stoffübergangs von Produkt aus der Zelle in die wässrige Phase, sowie dann anschließend in die ionische Flüssigkeit, erfolgt analog zum Edukt. Die Edukt-Konzentration in der ionischen Flüssigkeit zum Zeitpunkt  $t_{i+1}$  ergibt sich abschließend über eine Stoffbilanz unter Vernachlässigung der intrazellulären Stoffmengen zu:

$$\text{Gleichung 4.19} \quad c_{E,IL}(t_{i+1}) = c_{E,IL}(t_i) - c_{E,H_2O}(t_i) \cdot (\varphi_d^{-1} - 1) - c_{P,H_2O}(t_{i+1}) \cdot (\varphi_d^{-1} - 1) - c_{P,IL}(t_{i+1}).$$

## 5 Prozessentwicklung zur Biokatalysator-Herstellung

Für die vier rekombinanten *E.coli*-Stämme wurden Satz- bzw. Zulaufverfahren zur effektiven Herstellung der Biokatalysatoren entwickelt. Aufgrund der bei einer Ganzzell-Biotransformation meist vorliegenden Stofftransport-Limitierung an der Zellmembran zielte diese daher nicht nur auf eine ausreichende Expression der zur späteren Umsetzung bzw. Cofaktor-regenerierung benötigten Enzyme, sondern gleichzeitig auch auf eine möglichst effiziente Produktion von Biomasse ab. Da in der Literatur bisher noch keine Daten zur LB-ADH Expression in *E.coli* veröffentlicht worden sind, erfolgte daher ein Vergleich mit den von Pfründer (2005) mit *Lactobacillus kefir* generierten Ergebnissen.

### 5.1 Herstellung von *Escherichia coli* BL21 LB-ADH MV-FDH

Die Tatsache, dass *Escherichia coli* BL21 LB-ADH MV-FDH mit zwei verschiedenen Plasmiden versehen war, die getrennt voneinander die Gene für ADH und FDH trugen, erforderte ein Anzuchtverfahren, das einem drohenden Plasmidverlust entgegenwirkte. Trotz der Verwendung von zwei spezifischen Selektionsmarkern zeigte sich aber, dass ein Plasmidverlust unter besonderen Stressbedingungen, wie sie zum Beispiel in einem Hochzell-dichte-Verfahren vorliegen, nicht vermieden werden konnte. Aufgrund dessen beschränkte sich die Prozessentwicklung zur Herstellung des Biokatalysators auf die Optimierung eines Satzverfahrens.

#### 5.1.1 Herstellung im Satzverfahren

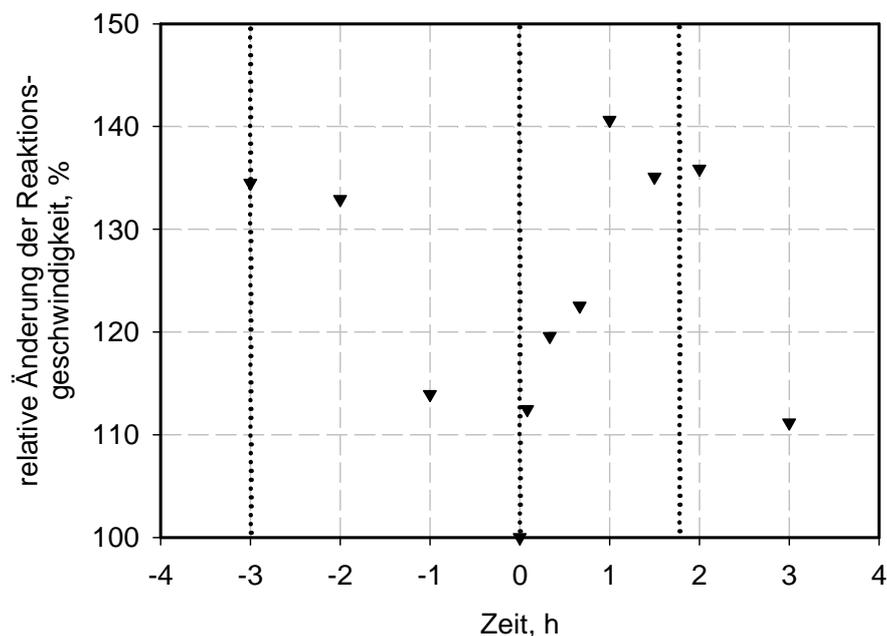
Die Herstellung des Biokatalysators erfolgte zunächst unter Verwendung eines modifizierten LB-Mediums mit 30 g L<sup>-1</sup> Glukose (Tabelle 16.9). Einem drohenden Plasmidverlust wurde hierbei durch Erhöhung der Antibiotika-Konzentration auf 100 mg L<sup>-1</sup> versucht entgegenzuwirken. Die Induktion erfolgte direkt nach Verstoffwechslung der Glukose durch Zugabe von 1 mM IPTG. Die nach fünf Stunden generierten Aktivitäten lagen aber deutlich unter denen, die im Schüttelkolben erreicht worden waren. Da vermutet wurde, dass dies

durch den erhöhten Stress bei der Hochzell-dichte-Kultivierung und die zu Beginn der Induktion eventuell erhöhte Acetatkonzentration bedingt sei, wurde in den anschließenden Kultivierungen die Glukose-Konzentration im Medium auf  $10 \text{ g L}^{-1}$  begrenzt. Zusätzlich erfolgte mit der Induktion eine Zugabe von  $5 \text{ g L}^{-1}$  Glycerin, welches anstelle von Glukose, unter Umgehung einer Katabolit-repression, den Zellen während der Induktion als C-Quelle dienen sollte. Durch diese Maßnahme konnte eine allgemeine Verbesserung der Aktivitäten erreicht werden. Während aber die ADH-Aktivitäten zufrieden stellend ausfielen, wurde die FDH immer noch unzureichend exprimiert. Infolgedessen kam der Verdacht auf, dass ein gewisser Teil der Zellen während der Kultivierung sein FDH-Plasmid verloren hatte. Da eine hohe Phosphat-Konzentration im Medium die Kanamycin-Resistenz von *E.colis* deutlich erhöhen kann (Studier 2005), hätten sich nämlich auch Zellen ohne FDH-Plasmid und ohne Kanamycin-Resistenz vermehren können. In den nachfolgenden Kultivierungen galt es daher die Phosphat-Konzentration im Medium zu verringern.

Da das von Studier (2005) vorgeschlagene Autoinduktionsmedium für Schüttelkolben-Kulturen eine deutlich effektivere Proteinexpression erlauben sollte, wurde dann auf dessen Grundlage ein modifiziertes Medium für mittlere Zelldichten bis  $12 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  entwickelt (Tabelle 16.11). Um die Expression erst bei höheren Zelldichten auszulösen, wurde die Glukose-Konzentration auf  $6 \text{ g L}^{-1}$  erhöht. Die Phosphatkonzentration wurde dagegen aufgrund der beschriebenen Kanamycin-Problematik halbiert.

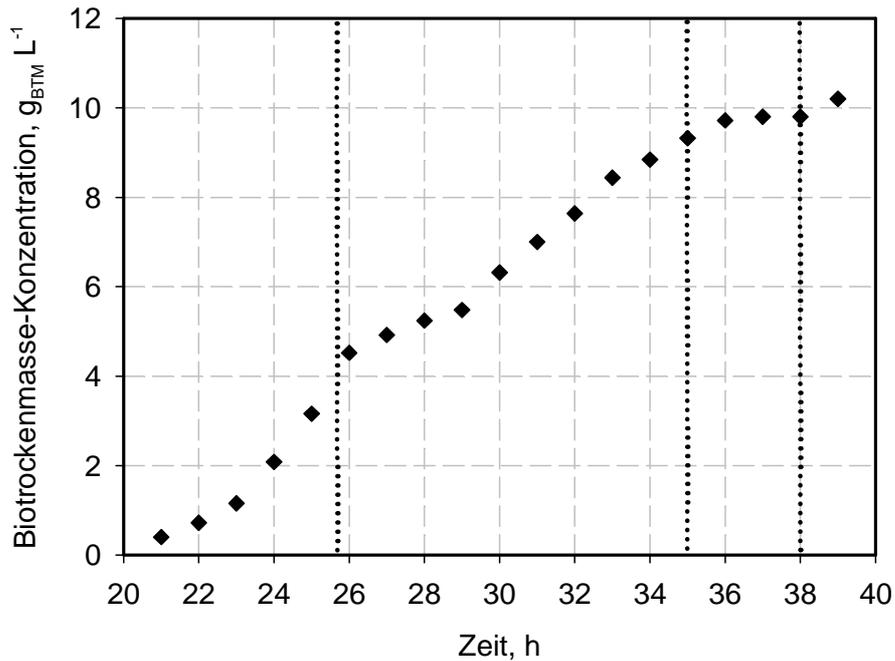
Durch die Verwendung des modifizierten Autoinduktions-Mediums konnte nicht nur von einer höheren ADH- und FDH-Aktivität profitiert werden, sondern zudem von einer einfacheren Handhabung, da durch die Vorlage von Laktose als Induktor nach dem Animpfen keine weiteren manuellen Eingriffe in die Kultivierung mehr erforderlich waren. Trotz der nun zufrieden stellenden Aktivität zeigte sich aber bei den späteren Biotransformationen, dass diese nicht maßgebend für eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit war. Während die direkt nach der Verstoffwechslung der C-Quellen geernteten und als Biokatalysator eingesetzten Zellen zufrieden stellende Reaktionsgeschwindigkeiten aufzeigten, generierten die bei  $4^\circ\text{C}$ , über ein bis zwei Tage gelagerten Zellen um 50 % niedrigere Reaktionsgeschwindigkeiten, obwohl sie die gleichen Aktivitäten wie die frisch verwendeten Zellen aufwiesen. Aus diesem Grund wurde eine dreistündige „Hungerphase“ etabliert, welche dadurch gekennzeichnet war, dass den Zellen im Medium kein Substrat zur Verfügung stand. Anschließend erfolgte eine Zugabe von  $5 \text{ g L}^{-1}$  Glukose. Die dann eine Stunde nach dem Glukose-Puls geernteten und anschließend bei  $4^\circ\text{C}$  gelagerten Zellen lieferten über einen Zeitraum von zwei Wochen gleich bleibend gute Biotransformations-Ergebnisse.

Um die Ursache für diesen Effekt zu identifizieren, wurde der Einfluss der Hungerphase und des Glukose-Pulses auf die Reaktionsgeschwindigkeit genauer untersucht. Die in Abbildung 5.1 auf den Zeitpunkt der Glukose-Zugabe bezogene relative Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit zeigt, dass während der Hungerphase die gesamtbiokatalytische Aktivität der Zellen um 35 % einbricht. Nach dem Glukose-Puls erreichen die Zellen aber innerhalb von einer Stunde wieder ihre ursprüngliche Gesamtaktivität. Damit kann allerdings immer noch nicht erklärt werden, warum durch Kombination von Hungerphase und Glukose-Puls die Leistungsfähigkeit des Biokatalysators über einen längeren Zeitraum erhalten bleibt.



**Abbildung 5.1** Relative Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit bei einer Biotransformation von 4-Cl-AP zu (R)-Cl-PE mit zu unterschiedlichen Zeitpunkten geernteten Zellen, bezogen auf die Reaktionsgeschwindigkeit bei  $t = 0$  h (gestrichelte vertikale Linien kennzeichnen den Beginn der Hungerphase (-3 h), den Zeitpunkt des Glukose-Pulses (0 h) und die vollständige Verstoffwechslung von Glukose (1,75 h)).

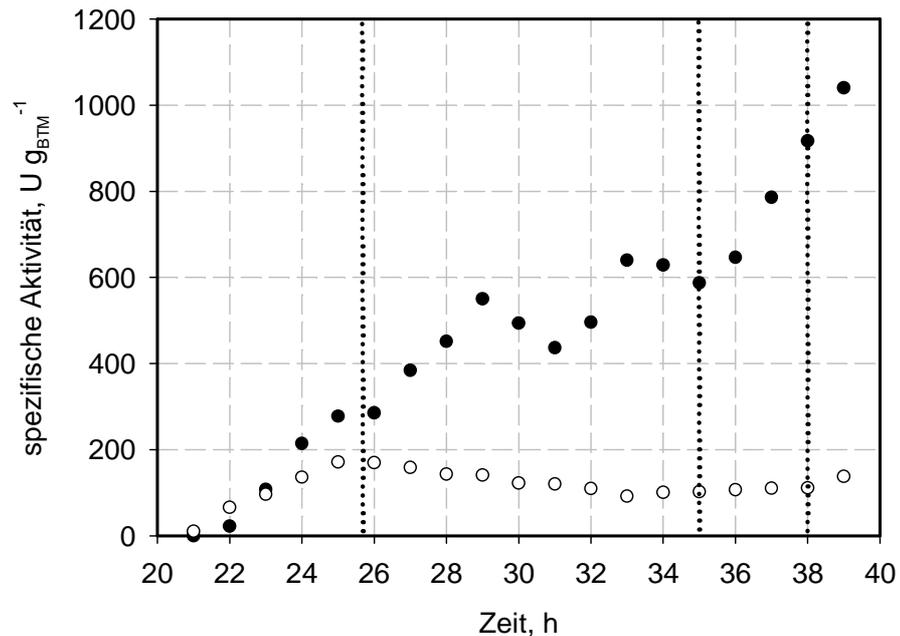
Abbildungen 5.2 und 5.3 zeigen den Verlauf der Biotrockenmasse-Konzentration bzw. den der spezifischen ADH- und FDH-Aktivität während der Kultivierung im 5 L-Satzverfahren unter Verwendung des modifizierten Autoinduktions-Mediums. Nachdem der Rührkesselreaktor mit acht Zellkolonien einer Agarplatte angeimpft worden war, wurde der  $pO_2$  über die Rührerdrehzahl auf einen Bereich von 5 % bis 15 % geregelt, ohne allerdings eine minimale Drehzahl von  $600 \text{ min}^{-1}$  zu unterschreiten. Anhand der vertikalen gestrichelten Linien ist der Beginn der Verstoffwechslung von Glycerin ( $\sim 25,5$  h), der Beginn der Hungerphase ( $\sim 35$  h) und der Zeitpunkt des Glukose-Pulses (38 h) visualisiert.



**Abbildung 5.2** Verlauf der Biotrockenmasse-Konzentration während der Kultivierung von *E.coli* BL21 LB-ADH MV-FDH im 5 L-Satzverfahren (gestrichelte vertikale Linien kennzeichnen den Beginn der Verstoffwechslung von Glycerin (~ 25,5 h), den Beginn der Hungerphase (~ 35 h) und den Zeitpunkt des Glukose-Pulses (38 h)).

Von den drei im Medium vorgelegten C-Quellen – Glukose, Glycerin und Laktose – bevorzugen *E.colis* zunächst Glukose. Aufgrund der bei niedrigen Zelldichten ausreichenden Sauerstoffversorgung, bedingt durch die konstante minimale Rührerdrehzahl von  $600 \text{ min}^{-1}$ , wachsen die Zellen in dieser Phase zunächst exponentiell auf eine Zelldichte von bis zu  $4,5 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ . Mit Beginn der Glycerin-Verstoffwechslung flacht das Wachstum dann aber ab und geht in ein, näherungsweise, lineares Zellwachstum über. Ursache hierfür ist zum einen die für eine optimale Induktion erwünschte Sauerstofflimitierung ( $5\% < p\text{O}_2 < 10\%$ ) und zum anderen die sich verstärkende Expression der Enzyme. Ein plötzlicher starker  $p\text{O}_2$ -Anstieg signalisierte schließlich das Auftreten einer Substratlimitierung und somit den Übergang in die Hungerphase. Nach der vollständigen Verstoffwechslung der Nebenprodukte wie Acetat und Formiat hatten die Zellen eine Biotrockenmasse-Konzentration von  $10 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  erreicht. Die spätere Zugabe von  $5 \text{ g L}^{-1}$  Glukose bewirkte nur noch eine geringe Zunahme an Biomasse, da der Biokatalysator bereits eine Stunde nach dem Glukose-Puls geerntet wurde.

Bei Betrachtung der spezifischen Aktivitäten in Abbildung 5.3 zeigt sich sowohl für die ADH als auch FDH, dass die Induktion, trotz der Katabolitrepession, schon während der Verstoffwechslung von Glukose eingeleitet wird. Erwartungsgemäß nimmt die ADH-Aktivität



**Abbildung 5.3** Verlauf der spezifischen LB-ADH- ● und der MV-FDH-Aktivität ○ während der Kultivierung von *E.coli* BL21 LB-ADH MV-FDH im 5 L-Satzverfahren (gestrichelte vertikale Linien kennzeichnen den Beginn der Verstoffwechslung von Glycerin (~ 25,5 h), den Beginn der Hungerphase (~ 35 h) und den Zeitpunkt des Glukose-Pulses (38 h)).

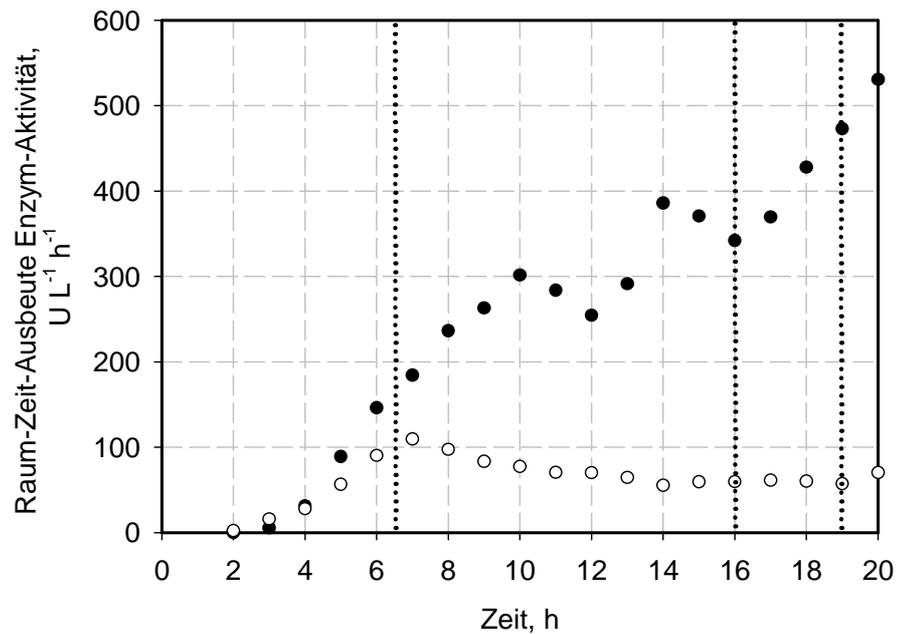
in der sogenannten Glycerin-Phase weiter zu und erreicht schließlich zu Beginn der Hungerphase einen Wert von ca. 600 U g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup>. Die spezifische FDH-Aktivität verringert sich dagegen im Laufe der Glycerin-Verstoffwechslung von zunächst 180 U g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> auf etwa 100 U g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup>. Von der anschließenden Hungerphase profitiert vor allem die ADH. Diese kann innerhalb von drei Stunden um 75 % zulegen, während sich die FDH nur um ca. 10 % erholt. Die Zunahme während der Hungerphase lässt sich auf die verminderte Transkriptionsrate der für das Protein kodierenden DNA zurückführen, wodurch sich zwar die Menge an zusätzlich gebildeten Enzym reduziert, aber das Verhältnis von aktiven zu refraktilen Enzym deutlich erhöht (Kopetzki und Schumacher 1988). Nach dem Glukose-Puls konnte der Biokatalysator schließlich mit einer Aktivität von ca. 1050 U g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> für die ADH und 140 U g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> für die FDH geerntet werden.

### 5.1.2 Diskussion

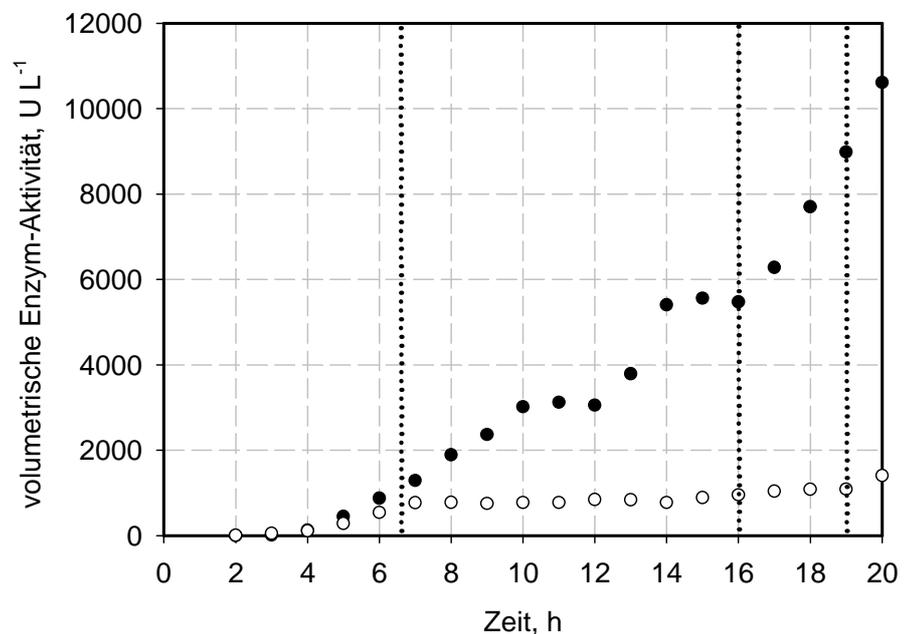
Der Biokatalysator ließ sich unter Verwendung eines modifizierten Autoinduktionsmediums im Satzverfahren mit zufrieden stellenden Aktivitäten herstellen. Eine dreistündige Hungerphase in Kombination mit einem Glukose-Puls hat sich als geeignete Methode erwiesen, die gesamt-katalytische Aktivität auch über eine längere Lagerzeit zu erhalten. Da die Aktivitäten von ADH und FDH über die Lagerungszeit nahezu konstant blieben, wurde bei früher geernteten Zellen eine niedrigere NAD(H)-Konzentration als Ursache der limitierten Reaktionsgeschwindigkeit vermutet. Die Konzentration hätte dann zwar direkt nach der Ernte noch für zufrieden stellende Ergebnisse ausgereicht, im Laufe der Lagerung aber weiter abgenommen und somit einen kritischen Wert unterschritten. Nach dieser Theorie müsste dann aber die Kombination von Hungerphase und Glukose-Puls die NAD(H)-Konzentration soweit angehoben haben, dass trotz der kontinuierlichen Abnahme während der Lagerung eine ausreichende Konzentration für eine der Enzymaktivitäten entsprechende optimale Biotransformation zur Verfügung gestanden hat. Eine Analyse der intrazellulären NAD(H)-Konzentration vor und nach dem Glukose-Puls konnte diese Annahme allerdings nicht bestätigen.

Bezieht man die Kultivierungszeit für die Berechnung der Raum-Zeit-Ausbeute an Enzymaktivität korrekter Weise auf den Zeitpunkt, bei dem die Biomassekonzentration einen Wert von ungefähr  $0,2 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  erreicht hat – entsprechend der sonst üblichen Animpfkonzentrationen – ergibt sich zum Zeitpunkt der Ernte eine Raum-Zeit-Ausbeute von  $540 \text{ U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  für ADH und  $70 \text{ U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  für FDH (Abbildung 5.4). Damit konnte im Vergleich zu den von Pfründer (2005) mit *Lactobacillus kefir* im Zulaufverfahren generierten Ergebnissen die ADH bezogene Raum-Zeit-Ausbeute verdoppelt werden. Unter Berücksichtigung, dass die hier dargestellte NADH-abhängige Aktivität der LB-ADH bei Nutzung von NADPH als Cofaktor noch zehnfach höher ausfällt, ergibt sich eine um das zwanzigfache gesteigerte Raum-Zeit-Ausbeute. Dieses Ergebnis unterstreicht auf eindrucksvolle Weise den großen Vorteil rekombinanter *Escherichia coli* zur Expression artfremder Enzyme. Gegenüber den korrespondierenden Wildtyp-Stämmen profitieren sie hierbei vor allem von ihrem schnellen Wachstum und der kontrollierten Expression des gewünschten Enzyms.

Hinsichtlich der volumetrischen ADH-Aktivität ergibt sich im Vergleich zu Pfründer (2005) mit  $10600 \text{ U L}^{-1}$  ein um 12 % niedrigeres Ergebnis (Abbildung 5.5). Bezieht man diese allerdings auch hier auf den Cofaktor NADPH übertrifft der hier dargestellte Prozess den von Pfründer (2005) um mehr als das achtfache. Die volumetrische FDH-Aktivität fällt im



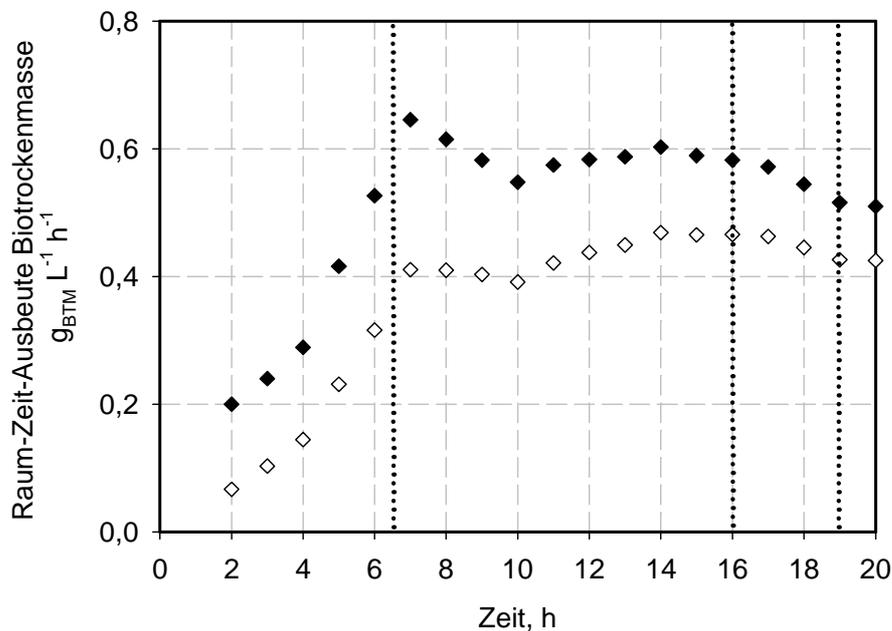
**Abbildung 5.4** Verlauf der Raum-Zeit-Ausbeute an LB-ADH-● und MV-FDH-Aktivität ○ während der Kultivierung von *E.coli* BL21 LB-ADH MV-FDH im 5 L-Satzverfahren (gestrichelte vertikale Linien kennzeichnen den Beginn der Verstoffwechslung von Glycerin (~ 6,5 h), den Beginn der Hungerphase (~ 16 h) und den Zeitpunkt des Glukose-Pulses (19 h)).



**Abbildung 5.5** Verlauf der volumetrischen LB-ADH-● und MV-FDH-Aktivität ○ während der Kultivierung von *E.coli* BL21 LB-ADH MV-FDH im 5 L-Satzverfahren (gestrichelte vertikale Linien kennzeichnen den Beginn der Verstoffwechslung von Glycerin (~ 6,5 h), den Beginn der Hungerphase (~ 16 h) und den Zeitpunkt des Glukose-Pulses (19 h)).

Vergleich dazu deutlich geringer aus. Sie lässt sich aber durch den Glukose-Puls noch mal um 30 % steigern und liegt zum Zeitpunkt der Ernte bei etwa  $1400 \text{ U L}^{-1}$ .

Da die Zellen als Ganzzell-Biokatalysator Verwendung finden sollten und sich gezeigt hatte, dass nicht die spezifische Aktivität von ADH und FDH die Leistungsfähigkeit des Biokatalysators bei Biotransformationen limitiert, sondern der Stofftransport von Edukt durch die Zellmembran, muss neben einer ausreichenden spezifischen Aktivität vor allem eine möglichst effiziente Biomasse-Produktion gewährleistet sein. Eine hohe Ausbeute an Biomasse eröffnet zudem bei späteren Biotransformationen die Möglichkeit höhere Biokatalysatorkonzentrationen einstellen zu können, um dann von einer höheren Edukttransferrate zu profitieren. Unter der Voraussetzung, dass für die Prozesszeit die reine Kultivierungsdauer angesetzt werden kann, wird bereits nach sieben Stunden mit einem Wert von  $0,65 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  die maximale Raum-Zeit-Ausbeute an Biotrockenmasse erreicht (Abbildung 5.6). Über den optimalen Erntezeitpunkt lässt sich allerdings nur eine realistische Aussage treffen, wenn zusätzlich die für die Vorbereitung des Reaktors benötigte Zeit Berücksichtigung findet. Werden vier Stunden für das Spülen und Füllen des Reaktors, sowie für das Einstellen der gewünschten Reaktionsbedingungen einkalkuliert, ergibt sich zwischen der 14.



**Abbildung 5.6** Verlauf der Raum-Zeit-Ausbeute an Biotrockenmasse während der Kultivierung von *E.coli* BL21 LB-ADH MV-FDH im 5 L-Satzverfahren: ◆ Prozessdauer = Kultivierungsdauer, ◇ Prozessdauer = Kultivierungsdauer + 4 h Vorbereitung (gestrichelte vertikale Linien kennzeichnen den Beginn der Verstoffwechslung von Glycerin (~ 6,5 h), den Beginn der Hungerphase (~ 16 h) und den Zeitpunkt des Glukose-Pulses (19 h)).

und 16. Stunde eine optimale Raum-Zeit-Ausbeute von  $0,465 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Da aber für eine ausreichende Lagerstabilität bzw. für ausreichend gute Biotransformationen bei längerer Lagerung eine dreistündige Hungerphase mit Glukose-Puls erforderlich ist, macht eine Ernte der Zellen in diesem Zeitfenster keinen Sinn. Mit dem Anstieg der FDH-Aktivität auf  $140 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$ , eine Stunde nach dem Glukose-Puls, ist der optimale Erntezeitpunkt erreicht. Die Raum-Zeit-Ausbeute an Biotrockenmasse liegt dann zwar nur noch bei  $0,425 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , übertrifft aber die von Pfründer (2005) im Zulaufverfahren mit *Lactobacillus kefir* generierten um mehr als das doppelte.

## 5.2 Herstellung von *Escherichia coli* BL21 LB-ADH BS-GDH

*Escherichia coli* BL21 LB-ADH BS-GDH wurde lediglich als Negativkontrolle verwendet. Daher war eine Herstellung im Satzverfahren für die benötigten Biomasse-Mengen ausreichend.

### 5.2.1 Herstellung im Satzverfahren

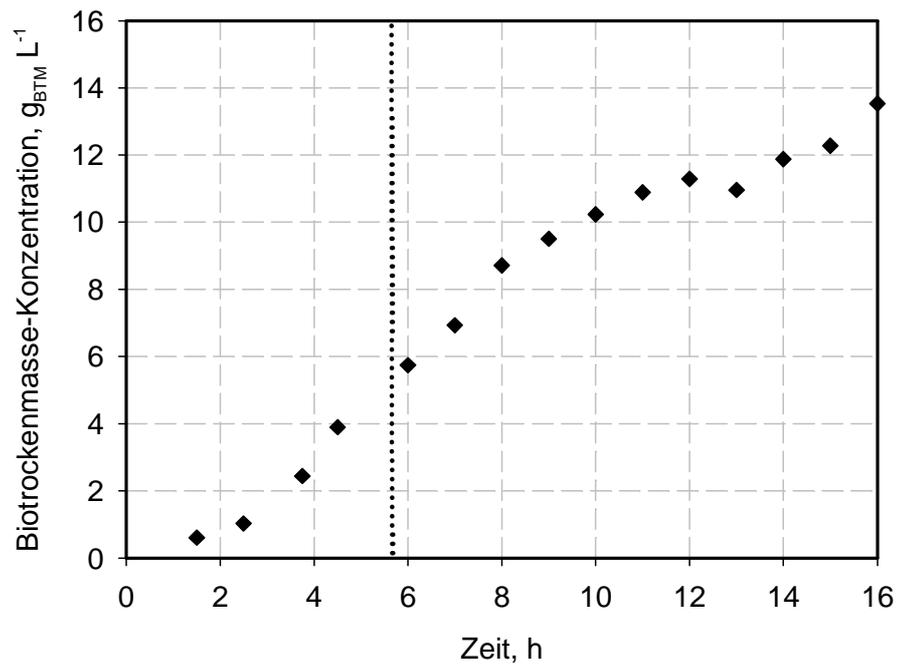
Die Herstellung des Biokatalysators erfolgte unter Verwendung des modifizierten Autoinduktionsmediums (Tabelle 16.11), allerdings mit zunächst  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  Glukose und  $20 \text{ g L}^{-1}$  Glycerin. Nach Vorlage der Medium-Komponenten und Einstellen der gewünschten Kultivierungsbedingungen wurde der Reaktor mit Zellen aus einer Schüttelkolben-Übernachtskultur (Tabelle 16.8) auf eine  $\text{OD}_{600}$  von ungefähr 0,5 bis 1 angeimpft. Nachdem sich bei den ersten Kultivierungen gezeigt hatte, dass der Sauerstoffpartialdruck im Medium eine Einflussgröße sein könnte, die die Expression und die Höhe der Aktivität maßgeblich beeinflusst, wurde dieser Zusammenhang in vier 5 L-Kultivierungen gezielt untersucht. Dazu wurde der Sauerstoffpartialdruck mit der Rührerdrehzahl als Stellgröße über die gesamte Laufzeit in vier engen Intervallgrenzen weitestgehend konstant gehalten. Die unter den Bedingungen erhaltenen maximalen spezifischen Aktivitäten sind in Tabelle 5.1 dargestellt. Im Allgemeinen lässt sich feststellen, dass mitzunehmender Sauerstofflimitierung auch die Aktivitäten von ADH und GDH steigen. Dies kann zum einen auf das verlangsamte Wachstum zurückgeführt werden, welches die Zellen zwar weniger Protein, dafür aber anteilmäßig weniger nicht katalytisch aktives produzieren lässt, und zum anderen auf die Sauerstoff-Abhängigkeit der Laktose-Verstoffwechslung, die letztendlich den Zeitpunkt der Induktion bestimmt (Blommel *et al.* 2006). Wird zum Beispiel aufgrund eines zu hohen

**Tabelle 5.1** Vergleich der maximalen LB-ADH- und BS-GDH-Aktivität in Abhängigkeit des Sauerstoffpartialdrucks im Medium.

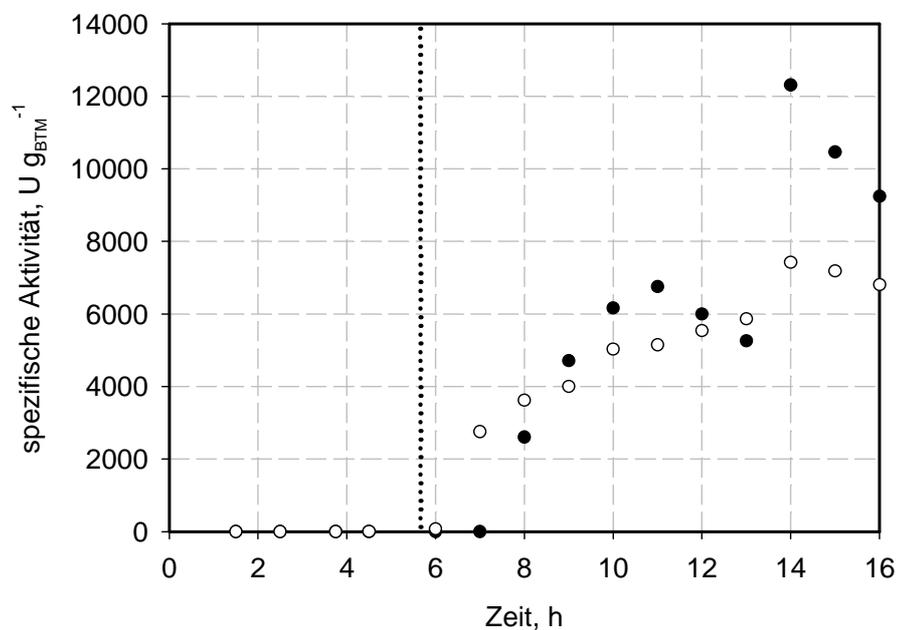
Sauerstoffpartialdruck	ADH, U g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup>	GDH, U g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup>
80 % - 70 %	1500	1500
30 % - 20 %	1800	1800
20 % - 10 %	5100	2700
10 % - 5 %	4500	4500

Sauerstoffpartialdrucks Laktose erst nach der Glycerin-Phase verstoffwechselt, kann die Expression nicht von einer zweiten C-Quelle profitieren. Wünschenswert ist daher eine möglichst parallele Verstoffwechslung von Laktose und Glycerin, die dann letztendlich über eine verlängerte Expression in maximalen spezifischen Aktivitäten resultiert. Der hier untersuchte Fall erforderte dazu eine Regelung des pO<sub>2</sub> auf ein Intervall zwischen 5 % bis 10 %.

Da sich bei den Untersuchungen zur Sauerstoff-Abhängigkeit gezeigt hatte, dass die maximale spezifische Aktivität bereits bei Zelldichten von 5 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup> erreicht wird, sollte die Expression zu Beginn der Kultivierung begrenzt und die eigentliche Induktion nach hinten verschoben werden. Aus diesem Grund wurde die Glukose-Konzentration im Medium auf 6 g L<sup>-1</sup> erhöht und die von Glycerin auf 15 g L<sup>-1</sup> gesenkt. Der entsprechende Verlauf der Biotrockenmasse-Konzentration während der Kultivierung in einem 5 L-Satzverfahren ist in Abbildung 5.7 dargestellt. Der pO<sub>2</sub> wurde hierbei über die Rührerdrehzahl auf einen Bereich von 5 % bis 10 % geregelt, ohne allerdings eine minimale Drehzahl von 600 min<sup>-1</sup> zu unterschreiten. Bis zum Ende der Glukose-Verstoffwechslung, gekennzeichnet durch eine vertikale gestrichelte Linie, wachsen die Zellen zunächst exponentiell, da die minimale Drehzahl noch eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff sicherstellt. Mit dem Übergang in die Glycerin-Phase verlangsamt sich dann aber das Wachstum aufgrund der zunehmenden Sauerstofflimitierung und Expression der Enzyme. Zur 13. Stunde lässt sich eine leichte Abnahme der Biotrockenmasse-Konzentration beobachten. Diese lässt sich wahrscheinlich darauf zurückführen, dass die Zellen ihren Stoffwechsel von Glycerin als Haupt-Kohlenstoffquelle auf Laktose umstellen. Aufgrund der parallelen Verstoffwechslung beider C-Quellen liegt allerdings ein schleichender Übergang vor, der sich nicht wie bei Glukose auf einen definitiven Zeitpunkt eingrenzen lässt (Bommel *et al.* 2006). In der Abbildung wurde daher auf eine Kennzeichnung durch eine vertikale Linie verzichtet. Nach 16 Stunden sind schließlich sämtliche C-Quellen aufgebraucht. Die Biotrockenmasse-Konzentration beträgt zu dem Zeitpunkt 13,5 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup>.



**Abbildung 5.7** Verlauf der Biotrockenmasse-Konzentration während der Kultivierung von *E.coli* BL21 LB-ADH BS-GDH im 5 L-Satzverfahren (gestrichelte vertikale Linie kennzeichnet den Beginn der Verstoffwechslung von Glycerin (~ 5,5 h)).



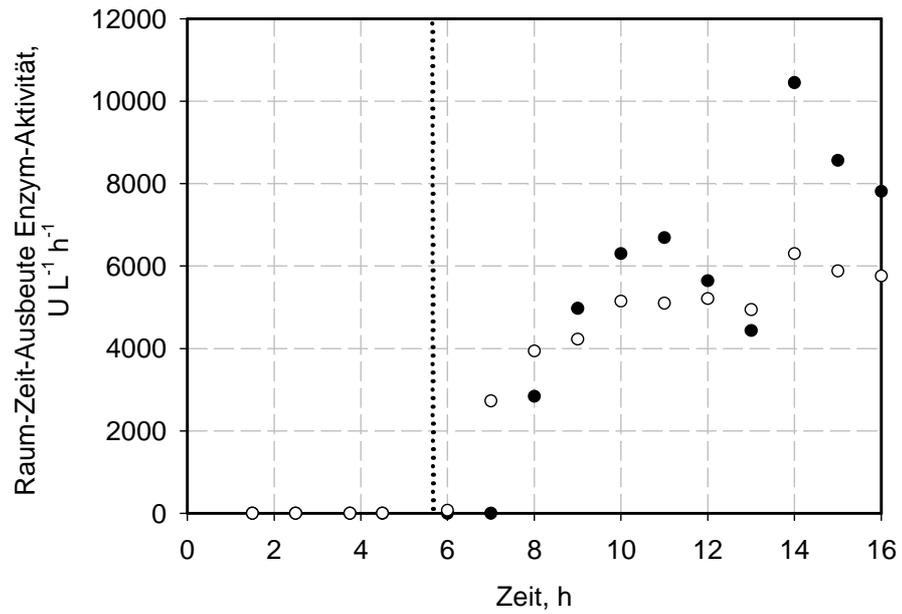
**Abbildung 5.8** Verlauf der spezifischen LB-ADH- ● und der BS-GDH-Aktivität ○ während der Kultivierung von *E.coli* BL21 LB-ADH BS-GDH im 5 L-Satzverfahren (gestrichelte vertikale Linie kennzeichnet den Beginn der Verstoffwechslung von Glycerin (~ 5,5 h)).

Bei Betrachtung der spezifischen, auf NADP(H) bezogenen Aktivitäten in Abbildung 5.8 zeigt sich sowohl für ADH als auch GDH, dass die Induktion durch Erhöhung der Glukose-Konzentration wie gewünscht bis zu einer Zelldichte von  $6 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  unterdrückt werden konnte. Erst mit Beginn der Glycerin-Verstoffwechslung erfolgte die Expression der Enzyme, die dann bis zur 11. Stunde Aktivitäten von um die  $5000 - 6000 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$  entwickelten. Mit der schleichenden Umstellung auf Laktose als Haupt-Kohlenstoffquelle verringerte sich in den darauf folgenden Stunden die ADH-Aktivität zunächst. Nach Verbrauch sämtlicher im Medium vorliegender Substrate außer Laktose und vollständiger Umstellung des Stoffwechsels verdoppelte sich die ADH-Aktivität dann aber schlagartig auf über  $12000 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$ . Unter Berücksichtigung der Aktivitätszunahme zwischen der siebten und neunten Stunde muss allerdings angezweifelt werden, dass tatsächlich ein derart starker Anstieg der ADH-Aktivität zwischen der 13. und 14. Stunde stattgefunden hat. Wie weitere Versuche bestätigt haben, liegt bei der zur 14. Stunde ermittelten ADH-Aktivität wahrscheinlich ein Messfehler vor. Die Tatsache, dass die GDH-Aktivität zur 14. Stunde keine entsprechend hohe Zunahme aufzeigt, sondern nur einen 25 prozentigen Anstieg auf  $7400 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$ , unterstützt diese Vermutung. Nach Verstoffwechslung sämtlicher Kohlenstoffquellen konnte der Biokatalysator schließlich mit einer Aktivität von  $9200 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$  für ADH und  $6800 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$  für GDH geerntet werden.

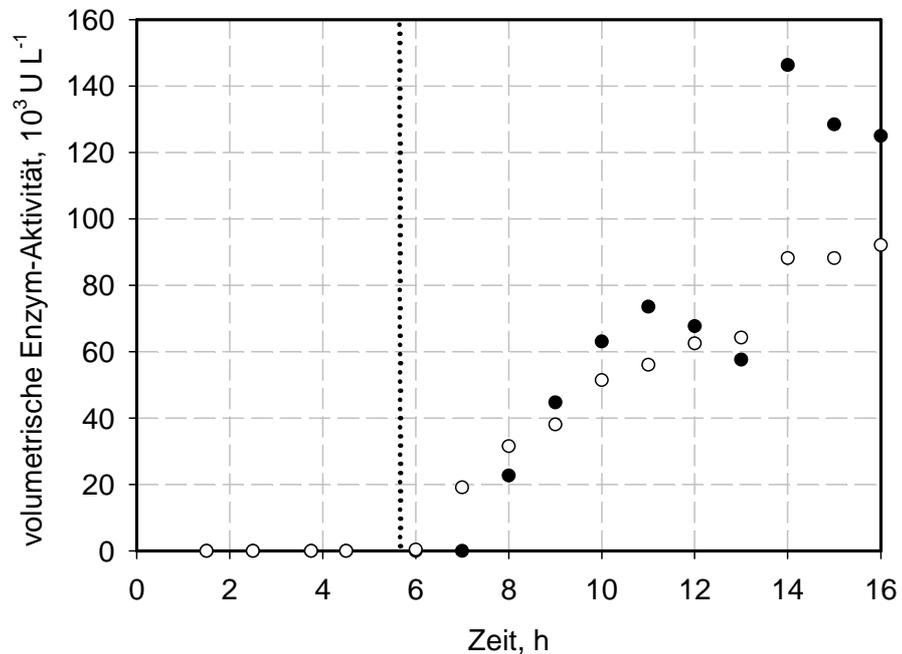
## 5.2.2 Diskussion

Der Biokatalysator ließ sich unter Verwendung des modifizierten Autoinduktionsmediums im Satzverfahren mit hohen spezifischen Aktivitäten herstellen. Für die Raum-Zeit-Ausbeute der Enzymaktivität ergibt sich nach Abbildung 5.9 zum Zeitpunkt der Ernte ein Wert von  $7800 \text{ U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  für ADH und  $5700 \text{ U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  für GDH. Für ADH könnte eine um 30 % höhere Raum-Zeit-Ausbeute erzielt werden, wenn die Ernte bereits nach 14 Stunden Kultivierung erfolgen würde. Da es sich bei der zu diesem Zeitpunkt ermittelten Aktivität aber wahrscheinlich um einen Messfehler handelt und sich der Zeitpunkt der maximalen ADH-Aktivität bei keiner Kultivierung nicht exakt voraussagen ließ, muss die etwas verringerte Effizienz in Kauf genommen werden. Dennoch konnte im Vergleich zu den von Pfründer (2005) mit *Lactobacillus kefir* im Zulaufverfahren generierten Ergebnissen die ADH bezogene Raum-Zeit Ausbeute knapp verdreifachfacht werden.

Hinsichtlich der volumetrischen ADH-Aktivität ergibt sich im Vergleich zu Pfründer (2005) mit  $125000 \text{ U L}^{-1}$  ein um das zehnfache gesteigerte Ergebnis (Abbildung 5.10).

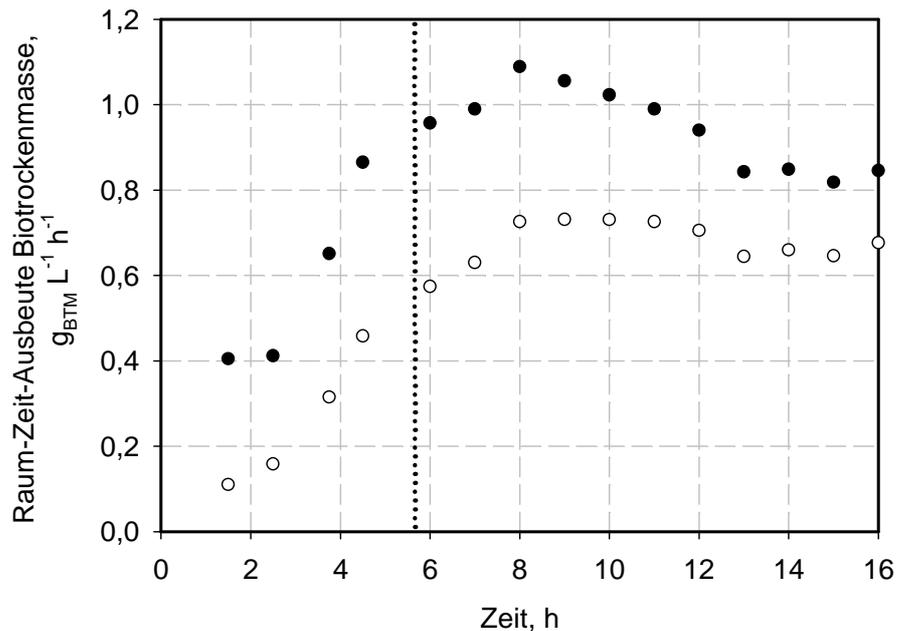


**Abbildung 5.9** Verlauf der Raum-Zeit-Ausbeute an LB-ADH-● und BS-GDH-Aktivität ○ während der Kultivierung von *E.coli* BL21 LB-ADH MV-FDH im 5 L-Satzverfahren (gestrichelte vertikale Linie kennzeichnet den Beginn der Verstoffwechslung von Glycerin (~ 5,5 h)).



**Abbildung 5.10** Verlauf der volumetrischen LB-ADH-● und BS-GDH-Aktivität ○ während der Kultivierung von *E.coli* BL21 LB-ADH BS-GDH im 5 L-Satzverfahren (gestrichelte vertikale Linie kennzeichnet den Beginn der Verstoffwechslung von Glycerin (~ 5,5 h)).

Zellen mit einer GDH zur Cofaktorregenerierung können im Allgemeinen nicht als Ganzzell-Biokatalysator eingesetzt werden. Wenn jedoch die Zellmembran permeabilisiert wird, zum Beispiel durch Einfrieren des Biokatalysators, kann Glukose ohne phosphoryliert zu werden in die Zelle gelangen und sich so doch noch eine biokatalytische Aktivität entfalten (Gröger *et al.* 2006). In diesem Fall könnte die in Abbildung 5.11 dargestellte Raum-Zeit-Ausbeute für Biomasse ebenfalls von Bedeutung sein.



**Abbildung 5.11** Verlauf der Raum-Zeit-Ausbeute an Biotrockenmasse während der Kultivierung von *E.coli* BL21 LB-ADH BS-GDH im 5 L-Satzverfahren: ◆ Prozessdauer = Kultivierungsdauer, ◇ Prozessdauer = Kultivierungsdauer + 4 h Vorbereitung (gestrichelte vertikale Linie kennzeichnet den Beginn der Verstoffwechslung von Glycerin (~ 5,5 h)).

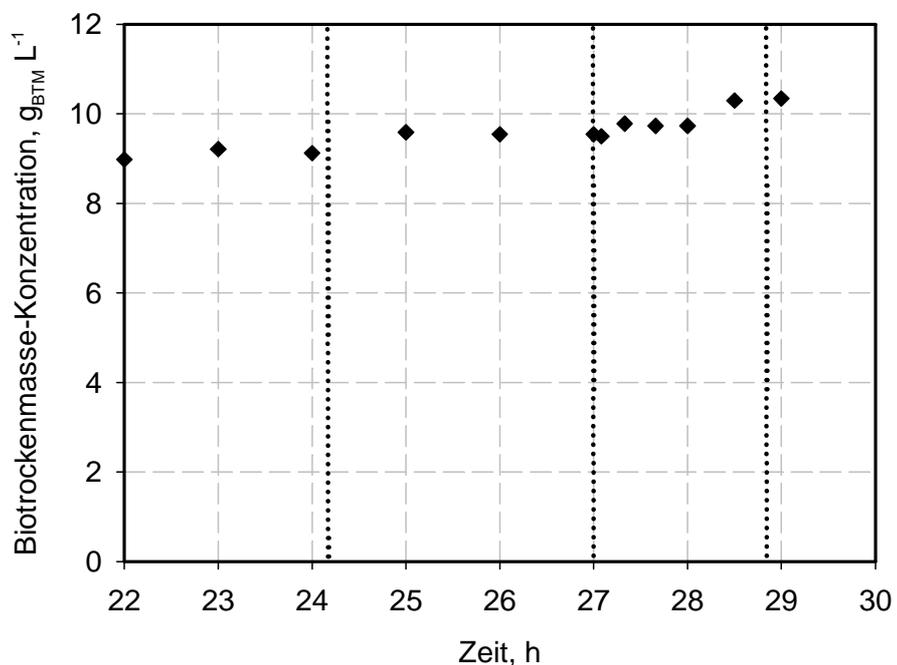
Unter der Voraussetzung, dass für die Prozesszeit die reine Kultivierungsdauer angesetzt werden kann, wird bereits nach acht Stunden die maximale Raum-Zeit-Ausbeute von 1,1  $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$  erreicht (Abbildung 5.11). Wird zusätzlich die für die Vorbereitung des Reaktors benötigte Zeit von vier Stunden berücksichtigt, ergibt sich zwischen der achten und elften Stunde eine maximale Raum-Zeit-Ausbeute von 0,73  $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$ . Da dieser Wert nur geringfügig von dem nach 16 Stunden Kultivierung abweicht, kann – auch im Hinblick auf den Verlauf der spezifischen ADH-Aktivität – eine spätere Ernte vertreten werden.

### 5.3 Herstellung von *Escherichia coli* BL21 LB-ADH LM-G6PDH

Da für die späteren Untersuchungen keine größeren Mengen an *Escherichia coli* BL21 LB-ADH LM-G6PDH benötigt wurden, war eine Herstellung im Satzverfahren ausreichend.

#### 5.3.1 Herstellung im Satzverfahren

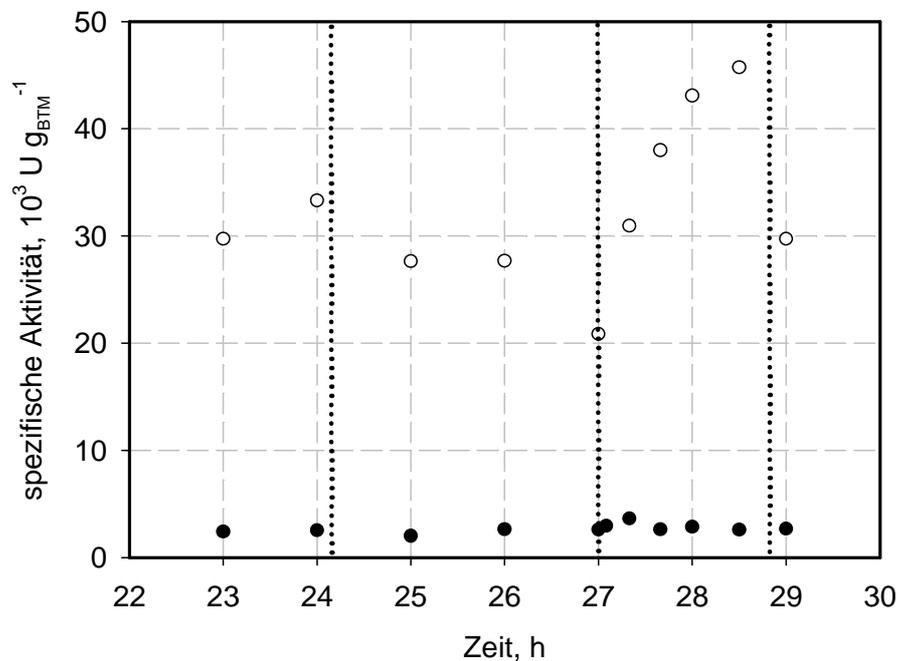
Die Herstellung des Biokatalysators erfolgte unter Verwendung des modifizierten Autoinduktionsmediums (Tabelle 16.11). Nach Vorlage der Medium-Komponenten und Einstellen der gewünschten Kultivierungsbedingungen wurde der Reaktor mit 0,1 % v/v Zellsuspension aus der Zellbank angeimpft. Entsprechend der aus vorangegangenen Kultivierungen gewonnenen Erkenntnisse erfolgte die Kultivierung bei einem Sauerstoffpartialdruck von 5 % - 10 %. Der Biokatalysator ließ sich damit ohne weitere Optimierungen mit hohen spezifischen Aktivitäten herstellen. Da aber die biokatalytische Leistungsfähigkeit dieser Zellen bei Biotransformation unzureichend war, wurde eine drei- bis vierstündige Hungerphase in Kombination mit einem Glukose-Puls etabliert. Abbildung 5.12 gibt den Verlauf der Biotrockenmasse-Konzentration für den näher betrachteten Zeitraum der Hungerphase und



**Abbildung 5.12** Verlauf der Biotrockenmasse-Konzentration während der Kultivierung von *E. coli* BL21 LB-ADH LM-G6PDH im 5 L-Satzverfahren (gestrichelte vertikale Linien kennzeichnen Beginn der Hungerphase (~ 24,2 h), Zeitpunkt des Glukose-Pulses (~ 27 h) und vollständige Verstoffwechslung von Glukose (~ 28,8 h).

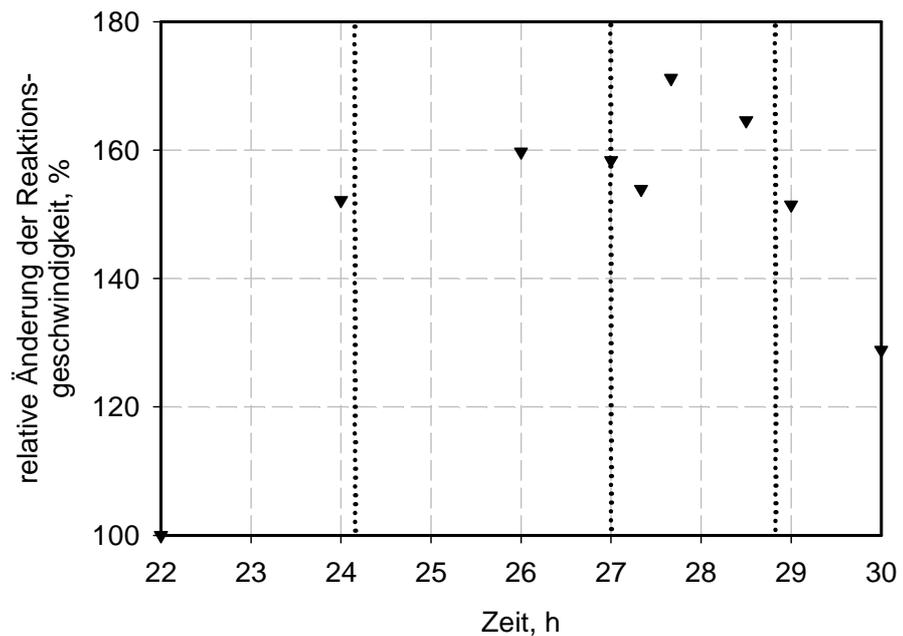
des Glukose-Pulses wieder. Demnach kann am Ende der Kultivierung mit einer maximalen Biotrockenmasse von ungefähr  $10 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  gerechnet werden.

Die spezifischen, auf NADP(H) bezogenen Aktivitäten von ADH und G6PDH sind in Abbildung 5.13 dargestellt. Es zeigt sich, dass die G6PDH-Aktivität infolge der fast vierstündigen Hungerphase zunächst um 35 % auf  $21000 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$  einbricht. Der Glukose-Puls kann diesen negativen Effekt allerdings wieder rückgängig machen und innerhalb von anderthalb Stunden eine Zunahme auf  $47000 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$  bewirken. Die ADH-Aktivitäten profitieren dieses mal nicht von der Hungerphase. Lediglich der Glukose-Puls hat eine kurzzeitige Verbesserung um 20 % auf  $2900 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$  zur Folge.



**Abbildung 5.13** Verlauf der spezifischen LB-ADH-● und der LM-G6PDH-Aktivität ○ während der Kultivierung von *E.coli* BL21 LB-ADH LM-G6PDH im 5 L-Satzverfahren (gestrichelte vertikale Linien kennzeichnen den Beginn der Hungerphase (~ 24,2 h), den Zeitpunkt des Glukose-Pulses (~ 27 h) und die vollständige Verstoffwechslung von Glukose (~ 28,8 h).

Um zu verifizieren, ob die Hungerphase in Kombination mit einem Glukose-Puls einen positiven Effekt auf die biokatalytische Leistungsfähigkeit der Zellen hat, wurden zusätzliche Untersuchungen vorgenommen. Die Ergebnisse sind als relative Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit auf den Zeitpunkt zwei Stunden vor Beginn der Hungerphase bezogen (Abbildung 5.14). Wie sich erkennen lässt, nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit bereits vor



**Abbildung 5.14** relative Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit bei einer Biotransformation von 4-Cl-AP zu (R)-Cl-PE mit zu unterschiedlichen Zeitpunkten geernteten Zellen, bezogen auf die Reaktionsgeschwindigkeit bei  $t = 22$  h (gestrichelte vertikale Linien kennzeichnen Beginn der Hungerphase ( $\sim 24,2$  h), Zeitpunkt des Glukose-Pulses ( $\sim 27$  h) und vollständige Verstoffwechslung von Glukose ( $\sim 28,8$  h).

der Hungerphase deutlich um 50 % zu – wahrscheinlich infolge der Substratlimitierung – und verharrt dann bis zum Glukose-Puls auf einem relativ konstanten Niveau. Nach der Zugabe von Glukose verringert sich die Reaktionsgeschwindigkeit trotz steigender Aktivitäten zunächst, erholt sich dann aber wieder. Im Allgemeinen sollte aber die Ernte des Biokatalysators, kurz nach Eintritt in die Hungerphase, für eine Maximierung der Reaktionsgeschwindigkeit ausreichen.

### 5.3.2 Diskussion

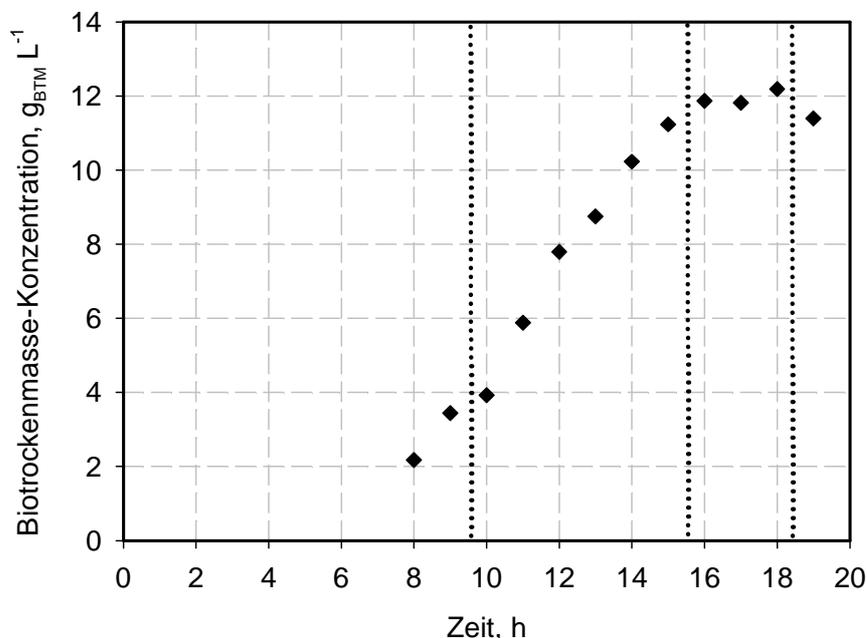
Der Biokatalysator ließ sich unter Verwendung des modifizierten Autoinduktionsmediums im Satzverfahren mit hohen spezifischen Aktivitäten herstellen. Die Entscheidung, zu welchem Zeitpunkt die Ernte erfolgen soll, ist bei diesem *E.coli* allerdings nicht an eine Beurteilung der Raum-Zeit-Ausbeute bzw. an eine Betrachtung der volumetrischen Ausbeute geknüpft. Aufgrund ihrer höchsten biokatalytischen Leistungsfähigkeit nach Erreichen der Substratlimitierung bzw. Hungerphase ist die Ernte unbedingt zu diesem Zeitpunkt zu empfehlen.

## 5.4 Herstellung von *Escherichia coli* BL21 LB-ADH CB-FDH

Aufgrund der Tatsache, dass die Gene für ADH und FDH bei diesem *E.coli* auf einem Plasmid untergebracht waren, konnte davon ausgegangen werden, dass dieser deutlich stabiler ist, als derjenige mit der MV-FDH. Die Herstellung des Biokatalysators sollte daher nicht nur im Satzverfahren erfolgen, sondern zusätzlich auch die Entwicklung eines Zulaufverfahrens miteinschließen.

### 5.4.1 Herstellung im Satzverfahren

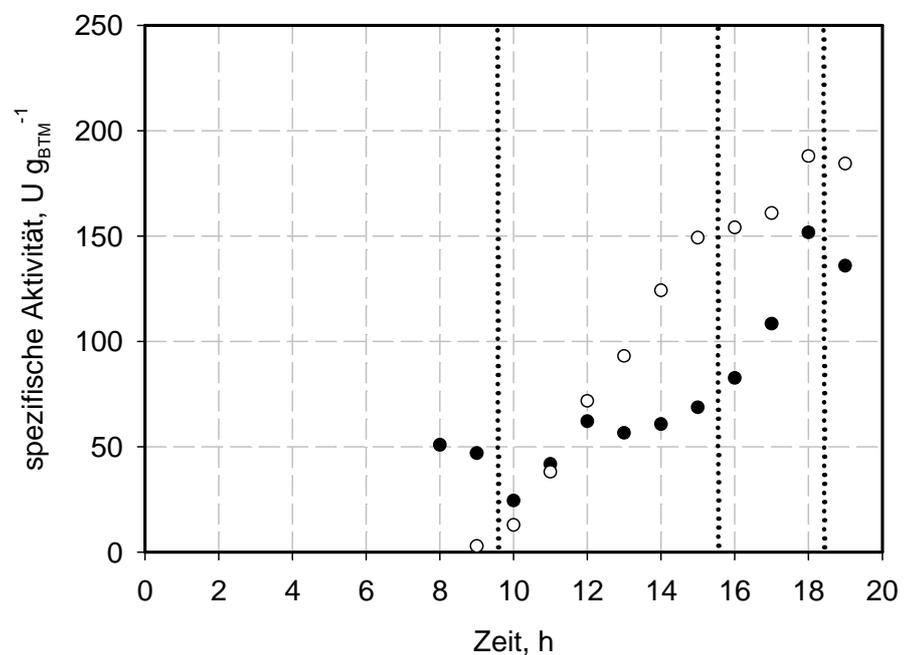
Die Herstellung des Biokatalysators erfolgte analog zum MV-FDH-*E.coli* in einem modifizierten Autoinduktionsmedium (Tabelle 16.11). Nach Vorlage der Medium-Komponenten und Einstellen der gewünschten Kultivierungsbedingungen wurde der Reaktor mit 0,1 % v/v Zellsuspension aus der Zellbank angeimpft. Um die Gesamtkultivierungsdauer zu verringern, erfolgte die Anzucht zunächst bei 37°C. Neun Stunden nach dem Animpfen wurde die Temperatur auf 30°C gesenkt. Entsprechend der aus vorangegangenen Kultivierungen gewonnenen Erkenntnisse erfolgte die Kultivierung bei einem Sauerstoffpartialdruck von 5-10%. Der Verlauf der Biotrockenmasse-Konzentration ist in Abbildung 5.15 dargestellt.



**Abbildung 5.15** Verlauf der Biotrockenmasse-Konzentration während der Kultivierung von *E.coli* BL21 LB-ADH CB-FDH im 5 L-Satzverfahren (gestrichelte vertikale Linien kennzeichnen den Beginn der Verstoffwechslung von Glycerin (~ 9,5 h), den Beginn der Hungerphase (~ 15,3 h) und den Zeitpunkt des Glukose-Pulses (18,3 h)).

Anhand der vertikalen gestrichelten Linien ist der Beginn der Verstoffwechslung von Glycerin (~ 9,5 h), der Beginn der Hungerphase (~ 15,3 h) und der Zeitpunkt des Glukose-Pulses (18,3 h) visualisiert. Mit dem Absenken der Temperatur auf 30°C und der Umstellung auf Glycerin als C-Quelle flachte das Wachstum zwischen der neunten und zehnten Stunde etwas ab. Sechs Stunden später waren sämtliche im Medium vorgelegten C-Quellen aufgebraucht und eine maximale Zelldichte von  $12 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  erreicht. Der Glukose-Puls konnte sich nicht mehr positiv auf die Zelldichte auswirken, da der Biokatalysator bereits eine halbe Stunde später geerntet wurde.

Bei Betrachtung der spezifischen Aktivitäten in Abbildung 5.16 wird deutlich, dass die Expression von ADH, trotz der Katabolitrepression, schon während der Verstoffwechslung von Glukose erfolgt. Obwohl FDH vom gleichen Operon aus wie ADH exprimiert wird, zeigt sich aber für diese erst mit Beginn der Glycerin-Phase eine erste Aktivität. Dieses Ergebnis verwundert zunächst, lässt sich aber damit erklären, dass die detektierten Aktivitäten keinen Hinweis auf die tatsächlich exprimierte Proteinmenge geben. Zum Ende der Glycerin-Phase haben ADH bzw. FDH schließlich Aktivitäten von  $80 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$  bzw.  $150 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$  erreicht. Mit der Hungerphase können diese aber noch deutlich gesteigert werden, so dass sich die



**Abbildung 5.16** Verlauf der spezifischen LB-ADH- ● und der CB-FDH-Aktivität ○ während der Kultivierung von *E.coli* BL21 LB-ADH CB-FDH im 5 L-Satzverfahren (gestrichelte vertikale Linien kennzeichnen den Beginn der Verstoffwechslung von Glycerin (~ 9,5 h), den Beginn der Hungerphase (~ 15,3 h) und den Zeitpunkt des Glukose-Pulses (18,3 h)).

Zellen letztendlich mit einer Aktivität von  $135 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$  für ADH und  $185 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$  für FDH ernten lassen. Die Anwendung einer Hungerphase in Kombination mit einem Glukose-Puls ist also auch bei diesem *E.coli* dringend erforderlich.

#### 5.4.2 Herstellung im Zulaufverfahren

Zur Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute an Biomasse wurde auf Grundlage der im Satzverfahren gewonnenen Erkenntnisse ein mehrstufiges exponentielles Zulaufverfahren entwickelt, welches sich in folgende grundlegende Phasen unterteilt:

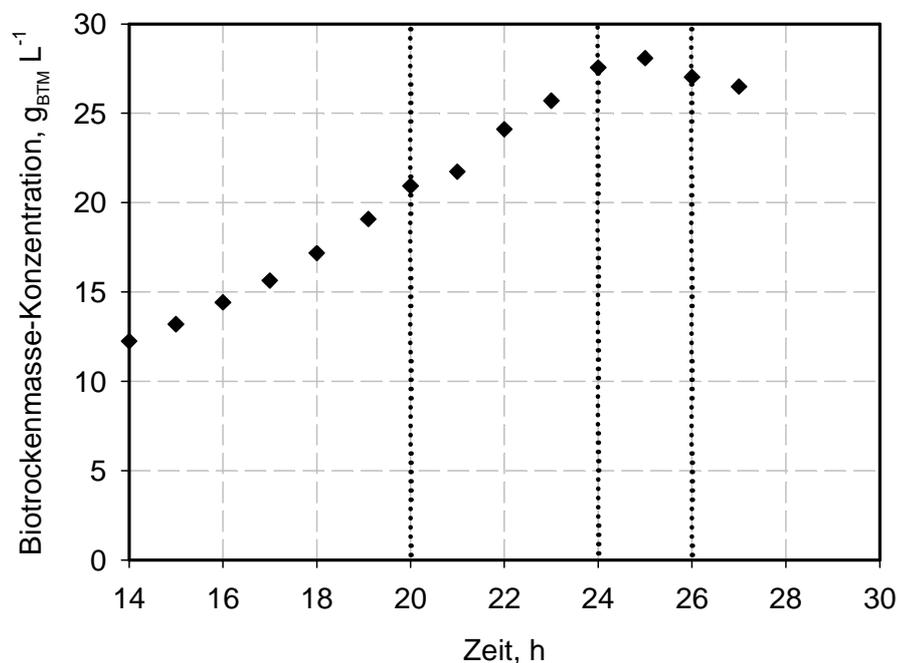
- 1) Satzphase: Anzucht bei  $37^{\circ}\text{C}$ ,
- 2) Satzphase: Anzucht bei  $30^{\circ}\text{C}$ ,
- 3) exponentieller Glukose-Zulauf,
- 4) exponentieller Glycerin-Zulauf,
- 5) Hungerphase,
- 6) Glukose-Puls.

Eine ausführliche Darstellung der jeweiligen Anzuchtbedingungen und Kriterien für den Start der nächsten Phase erfolgte bereits in Kapitel 4.4.4. Zur Vereinfachung der Anzucht wurden parametergesteuerte Regelsequenzen programmiert, die es erlaubten, das Zulaufverfahren in Abhängigkeit der unterschiedlichen Anzuchtphasen automatisch zu steuern und zu regeln. Lediglich der Austausch des Zulaufmediums und die Zugabe von IPTG erforderten manuelle Eingriffe in die Kultivierung.

Die Berechnung des exponentiellen Glukose-Zulaufs erfolgte über Gleichung 3.26 unter Vernachlässigung des Erhaltungsstoffwechsels und der Volumenzunahme. Um die Acetatbildung während der Zudosierung von Glukose zu vermeiden, wurde in dem hier dargestellten Fall eine theoretische Wachstumsrate von  $0,11 \text{ h}^{-1}$  angesetzt. Eine spätere Überprüfung des Biomassen-Zuwachses zeigte allerdings, dass nur eine Wachstumsrate von  $0,09 \text{ h}^{-1}$  erreicht wurde. Dieser Effekt lässt sich darauf zurückführen, dass in Gleichung 3.26 nur die zu Beginn der Kultivierung vorgelegte Glukose Berücksichtigung findet. Da die Zellen in der Satzphase aber auch auf Pepton und Hefeextrakt wachsen, liegt zum Start des Zulaufs eine höhere Biomasse-Konzentration vor, als letztendlich über die Gleichung zur Berechnung des Zulauf-Volumenstroms angenommen worden ist. Infolgedessen wird dann auch weniger Glukose dem Medium zudosiert, als die bereits vorhandene Zellmenge eigentlich zur Einhaltung der gewünschten Wachstumsrate benötigen würde. Die in Jentsch

et al. (2006) dargestellten ausführlichen Untersuchungen hinsichtlich des Effekts einer zu hohen oder zu niedrigen Startkonzentration an Biomasse zu Beginn einer Substrat-Zudosierung bestätigen diese Annahme.

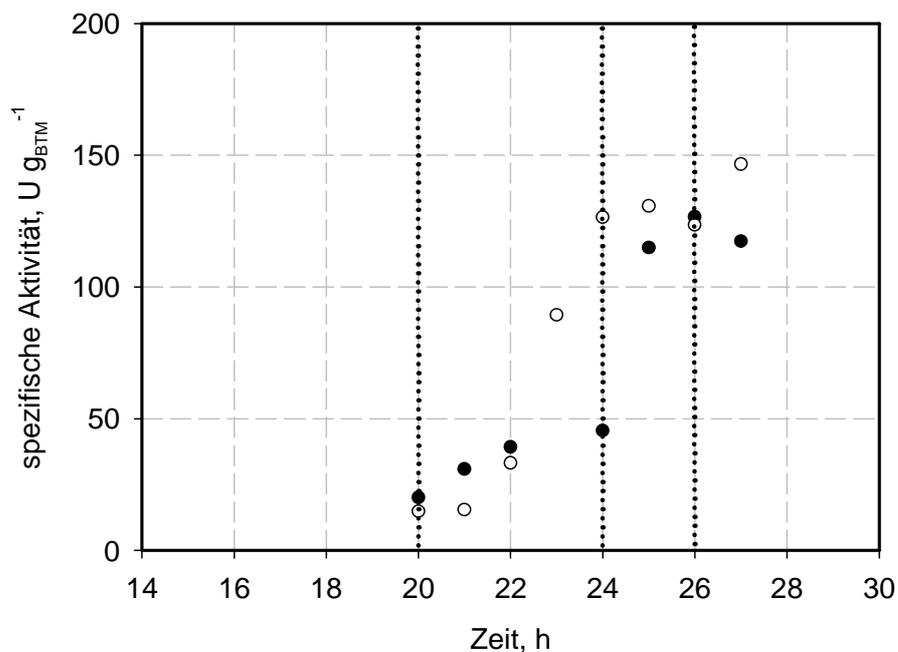
Abbildung 5.17 zeigt den Verlauf der Biotrockenmasse-Konzentration während der Kultivierung im Zulaufverfahren. Die vertikalen gestrichelten Linien kennzeichnen hier das Ende des Glukose-Zulaufs bzw. den Beginn des Glycerin-Zulaufs, den Beginn der Hungerphase und den Zeitpunkt des Glukose-Pulses. Zur 20. Stunde erfolgte mit dem Austausch des Glukose-Zulaufmediums gegen das Glycerin-Zulaufmedium die Zugabe von 1 mM IPTG. Gleichzeitig wurde die zur Berechnung des Zulauf-Volumenstroms benötigte theoretische Wachstumsrate auf  $0,8 \text{ h}^{-1}$  herabgesetzt und der Sauerstoffpartialdruck nun auf Werte zwischen 5 % bis 15 % geregelt, um das Wachstum und somit auch den Anteil nicht katalytisch aktiven Enzyms zusätzlich zu begrenzen. Aufgrund der oben bereits beschriebenen Problematik lag die reale Wachstumsrate mit  $0,7 \text{ h}^{-1}$  auch hier niedriger. Innerhalb der vierstündigen Glycerin-Phase konnte die Biotrockenmasse-Konzentration schließlich auf  $27,5 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  gesteigert werden. Während der sich anschließenden zweistündigen Hungerphase reduzierte sie sich allerdings wieder. Der Glukose-Puls hatte bis zum Zeit-



**Abbildung 5.17** Verlauf der Biotrockenmasse-Konzentration während der Kultivierung von *E.coli* BL21 LB-ADH CB-FDH im 4 L-Zulaufverfahren (gestrichelte vertikale Linien kennzeichnen den Beginn des Glycerin-Zulaufs (20 h), den Beginn der Hungerphase (24 h) und den Zeitpunkt des Glukose-Pulses (26 h)).

punkt der Ernte keine Verbesserung der Biomasse-Konzentration mehr zur Folge, so dass der Biokatalysator nach 27 h Kultivierung mit einer Zelldichte von  $26,5 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  geerntet wurde.

Der in Abbildung 5.18 dargestellte Verlauf der spezifischen Aktivitäten von ADH und FDH verdeutlicht die Wichtigkeit der Hungerphase auch für das Zulaufverfahren. Neben der Tatsache, dass die Lagerstabilität des Biokatalysators im Hinblick auf die gesamtkatalytische Leistungsfähigkeit angehoben wird, bewirkt die zweistündige Hungerphase zusätzlich eine deutliche Steigerung der ADH-Aktivität von  $45 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$  auf  $130 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$ . Für FDH besitzt die Hungerphase dagegen keine Bedeutung. Eine Stunde nach dem Glukose-Puls kann der Biokatalysator schließlich mit einer ADH-Aktivität von  $120 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$  und einer FDH-Aktivität von  $150 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$  geerntet werden.

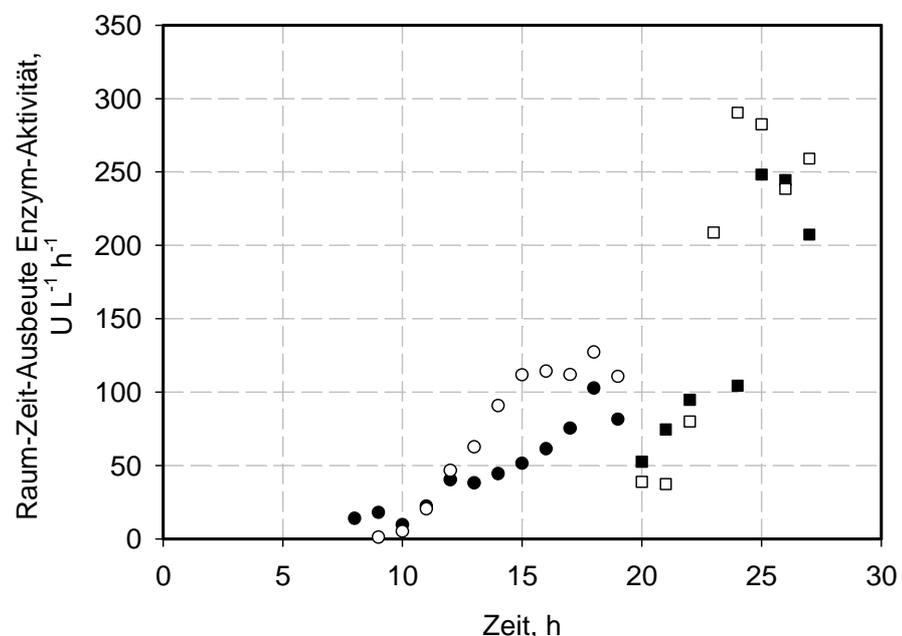


**Abbildung 5.18** Verlauf der spezifischen LB-ADH- ● und der CB-FDH-Aktivität ○ während der Kultivierung von *E.coli* BL21 LB-ADH CB-FDH im 4 L-Zulaufverfahren (gestrichelte vertikale Linien kennzeichnen Beginn des Glycerin-Zulaufs (20 h), Beginn der Hungerphase (24 h) und Zeitpunkt des Glukose-Pulses (26 h)).

### 5.4.3 Diskussion

Der Biokatalysator ließ sich sowohl im Satzverfahren als auch in einem mehrstufigen Zulaufverfahren mit zufriedenstellenden Aktivitäten herstellen. Eine drei- bzw. zweistündige Hungerphase hat sich als geeignete Methode erwiesen, die ADH-Aktivität deutlich anzuheben. Zum Zeitpunkt der Ernte ergibt sich für die Kultivierung im Satzverfahren eine Raum-Zeit-Ausbeute von  $80 \text{ U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  für ADH und  $110 \text{ U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  für FDH (Abbildung 5.19). Im Zulaufverfahren ließen sich diese deutlich auf  $210 \text{ U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (ADH) und  $260 \text{ U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (FDH) steigern. Damit liegt die auf ADH bezogene Raum-Zeit-Ausbeute nur 20 % unter den von Pfründer (2005) mit *Lactobacillus kefir* generierten Ergebnissen. Unter Berücksichtigung, dass die hier dargestellte NADH-abhängige ADH-Aktivität mit NADPH als Cofaktor zehnfach höher ausfällt, ergibt sich eine um das achtfache gesteigerte Raum-Zeit-Ausbeute. Im Vergleich zum MV-FDH *E.coli* fällt der Wert für die ADH zwar um 60 % geringer aus, die Raum-Zeit-Ausbeute an FDH kann dagegen um knapp das vierfache gesteigert werden.

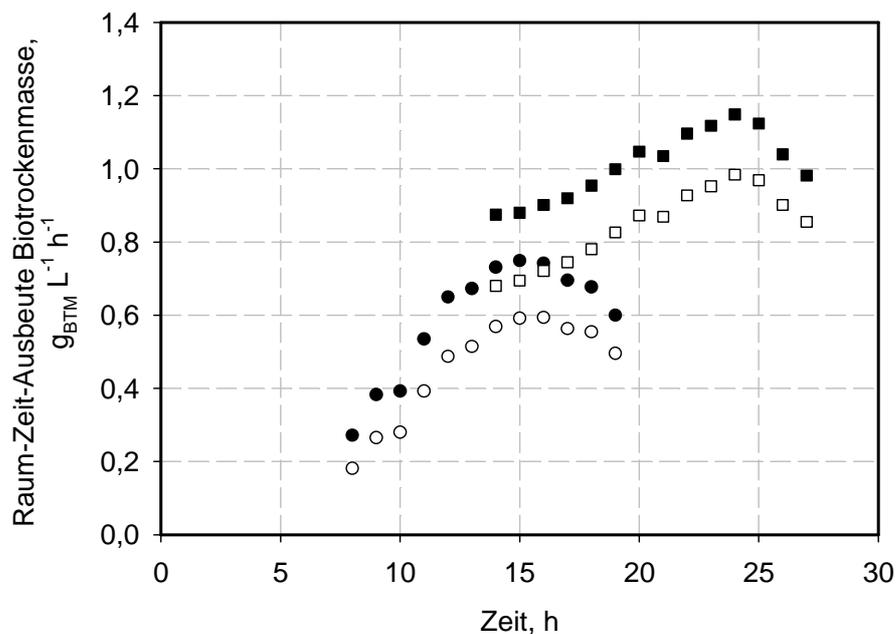
Wenn nicht die spezifische Aktivität von ADH und FDH die Leistungsfähigkeit des Ganzzell-Biokatalysators limitiert, sondern der Stofftransport von Edukt durch die Zellmembran, muss vor allem eine möglichst effiziente Biomasse-Produktion gewährleistet sein. Die in Abbil-



**Abbildung 5.19** Verlauf der Raum-Zeit-Ausbeute an LB-ADH- ● / ■ und CB-FDH-Aktivität ○ / □ während der Kultivierung von *E.coli* BL21 LB-ADH MV-FDH im 5 L-Satzverfahren ● / ○ und 4 L-Zulaufverfahren ■ / □.

dung 5.20 dargestellte Raum-Zeit-Ausbeute an Biotrockenmasse für die Kultivierungen im Satz- und Zulaufverfahren implizieren durch die Maxima Optimierungspotentiale hinsichtlich der Kultivierungsdauer. Da aber die Anwendung von Hungerphase und Glukosepuls am Ende einer jeden Anzucht dringend erforderlich ist, was sich zwangsläufig auch in einer Abnahme der Raum-Zeit-Ausbeute niederschlägt, lässt sich nicht von einer früheren Ernte profitieren.

Unter der Voraussetzung, dass für die Prozesszeit zusätzlich zur reinen Kultivierungsdauer auch vier Stunden für die Vorbereitung des Reaktors einkalkuliert werden, kann mit dem Zulaufverfahren gegenüber dem Satzverfahren für die Raum-Zeit-Ausbeute an Biomasse eine Verbesserung von 70 % erzielt werden. Im Vergleich zum MV-FDH *E.coli* und den von Pfründer (2005) mit *Lactobacillus kefir* generierten Ergebnissen wird die Effizienz der Biokatalysator-Herstellung sogar verdoppelt bzw. vervierfacht.



**Abbildung 5.20** Verlauf der Raum-Zeit-Ausbeute an Biotrockenmasse während der Kultivierung von *E.coli* BL21 LB-ADH BS-GDH im 5 L-Satzverfahren ●/○ und 4 L-Zulaufverfahren ■/□: ●/■ Prozessdauer = Kultivierungsdauer, ○/□ Prozessdauer = Kultivierungsdauer + 4 h Vorbereitung.

## 6 Untersuchungen zur Biokompatibilität von ionischen Flüssigkeiten mit *E. coli* BL21 LB-ADH BS-GDH

Ionische Flüssigkeiten, die bei zweiphasig geführten Ganzzell-Biotransformationen als Edukt-Reservoir und *in situ*-Extraktionsmittel Verwendung finden sollen, müssen gegenüber den verwendeten Mikroorganismen eine ausreichende Biokompatibilität aufweisen, um eine Schädigung der Zellmembran und somit einen Verlust der Cofaktoren zu vermeiden. Die Untersuchung der Membranintegrität bietet daher ein aussagekräftiges Kriterium, um die ionischen Flüssigkeiten hinsichtlich ihrer Eignung zu beurteilen.

Die Abschätzung der Biokompatibilität erfolgte mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Methoden unter Verwendung von *E. coli* BL21 LB-ADH BS-GDH als Modellorganismus. Da die von der GDH benötigte Glukose an der Zellmembran phosphoryliert wird, eignete sich dieser *E. coli*-Stamm nicht für die Ganzzell-Biokatalyse. War das Cofaktorregenerierungssystem aber dennoch aktiv, konnte auf eine geschädigte Zellmembran geschlossen werden (Negativkontrolle). Damit bot sich dieser *E. coli* auch für die Abschätzung der Permeabilisierung bei Biotransformationen im 1,4 mL-Maßstab an.

Bei den im Folgenden eingesetzten ionischen Flüssigkeiten handelte es sich ausschließlich um nicht mit Wasser mischbare ILs. Eine Aufschlüsselung der verwendeten Abkürzungen erfolgt in Kapitel 14, eine ausführlichere Auflistung der Eigenschaften in Kapitel 16.2.

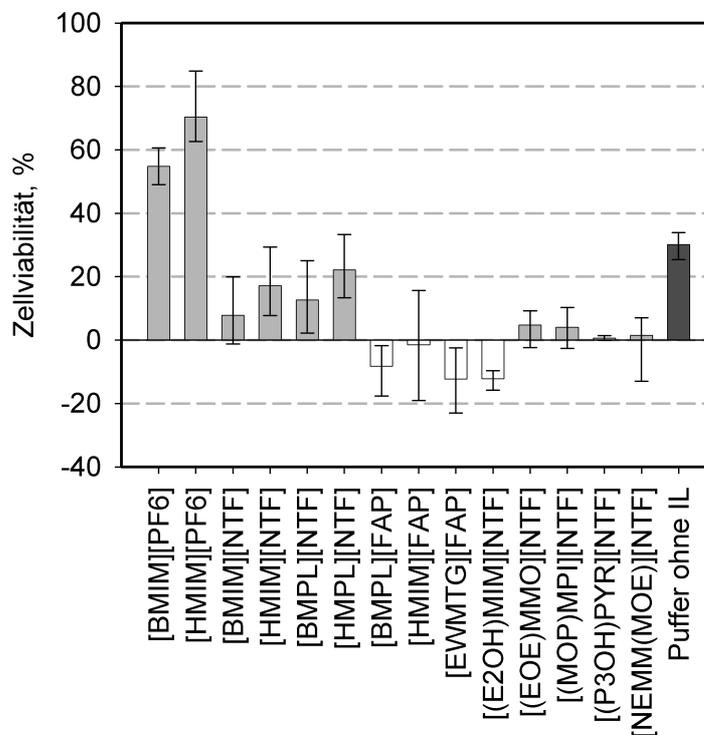
### 6.1 Viabilitätstests mit dem LIVE/DEAD® BacLight™-Kit

Zur Beurteilung des schädigenden Einflusses verschiedener ionischer Flüssigkeiten wurde *E. coli* BL21 LB-ADH BS-GDH unter Reaktionsbedingungen, ohne Zugabe eines Edukts, für fünf Stunden mit 14 ILs inkubiert und anschließend mit dem LIVE/DEAD® BacLight™-Verfahren hinsichtlich der Viabilität untersucht. Mit Hilfe dieses Tests konnten permeabilisierte und integral vorliegende Zellen durch zwei DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe selektiv

angefärbt und dann photometrisch detektiert werden. Die quantitative Einordnung der Fluoreszenzsignalverhältnisse erfolgte anhand von parallel durchgeführten Kalibriermessungen von Proben mit definiertem Lebendzellanteil.

Die in Abbildung 6.1 dargestellten Ergebnisse bestätigen die bereits von Pfründer (2005) festgestellte gute Biokompatibilität von [BMIM][PF6]. Mehr als 50 % der Zellen liegen nach der Inkubation integral vor. Eine noch höhere Biokompatibilität scheint nur [HMIM][PF6] aufzuweisen. Die Anwesenheit der anderen 12 ILs reduziert dagegen den Anteil intakter Zellen signifikant. Lediglich bei [BMIM]- und [HMIM][NTF], sowie bei [BMPL]- und [HMPL][NTF] beträgt der Lebendzellanteil nach fünf Stunden Inkubation noch 5 % bis 20 %. Die in reinem Puffer ohne IL inkubierten Zellen zeigen mit einer verbliebenen Viabilität von 30 % ebenfalls eine starke Schädigung.

Bei Betrachtung der negativen Zellviabilitäten für die ILs mit [FAP]-Anion, sowie für [E2OH]MIM][NTF], muss allerdings zur Kenntnis genommen werden, dass der hier angewandte Test nur eine eingeschränkte Aussagekraft besitzt. Führt man die unrealistischen negativen Werte auf eine mögliche Interaktion zwischen Fluoreszenzmarker und der in der verdünnten Probe verbliebenen ionischen Flüssigkeit zurück, lässt sich für keine der ILs

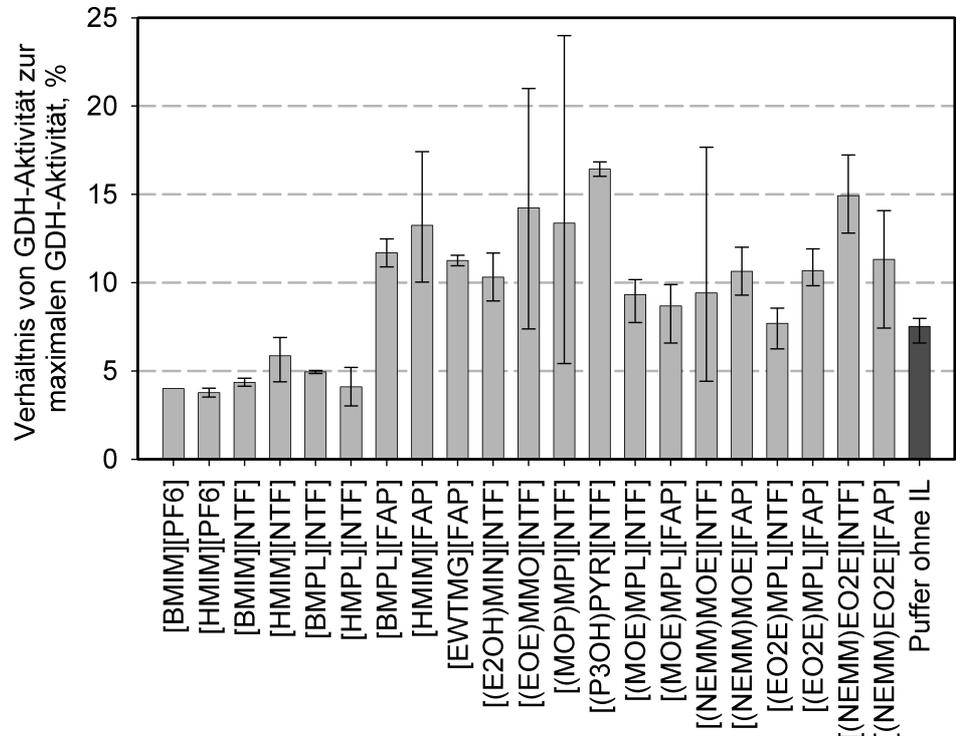


**Abbildung 6.1** Prozentuale Viabilität bestimmt mit Hilfe der BacLight-Methode nach 5 Stunden Inkubation von 50 g/L *E.coli* BL21 LB-ADH BS-GDH bei 30°C und 350 min<sup>-1</sup> mit 20 % v/v IL im Vergleich zum einphasig-wässrigen Ansatz.

voraussagen, inwieweit das hier dargestellte Ergebnis ein Resultat der Zellmembranschädigung oder einer Fluoreszenzverfälschung ist. Theoretisch liegt in der analysierten Probe zwar nur eine [FAP]-Konzentration von lediglich  $\sim 1 \cdot 10^{-5}$  mM vor, aufgrund des Tensidcharakters der ILs dürften sich diese an der Zellmembran aber anlagern und somit die tatsächliche Konzentration in der Probe deutlich erhöhen. Infolgedessen darf dieser Test allein für keine Beurteilung der Biokompatibilität herangezogen werden. Die Schädigung der Zellmembran muss daher auf einem anderen Weg versucht werden zu identifizieren.

## 6.2 Membranintegritätstest über die GDH-Aktivität

Die in dem *E.coli* BL21 LB-ADH BD-GDH intrazellulär vorliegende GDH kann nur dann aktiv sein, wenn es der Glukose gelingt die Zellmembran zu überwinden. Da Glukose aber an der Zellmembran zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert wird und daher nur bei geschädigten Zellen die GDH erreicht, kann die photometrisch bestimmte Zunahme an NAD(P)H, bei Vorlage von NAD(P) im Überschuss, daher als Indiz für die Permeabilisierung der Zellmembran herangezogen werden. Setzt man die auf diese Weise ermittelte GDH-Aktivität der mit IL inkubierten Zellen in Beziehung zu der maximalen Aktivität, die ein vollständiger



**Abbildung 6.2** GDH-Aktivität nach 5 Stunden Inkubation von  $50 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  *E.coli* BL21 LB-ADH BS-GDH bei  $30^\circ\text{C}$  und  $350 \text{ min}^{-1}$  mit 20 % v/v IL im Vergleich zum einphasig-wässrigen Ansatz als prozentualer Anteil der maximalen Aktivität.

Zellaufschluss liefert, erhält man für sämtliche in dieser Arbeit verwendeten ionischen Flüssigkeiten ein in Abbildung 6.2 dargestelltes Ergebnis. Hierbei gilt zu beachten, dass die zu erwartende Biokompatibilität der jeweiligen ionischen Flüssigkeit mit sinkendem Verhältnis zunimmt, da eine hohe GDH-Aktivität nur aufgrund einer stärkeren Schädigung der Zellen zustande kommt.

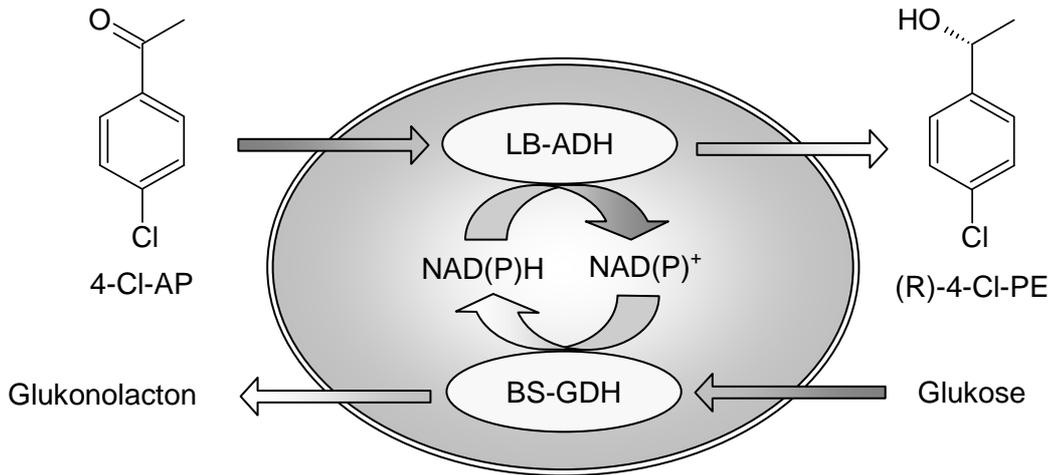
Die ersten sechs ionischen Flüssigkeiten – [BMIM]- und [HMIM][PF<sub>6</sub>], sowie [BMIM]-, [HMIM]-, [BMPL]- und [HMPL][NTF] – sind demnach am besten als zweite Phase bei Ganzzell-Biotransformationen geeignet, da sie die Zellmembran im Vergleich zu den anderen ILs am geringsten schädigen. Ionische Flüssigkeiten mit [FAP]-Anion scheinen im Vergleich zu den korrespondierenden mit [NTF]-Anion im Allgemeinen weniger biokompatibel zu sein. Die qualitativen Aussagen der mit dem Viability-Testkit generierten Ergebnisse können somit bestätigt werden.

Aber auch dieser indirekte Nachweis liefert allein keine Möglichkeit zur Beurteilung der Biokompatibilität. Die Schädigung der Zellmembran ist zwar ein notwendiges Kriterium für die GDH-Aktivität, aber kein hinreichendes. So könnte zum Beispiel durch eine IL-bedingte direkte Inaktivierung der GDH die detektierte Aktivität deutlich niedriger ausfallen, wodurch dann eine geringere Schädigung und somit eine höhere Biokompatibilität der ionischen Flüssigkeit impliziert wird. Die hier dargestellten Ergebnisse müssen daher in Kombination mit dem BacLight<sup>TM</sup>-Verfahren generierten betrachtet werden und können zusammen nur als Indiz für die Erklärung einer niedrigeren bzw. höheren Ausbeute bei Biotransformationen dienen. Eine allgemein gültige Aussage über die generelle Biokompatibilität einer ionischen Flüssigkeit lässt sich damit nicht ableiten. Aus diesem Grund sind exemplarische Biotransformationen zur Beurteilung der Eignung von ILs auch weiterhin notwendig.

### **6.3 Zellmembranschädigung bei Biotransformationen**

Bei einer Biotransformation mit ganzen Zellen wirkt nicht nur die ionische Flüssigkeit schädigend auf die Zellmembran, sondern zusätzlich auch das in der IL vorgelegte Edukt und das bei der Umsetzung gebildete Produkt. Der kombinierte Einfluss aller drei Stoffe wurde daher anhand der asymmetrischen Reduktion von 4-Chlor-Acetophenon (4-Cl-AP) zu (R)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol im 1,4-mL-Maßstab überprüft (Abbildung 6.3). Im Anschluss an die Biotransformation war aber aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit eine aussagekräftige Bestimmung der Viabilität mit Hilfe des BacLight<sup>TM</sup>-Verfahrens nicht möglich. Aus diesem Grund muss die Beurteilung des schädigenden Einflusses anhand der -

generierten Umsätze erfolgen. Um im Vergleich der einzelnen IL-Systeme allerdings einschätzen zu können, ob die Schädigung auf eine höhere Edukt-/Produkt-Konzentration in der wässrigen Phase zurückzuführen ist, wurden zusätzlich die Edukt- und Produkt-bezogenen Löslichkeitsgrenzen ermittelt, sowie die spezifischen Verteilungskoeffizienten zwischen ionischer Flüssigkeit und dem verwendeten Glukose-Umsetzungspuffer.



**Abbildung 6.3** Reaktionsschema der asymmetrischen Reduktion von 4-Chlor-Acetophenon (4-Cl-AP) zu (R)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol ((R)-4-Cl-PE) mit *E.coli* BL21 LB-ADH BS-GDH.

### 6.3.1 Löslichkeiten von Edukt und Produkt

Die Löslichkeitsgrenzen von 4-Cl-AP und 4-Cl-PE in Glukose-Umsetzungspuffer wurden zu 6,4 mM und 15,0 mM bestimmt (Tabelle 6.1). Die Ergebnisse sind somit identisch mit den von Pfründer (2005) ermittelten Löslichkeiten.

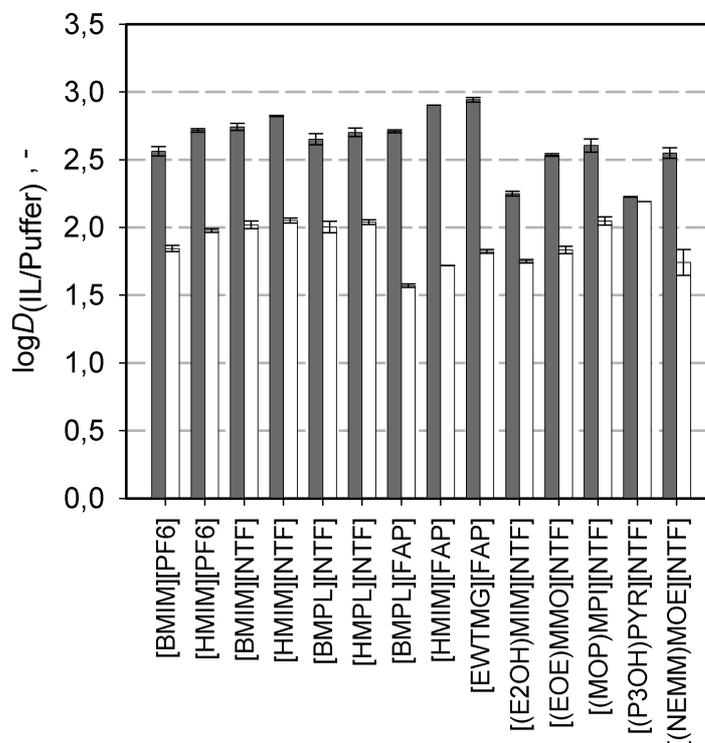
In den hier verwendeten ionischen Flüssigkeiten sind beide Substanzen bis mindestens 600 mM löslich. Somit war es in den späteren Biotransformationen auch möglich, 4-Cl-AP in dieser hohen Konzentration als Edukt in der IL vorzulegen, ohne eine Sättigungskonzentration zu überschreiten.

**Tabelle 6.1** Löslichkeit von 4-Cl-AP und 4-Cl-PE im Puffer (100 mM KPi, 200 mM Glukose, pH 6,5).

Löslichkeit im Puffer, mmol L <sup>-1</sup>	
4-Cl-AP	6,39
4-Cl-PE	25,01

### 6.3.2 Verteilungskoeffizienten von Edukt und Produkt

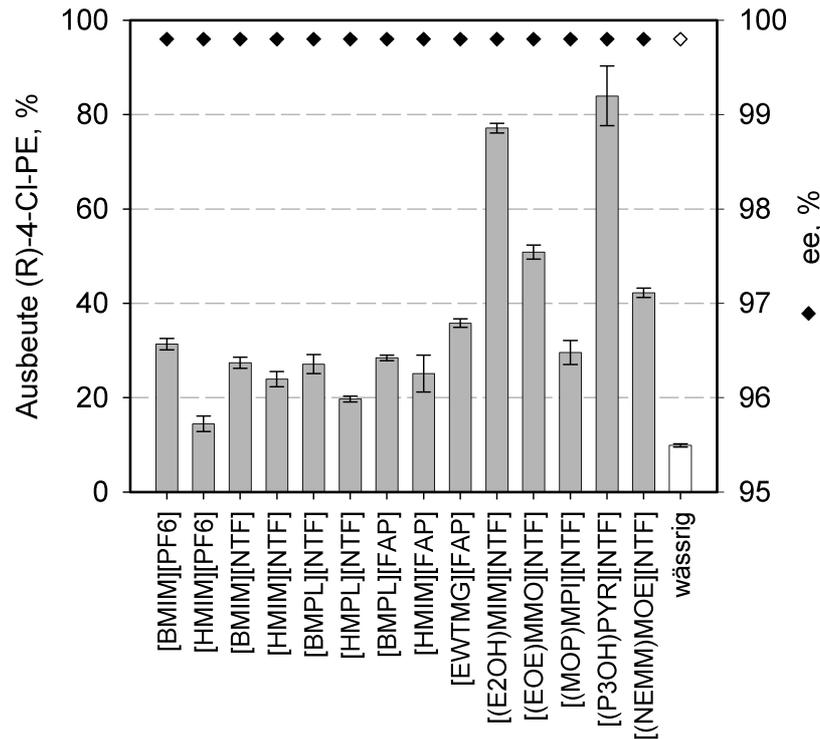
Die Verteilungskoeffizienten zwischen IL und Umsetzungspuffer sind in Abbildung 6.4 dargestellt. Bezogen auf das Edukt 4-Cl-AP weisen sämtliche ILs, bis auf [(E2OH)MIM]- und [(P3OH)PYR][NTF], einen hohen  $\log D$  von über 2,5 auf. Aufgrund der höheren Wasserlöslichkeit von 4-Cl-PE und der damit verbundenen ebenfalls höheren Toxizität kommt der Betrachtung der Produktspezifischen Verteilungskoeffizienten aber eine größere Bedeutung zu. Bis auf [BMIM][PF6] zeigen hier die ersten sechs ILs, zusammen mit [(MOP)MPI]- und [(P3OH)PYR][NTF], mit  $\log D$  um 2 die höchsten Verteilungskoeffizienten. Demnach ist zu erwarten, dass diese ionischen Flüssigkeiten die Toxizität des gebildeten Produkts am deutlichsten minimieren können. Sofern der Zellmembranschädigende Einfluss der ILs nicht überwiegt, sollte daher bei den später durchgeführten Biotransformationen eine im Vergleich zu den anderen ionischen Flüssigkeiten niedrigere Ausbeute erzielt werden. Dies setzt allerdings auch hier voraus, dass die eingesetzten ionischen Flüssigkeiten, nach einer Schädigung der Zellmembran, die Aktivitäten von ADH und GDH, und somit auch die Gesamtausbeute, nicht signifikant beeinflussen.



**Abbildung 6.4** Verteilungskoeffizienten  $\log D$  von 4-Cl-AP ■ und 4-Cl-PE □ zwischen ionischen Flüssigkeiten und Glukose-Umsetzungspuffer.

### 6.3.3 Umsetzungen im 1,4 ml-Maßstab

Zur Beurteilung des schädigenden Einflusses von Edukt und Produkt in Kombination mit 20 % (v/v) ionische Flüssigkeit während einer asymmetrischen Reduktion wurden Biotransformationen von 4-Cl-AP im 1,4 mL-Maßstab durchgeführt. Die dabei generierten Ausbeuten an (R)-4-Cl-PE, sowie die zugehörigen Enantiomerenüberschüsse sind in Abbildung 6.5 dargestellt.



**Abbildung 6.5** Chemische Ausbeute an (R)-4-Cl-PE und Enantiomerenüberschuss nach ein-stündiger Umsetzung von 600 mM 4-Cl-AP mit 50 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup> *E.coli* BL21 LB-ADH BS-GDH bei 30°C und 350 min<sup>-1</sup> mit 20 % v/v IL im Vergleich zum einphasig-wässrigen Ansatz.

Die nach einer Stunde mit 80 % sehr hoch ausfallenden Ausbeuten für [(E2OH)MIM]- und [(P3OH)PYR][NTF] sind ein eindeutiges Indiz für eine starke Schädigung der Zellmembran. Bei der erst genannten IL lässt sich dies vor allem auf die besonders niedrig ausfallenden Verteilungskoeffizienten zurückführen. Im Ansatz mit [(P3OH)PYR][NTF] scheinen sich die Effekte der geringen Biokompatibilität und des niedrigen Edukt bezogenen Verteilungskoeffizienten zu überschneiden. Im Vergleich zu den anderen eignen sich diese beiden ILs somit deutlich schlechter für eine Ganzzell-Biotransformation. Bei den ersten sechs ionischen Flüssigkeiten scheint der niedrigere Verteilungskoeffizient der ILs mit Butyl-

Kation, im Vergleich zu den korrespondierenden mit einer Hexyl-Seitenkette, die Schädigung der Zellmembran zu dominieren. Kritisch zu bewerten sind die für die weniger biokompatibleren [FAP]-ILs erstaunlich niedrig ausfallenden Ausbeuten. Da diese ionischen Flüssigkeiten zusätzlich auch die niedrigsten Produkt bezogenen Verteilungskoeffizienten aufzeigen, ist davon auszugehen, dass hier nicht nur die Zellmembran, sondern auch ADH und/oder GDH nachhaltig geschädigt werden.

Anhand der Enantiomerenüberschüsse lässt sich keine Aussage über die bessere oder schlechtere Eignung einer ionischen Flüssigkeit ableiten. In sämtlichen Ansätzen lag der ee bei über 99,8 % und war damit mehr als zufriedenstellend.

## 6.4 Diskussion

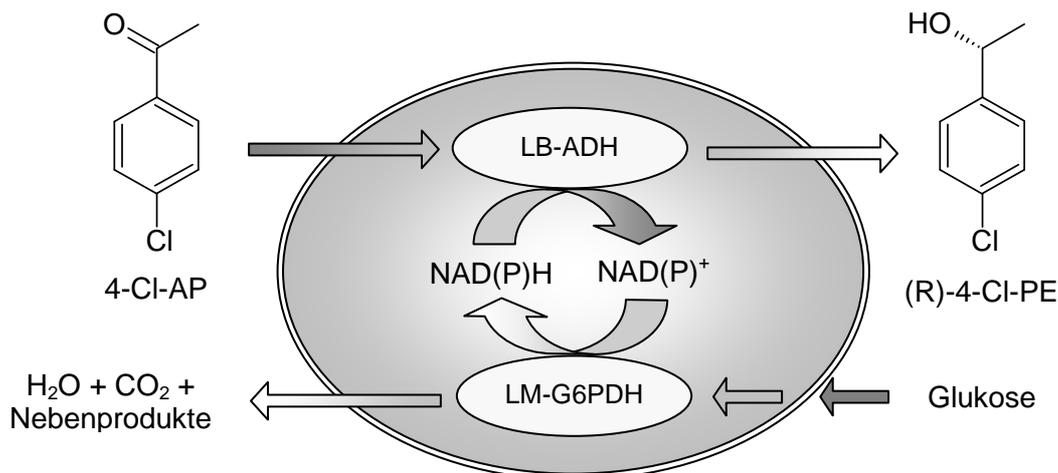
Die Abschätzung der Biokompatibilität von ionischen Flüssigkeiten über die Bestimmung der Zellmembranintegrität hat sowohl für den LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup>-Test, als auch über die detektierte GDH-Aktivität nur unzureichende Aussagen geliefert. Zwar lassen sich durch die Kombination der Erkenntnisse Schlussfolgerungen ziehen, aber auch diese besitzen nur eine eingeschränkte Gültigkeit. Zum anderen ist auch fraglich, ob die mit diesem *E.coli* gewonnen Erkenntnisse ohne weiteres auf andere Stämme übertragen werden können. Es ist daher nicht möglich die in dieser Arbeit zur Verfügung stehenden ILs hinsichtlich ihrer Eignung für Ganzzell-Biotransformationen mit der Biokompatibilität als Ausschlusskriterium ausreichend zu beurteilen. Bis zur Verfügbarkeit einer zuverlässigen Methodik zur Bestimmung der tatsächlichen Biokompatibilität ionischer Flüssigkeiten müssen daher auch weiterhin exemplarische Biotransformationen durchgeführt werden.

## 7 Asymmetrische Synthesen mit *E. coli* BL21 LB-ADH LM-G6PDH

Wie im vorangegangenen Kapitel bestätigt werden konnte, kann mit Hilfe einer GDH in einem Ganzzell-Biokatalysator keine Cofaktorregenerierung gewährleistet werden, da die als Substrat vorgelegte Glukose an der Zellmembran zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert wird. Dieses Problem ließe sich zwar durch eine Permeabilisierung der Zellmembran lösen, jedoch können die intrazellulär vorliegenden Enzyme dann nicht mehr vor der molekularen Toxizität der ionischen Flüssigkeiten (direkte Interaktion mit IL-Molekülen) geschützt werden. Ein weiteres, für die Biokatalyse entscheidendes Problem stellt der Verlust des Cofaktors über die perforierte Zellmembran dar. Um von den Vorteilen eines Ganzzell-Biokatalysators profitieren zu können, muss daher GDH gegen ein anderes cofaktorregenerierendes Enzym ausgetauscht werden. Mit der *Leuconostoc mesenteroides* Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (LM-G6PDH) wurde aus diesem Grund ein Cofaktorregenerierungssystem ausgewählt, welches im Gegensatz zur GDH in der Lage war, intrazelluläres Glukose-6-Phosphat (G6P) zu nutzen.

### 7.1 Synthese von (R)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol

Die Leistungsfähigkeit des Ganzzell-Biokatalysators *E. coli* BL21 LB-ADH LM-G6PDH wurde anhand der asymmetrischen Reduktion von 4-Chlor-Acetophenon (4-Cl-AP) zu (R)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol ((R)-4-Cl-PE)) im 1,4 mL-Maßstab überprüft. In Abbildung 7.1 erfolgt eine schematische Darstellung der Reaktion. Das bei der Cofaktorregenerierung entstehende 6-Phosphogluconolakton wird intrazellulär über den Entner-Doudoroff-Pfad verstoffwechselt (Lengeler *et al.* 1999). Auch bei diesen Biotransformationen sollten die ionischen Flüssigkeiten auf ihre Eignung zur Biokatalyse untersucht werden. Zur Beurteilung, inwieweit die ionischen Flüssigkeiten die Konzentration des vorgelegten Edukts / gebildeten Produkts in der wässrigen Phase minimieren können, wurden auch hier die Verteilungskoeffizienten zwischen IL und Umsetzungspuffer ermittelt. Bei den nachfolgend dargestellten Untersuchungen fanden sämtliche zur Verfügung stehenden ILs Verwendung.



**Abbildung 7.1** Reaktionsschema der asymmetrischen Reduktion von 4-Chlor-Acetophenon (4-Cl-AP) zu (R)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol ((R)-4-Cl-PE) mit *E.coli* BL21 LB-ADH LM-G6PDH.

### 7.1.1 Löslichkeiten von Edukt und Produkt

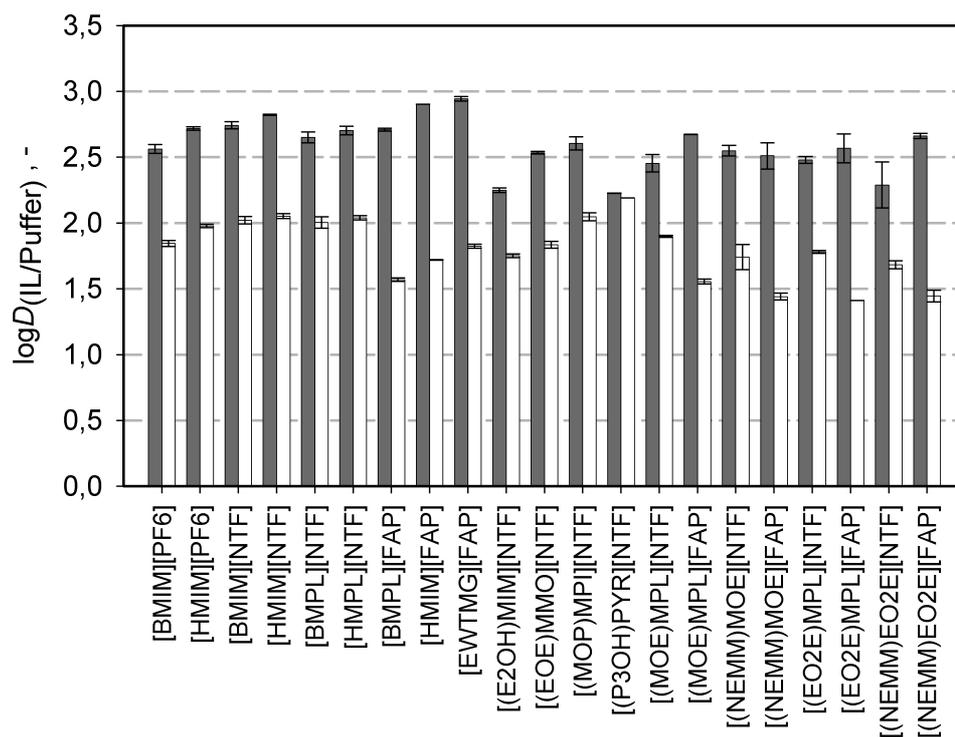
Da sich der Umsetzungspuffer nicht gegenüber dem in Kapitel 6 verwendeten unterschied, sind die in Tabelle 7.1 dargestellten Löslichkeiten identisch zu den dort präsentierten. In den zusätzlich untersuchten ILs ließen sich beide Substanzen ebenfalls bis mindestens 600 mM lösen.

**Tabelle 7.1** Löslichkeit von 4-Cl-AP und 4-Cl-PE im Puffer (100 mM KPi, 200 mM Glukose, pH 6,5).

Löslichkeit im Puffer, mmol L <sup>-1</sup>	
4-Cl-AP	6,39
4-Cl-PE	25,01

### 7.1.2 Verteilungskoeffizienten von Edukt und Produkt

Die Verteilungskoeffizienten zwischen IL und Umsetzungspuffer sind in Abbildung 7.2 dargestellt. Es kann gezeigt werden, dass auch die zusätzlich untersuchten ionischen Flüssigkeiten hinsichtlich ihres Verteilungskoeffizienten für das Produkt 4-Cl-PE keine höheren Verteilungskoeffizienten als die ersten sechs ILs gewährleisten können. Ob sie sich daher



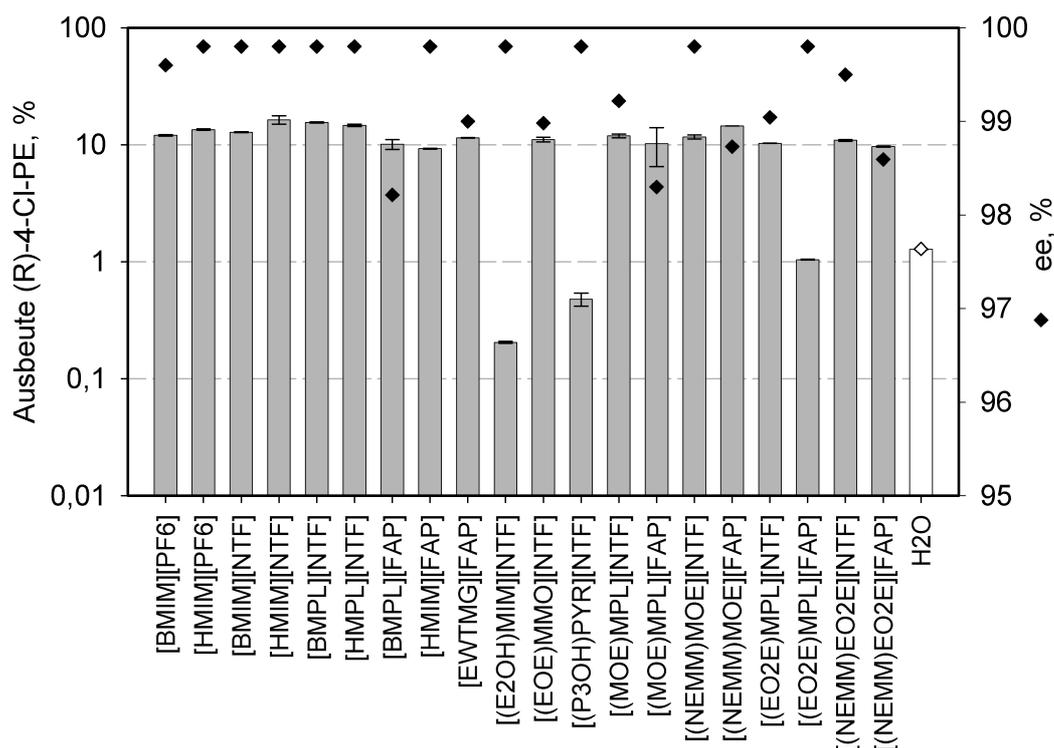
**Abbildung 7.2** Verteilungskoeffizienten  $\log D$  von 4-Cl-AP ■ und 4-Cl-PE □ zwischen ionischen Flüssigkeiten und Glukose-Umsetzungspuffer.

aber weniger gut für Ganzzell-Biotransformationen eignen, lässt sich davon allerdings noch nicht ableiten. Bei genauerer Betrachtung der letzten vier IL-Paare, mit jeweils identischem Kation aber unterschiedlichem Anion, zeigt sich aber ein interessanter Zusammenhang. [FAP]-Anionen liefern im Vergleich zu [NTF]-Anionen generell höhere Verteilungskoeffizienten für das Edukt 4-Cl-AP, dafür aber deutlich niedrigere für das Produkt 4-Cl-PE. Da bei einer vollständigen Umsetzung des Edukts aber genau so viel Produkt entsteht, wie an Edukt vorgelegt worden ist, scheinen ionische Flüssigkeiten mit [NTF]-Anionen [FAP]-ILs, hinsichtlich der Minimierung der Produkt-Konzentration in der wässrigen Phase, überlegen zu sein. Ob sich dies allerdings auf die Ausbeute der Biotransformation auswirkt, ist immer auch von der spezifischen Toxizität des Produkts abhängig.

### Umsetzungen im 1,4 ml-Maßstab

Die im 1,4 mL-Biotransformationen generierten Ausbeuten an (R)-4-Cl-PE, sowie die zugehörigen Enantiomerenüberschüsse sind in Abbildung 7.3 dargestellt. Trotz der Verwendung eines nun funktionsfähigen Ganzzell-Biokatalysators mit sehr hohen Aktivitäten von 6500 U

$\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$  für LB-ADH und  $4500 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$  für LM-G6PDH fielen die Ausbeuten der einstündigen Biotransformation mit maximal 18 % sehr gering aus. Gegenüber dem rein wässrigen Ansatz konnte aber für viele ionische Flüssigkeiten eine zehnfach höhere Ausbeute erzielt werden. Für acht ionische Flüssigkeiten lagen die Enantiomerenüberschüsse deutlich unter 99,5 %. Die als weniger biokompatibel eingestuft ILs [(E2OH)MIM]- und [(P3OH)MIM][NTF] zeigten wie erwartet keinen messbaren Umsatz und scheinen damit tatsächlich ungeeignet für eine Ganzzell-Biokatalyse zu sein.



**Abbildung 7.3** Chemische Ausbeute an (R)-4-Cl-PE und Enantiomerenüberschuss nach einstündiger Umsetzung von 600 mM 4-Cl-AP mit  $50 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  *E.coli* BL21 LB-ADH LM-G6PDH bei  $30^\circ\text{C}$  und  $350 \text{ min}^{-1}$  mit 20 % v/v IL im Vergleich zum einphasig-wässrigen Ansatz.

Als mögliche Ursache für dieses erstaunliche Ergebnis wurde zunächst eine zu geringe intrazelluläre  $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ -Konzentration vermutet. Da aber in einer über 24 Stunden durchgeführten Biotransformation mit [BMIM][NTF] nachgewiesen werden konnte, dass die Ausbeute kontinuierlich auf über 80 % steigt, konnte eine Schädigung der Zellen und ein Cofaktor-Verlust ausgeschlossen werden. Die Regulation des Verhältnisses von NADPH zu  $\text{NADP}^+$  auf einen nahezu konstanten Wert von 1 (Kapitel 3.3.2) dürfte der Biokatalyse zudem entgegenkommen. Damit könnte die niedrige Reaktionsgeschwindigkeit mit großer Wahrscheinlichkeit allein auf eine Limitierung des Glukose-Transports in die Zelle zurückzuführen sein.

## 7.2 Diskussion

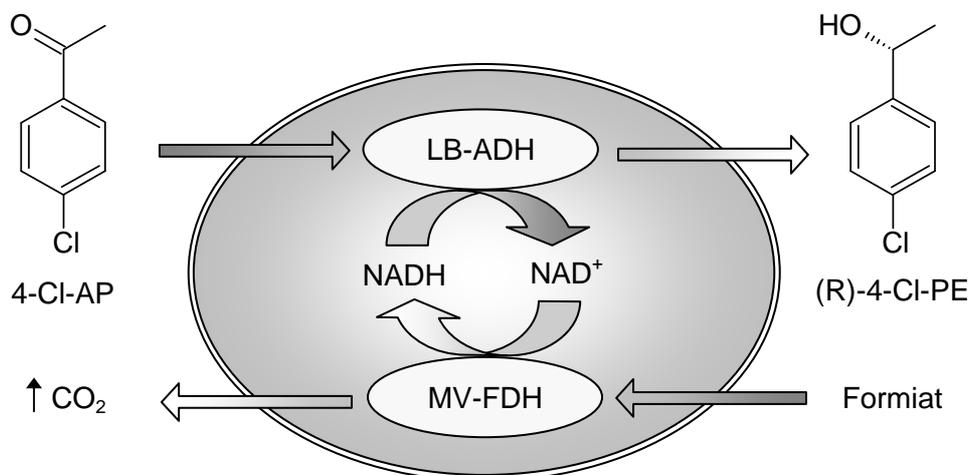
Für Ganzzell-Biokatalysatoren scheint die Cofaktorregenerierung mit Hilfe einer Glukose-6-Phosphatdehydrogenase nicht geeignet zu sein. Trotz sehr hoher spezifischer Aktivitäten kann in der Biotransformation von diesen nicht profitiert werden. Die Cofaktorregenerierung sollte daher über ein anderes Enzym gewährleistet werden.

## 8 Asymmetrische Synthesen mit *E. coli* BL21 LB-ADH MV-FDH

Eine Cofaktorregenerierung mit Hilfe einer Formiatdehydrogenase (FDH) bietet den Vorteil, dass das für die Regenerierung benötigte Cosubstrat Formiat als Ameisensäure ( $pK_s = 3,75$ ) ohne aktiven Transport direkt von der Zelle aufgenommen werden kann. Ein weiterer Vorteil bietet sich durch die Tatsache, dass bei der Umsetzung als einziges Nebenprodukt gasförmiges Kohlendioxid entsteht, welches sich nicht im Umsetzungspuffer anreichert. Dadurch liegt auch das Gleichgewicht der cofaktorregenerierenden Reaktion auf der Seite des Kohlendioxids. Aus diesen genannten Gründen sollte die Formiatdehydrogenase das optimale Cofaktorregenerierungssystem für den Ganzzell-Biokatalysator sein. Eine Überprüfung dieser Hypothese erfolgte anhand der asymmetrischen Reduktion sechs verschiedener prochiraler Ketone unter Verwendung einer FDH aus *Mycobacterium vaccae*. Bei sämtlichen hier dargestellten Ergebnissen fanden nur Zellen einer Produktion Verwendung.

### 8.1 Synthese von (R)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol

Eine schematische Darstellung der hier untersuchten Reaktion erfolgt in Abbildung 8.1.



**Abbildung 8.1** Schema der asymmetrischen Reduktion von 4-Chlor-Acetophenon (4-Cl-AP) zu (R)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol ((R)-4-Cl-PE) mit *E. coli* BL21 LB-ADH MV-FDH.

### 8.1.1 Löslichkeiten von Edukt und Produkt

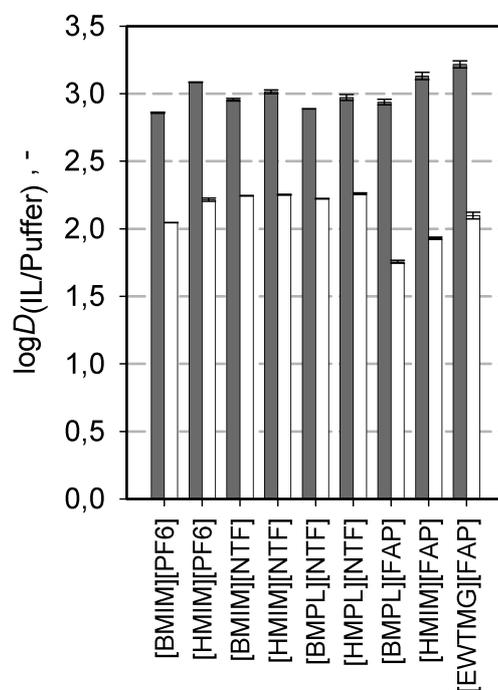
Die Löslichkeitsgrenzen von 4-Cl-AP und 4-Cl-PE in dem verwendeten Umsetzungspuffer mit Natriumformiat wurden zu 3,1 mM und 9,4 mM bestimmt (Tabelle 8.1). Im Vergleich zu den für den Glukose-Puffer ermittelten Löslichkeiten liegen diese somit niedriger. Wie bereits in den vorangegangenen Untersuchungen festgestellt, waren beide Substanzen bis mindestens 600 mM in den hier verwendeten ionischen Flüssigkeiten löslich.

**Tabelle 8.1** Löslichkeit von 4-Cl-AP und 4-Cl-PE im Puffer (500 mM KPi, 1000 mM Natriumformiat, pH 6,5).

Löslichkeit im Puffer, mmol L <sup>-1</sup>	
4-Cl-AP	3,12
4-Cl-PE	9,43

### 8.1.2 Verteilungskoeffizienten von Edukt und Produkt

Die in Abbildung 8.1 dargestellten Verteilungskoeffizienten fallen aufgrund der hohen Ionenstärke des hier verwendeten Umsetzungspuffers deutlich höher aus. Für 4-Cl-AP liegen die

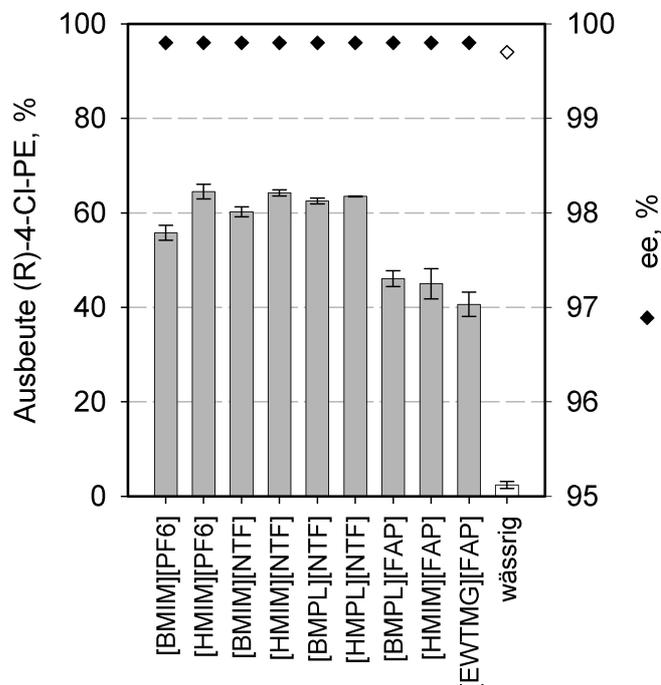


**Abbildung 8.2** Verteilungskoeffizienten  $\log D$  von 4-Cl-AP ■ und 4-Cl-PE □ zwischen ionischen Flüssigkeiten und Natriumformiat-Umsetzungspuffer.

ermittelten  $\log D$  nahe 3, für 4-Cl-PE zwischen 1,75 und 2,25. Die ersten sechs ionischen Flüssigkeiten und [EWTMG][FAP] implizieren aufgrund der hohen Produkt bezogenen Verteilungskoeffizienten über 2 eine gute Eignung für Ganzzell-Biotransformationen.

### 8.1.3 Umsetzungen im 1,4 ml-Maßstab

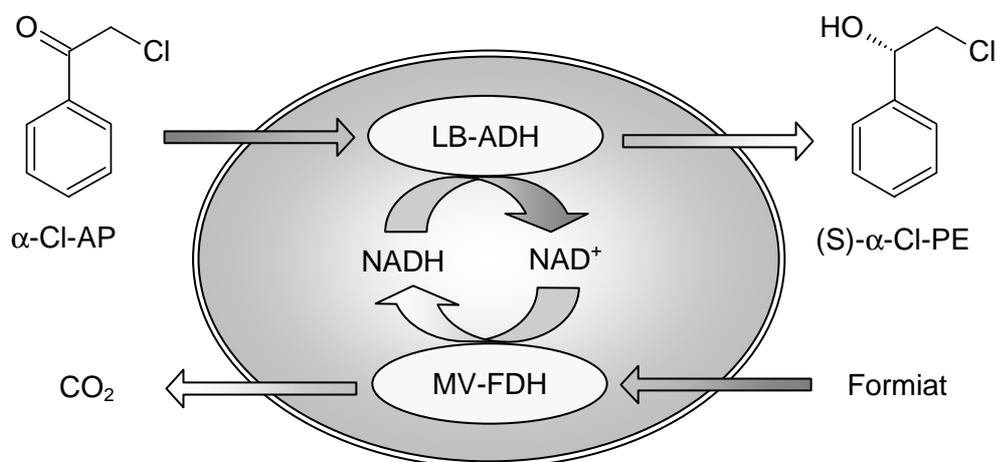
Die im 1,4 mL-Maßstab erzielten Ausbeuten und Enantiomerenüberschüsse der asymmetrischen Reduktion von 4-Cl-AP sind in Abbildung 8.3 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen auf eindrucksvolle Weise die gute Eignung von Formiatdehydrogenase als cofaktorregenerierendes System. Nach einer einstündigen Umsetzung werden für die ersten sechs ionischen Flüssigkeiten Ausbeuten von um die 60 % erzielt. Die Ansätze mit [FAP]-ILs generieren dagegen nur Ausbeuten um die 45 %. Da auch die Ausbeute für [EWTMG][FAP] trotz guter Verteilungskoeffizienten deutlich niedriger ausfällt, ist dies wahrscheinlich auf die schlechtere Biokompatibilität zurückzuführen. Im Vergleich zum einphasig wässrigen Ansatz lässt sich aber mit allen ionischen Flüssigkeiten eine deutliche Verbesserung der Biotransformation erzielen. So liegt die Ausbeute für die ersten sechs ILs um das 20fache höher. Die Enantiomerenüberschüsse liegen für sämtliche Umsetzungen bei über 99,8 %.



**Abbildung 8.3** Chemische Ausbeute an (R)-4-Cl-PE und Enantiomerenüberschuss nach einstündiger Umsetzung von 600 mM 4-Cl-AP mit 50  $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$  *E.coli* BL21 LB-ADH MV-FDH bei 30°C und 350  $\text{min}^{-1}$  mit 20 % v/v IL im Vergleich zum einphasig-wässrigen Ansatz.

## 8.2 Synthese von (S)- $\alpha$ -Chlor-1-Phenylethanol

Da mit *E.coli* BL21 LB-ADH MV-FDH nun ein Biokatalysator zur Verfügung stand, mit dem sich hohe Ausbeuten erzielen lassen, sollte nachfolgend auch die Eignung anderer prochiraler Ketone für die asymmetrische Reduktion zu chiralen Alkoholen untersucht werden. Die Herstellung von (S)- $\alpha$ -Chlor-1-Phenylethanol war eine der zusätzlich untersuchten Ganzzell-Biotransformationen. Eine schematische Darstellung der Reaktion erfolgt in Abbildung 8.4.



**Abbildung 8.4** Reaktionsschema der asymmetrischen Reduktion von  $\alpha$ -Chlor-Acetophenon ( $\alpha$ -Cl-AP) zu (S)- $\alpha$ -Chlor-1-Phenylethanol ((S)- $\alpha$ -Cl-PE) mit *E.coli* BL21 LB-ADH MV-FDH.

### 8.2.1 Löslichkeiten von Edukt und Produkt

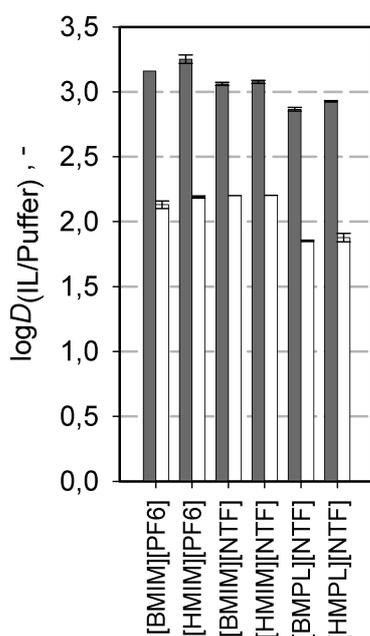
Mit einer Löslichkeit von 2,21 mM für  $\alpha$ -Cl-AP und 22,75 mM für  $\alpha$ -Cl-PE (Tabelle 8.2) handelte es sich hier ebenfalls um ein schlecht wasserlösliches Reaktionssystem. In den ionischen Flüssigkeiten ließen sich beide Substanzen bis mindestens 600 mM lösen.

**Tabelle 8.2** Löslichkeit von  $\alpha$ -Cl-AP und  $\alpha$ -Cl-PE im Puffer (500 mM KPi, 1000 mM Natriumformiat, pH 6,5).

Löslichkeit im Puffer, mmol L <sup>-1</sup>	
$\alpha$ -Cl-AP	2,21
$\alpha$ -Cl-PE	22,75

## Verteilungskoeffizienten von Edukt und Produkt

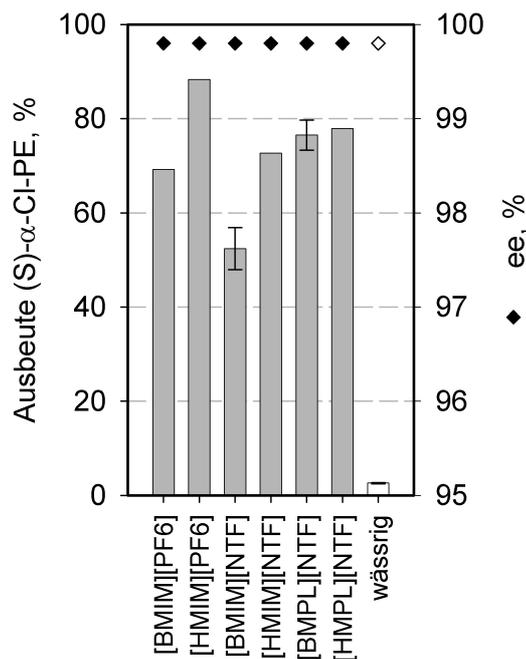
In Abbildung 8.5 sind die Verteilungskoeffizienten für die bei diesem Reaktionssystem untersuchten sechs ionischen Flüssigkeiten dargestellt. [BMIM]- und [HMIM][PF<sub>6</sub>], sowie [BMIM]- und [HMIM][NTF] zeigen zufriedenstellend hohe Verteilungskoeffizienten von  $\log D$  um die 3 für das Edukt und deutlich über 2 für das Produkt. [BMPL]- und [HMPL][NTF] liefern dagegen nur deutlich niedrigere Verteilungskoeffizienten von ungefähr  $\log D = 2,8$  bzw. 1,8 und scheinen daher für Biotransformationen etwas schlechter geeignet zu sein, als die zuerst genannten ILs.



**Abbildung 8.5** Verteilungskoeffizienten  $\log D$  von  $\alpha\text{-Cl-AP}$  ■ und  $\alpha\text{-Cl-PE}$  □ zwischen ionischen Flüssigkeiten und Natriumformiat-Umsetzungspuffer.

### 8.2.3 Umsetzungen im 1,4 ml-Maßstab

Trotz ihrer geringeren Verteilungskoeffizienten zeigen [BMPL]- und [HMPL][NTF] in Abbildung 8.6 nach einer Stunde erstaunlich gute Ausbeuten von über 75 %. Der geringere Verteilungskoeffizient scheint somit für die Minimierung der Edukt-Produkt-Konzentrationen in der wässrigen Phase auszureichen. Neben diesen beiden ILs zeigen auch [BMIM][PF<sub>6</sub>] (70 %), [HMIM][PF<sub>6</sub>] (~ 90 %) und [HMIM][NTF] (> 70 %) eine gute Eignung für Ganzzell-Biotransformationen. [BMIM][NTF] scheint dagegen weniger gut geeignet zu sein. Im Vergleich zum rein wässrigen Ansatz lässt sich aber mit allen getesteten ionischen Flüssigkeiten eine deutliche Verbesserung der Biokatalyse erzielen. So liegt zum Beispiel die Ausbeute für [HMIM][PF<sub>6</sub>] um das 30fache höher.

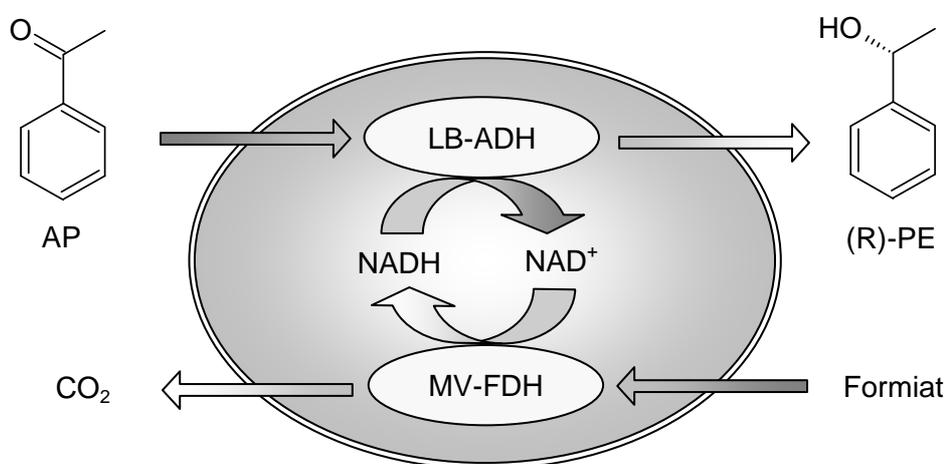


**Abbildung 8.6** Chemische Ausbeute an (S)- $\alpha$ -Cl-PE und Enantiomerenüberschuss nach ein-stündiger Umsetzung von 600 mM  $\alpha$ -Cl-AP mit 50 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup> *E.coli* BL21 LB-ADH MV-FDH bei 30°C und 350 min<sup>-1</sup> mit 20 % v/v IL im Vergleich zum einphasig-wässrigen Ansatz.

Wie Abbildung 8.6 zeigt, liegen sämtliche Enantiomerenüberschüsse bei den hier durchgeführten Biotransformationen bei über 99,8%. Auffällig ist zudem, dass die Ausbeuten des hier betrachteten Reaktionssystems deutlich höher ausfallen, als für 4-Cl-AP. Dies scheint auf eine höhere Aktivität der LB-ADH gegenüber  $\alpha$ -Cl-AP zurückzuführen sein.

## 8.2 Synthese von (R)-1-Phenylethanol

Bei dem nachfolgend betrachteten Reaktionssystem handelte es sich um eine asymmetrische Umsetzung von Acetophenon (AP) zu (R)-1-Phenylethanol (PE). Eine schematische Darstellung der Reaktion erfolgt in Abbildung 8.7. Aufgrund der um 50 % geringeren relativen Aktivität der *Lactobacillus brevis* Alkoholdehydrogenase im Vergleich zu einer Umsetzung von 4-Cl-AP (Tabelle 3.5, Kapitel 3.4.1), war bei diesem Keton mit einer deutlich geringeren Ausbeute zu rechnen. Ob sich der Einfluss der relativen Enzymaktivität aber auch tatsächlich bei der Ganzzell-Biotransformation auswirkt, sollte anhand der nachfolgenden Untersuchungen aufgezeigt werden.



**Abbildung 8.7** Reaktionsschema der asymmetrischen Reduktion von Acetophenon (AP) zu (R)-1-Phenylethanol ((R)-PE) mit *E.coli* BL21 LB-ADH MV-FDH.

### 8.3.1 Löslichkeiten von Edukt und Produkt

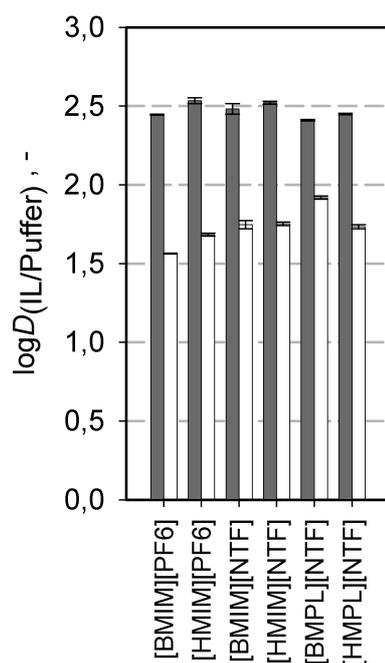
Die Löslichkeitsgrenzen von AP und PE sind in Tabelle 8.3 dargestellt. Mit Werten von 47,6 mM bzw. 84,5 mM besitzen beide Substanzen eine deutlich höhere Löslichkeit als die zuvor untersuchten Reaktanden. In den verwendeten sechs ionischen Flüssigkeiten ließen sie sich bis mindestens 600 mM lösen.

**Tabelle 8.3** Löslichkeit von AP und PE im Puffer (500 mM KPi, 1000 mM Natriumformiat, pH 6,5).

Löslichkeit im Puffer, mmol L <sup>-1</sup>	
AP	47,58
PE	84,48

### 8.3.2 Verteilungskoeffizienten von Edukt und Produkt

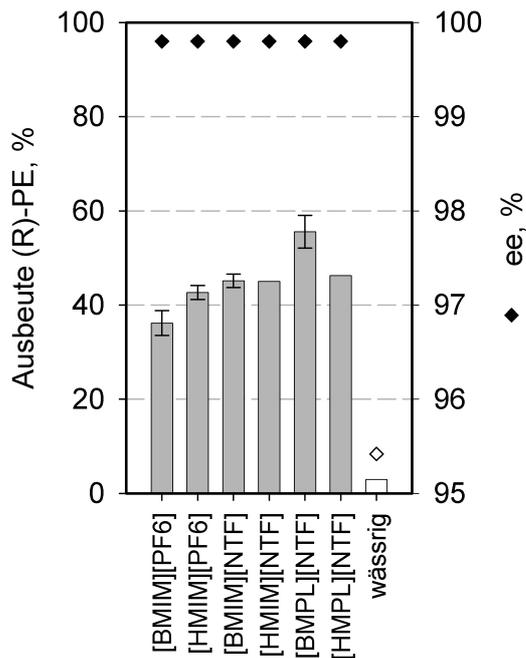
Aufgrund der höheren Wasserlöslichkeit von Acetophenon und 1-Phenylethanol fallen die in Abbildung 8.8 dargestellten Verteilungskoeffizienten deutlich niedriger aus. Die  $\log D$  für AP liegen bei allen getesteten ionischen Flüssigkeiten auf einem ähnlich hohen Niveau von ca. 2,5. Hinsichtlich der Produkt bezogenen Verteilungskoeffizienten scheinen ILs mit [NTF]-Anion besser für die Minimierung der wässrigen PE-Konzentration geeignet zu sein. [BMPL][NTF] erreicht mit einem  $\log D$  von ungefähr 1,9 den höchsten Wert von allen ILs.



**Abbildung 8.8** Verteilungskoeffizienten  $\log D$  von AP ■ und PE □ zwischen ionischen Flüssigkeiten und Natriumformiat-Umsetzungspuffer.

### 8.3.3 Umsetzungen im 1,4 ml-Maßstab

Die im 1,4 mL-Maßstab nach einer Stunde erzielten Ausbeuten und Enantiomerenüberschüsse der asymmetrischen Reduktion von AP sind in Abbildung 8.9 dargestellt. Die Ergebnisse bestätigen die im Vergleich zu 4-Cl-AP deutlich niedrigere Aktivität der LB-ADH gegenüber Acetophenon. [BMPL][NTF] liefert mit einer Ausbeute von etwa 55 % von allen ILs das beste Ergebnis. Auffällig ist, dass bei diesem Reaktionssystem die Verteilungskoeffizienten einen dominierenden Effekt auf die Biotransformation besitzen. So ordnen sich die Ausbeuten der einzelnen ILs entsprechend der Ergebnisse für die Verteilungskoeffizienten. Die Ursache hierfür lässt sich auf die hohe Wasserlöslichkeit von AP und PE zurückführen.

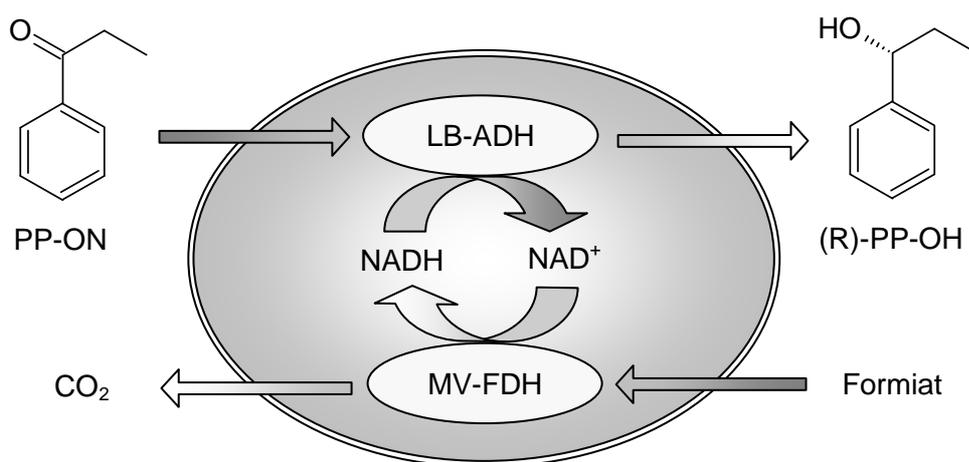


**Abbildung 8.9** Chemische Ausbeute an (R)-PE und Enantiomerenüberschuss nach einstündiger Umsetzung von 600 mM AP mit  $50 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  *E.coli* BL21 LB-ADH MV-FDH bei  $30^\circ\text{C}$  und  $350 \text{ min}^{-1}$  mit 20 % v/v IL im Vergleich zum einphasig-wässrigen Ansatz.

Ein Vergleich mit dem rein wässrigen Ansatz verdeutlicht ein weiteres Mal den positiven Einfluss der zweiphasigen Prozessführung mit ionischen Flüssigkeiten. Die Ausbeute an (R)-1-Phenylethanol kann für [BMPL][NTF] um das 20fache gesteigert werden. Zudem wird deutlich, dass eine hohe Edukt- bzw. Produkt-Konzentration in der wässrigen Phase sich äußerst negativ auf die maximal erzielbaren ee auswirkt. Während ohne ionische Flüssigkeiten nur eine Enantiomerenreinheit von 95,4 % erreicht werden kann, liefern alle Ansätze mit ILs ee von über 99,8 %.

## 8.4 Synthese von (R)-1-Phenyl-1-Propanol

Als viertes Reaktionssystem wurde die asymmetrische Reduktion von Propiophenon (PP-ON) zu (R)-1-Phenyl-1-Propanol ((R)-PP-OH) untersucht. Der chirale Alkohol dient als Baustein für nematische Flüssigkristalle und besitzt daher eine hohe Wertschöpfung. Eine schematische Darstellung der Ganzzell-Biotransformation mit *E.coli* BL21 LB-ADH MV-FDH erfolgt in Abbildung 8.10



**Abbildung 8.10** Reaktionsschema der asymmetrischen Reduktion von Propiophenon (PP-ON) zu (R)-1-Phenyl-1-Propanol ((R)-PP-OH) mit *E.coli* BL21 LB-ADH MV-FDH.

### 8.4.1 Löslichkeiten von Edukt und Produkt

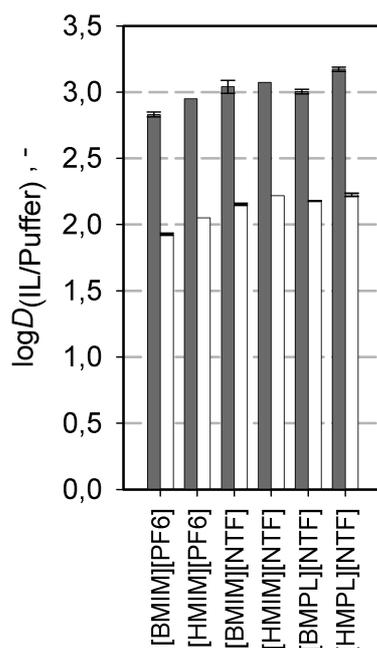
Mit einer Löslichkeit von 9,7 mM für PP-ON und 21,9 mM für PP-OH (Tabelle 8.4) handelte es sich hier ebenfalls um ein schlecht wasserlösliches Reaktionssystem. In den nachfolgend getesteten ionischen Flüssigkeiten ließen sich beide Substanzen bis mindestens 600 mM lösen.

**Tabelle 8.4** Löslichkeit von PP-ON und PP-OH im Puffer (500 mM KPi, 1000 mM Natriumformiat, pH 6,5).

Löslichkeit im Puffer, mmol L <sup>-1</sup>	
PP-ON	9,68
PP-OH	21,93

### 8.4.2 Verteilungskoeffizienten von Edukt und Produkt

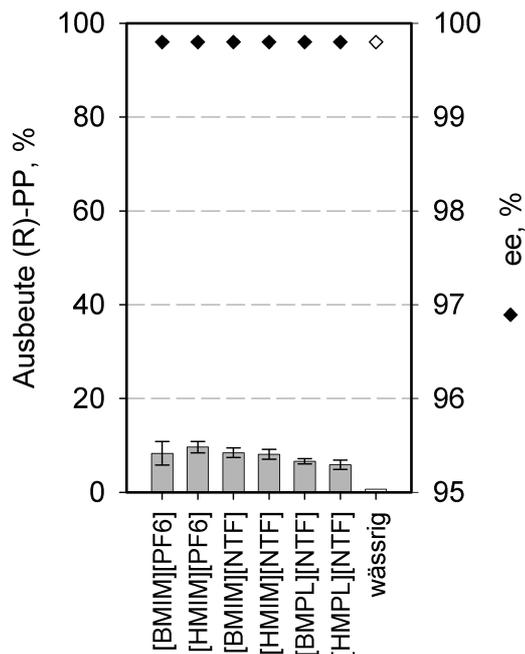
In Abbildung 8.11 sind die Verteilungskoeffizienten für die bei diesem Reaktionssystem untersuchten sechs ionischen Flüssigkeiten dargestellt. Sämtliche ILs zeigen mit  $\log D$  von 2,8 bis 3,2 für PP-ON und 1,9 bis 2,2 für PP-OH eine gute Eignung für die Biokatalyse. Den höchsten Edukt bezogenen Verteilungskoeffizienten generiert [HMPL][NTF]. Hinsichtlich der Verteilungskoeffizienten für PP-OH liegen [BMIM]-, [HMIM]-, [BMPL]- und [HMPL][NTF] auf einem ähnlich hohen Niveau.



**Abbildung 8.11** Verteilungskoeffizienten  $\log D$  von PP-ON ■ und PP-OH □ zwischen ionischen Flüssigkeiten und Natriumformiat-Umsetzungspuffer.

### 8.4.3 Umsetzungen im 1,4 ml-Maßstab

Trotz ihrer guten Verteilungskoeffizienten zeigen sämtliche ionische Flüssigkeiten, wie in Abbildung 8.12 dargestellt, nach einer Stunde nur sehr geringe Ausbeuten von maximal 10 %, bei gleichzeitig aber sehr hohen Enantiomerenüberschüssen von über 99,8 %. Die Ursache für dieses zunächst erstaunliche Ergebnis lässt sich auf die niedrige relative Aktivität der LB-ADH gegenüber dem Keton PP-ON zurückführen. Bezogen auf eine biokatalytische Umsetzung von Acetophenon liegt diese nämlich nur bei 17 % (Tabelle 3.5, Kapitel 3.4.1). Erweiterte Untersuchungen haben zeigen können (Ergebnisse nicht dargestellt), dass eine Verlängerung der Reaktionszeit tatsächlich höhere Ausbeuten liefert. Damit konnte bestätigt werden, dass keine Schädigung des Biokatalysators vorliegt.

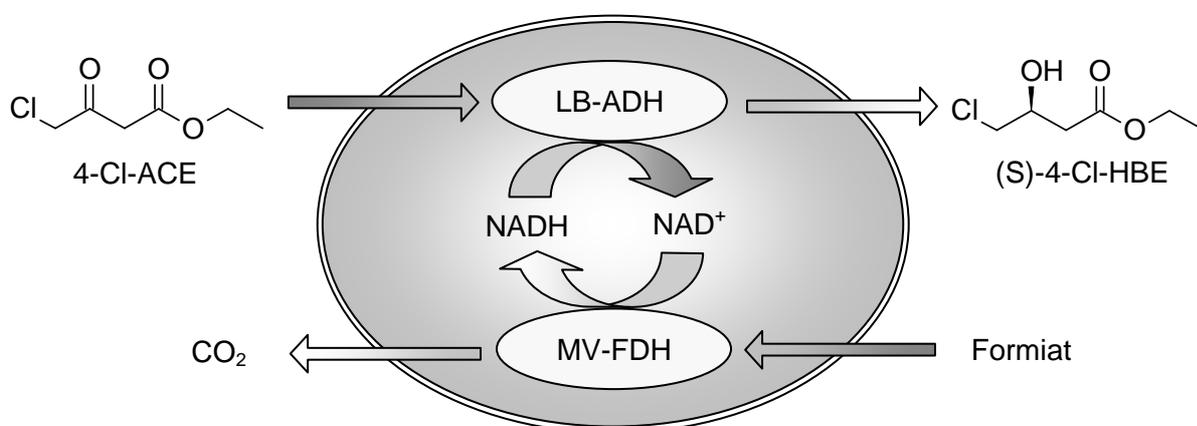


**Abbildung 8.12** Chemische Ausbeute an (R)-PP-OH und Enantiomerenüberschuss nach ein-stündiger Umsetzung von 600 mM PP-ON mit  $50 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  *E.coli* BL21 LB-ADH MV-FDH bei  $30^\circ\text{C}$  und  $350 \text{ min}^{-1}$  mit 20 % v/v IL im Vergleich zum einphasig-wässrigen Ansatz.

Ein Vergleich mit dem rein wässrigen Ansatz verdeutlicht ein weiteres Mal den positiven Einfluss der zweiphasigen Prozessführung mit ionischen Flüssigkeiten. Unter Verwendung von [HMIM][PF6] als zweite Lösungsmittelphase kann die Ausbeute um das 15fache gesteigert werden.

## 8.5 Synthese von (S)-4-Chlor-3-Hydroxybuttersäureethylester

Bei der nachfolgend betrachteten Reaktion handelte es sich um eine asymmetrische Biotransformation von 4-Chlor-Acetessigsäureethylester (4-Cl-ACE) zu (S)-4-Chlor-3-Hydroxybuttersäureethylester (4-Cl-HBE). Bei diesem chiralen Produkt handelt es sich um einen wichtigen Baustein für Statine. Eine schematische Darstellung der Reaktion erfolgt in Abbildung 8.13. *In-vitro*-Untersuchungen der LB-ADH hatten gezeigt, dass sie gegenüber diesem Edukt eine dem Acetophenon vergleichbare Aktivität aufzeigt (Tabelle 3.5, Kapitel 3.4.1). Aus diesem Grund sollten bei den durchgeführten Biotransformationen ähnlich gute Ausbeuten erzielt werden können.



**Abbildung 8.13** Reaktionsschema der asymmetrischen Reduktion von 4-Chlor-Acetessigsäureethylester (4-Cl-ACE) zu (S)-4-Chlor-3-Hydroxybuttersäureethylester ((S)-4-Cl-HBE) mit *E.coli* BL21 LB-ADH MV-FDH.

### 8.5.1 Löslichkeiten von Edukt und Produkt

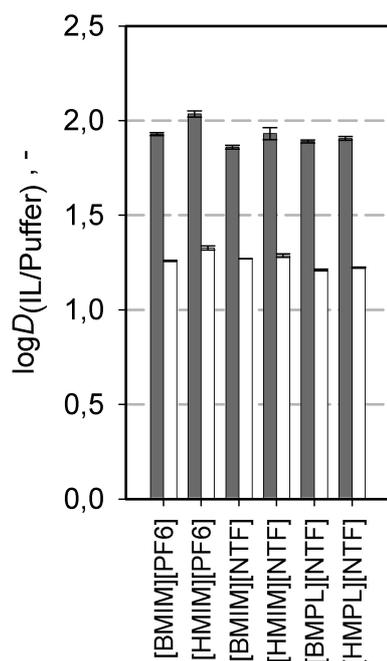
Die Löslichkeitsgrenzen von 4-Cl-ACE und 4-Cl-HBE sind in Tabelle 8.5 dargestellt. Mit Werten von 243 mM bzw. 721 mM besitzen beide Substanzen eine gute Wasserlöslichkeit. In den betrachteten ionischen Flüssigkeiten ließen sie sich bis mindestens 600 mM lösen.

**Tabelle 8.5** Löslichkeit von 4-Cl-ACE und 4-Cl-HBE im Puffer (500 mM KPi, 1000 mM Natriumformiat, pH 6,5).

Löslichkeit im Puffer, mmol L <sup>-1</sup>	
4-Cl-ACE	243
4-Cl-HBE	721

### 8.5.2 Verteilungskoeffizienten von Edukt und Produkt

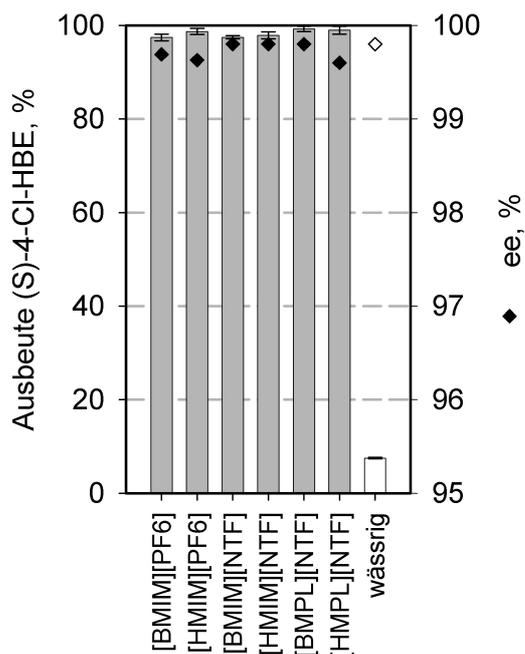
Infolge der guten Wasserlöslichkeit von 4-Cl-ACE und 4-CL-HBE liegen die in Abbildung 8.14 dargestellten Verteilungskoeffizienten deutlich niedriger als bei den anderen Reaktionssystemen. So konnten für das Edukt nur Verteilungskoeffizienten zwischen  $\log D = 1,85$  und  $2,05$  und für das Produkt lediglich  $\log D$  bis maximal  $1,3$  ermittelt werden. Um zu überprüfen, ob diese niedrigen Verteilungskoeffizienten dennoch für eine hinreichende Senkung der wässrigen Konzentrationen von Edukt und Produkt ausreichen, wurden auch für dieses Reaktionssystem exemplarische Biotransformationen durchgeführt.



**Abbildung 8.14** Verteilungskoeffizienten  $\log D$  von 4-Cl-ACE ■ und 4-Cl-HBE □ zwischen ionischen Flüssigkeiten und Natriumformiat-Umsetzungspuffer.

### 8.5.3 Umsetzungen im 1,4 ml-Maßstab

Die im 1,4 mL-Maßstab erzielten Ausbeuten und Enantiomerenüberschüsse der asymmetrischen Reduktion von 4-Cl-ACE sind in Abbildung 8.15 dargestellt. Im Vergleich zu den bei Umsetzungen von Acetophenon erhaltenen Ergebnissen konnte nach einer einstündigen Biotransformation für sämtliche ionische Flüssigkeiten ein fast vollständiger Umsatz erreicht werden. Dies lässt sich vor allem auf die gute Edukt-Verfügbarkeit in der wässrigen Phase und die scheinbar niedrige molekulare Toxizität von Edukt und Produkt zurückführen. Im Vergleich zum rein wässrigen Ansatz konnte die Ausbeute durch den Einsatz von ILs als Eduktreservoir und in situ-Extraktionsmittel um mehr als das 12fache gesteigert werden.

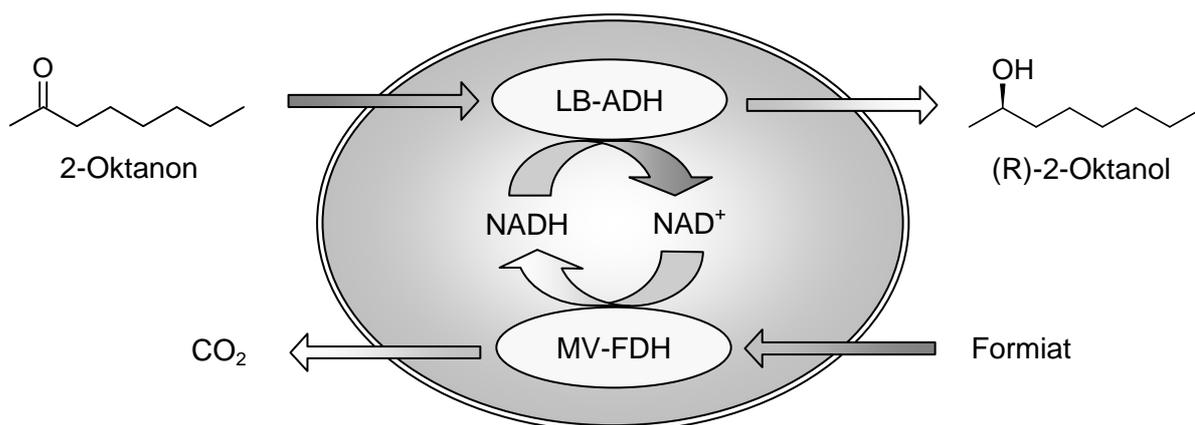


**Abbildung 8.15** Chemische Ausbeute an (S)-4-Cl-HBE und Enantiomerenüberschuss nach ein-stündiger Umsetzung von 600 mM 4-Cl-ACE mit  $50 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  *E.coli* BL21 LB-ADH MV-FDH bei  $30^\circ\text{C}$  und  $350 \text{ min}^{-1}$  mit 20 % v/v IL im Vergleich zum einphasig-wässrigen Ansatz.

Anhand der Enantiomerenüberschüsse zeigt sich allerdings, dass die hohen Konzentrationen an 4-Cl-ACE und 4-Cl-HBE auch einen negativen Effekt haben. So können die Enantiomerenüberschüsse auf 99,6 % absinken. Da diese Ergebnisse aber immer noch den industriellen Anforderungen genügen, bietet sich die zweiphasige Prozessführung mit ionischen Flüssigkeiten auch bei diesem Reaktionssystem als besonders effiziente Methode zur Synthese von (S)-4-Chlor-3-Hydroxybuttersäureethylester an.

## 8.6 Synthese von (R)-2-Oktanol

Bei dem nachfolgend betrachteten Reaktionssystem handelte es sich um eine asymmetrische Reduktion von 2-Oktanon zu (R)-2-Oktanol. Der chirale Alkohol ist ein sehr interessanter Baustein für die Synthese von Flüssigkristallen und besitzt daher ebenfalls eine hohe Wertschöpfung. Eine schematische Darstellung der Ganzzell-Biotransformation mit *E.coli* BL21 LB-ADH MV-FDH erfolgt in Abbildung 8.16.



**Abbildung 8.16** Reaktionsschema der asymmetrischen Reduktion von 2-Oktanon zu (R)-2-Oktanol mit *E.coli* BL21 LB-ADH MV-FDH.

### 8.6.1 Löslichkeiten von Edukt und Produkt

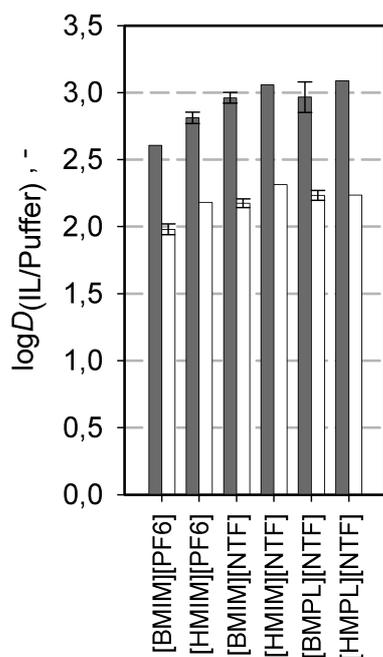
2-Oktanon und 2-Oktanol besaßen im Umsetzungspuffer mit Natriumformiat, wie in Tabelle 8.6 dargestellt, mit Werten von 13,3 mM und 17,8 mM nur eine geringe Löslichkeit. In den nachfolgend verwendeten ionischen Flüssigkeiten ließen sich beide Substanzen bis mindestens 600 mM lösen.

**Tabelle 8.6** Löslichkeit von 2-Oktanon und 2-Oktanol im Puffer (500 mM KPi, 1000 mM Natriumformiat, pH 6,5).

Löslichkeit im Puffer, mmol L <sup>-1</sup>	
2-Oktanon	13,26
2-Oktanol	17,79

### 8.6.2 Verteilungskoeffizienten von Edukt und Produkt

Die Verteilungskoeffizienten für die bei diesem Reaktionssystem untersuchten sechs ionischen Flüssigkeiten sind in Abbildung 8.17 dargestellt. Sämtliche ILs zeigen mit Verteilungskoeffizienten zwischen  $\log D = 2,6$  bis  $3,1$  für 2-Oktanon und  $1,9$  bis  $2,3$  für 2-Oktanol eine gute Eignung für die Ganzzell-Biokatalyse.

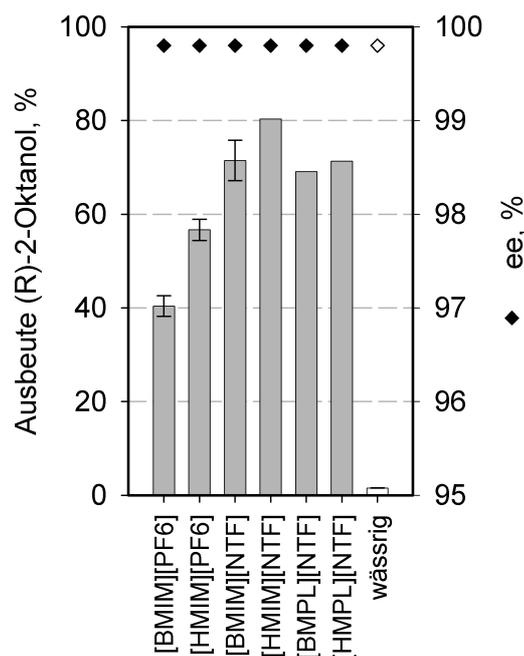


**Abbildung 8.17** Verteilungskoeffizienten  $\log D$  von 2-Oktanon ■ und 2-Oktanol □ zwischen ionischen Flüssigkeiten und Natriumformiat-Umsetzungspuffer.

### 8.6.3 Umsetzungen im 1,4 ml-Maßstab

Trotz ihrer guten Verteilungskoeffizienten können [BMIM]- und [HMIM][PF6], wie in Abbildung 8.18 dargestellt, bei Biotransformationen im 1,4 mL-Maßstab in einer Stunde nur Ausbeuten von 41 % und 57 % erzielen. ILs mit [NTF]-Anion scheinen dagegen deutlich besser geeignet zu sein. Mit Werten von 70 % bis 80 % liefern sie deutlich höhere Ausbeuten an (R)-2-Oktanol. Die beste Eignung für das hier untersuchte Reaktionssystem weist [HMIM][NTF] auf.

Im Vergleich zum rein wässrigen Ansatz konnte mit allen sechs ionischen Flüssigkeiten die Ausbeute um ein Vielfaches gesteigert werden. Die Verwendung von [HMIM][NTF] als zweite Lösungsmittelphase resultierte in einer 50fach höheren Ausbeute. Der Enantiomerenüberschuss lag für alle getesteten Ansätze bei über 99,8 %.



**Abbildung 8.18** Chemische Ausbeute an (R)-2-Oktanol und Enantiomerenüberschuss nach ein-stündiger Umsetzung von 600 mM 2-Oktanon mit 50 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup> *E.coli* BL21 LB-ADH MV-FDH bei 30°C und 350 min<sup>-1</sup> mit 20 % v/v IL im Vergleich zum einphasig-wässrigen Ansatz.

## 8.7 Diskussion

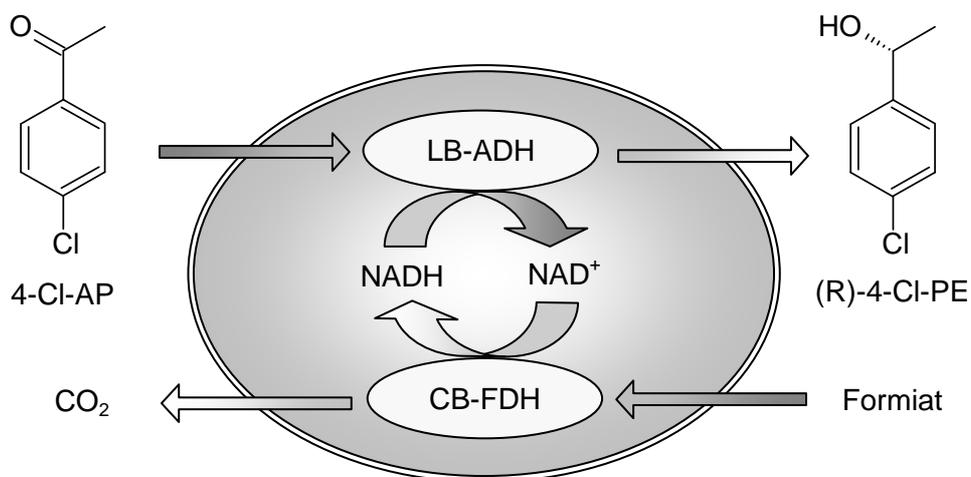
Die Cofaktorregenerierung mit Hilfe einer Formiatdehydrogenase hat sich in einem Ganzzell-Biokatalysator als besonders vorteilhaft erwiesen. Im Vergleich zu den Ganzzell-Biokatalysatoren mit GDH oder G6PDH zur Cofaktorregenerierung konnte trotz der mehr als zehnfach geringeren Enzymaktivitäten von außergewöhnlich hohen Ausbeuten profitiert werden. Anhand der asymmetrischen Reduktion verschiedener prochiraler Ketone ließ sich feststellen, dass die Eignung einer ionischen Flüssigkeit sich nicht allein aus der Höhe der Verteilungskoeffizienten herleiten lässt. Das in dem jeweiligen Fall vorliegende Reaktionssystem besitzt über die Löslichkeit und die molekulare Toxizität von Edukt und Produkt einen wesentlichen Einfluss auf die Effizienz der Biotransformation. Eine allgemeingültige Beurteilung von ionischen Flüssigkeiten kann daher nicht nur auf der Basis von Verteilungskoeffizienten erfolgen. Nur über die Toxizität der IL selber, lässt sich ein Ausschlusskriterium definieren. Bei den hier getesteten ionischen Flüssigkeiten konnte allerdings keine identifiziert werden, die den Biokatalysator so nachhaltig schädigt, dass keine Umsetzung mehr möglich ist. Infolgedessen muss die Auswahl einer oder mehrerer ILs darüber hinaus über reaktions-, verfahrens- und prozesstechnische Kriterien erfolgen.

## 9 Asymmetrische Synthesen mit *E. coli* BL21 LB-ADH CB-FDH

Nachdem sich die Cofaktorregenerierung mit einer *Mycobacterium vaccae* Formiatdehydrogenase in einem Ganzzell-Biokatalysator als besonders vorteilhaft erwiesen hatte, stellte sich die Frage, ob sich dies auf die grundlegenden Vorteile einer FDH zurückführen ließe. Um diese Frage zu beantworten wurde zusätzlich eine Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* zur Cofaktorregenerierung untersucht. Die Untersuchungen erfolgten für zwei verschiedene Reaktionssysteme. Um gleichzeitig auch eine bessere Beurteilung der ionischen Flüssigkeiten zu erlauben, fanden bei den nachfolgenden Biotransformationen im 1,4 mL-Maßstab 20 nicht mit Wasser mischbare ILs Verwendung.

### 9.1 Synthese von (R)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol

Wie in den vorangegangenen Untersuchungen sollte die Leistungsfähigkeit des Biokatalysators zunächst anhand der als Referenzreaktion verwendeten asymmetrischen Reduktion von 4-Cl-AP zu (R)-4-Cl-PE überprüft werden (Abbildung 9.1).



**Abbildung 9.1** Reaktionsschema der asymmetrischen Reduktion von 4-Chlor-Acetophenon (4-Cl-AP) zu (R)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol ((R)-4-Cl-PE) mit *E.coli* BL21 LB-ADH CB-FDH.

### 9.1.1 Löslichkeiten von Edukt und Produkt

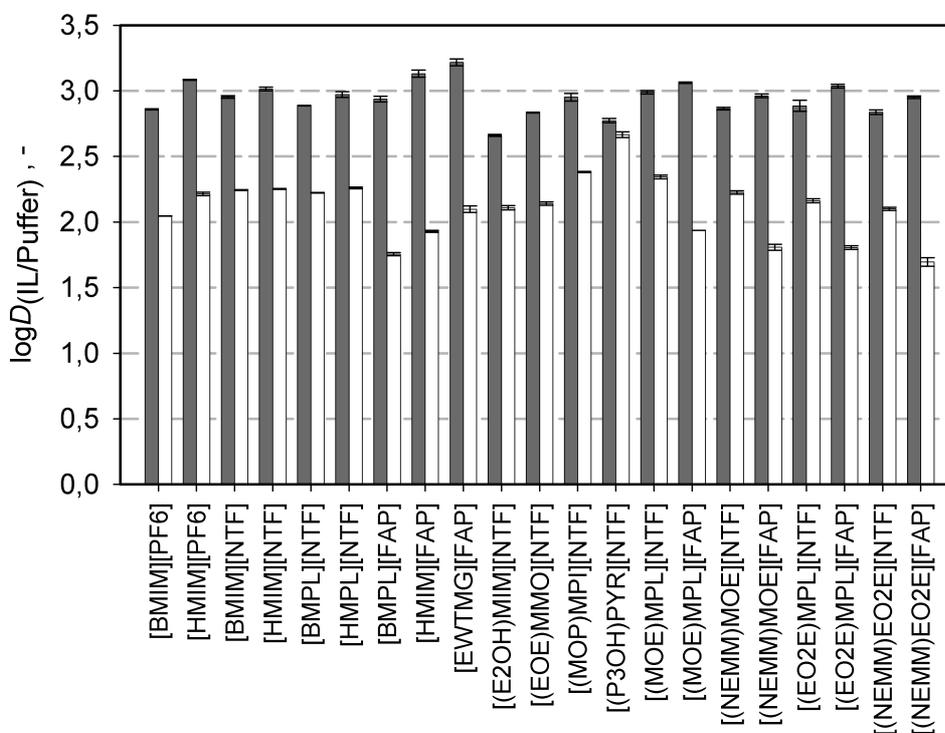
Da bei den hier durchgeführten Untersuchungen derselbe Umsetzungspuffer wie beim *E.coli* BL21 LB-ADH MV-FDH verwendet wurde, unterscheiden sich die in Tabelle 9.1 nochmals aufgelisteten Löslichkeiten nicht von den in Kapitel 8.1.1 präsentierten. In den ionischen Flüssigkeiten waren die beiden Substanzen bis mindestens 600 mM löslich.

**Tabelle 9.1** Löslichkeit von 4-Cl-AP und 4-Cl-PE im Puffer (500 mM KPi, 1000 mM Natriumformiat, pH 6,5).

Löslichkeit im Puffer, mmol L <sup>-1</sup>	
4-Cl-AP	3,12
4-Cl-PE	9,43

### Verteilungskoeffizienten von Edukt und Produkt

Die in Abbildung 9.2 dargestellten Verteilungskoeffizienten von 4-Cl-AP fallen für sämtliche ionische Flüssigkeiten zufriedenstellend aus. Größere Unterschiede sind vor allem bei den

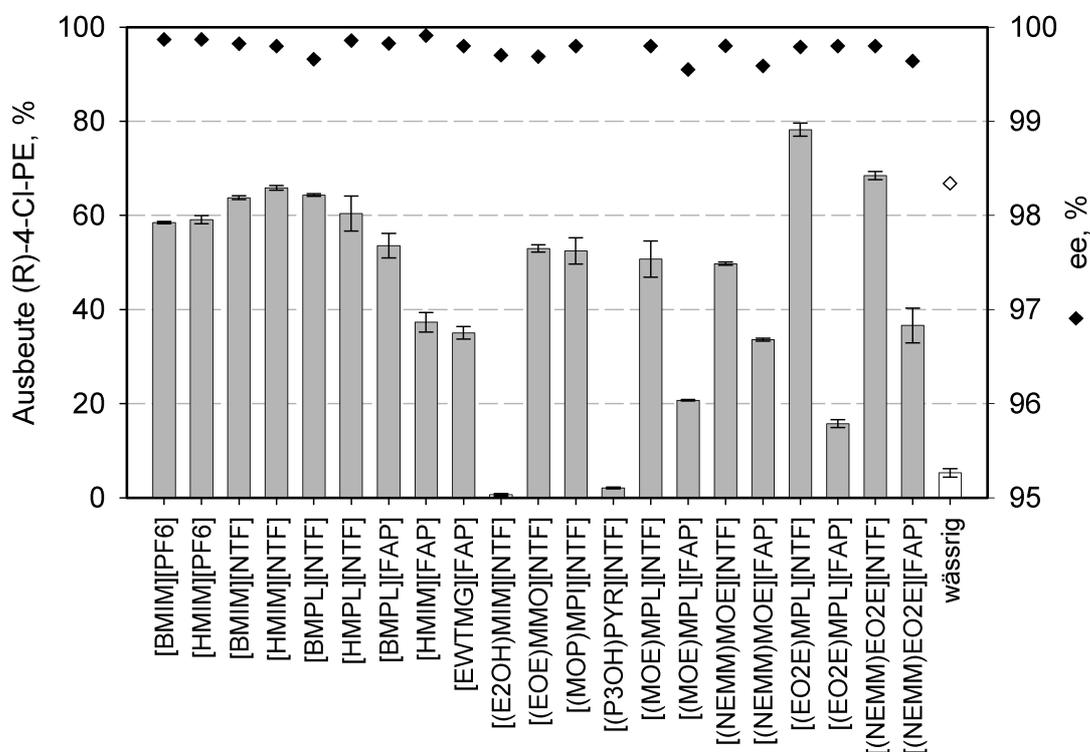


**Abbildung 9.2** Verteilungskoeffizienten  $\log D$  von 4-Cl-AP ■ und 4-Cl-PE □ zwischen ionischen Flüssigkeiten und Natriumformiat-Umsetzungspuffer.

Produkt bezogenen Verteilungskoeffizienten festzustellen. Mit Ausnahme von [EWTMG] [FAP] scheinen alle übrigen ILs mit [FAP]-Anion – aufgrund ihres geringeren Potentials, die Konzentration an 4-Cl-PE in der wässrigen Phase senken zu können – für Biotransformationen weniger gut geeignet zu sein als die mit [PF6]- oder [NTF]-Anion. [(P3OH)PYR]- und [(MOE)MPL][NTF] weisen dagegen besonders gute Verteilungskoeffizienten für 4-Cl-PE auf. Wie aber bereits in den vorangegangenen Untersuchungen festgestellt worden war, liefert der Verteilungskoeffizient nur eine eingeschränkte Aussagekraft. Eine Beurteilung der tatsächlichen Eignung von einzelnen ionischen Flüssigkeiten kann immer nur über exemplarische Biotransformationen erfolgen.

### Umsetzungen im 1,4 ml-Maßstab

Die im 1,4 mL-Maßstab erzielten Ausbeuten und Enantiomerenüberschüsse der asymmetrischen Reduktion von 4-Cl-AP sind in Abbildung 9.3 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass auch eine Cofaktorregenerierung mit einer *Candida boidinii* Formiatdehydrogenase vergleichbare Ergebnisse wie mit einer MV-FDH liefert. Für die ersten sechs ionischen Flüssigkeiten werden nach einer Stunde abermals Ausbeuten von ca. 60 % erzielt. Eine noch

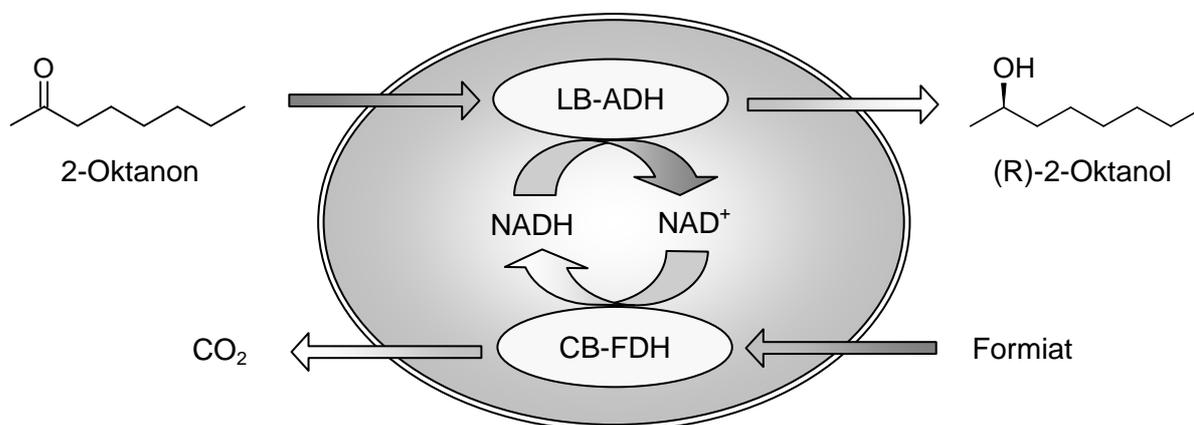


**Abbildung 9.3** Chemische Ausbeute an (R)-4-Cl-PE und Enantiomerenüberschuss nach ein-stündiger Umsetzung von 600 mM 4-Cl-AP mit  $50 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  *E.coli* BL21 LB-ADH CB-FDH bei  $30^\circ\text{C}$  und  $350 \text{ min}^{-1}$  mit 20 % v/v IL im Vergleich zum einphasig-wässrigen Ansatz.

bessere Eignung weisen nur [(EO2E)MPL]- und [(NEMM)EO2E][NTF] mit einer Ausbeute von knapp 80 % und 70 % auf. Gegenüber dem wässrigen Ansatz können die Ausbeuten somit um das 12fache gesteigert werden. Ansätze mit [FAP]-ILs generieren deutlich weniger (R)-4-Cl-PE. [(P3OH)PYR]- und [(E2OH)MIM][NTF] dürften dagegen für eine Ganzzell-Biotransformation völlig ungeeignet sein. Die Enantiomerenüberschüsse liegen für alle ILs bei über 99,5 %.

## 9.2 Synthese von (R)-2-Oktanol

Die asymmetrische Reduktion von 2-Oktanon zu 2-Oktanol diene als zweites Reaktionssystem zur Beurteilung der Eignung ionischer Flüssigkeiten. Eine schematische Darstellung der Reaktion erfolgt in Abbildung 9.4.



**Abbildung 9.4** Reaktionsschema der asymmetrischen Reduktion von 2-Oktanon zu (R)-2-Oktanol mit *E.coli* BL21 LB-ADH CB-FDH.

### 9.2.1 Löslichkeiten von Edukt und Produkt

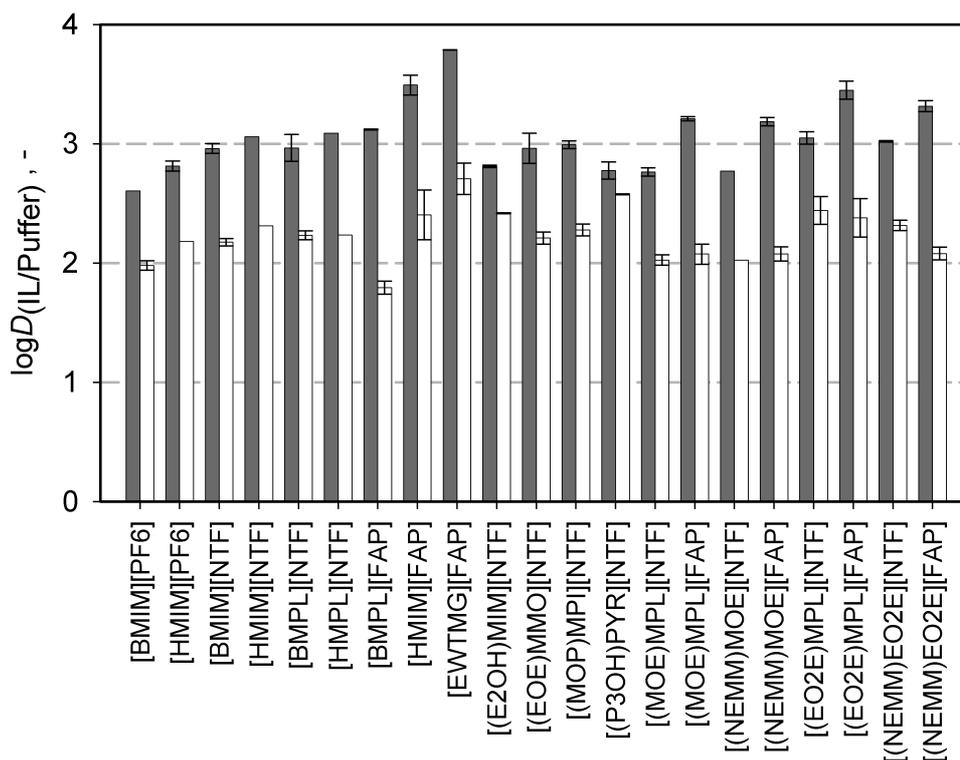
Die in Tabelle 9.2 nochmals aufgelisteten Löslichkeiten sind identisch mit den in Kapitel 8.6.1 präsentierten. In den ILs waren beide Substanzen bis mindestens 600 mM löslich.

**Tabelle 9.2** Löslichkeit von 2-Oktanon und 2-Oktanol im Puffer (500 mM KPi, 1000 mM Natriumformiat, pH 6,5).

Löslichkeit im Puffer, mmol L <sup>-1</sup>	
2-Oktanon	13,26
2-Oktanol	17,79

## 9.2.2 Verteilungskoeffizienten von Edukt und Produkt

In Abbildung 9.5 kann gezeigt werden, dass sämtliche ionische Flüssigkeiten sowohl für 2-Oktanon als auch 2-Oktanol zufriedenstellende Verteilungskoeffizienten besitzen. Die Verteilungskoeffizienten unterscheiden sich zwar in ihrer Höhe, liegen aber alle über einem  $\log D$  von 2. Die einzige Ausnahme bildet [BMPL][FAP].

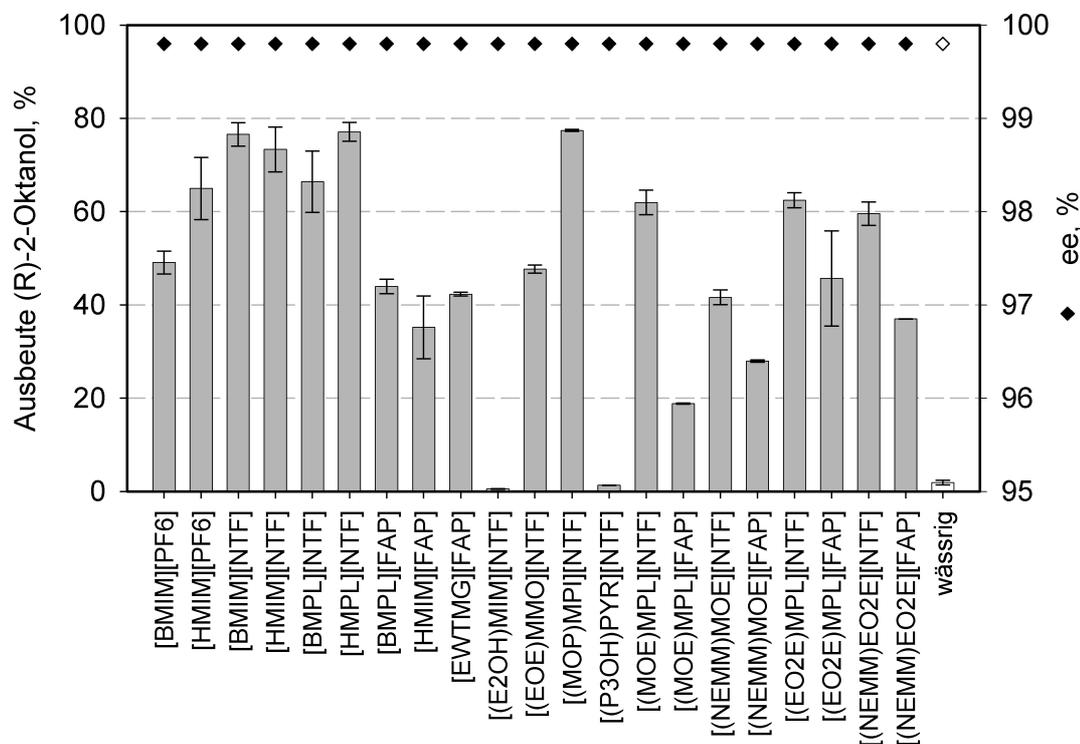


**Abbildung 9.5** Verteilungskoeffizienten  $\log D$  von 2-Oktanon ■ und 2-Oktanol □ zwischen ionischen Flüssigkeiten und Natriumformiat-Umsetzungspuffer.

## 8.2.3 Umsetzungen im 1,4 ml-Maßstab

Die im 1,4 mL-Maßstab erzielten Ausbeuten und Enantiomerenüberschüsse der asymmetrischen Reduktion von 2-Oktanon zu (R)-2-Oktanol zeigen, wie in Abbildung 9.6 dargestellt, im Vergleich zu den Ergebnissen mit dem MV-FDH-*E.coli* eine erstaunlich gute Übereinstimmung. [BMIM]-, [HMIM]-, [HMPL]- und [(MOP)MPI][NTF] generieren nach einer Stunde mit über 70 % die höchsten Ausbeuten an (R)-2-Oktanol. Gegenüber dem einphasig wässrigen Ansatz kann die Ausbeute somit um das 30fache gesteigert werden. Neben diesen ILs weisen nur [HMIM][PF6], [HMPL]-, [(MOE)MPL]-, [(EO2E)MPL]- und [(NEMM)EO2E][NTF] eine ähnlich gute Eignung für die Ganzzell-Biotransformation auf. [(E2OH)-

MIM]- und [(P3OH)PYR] [NTF] zeigen wie im 4-Cl-AP-Reaktionssystem als einzige ILs kaum einen Umsatz und sind daher tatsächlich für einen Einsatz als zweite Lösungsmittelphase nicht geeignet. Die Enantiomerenreinheiten des synthetisierten Produkts (R)-2-Oktanol liegen in sämtlichen Ansätzen bei über 99,8 %.



**Abbildung 9.6** Chemische Ausbeute an (R)-2-Oktanol und Enantiomerenüberschuss nach ein-stündiger Umsetzung von 600 mM 2-Oktanon mit 50 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup> *E.coli* BL21 LB-ADH CB-FDH bei 30°C und 350 min<sup>-1</sup> mit 20 % v/v IL im Vergleich zum einphasig-wässrigen Ansatz.

### 9.3 Diskussion

Für zwei verschiedene Reaktionssysteme konnte gezeigt werden, dass die Cofaktoregenerierung in einem Ganzzell-Biokatalysator mit einer *Candida boidinii* Formiatdehydrogenase vergleichbare Ergebnisse wie mit einer *Mycobacterium vaccae* FDH liefert. Beide FDHs profitieren daher von den gleichen Vorteilen, wie zum Beispiel von der guten intrazellulären Verfügbarkeit des Cosubstrats Formiat und der Umsetzung von Formiat zu einem gasförmigen Nebenprodukt. Cofaktoregenerierungen mit Formiatdehydrogenasen sind daher in einem Ganzzell-Biokatalysator Glukosedehydrogenasen und Glukose-6-Phosphatdehydrogenasen vorzuziehen.

Hinsichtlich der Eignung von ionischen Flüssigkeiten lässt sich festhalten, dass [(E2OH)-MIM]- und [(P3OH)PYR] [NTF] für einen Einsatz bei Biotransformationen nicht in Frage kommen, da sie den Biokatalysator nachhaltig zu schädigen scheinen. Ionische Flüssigkeiten mit [FAP]-Anion liefern im Allgemeinen deutlich niedrigere Ausbeuten, als die korrespondierenden ILs mit [PF6]- und [NTF]-Anion. In erweiterten Untersuchungen konnte gezeigt werden (Ergebnisse nicht dargestellt), dass sich dies auch nicht auf die höheren Edukt-bezogenen Verteilungskoeffizienten zurückführen lässt, da eine Erhöhung der Edukt-Konzentration in keiner verbesserten Ausbeute resultierte. Infolgedessen kann auch für [FAP]-ILs eine Schädigung des Biokatalysators vermutet werden.

Welche der übrigen ILs sich allerdings am besten für die Ganzzell-Biotransformationen eignen, muss anhand exemplarischer Umsetzungen ermittelt werden. So gewährleistet zum Beispiel ein hoher Verteilungskoeffizient zwar eine Minimierung der Edukt-/Produkt-Konzentration in der wässrigen Phase, und somit auch der molekularen Toxizität dieser Substanzen auf den Biokatalysator, gleichzeitig erhöht sich dadurch an der Zellmembran aber auch die Stofftransportlimitierung des Edukts. Das Ziel muss daher sein, für ein gegebenes Reaktionssystem die ionischen Flüssigkeiten zu identifizieren, denen es aufgrund ihres spezifischen Verteilungskoeffizienten gelingt, bei maximaler Edukt-Konzentration in der wässrigen Phase so eben die jeweilige toxische Grenzkonzentration zu unterschreiten. Auf diese Weise kann dann von maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten profitiert werden. Zwar lässt sich durch Vorlage von höheren Edukt-Konzentrationen in der IL ein zu hoher Verteilungskoeffizient im Hinblick auf die wässrige Konzentration „korrigieren“, bei geringer werdenden Konzentrationen müsste dann jedoch mit deutlich verlangsamten Reaktionsgeschwindigkeiten gerechnet werden. Dieser Umstand erklärt auch, warum die Eignung der ionischen Flüssigkeiten mit der Wahl des Reaktionssystems variiert.

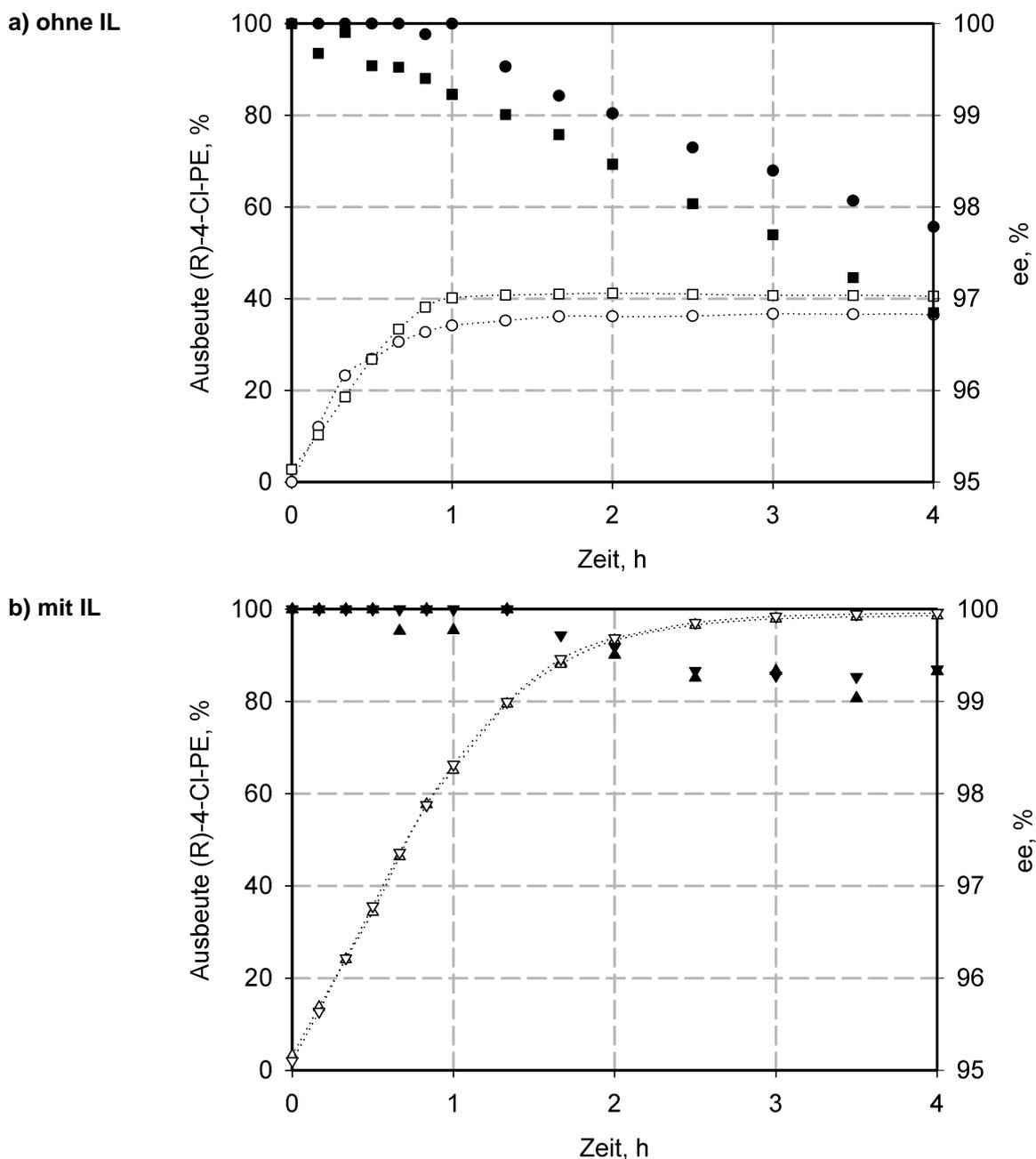
## 10 Asymmetrische Synthesen im 200 ml-Maßstab

Die im 1,4 mL-Maßstab durchgeführten Umsetzungen verschiedener prochiraler Ketone haben zeigen können, dass eine zweiphasige Prozessführung mit ionischen Flüssigkeiten als Eduktreservoir und *in situ*-Extraktionsmittel die Effizienz einer Ganzzell-Biotransformation signifikant verbessern kann. Für die Cofaktorregenerierung im Ganzzell-Biokatalysator haben sich hierbei die Formiatdehydrogenasen aus *Mycobacterium vaccae* und *Candida boidinii* als besonders vorteilhaft erwiesen. Ob sich von den vielversprechenden Ergebnissen der exemplarisch durchgeführten 1,4 mL-Biotransformationen aber auch in einem größeren Maßstab profitieren lässt, sollten nachfolgende Untersuchungen zeigen. Zu diesem Zweck wurde die asymmetrische Reduktion im Satzverfahren von 4-Cl-AP und 2-Oktanon zu den entsprechenden chiralen Alkoholen für verschiedene ionische Flüssigkeiten in den 200 mL-Maßstab übertragen. Als Ganzzell-Biokatalysator fand sowohl *E.coli* BL21 LB-ADH MV-FDH als auch *E.coli* BL21 LB-ADH CB-FDH Verwendung. Die Maßstabsvergrößerung erlaubte zudem eine reaktionskinetische Betrachtung der Ganzzell-Biotransformation, da aufgrund des größeren Reaktionsvolumens eine mehrfache Probenahme und somit auch die Aufnahme des Reaktionsverlaufs möglich war.

### 10.1 Synthese von (R)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol mit *E. coli* BL21 LB-ADH MV-FDH

Die asymmetrische Reduktion von 4-Chlor-Acetophenon zu (R)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol mit *E.coli* BL21 LB-ADH MV-FDH wurde im 200 mL-Maßstab im einphasig-wässrigen System ohne IL und in zweiphasigen Ansätzen mit n-Dekan und [BMIM][NTF] durchgeführt. n-Dekan wurde als repräsentatives organisches Lösungsmittel gewählt, da diese Lösungsmittel gegenüber *E.coli* eine im Vergleich zu [BMIM][NTF] ähnliche Toxizität aufweist (Pfründer 2005). Die Reaktionsbedingungen im 200 mL-Maßstab waren identisch zu den früheren Versuchen. Der eingesetzte Biokatalysator wies für LB-ADH eine spezifische

Aktivität von  $1050 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$  auf und für MV-FDH eine spezifische Aktivität von  $140 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$ . Die Verläufe der Ausbeute an (R)-4-Cl-PE und die zugehörigen Enantiomerenüberschüsse sind in Abbildung 10.1 a und b dargestellt.



**Abbildung 10.1** (R)-4-Cl-PE-Ausbeute  $\circ \square \triangle$  und Enantiomerenüberschuss  $\bullet \blacksquare \blacktriangle$  bei Umsetzung von 600 mM 4-Cl-AP im 200 mL-Satzverfahren mit  $50 \text{ g L}^{-1}$  *E.coli* BL21 LB-ADH MV-FDH bei  $30^\circ\text{C}$  a) im einphasig wässrigen Ansatz ( $600 \text{ min}^{-1}$ )  $\circ \bullet$ , mit 20 % v/v n-Dekan ( $600 \text{ min}^{-1}$ )  $\square \blacksquare$ , b) mit 20 % v/v [BMIM][NTF] ( $600 \text{ min}^{-1}$ )  $\triangle \blacktriangle$  und 20 % v/v [BMIM][NTF] ( $900 \text{ min}^{-1}$ )  $\nabla \blacktriangledown$ . (4-Cl-AP-Konzentration wird auf das Volumen der zweiten Lösungsmittelphase bezogen, im einphasig wässrigen Ansatz auf den fünften Teil des Gesamtvolumens. Linien dienen nur als visuelle Hilfe.)

Anhand der graphischen Darstellung wird deutlich, dass im einphasig-wässrigen Ansatz bereits nach einer Stunde Reaktionsdauer die Biokatalyse beendet ist. Da in diesem System kein Lösungsmittel vorhanden ist, welches die Konzentration an Edukt/Produkt in der wässrigen Phase senken könnte, liegen diese Substanzen in ihrer Sättigungskonzentration vor und können daher ihre Toxizität auf den Biokatalysator entfalten. Aufgrund der nachhaltigen Schädigung der Zellen kann daher nur eine maximale Ausbeute von 38% erzielt werden. Im Vergleich zu den 1,4 mL-Umsetzungen liegt dieses Ergebnis allerdings um ein Vielfaches höher. Dies lässt sich wahrscheinlich auf eine nicht ausreichende Dispergierung in den mL-Reaktorsystemen zurückführen. Das hier dargestellte Ergebnis im rein wässrigen System dürfte daher repräsentativ sein. Auffallend ist auch, dass der Enantiomerenüberschuss im Laufe der Reaktion kontinuierlich bis unter 98 % sinkt.

Trotz vergleichbarer Biokompatibilität zu [BMIM][NTF] kann der Einsatz von n-Dekan als zweite Lösungsmittelphase die Biotransformation nur unwesentlich verbessern. Ähnlich wie im einphasig-wässrigen Ansatz bricht die Reaktion, wahrscheinlich infolge einer Inaktivierung der intrazellulären Enzyme, bereits nach einer Stunde bei etwa 40 % ab. Die Enantiomerenreinheit sinkt ebenfalls mit fortschreitender Reaktionsdauer und erreicht nach vier Stunden schließlich einen Wert von unter 97 %.

Mit der Verwendung von 20 % v/v [BMIM][NTF] zeigt sich dagegen wie im 1,4 mL-Maßstab eine signifikante Verbesserung der Ganzzell-Biotransformation. Bereits nach drei Stunden wird ein vollständiger Umsatz erreicht, bei einem gleichzeitig hohen Enantiomerenüberschuss von 99,3 %. Die Übertragbarkeit des Prozesses in den 200 mL-Maßstab ist somit gelungen. Bei einem Vergleich der Resultate mit den von Pfründer (2005) im identischen Reaktionssystem mit *Lactobacillus kefir* generierten Ergebnissen kann zudem festgestellt werden, dass sich durch die Verwendung des rekombinanten *E.coli* BL21 LB-ADH MV-FDH die maximale Reaktionsgeschwindigkeit um über 50 % steigern lässt. Die Kombination von neuartigen Lösungsmitteln mit neuartigen Biokatalysatoren zeigt somit auf eindrucksvolle Weise seine Überlegenheit gegenüber klassischen biokatalytischen Methoden.

Da von Pfründer (2005) vermutet worden war, dass der Stofftransport von Edukt aus der ionischen Flüssigkeit in die wässrige Phase limitierend auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Ganzzell-Biotransformation wirkt, wurde in einem weiteren Ansatz überprüft, inwieweit sich eine Erhöhung der Rührerdrehzahl auf den Verlauf der Ausbeute auswirkt. Durch den höheren Energieeintrag und die dadurch bewirkte verbesserte Dispergierung sollte sich von einer deutlich gesteigerten Edukttransferrate profitieren lassen. Das in Abbildung 10.1 für

eine erhöhte Rührerdrehzahl von  $900 \text{ min}^{-1}$  dargestellte Ergebnis verdeutlicht allerdings durch den nahezu identischen Verlauf der Ausbeute, dass die Ursache der limitierten Reaktionsgeschwindigkeit hier nicht auf den Edukttransfer in die wässrige Phase zurückzuführen ist. Diese Erkenntnis lässt somit auch die Schlussfolgerung zu, dass die Ganzzell-Biotransformation in dem vorliegenden Fall höchst wahrscheinlich durch den Stofftransport über die Zellmembran dominiert wird.

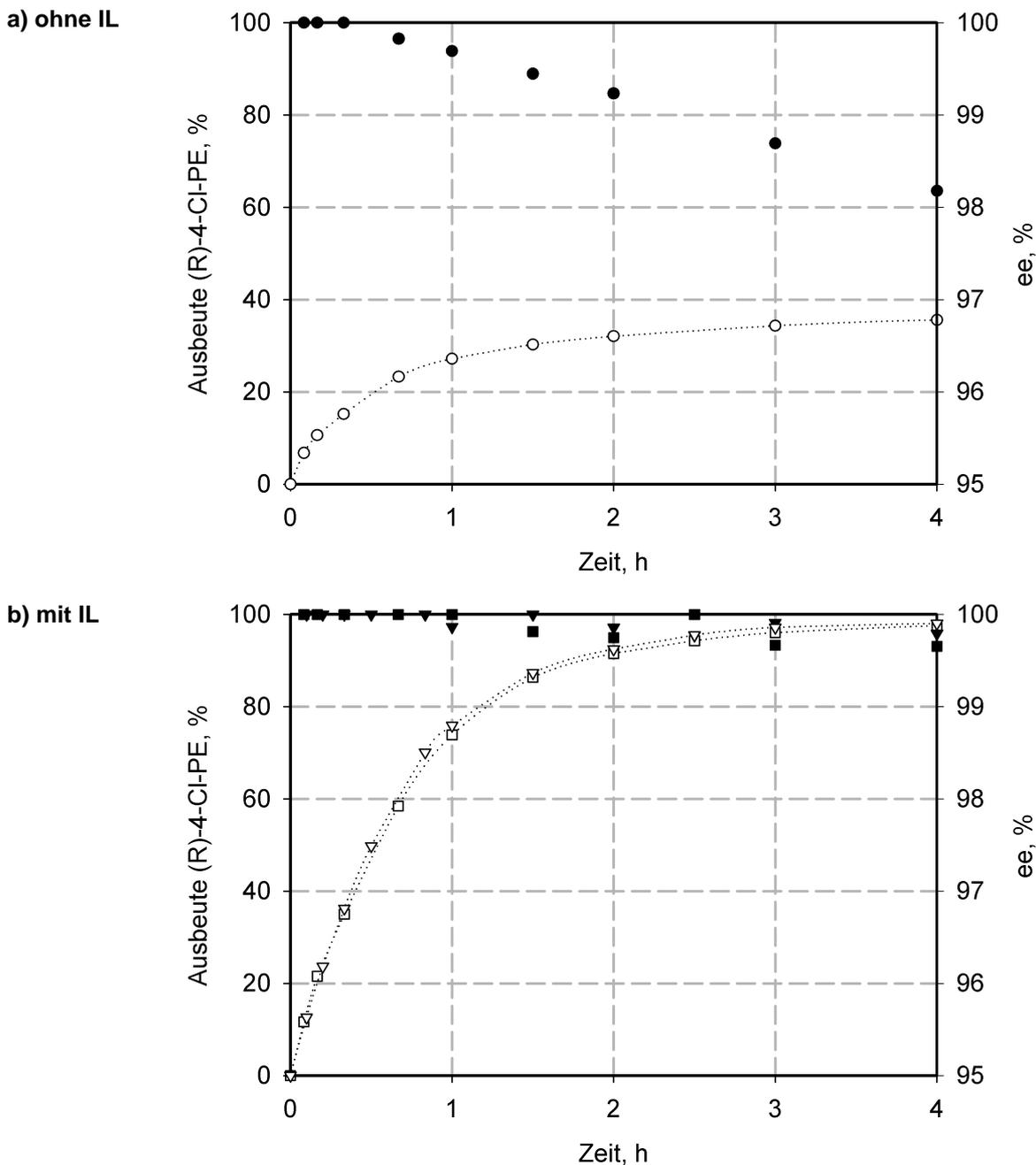
## 10.2 Synthese von (R)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol mit *E. coli* BL21 LB-ADH CB-FDH

Zusätzliche Biotransformationen im 200 mL-Maßstab mit *E. coli* BL21 LB-ADH CB-FDH sollten dazu dienen, die Leistungsfähigkeit gegenüber dem MV-FDH-*E. coli* abzuschätzen. Die Reaktionsbedingungen waren hierbei identisch zu den früheren Versuchen. Der eingesetzte Biokatalysator wies für LB-ADH eine spezifische Aktivität von  $135 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$  auf, für CB-FDH eine Aktivität von  $185 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$ . Die Verläufe der (R)-4-Cl-PE- Ausbeute und die zugehörigen Enantiomerenüberschüsse sind in Abbildung 10.2 dargestellt.

*E. coli* BL21 LB-ADH CB-FDH zeigt in der Biotransformation mit 20 % v/v n-Dekan eine etwas höhere Stabilität, was dadurch deutlich wird, dass die Reaktion nicht bereits nach einer Stunde abbricht, sondern kontinuierlich, wenn auch langsam, weiter fortschreitet (Abbildung 10.2a). Mit einer Ausbeute von knapp 37 % bleibt die Umsetzung nur leicht hinter *E. coli* BL21 LB-ADH MV-FDH zurück. Der Enantiomerenüberschuss sinkt wieder mit fortschreitender Reaktionsdauer, bleibt aber über 98 %. Somit scheint der CB-FDH-*E. coli* eine etwas bessere Eignung aufzuweisen.

Im zweiphasigen Ansatz mit [BMIM][NTF] kann *E. coli* BL21 LB-ADH CB-FDH im Vergleich zu *E. coli* BL21 LB-ADH MV-FDH (Kapitel 10.1) trotz der deutlich geringeren ADH-Aktivität von einer etwas höheren Reaktionsgeschwindigkeit profitieren (Abbildung 10.2b). Im Allgemeinen zeigen aber beide rekombinanten *E. coli*-Stämme einen ähnlichen Verlauf für die Ausbeute.

Zusätzlich zu der Umsetzung mit [BMIM][NTF] wurde unter identischen Reaktionsbedingungen eine exemplarische Biotransformation mit 20 % v/v [HMPL][NTF] durchgeführt. Der Verlauf der Ausbeute an (R)-4-Cl-PE verdeutlicht, dass hinsichtlich der Reaktionskinetik kaum ein Unterschied zwischen den beiden ionischen Flüssigkeiten besteht.



**Abbildung 10.2** (R)-4-Cl-PE-Ausbeute  $\circ \square \nabla$  und Enantiomerenüberschuss  $\bullet \blacksquare \blacktriangledown$  bei Umsetzung von 600 mM 4-Cl-AP im 200 mL-Satzverfahren mit  $50 \text{ g L}^{-1}$  *E.coli* BL21 LB-ADH CB-FDH bei  $30^\circ\text{C}$  a) mit 20 % v/v n-Dekan ( $600 \text{ min}^{-1}$ )  $\circ \bullet$ , b) mit 20 % v/v [BMIM][NTF] ( $600 \text{ min}^{-1}$ )  $\square \blacksquare$  und 20 % v/v [HMPL][NTF] ( $600 \text{ min}^{-1}$ )  $\nabla \blacktriangledown$ . (4-Cl-AP-Konzentration wird auf das Volumen der zweiten Lösungsmittelphase bezogen. Linien dienen nur als visuelle Hilfe.)

Unter genauerer Betrachtung aller Enantiomerenüberschüsse, lässt sich feststellen, dass in den Ansätzen mit ionischen Flüssigkeiten *E.coli* BL21 LB-ADH CB-FDH stets Produktreinheiten von über 99,5 % gewährleistet. Somit bietet sich auch dieser rekombinante *E.coli*-Stamm als Ganzzell-Biotransformationskatalysator in zweiphasig geführten Biotransformationen an.

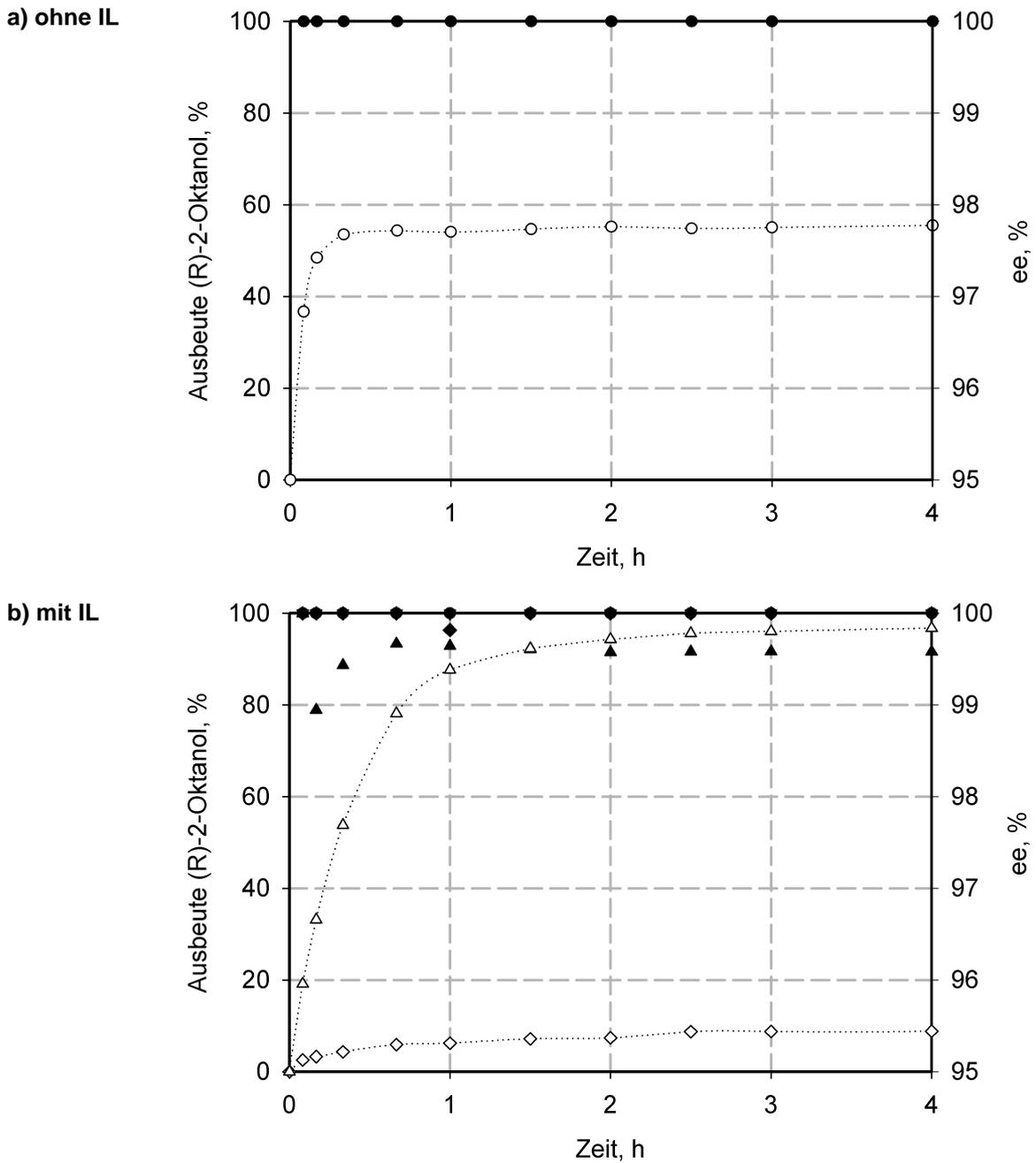
### 10.3 Synthese von (R)-2-Oktanol mit *E. coli* BL21 LB-ADH CB-FDH

Die asymmetrische Reduktion von 2-Oktanon zu (R)-2-Oktanol sollte als zweites Reaktionssystem die Übertragbarkeit der Erkenntnisse aus den 1,4 mL- in den 200 mL-Maßstab belegen. Als Ganzzell-Biokatalysator wurde *E. coli* BL21 LB-ADH CB-FDH eingesetzt. Da dieser derselben Zellcharge entstammte, wie bei den oben aufgeführten Untersuchungen, kann von einer identischen Qualität ausgegangen werden. Die Umsetzungen wurden im einphasig-wässrigen System, mit [HMPL][NTF] und mit [(NEMM)MOE][FAP] durchgeführt. Die Verläufe der Ausbeute an (R)-2-Oktanol und die zugehörigen Enantiomerenüberschüsse sind in Abbildung 10.3 dargestellt.

Im einphasig-wässrigen Ansatz (Abbildung 10.3a) steigt die Ausbeute innerhalb von 20 min zunächst sprunghaft auf ca. 55 % an, um dann allerdings, wie im 4-Cl-AP-Reaktionssystem, auf diesem Niveau zu verharren. 2-Oktanon scheint daher ebenfalls einen stark permeabilisierenden Einfluss auf den Ganzzell-Biokatalysator zu haben. Der Enantiomerenüberschuss verbleibt erstaunlicher Weise aber während der gesamten Reaktionsdauer bei über 99,8 % (Genauigkeit der Analytik mitberücksichtigt).

Mit der Verwendung von 20 % v/v [HMPL][NTF] (Abbildung 10.3b) ließ sich die Ganzzell-Biotransformation wie erwartet deutlich verbessern. Bereits nach einer Stunde konnte eine Ausbeute von knapp 90 % generiert werden. Die im Vergleich zu 4-Cl-AP höhere relative Aktivität von LB-ADH konnte daher auch im 200 mL-Maßstab bestätigt werden. Hinsichtlich der Enantiomerenüberschüsse zeigte sich, dass die Gesamtmenge an unerwünschtem Enantiomer innerhalb der ersten 10 min gebildet wurde und dann auf einem konstanten Niveau blieb. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass die intrazelluläre Produkt-Konzentration aufgrund der anfangs maximalen Reaktionsgeschwindigkeit zu Beginn der Biotransformation ebenfalls kurzzeitig ein Maximum erreicht.

Anhand der Ergebnisse für die Biotransformation mit 20 % v/v [(NEMM)MOE][FAP] kann auch im 200 mL-Maßstab die Annahme bestätigt werden, dass ILs mit [FAP]-Anion den *E. coli*-Biokatalysator nachhaltig schädigen.



**Abbildung 10.3** (R)-Oktanol-Ausbeute  $\circ\triangle\diamond$  und Enantiomerenüberschuss  $\bullet\blacktriangle\blacklozenge$  bei Umsetzung von 600 mM 2-Oktanone im 200 mL-Satzverfahren mit  $50 \text{ g L}^{-1}$  *E.coli* BL21 LB-ADH CB-FDH bei  $30^\circ\text{C}$  und  $600 \text{ min}^{-1}$  a) im einphasig-wässrigen Ansatz  $\circ\bullet$ , b) mit 20 % v/v [HMPL][NTF]  $\triangle\blacktriangle$  und 20 % v/v [(NEMM)MOE][FAP]  $\diamond\blacklozenge$ . (2-Oktanone-Konzentration wird auf das Volumen der zweiten Lösungsmittelphase bezogen, im einphasig-wässrigen Ansatz auf den fünften Teil des Gesamtvolumens. Linien dienen nur als visuelle Hilfe.)

## 10.4 Diskussion

Mit der Übertragung der zweiphasig geführten Ganzzell-Biotransformation in den 200 mL-Maßstab ließ sich der Nachweis erbringen, dass sich die Ergebnisse der 1,4 mL-Biotransformationen auch in einem größeren Maßstab reproduzieren lassen. In einer nicht optimierten asymmetrischen Reduktion von 4-Cl-AP, unter Verwendung von 20 % v/v [BMIM] [NTF] konnte der chirale Alkohol (R)-4-Cl-PE mit einer Ausbeute von 99 %, einem Enantiomerenüberschuss von 99,4 % und einer Raum-Zeit-Ausbeute von  $150 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  hergestellt werden. Im Vergleich zu den in Tabelle 3.3, Kapitel 3.2.4 aufgeführten Ergebnissen asymmetrischer Ketonreduktionen mit rekombinanten *E.colis*, gelingt es nur Gröger *et al.* (2006) mit einer RZA von  $200 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  dieses Resultat zu übertreffen. Dies beweist auf eindrucksvolle Weise das große Potential einer zweiphasigen Prozessführung mit ionischen Flüssigkeiten als Eduktreservoir und *in situ*-Extraktionsmittel.

Bei den durchgeführten Biotransformationen haben sowohl *E.coli* BL21 LB-ADH MV-FDH als auch *E.coli* LB-ADH CB-FDH ihre hervorragende Eignung als Ganzzell-Biokatalysator bestätigen können. Die intrazelluläre Cofaktorregenerierung mit Formiatdehydrogenasen ist demnach Glukosedehydrogenasen und Glukose-6-Phosphatdehydrogenasen vorzuziehen.

## 11 Ansätze zur Optimierung der zweiphasig geführten Ganzzell-Biotransformation

Die Identifikation von Optimierungspotentialen hinsichtlich einer verfahrenstechnischen Problemstellung erfordert üblicher Weise eine Vielzahl von Experimenten, die mit einem erheblichen Zeit-, Personal- und Kostenaufwand verbunden sind. Durch eine theoretische Simulation unterschiedlicher Reaktionsbedingungen und Prozesszustände kann dieser Aufwand deutlich minimiert werden.

Als Optimierungsparameter bieten sich bei der zweiphasig geführten Ganzzell-Biotransformation die über die IL-Auswahl einstellbare Verteilungskoeffizient, die Eduktstartkonzentration, das IL-Phasenverhältnis und die Biokatalysator-Konzentration an. Da allerdings keine ökonomische Zielfunktion vorhanden ist, kann über die Simulation keine Prozessoptimierung erfolgen. Aus diesem Grund wird eine Variablenstudie an einem Referenzprozess durchgeführt. Dies erfordert aber zunächst eine Abschätzung der Stofftransportprozesse und die Modellierung einer gegebenen Biotransformation.

### 11.1 Abschätzung der Stofftransportprozesse und Modellierung

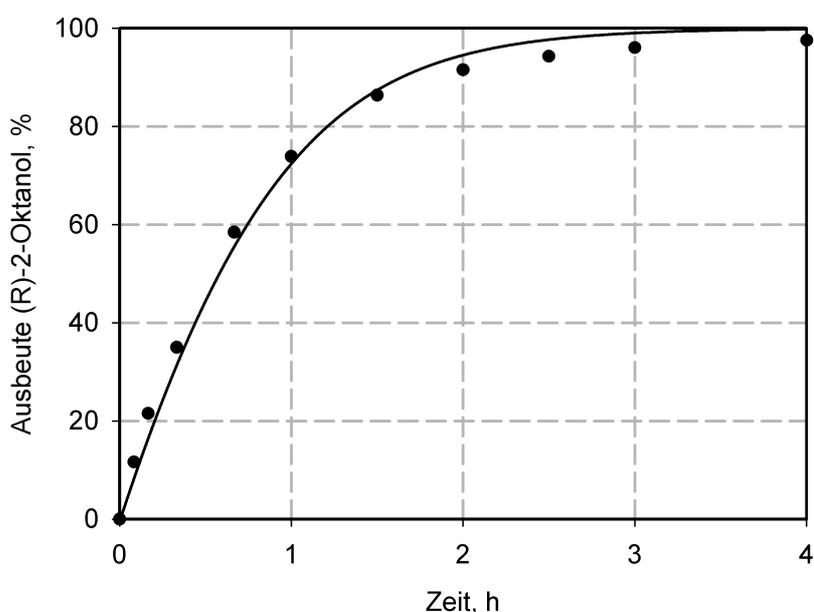
Die bei einer zweiphasig geführten Ganzzell-Biotransformation zu berücksichtigenden Stofftransportvorgänge sind bereits in Kapitel 4.9 ausführlich dargestellt worden. Aufgrund der in Kapitel 10.1 erhaltenen Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass der Stofftransport von Edukt aus der ionischen Flüssigkeit in die wässrige Phase nicht limitierend für die Reaktionsgeschwindigkeit ist. Infolgedessen war zu vermuten, dass eine Stofftransportlimitierung an der Zellmembran vorliegt. Betrachtet man exemplarisch die im Folgenden dargestellte asymmetrische Umsetzung von 2-Oktanon zu (R)-2-Oktanol mit *E.coli* BL21 LB-ADH CB-FDH, der hinsichtlich der ADH eine Aktivität von  $140 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$  und für die FDH  $160 \text{ U g}_{\text{BTM}}^{-1}$  bereitstellte, lässt sich feststellen, dass die Reaktionsgeschwindigkeit des Ganzzell-Biokatalysators um ca. 60 % verringert ist. Damit konnte nicht mehr davon ausgegangen werden, dass die intrazelluläre Enzymkinetik nur einen vernachlässigbaren

Einfluss auf die Biotransformation besitzt. In der in Kapitel 4.9 beschriebenen Modellierung wurde daher sowohl der Stoffübergang von Edukt in die Zelle berücksichtigt, die intrazelluläre enzymatische Umsetzung von Edukt zu Produkt, sowie der Stofftransport von Produkt aus der Zelle in die wässrige Phase. Die über eine Parameterschätzung unter Verwendung der Fehlerquadratsumme als Optimierungskriterium abgeschätzten modifizierten Permeabilitätskoeffizienten  $P_{E,BTM}$  und  $P_{P,BTM}$  sind in Tabelle 11.1 dargestellt.

**Tabelle 11.1** Identifizierte Permeabilitätskoeffizienten.

	modifizierter Permeabilitätskoeffizient, $L s^{-1} g_{BTM}^{-1}$
$P_{E,BTM}$	$2,19 \cdot 10^{-3}$
$P_{P,BTM}$	$5,99 \cdot 10^{-3}$

In Abbildung 11.1 kann gezeigt werden, dass sich mit Hilfe des identifizierten Modells die zur Parameteridentifikation genutzte Ganzzell-Biotransformation sehr gut beschreiben lässt. Damit eignet sich das Modell auch zur nachfolgenden Simulation der Edukt- und Produktkonzentrationen in der ionischen Flüssigkeit, in der wässrigen Phase und in der Zelle, sowie zur Simulation der Enzym-Kinetik und der Stofftransportgeschwindigkeit an der Membran.



**Abbildung 11.1** Verlauf der chemische Ausbeute an (R)-2-Oktanol ● bei einer Ganzzell-Biotransformation von 600 mM 2-Oktanon mit  $50 g_{BTM} L^{-1}$  *E.coli* BL21 LB-ADH CB-FDH bei 30°C und  $600 min^{-1}$  mit 20 % v/v [BMIM][NTF] im Vergleich zur Simulation —.

## 11.2 Simulation von extra- und intrazellulären Parametern

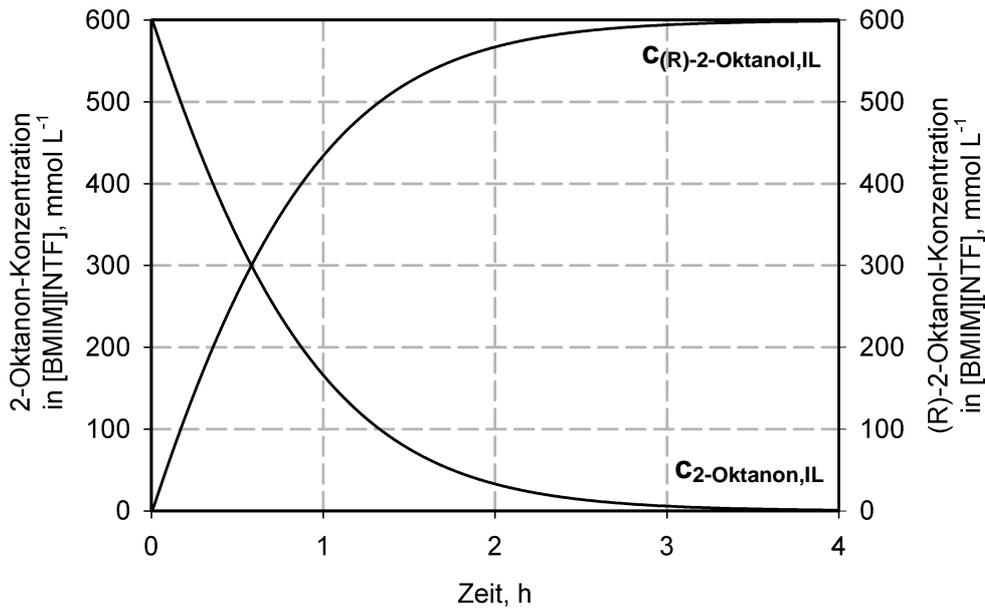
Mit der Identifizierung der Permeabilitätskoeffizienten steht nun ein vollständiges Modell zur Beschreibung der zweiphasig geführten Ganzzell-Biotransformation im Satzverfahren zur Verfügung. Dies soll im nachfolgenden zur Simulation von – im Allgemeinen nur schwierig bestimmbar – extra- und intrazellulären Parametern genutzt werden. Die Reaktionsbedingungen der zur Parameteridentifikation genutzten Biotransformation sowie die verwendeten Simulationsparameter (Tabelle 11.2) wurden hierfür festgehalten.

**Tabelle 11.2** Reaktionsbedingungen der zur Parameteridentifikation genutzten Biotransformation und verwendete Simulationsparameter.

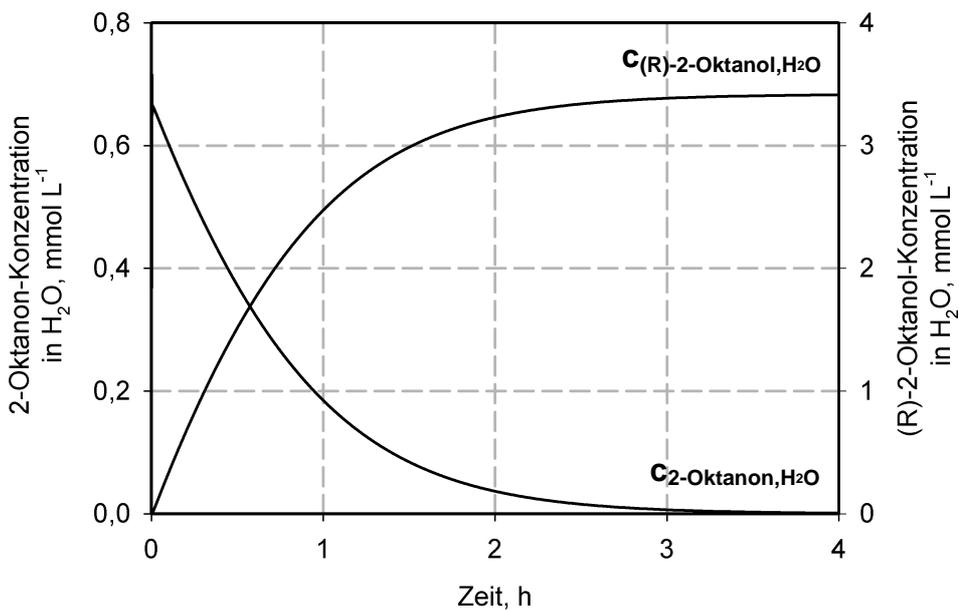
Parameter	
$\varphi_d$	20 % v/v [BMIM][NTF]
$c_{E,0}$	600 mM 2-Oktanon in IL
$c_X$	50 g <sub>BTM</sub> L <sup>-1</sup> <i>E.coli</i> LB-ADH CB-FDH in H <sub>2</sub> O
$v_{max}$	0,14 mmol min <sup>-1</sup> g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup>
$\log D_E$	2,96
$\log D_P$	2,17
$K_{m,2\text{-Oktanon}}$	0,04492 mmol L <sup>-1</sup>
$P_{E,BTM}$	2,19*10 <sup>-3</sup> L s <sup>-1</sup> g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup>
$P_{P,BTM}$	5,99*10 <sup>-3</sup> L s <sup>-1</sup> g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup>

### 11.2.1 Verlauf der Edukt- und Produktkonzentration

Der in Abbildung 11.2 dargestellte simulierte Verlauf der Konzentration an (R)-2-Oktanol in der ionischen Flüssigkeit [BMIM][NTF] entspricht natürlich dem Verlauf der (R)-2-Oktanol-Ausbeute in Abbildung 11.1. Über die Verknüpfung mit den Edukt- und Produkt-spezifischen Verteilungskoeffizienten ergibt sich daraus die Konzentration in der wässrigen Phase (Abbildung 11.3). Da der Verteilungskoeffizient für 2-Oktanol wesentlich kleiner als für 2-Oktanon ist, liegt die maximale 2-Oktanol-Konzentration in Wasser mit 3,42 mmol L<sup>-1</sup> fünf-fach höher als die Konzentration von 2-Oktanon zu Beginn der Biotransformation. Dies wirkt sich auch entsprechend auf die in Abbildung 11.4 simulierten Verläufe der intrazellulären



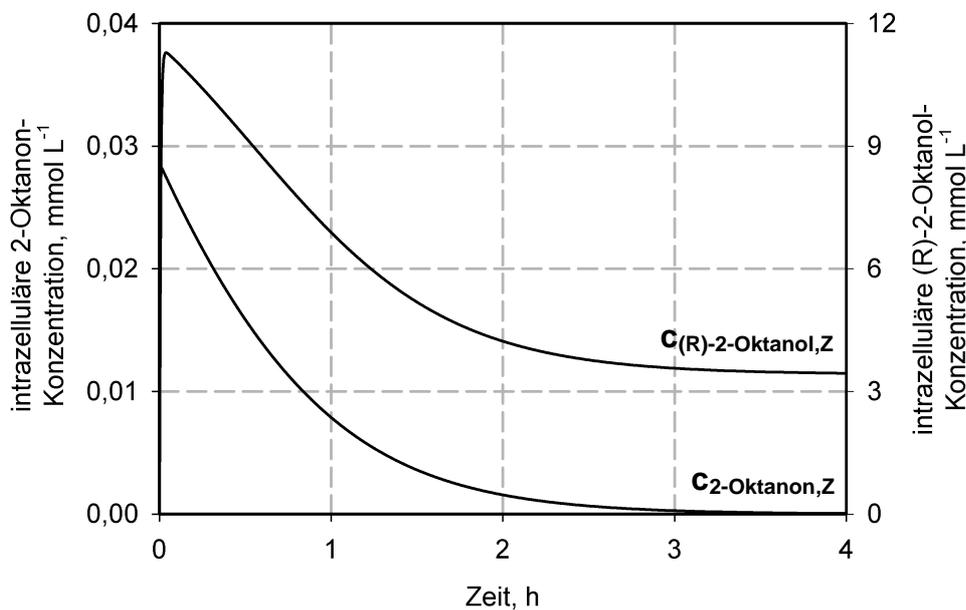
**Abbildung 11.2** Simulierter Verlauf der 2-Oktanon- und (R)-2-Oktanol-Konzentration in [BMIM][NTF] bei einer Ganzzell-Biotransformation von 600 mM 2-Oktanon im Satzverfahren mit  $50 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  *E.coli* BL21 LB-ADH CB-FDH und 20 % v/v [BMIM][NTF].



**Abbildung 11.3** Simulierter Verlauf der 2-Oktanon- und (R)-2-Oktanol-Konzentration in  $\text{H}_2\text{O}$  bei einer Ganzzell-Biotransformation von 600 mM 2-Oktanon im Satzverfahren mit  $50 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  *E.coli* BL21 LB-ADH CB-FDH und 20 % v/v [BMIM][NTF].

Konzentrationen aus. Bedingt durch die niedrige 2-Oktanon-Konzentration in der wässrigen Phase, den daraus resultierenden niedrigen Stofftransportgeschwindigkeiten und die katalytische Aktivität der Alkoholdehydrogenase, liegt die intrazelluläre 2-Oktanon-Konzentration mit maximal  $0,028 \text{ mmol L}^{-1}$  sogar um einen Faktor 400 niedriger als die intrazelluläre

Produkt-Konzentration ( $11,28 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Dies lässt sich allerdings auch darauf zurückführen, dass (R)-2-Oktanol zunächst in der Zelle akkumuliert, bis die Konzentrationsdifferenz zwischen intrazellulärer und extrazellulärer Phase soweit angestiegen ist, dass die Produkt-Transportgeschwindigkeit die Reaktionsgeschwindigkeit übersteigt. Ein Vergleich der (R)-2-Oktanol-Konzentrationen in der wässrigen (Abbildung 11.3) und intrazellulären Phase verdeutlicht zudem, dass die intrazelluläre Produkt-Konzentration stets höher ist als in der extrazellulären Phase. Erst zum Ende der Biotransformation nähern sich beide einer identischen Konzentration von  $3,42 \text{ mmol L}^{-1}$  an.

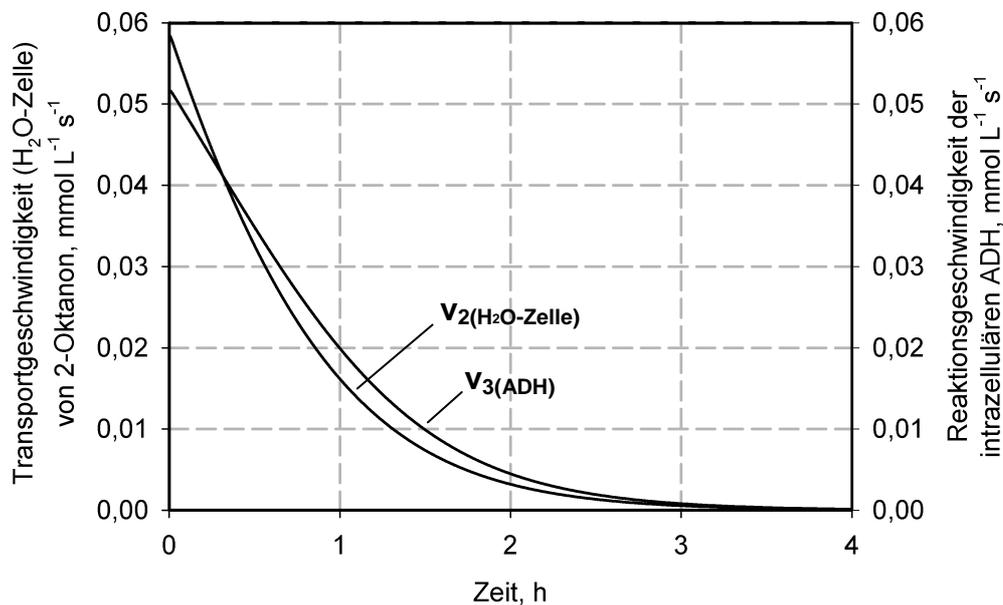


**Abbildung 11.4** Simulierter Verlauf der intrazellulären 2-Oktanon- und (R)-2-Oktanol-Konzentration bei einer Ganzzell-Biotransformation von  $600 \text{ mM}$  2-Oktanon im Satzverfahren mit  $50 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  *E.coli* BL21 LB-ADH CB-FDH und  $20 \% \text{ v/v}$  [BMIM][NTF].

### 11.2.2 Vergleich der Stofftransportgeschwindigkeit mit der Enzym-Kinetik

Der in Abbildung 11.5 dargestellte Vergleich der simulierten Transportgeschwindigkeit von 2-Oktanon aus der extrazellulären wässrigen Phase in die Zelle mit der simulierten Reaktionsgeschwindigkeit der intrazellulär vorliegenden ADH verdeutlicht über den ähnlichen Verlauf die gegenseitige Abhängigkeit beider Größen voneinander. Mit  $0,058 \text{ mmol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$  liegt die Transportgeschwindigkeit zu Beginn der Biotransformation zunächst über der Reaktionsgeschwindigkeit. Daraus darf aber nicht geschlossen werden, dass die Reaktionsgeschwindigkeit der ADH allein limitierend auf die Ganzzell-Biokatalyse wirkt, da die

Ursache für die gegenüber  $v_{\max}$  um mehr als 60 % verringerte ADH-Aktivität (bezogen auf den Beginn der Biotransformation) in der niedrigen intrazellulären 2-Oktanon-Konzentration liegt, die wiederum ein Resultat der zu geringen Transportgeschwindigkeit ist. Wie Abbildung 11.15 zeigt, ist ab der 20. Minute definitiv die Transportgeschwindigkeit von 2-Oktanon in die Zelle limitierend für die Biotransformation. Da nämlich die Reaktionsgeschwindigkeit mit der sinkenden intrazellulären Edukt-Konzentration weniger stark abnimmt als die Transportgeschwindigkeit, ist die Reaktionsgeschwindigkeit von da an etwas größer als die Transportgeschwindigkeit.



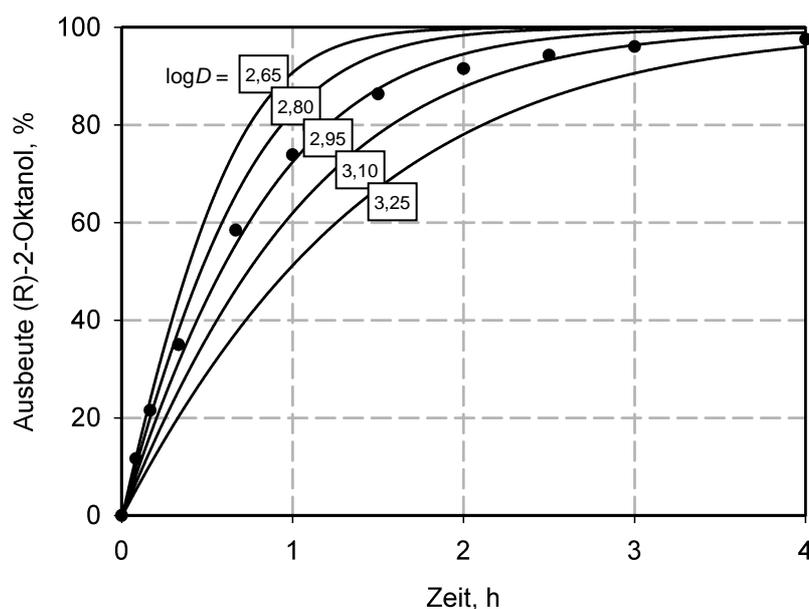
**Abbildung 11.5** Simulierter Verlauf der Transportgeschwindigkeit von 2-Oktanon aus der extrazellulären wässrigen Phase in die Zelle und der Reaktionsgeschwindigkeit der ADH bei einer Ganzzell-Biotransformation von 600 mM 2-Oktanon im Satzverfahren mit 50 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup> *E.coli* BL21 LB-ADH CB-FDH und 20 % v/v [BMIM][NTF].

### 11.3 Simulation von Optimierungsparametern

Da keine ökonomische Zielfunktion vorhanden ist, kann auch keine Prozessoptimierung erfolgen. Aus diesem Grund wird eine Variablenstudie an dem Referenzprozess durchgeführt, der bereits in Kapitel 11.1 zur Parameteridentifikation gedient hat. Die nachfolgende Variation der Optimierungsparameter Verteilungskoeffizient, Eduktstartkonzentration, IL-Phasenverhältnis und Biokatalysator-Konzentration erfolgt bei gleichzeitiger Fixierung der anderen in Tabelle 11.2 zusammengefassten Prozess- und Simulationsvariablen.

### 11.3.1 Einfluss des Verteilungskoeffizienten

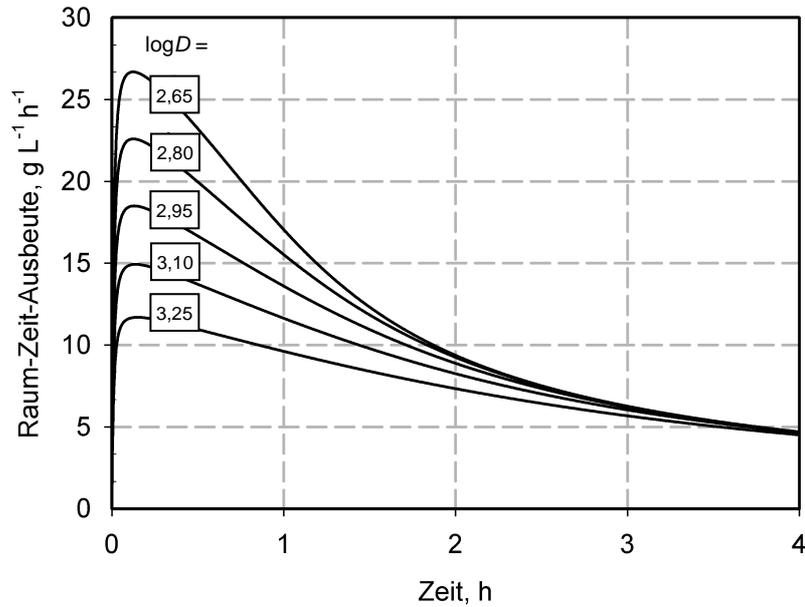
Der Verteilungskoeffizient von Edukt/Produkt zwischen der IL und der wässrigen Phase beschreibt die Fähigkeit der ionischen Flüssigkeit, die Konzentration der oftmals toxischen Reaktanden in der wässrigen Phase herabzusetzen und somit den Biokatalysator vor einer Schädigung zu schützen. Der Verteilungskoeffizient ist somit bei unveränderter Eduktmenge ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung der Eignung von ionischen Flüssigkeiten für die zweiphasig geführte Ganzzell-Biotransformation. Bei sehr hohen Edukt bezogenen Verteilungskoeffizienten ist jedoch zu erwarten, dass die Konzentration in der wässrigen Phase soweit minimiert wird, dass dies zu einer verstärkten Stofftransportlimitierung an der Zellmembran und somit zu einer Beeinträchtigung der Reaktionsgeschwindigkeit führt. Um diesen Zusammenhang genauer zu untersuchen, wurde der Verlauf der Ausbeute an (R)-2-Oktanol für unterschiedliche Verteilungskoeffizienten simuliert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11.6 dargestellt.



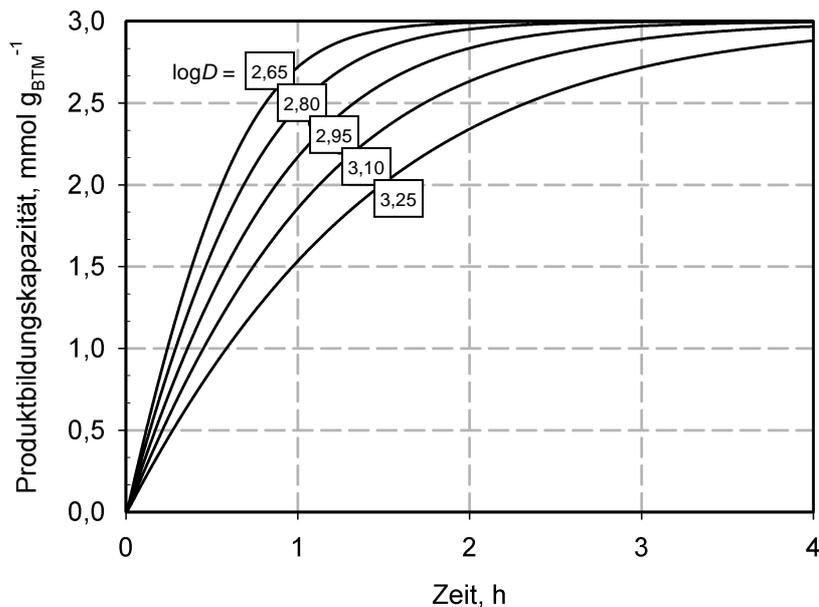
**Abbildung 11.6** Simulation des Ausbeuteverlaufs an (R)-2-Oktanol bei der zweiphasig geführten Ganzzell-Biotransformation von 600 mM 2-Oktanon mit *E.coli* BL21 LB-ADH CB-FDH für unterschiedliche Verteilungskoeffizienten im Vergleich zu experimentell ermittelten Ausbeuten ● mit 20 % v/v [BMIM][NTF].

Mit der Simulation kann bestätigt werden, dass der Verteilungskoeffizient einen maßgeblichen Einfluss auf den Reaktionsverlauf und somit auch auf die Reaktionsgeschwindigkeit besitzt. Die höhere Konzentration an Edukt in der wässrigen Phase bei niedrigeren Verteilungskoeffizienten erhöht die treibende Kraft für den diffusiven Stofftransport in die Zelle. Die Tatsache, dass die Biotransformation von der gesteigerten Edukttransferrate entschei-

dend profitieren kann, ist gleichzeitig auch ein Nachweis dafür, dass der Stoffübergang in die Zelle tatsächlich limitierend wirkt. Die Raum-Zeit-Ausbeute und die Produktbildungskapazität lassen sich bei unveränderten Bedingungen, wie in Abbildung 11.7 und 11.8 dargestellt, mit kleineren Verteilungskoeffizienten ebenfalls deutlich verbessern. Wie signifikant die Verbesserung allerdings ausfällt und ob die Auswahl einer anderen ionischen



**Abbildung 11.7** Simulation der Raum-Zeit-Ausbeute an (R)-2-Oktanol bei der zweiphasig geführten Ganzzell-Biotransformation von 600 mM 2-Oktanon mit *E.coli* BL21 LB-ADH CB-FDH für unterschiedliche Verteilungskoeffizienten.



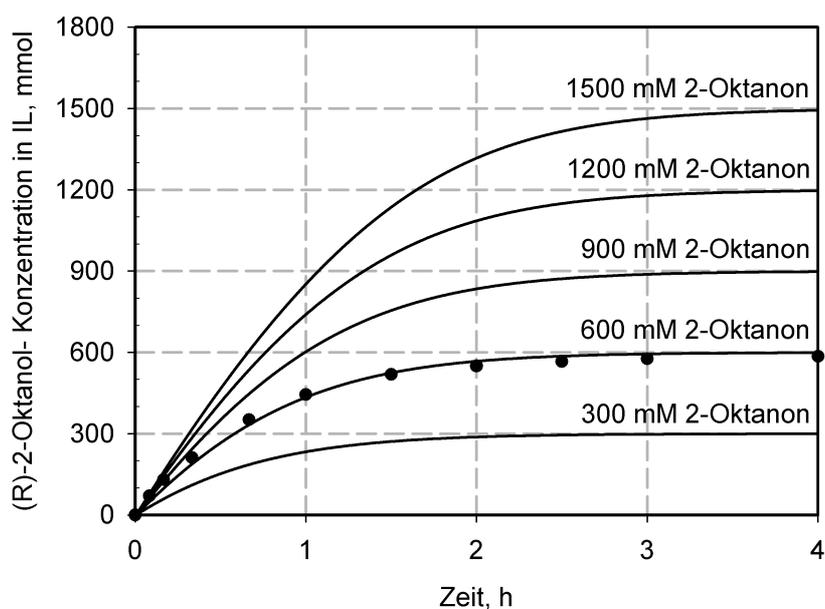
**Abbildung 11.8** Simulation der Produktbildungskapazität an (R)-2-Oktanol bei der zweiphasig geführten Ganzzell-Biotransformation von 600 mM 2-Oktanon mit *E.coli* BL21 LB-ADH CB-FDH für unterschiedliche Verteilungskoeffizienten.

Flüssigkeit mit kleinerem Verteilungskoeffizient tatsächlich Sinn macht, ist auch immer von dem erforderlichen Mindestumsatz abhängig. Wird zum Beispiel aufgrund einer schwierigen Trennung von Edukt und Produkt eine möglichst hohe Ausbeute erwartet, können die Einflüsse der unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten zunehmend vernachlässigt werden. Wäre jedoch eine Ausbeute von 80 % bereits akzeptabel, könnte bei einem Verteilungskoeffizienten von 2,65 mit einer Raumzeitausbeute von  $20 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  gegenüber der bei 3,25 mit  $7 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  eine entscheidende Verbesserung erzielt werden.

Von einem niedrigeren Verteilungskoeffizienten lässt sich im Allgemeinen aber nur profitieren, wenn die erhöhte Edukt-Konzentration in der wässrigen Phase keine Schädigung des Ganzzell-Biokatalysators hervorruft und wenn die betrachteten ionischen Flüssigkeiten eine vergleichbare Biokompatibilität aufweisen. Die hier dargestellten Zusammenhänge bieten daher nur unter diesen Voraussetzungen ein Optimierungspotential.

### 11.3.2 Einfluss der Eduktstartkonzentration

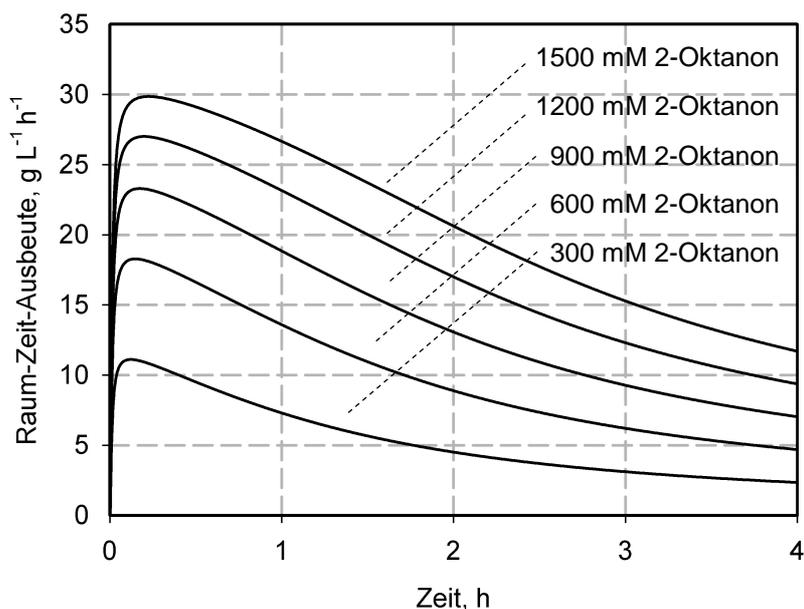
Die Erhöhung der Eduktstartkonzentration bietet eine weitere Möglichkeit die Konzentration in der wässrigen Phase anzuheben und somit die Stofftransportlimitierung an der Zellmembran zu minimieren. Um eine direkte Beurteilung der mit unterschiedlichen Startkonzentrationen simulierten Biotransformationen zu erlauben, sind die Ergebnisse in Abbildung 11.9 als IL-bezogene (R)-2-Oktanol-Konzentration dargestellt.



**Abbildung 11.9** Simulation der (R)-2-Oktanol-Konzentration in IL bei der zweiphasig geführten Umsetzung von 2-Oktanon für verschiedene Startkonzentrationen  $c_{E,0}$  mit *E.coli* BL21 LB-ADH CB-FDH im Vergleich zu experimentell ermittelten Werten ●.

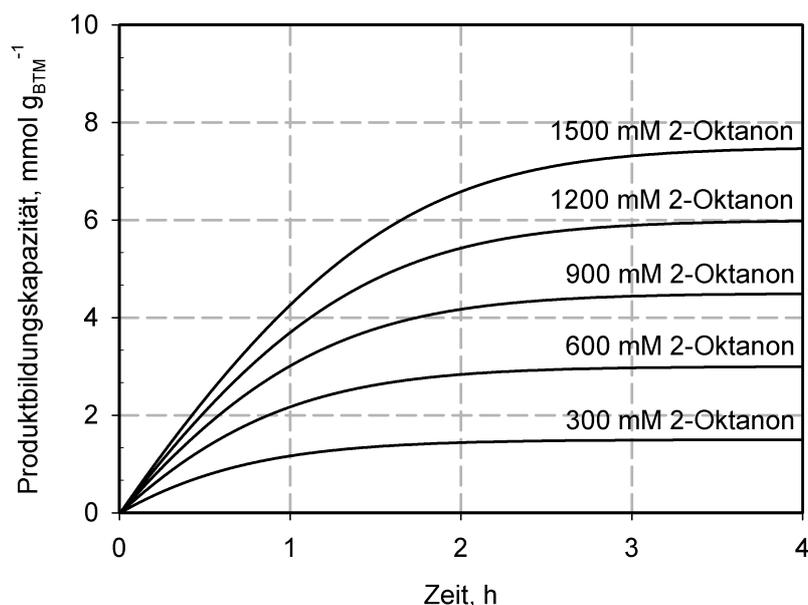
Unter der Annahme, dass keine Edukt- und Produktinhibierung der Alkoholdehydrogenase auftritt, zeigt die Simulation, dass aufgrund der deutlich gesteigerten Reaktionsgeschwindigkeit selbst Edukt-Konzentrationen von 1500 mM innerhalb von vier Stunden vollständig umgesetzt werden können. Dies setzt allerdings auch hier voraus, dass die erhöhte Edukt-Konzentration in der wässrigen Phase keine Schädigung des Biokatalysators und somit keinen Cofaktor-Verlust zur Folge hat.

Die Betrachtung der Raum-Zeit-Ausbeuten in Abbildung 11.10 zeigt, dass sich von höheren Edukt-Konzentrationen über die gesamte Reaktionsdauer profitieren lässt. Eine Optimierung der zweiphasig geführten Biotransformation im Satzverfahren müsste daher darauf abzielen, zu Beginn der Reaktion eine möglichst hohe 2-Oktanon-Konzentration vorzulegen. Da der chirale Alkohol im Allgemeinen aber eine deutlich höhere Wasserlöslichkeit und Toxizität auf den Biokatalysator besitzt, darf sich die maximal eingestellte Edukt-Konzentration nicht nur an der Edukt-Toxizität orientieren, sondern muss zusätzlich die bei Abbruch der Reaktion vorliegende Produkt-Konzentration/-Toxizität berücksichtigen.



**Abbildung 11.10** Simulation der Raum-Zeit-Ausbeute an (R)-2-Oktanol bei der zweiphasig geführten Ganzzell-Biotransformation von 2-Oktanon mit *E.coli* BL21 LB-ADH CB-FDH für unterschiedliche Eduktstartkonzentrationen  $c_{E,0}$ .

Aufgrund der konstanten Biokatalysator-Konzentration ergibt sich für die Produktbildungskapazität in Abbildung 11.11 ein gegenüber Abbildung 11.9 identischer Verlauf.

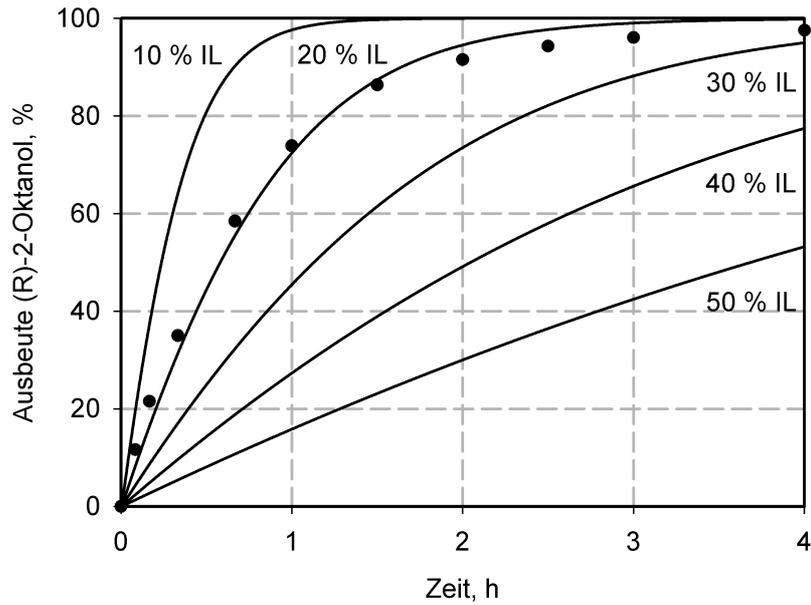


**Abbildung 11.11** Simulation der Produktbildungskapazität an (R)-2-Oktanol bei der zweiphasig geführten Ganzzell-Biotransformation von 2-Oktanon mit *E.coli* BL21 LB-ADH CB-FDH für unterschiedliche Eduktstartkonzentrationen  $c_{E,0}$ .

### 11.3.3 Einfluss des IL-Phasenverhältnisses

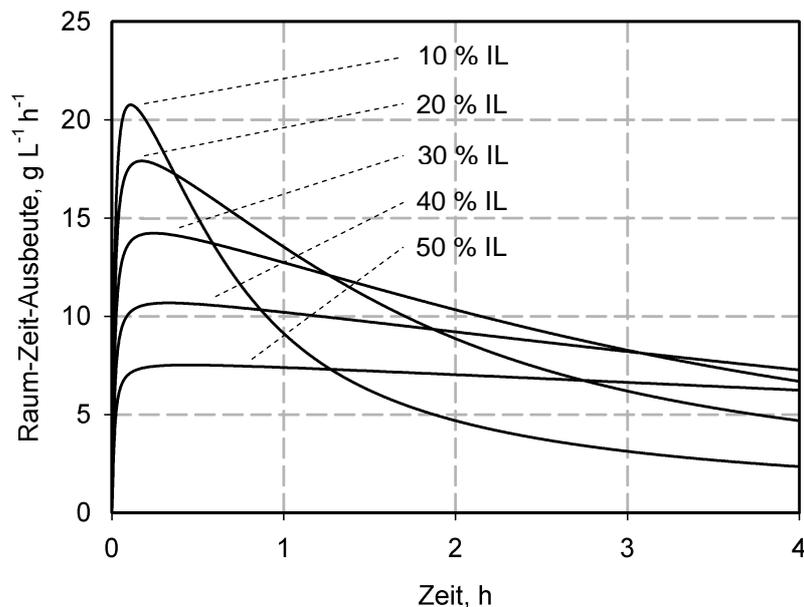
Eine Erhöhung des Phasenverhältnisses von ionischer Flüssigkeit zu Umsetzungspuffer bietet die Möglichkeit bei gleichbleibender Edukt-Konzentration in IL und wässriger Phase, die auf das Gesamtvolumen bezogene Edukt-Menge zu erhöhen, ohne die Toxizität auf den Biokatalysator zu vergrößern. Für die Simulation wurden allerdings nur Phasenanteile bis 50 % berücksichtigt, da noch höhere Phasenverhältnisse zunehmend Probleme bei der Dispergierung der ionischen Flüssigkeit bereiten, und sich somit negativ auf den Stofftransport von Edukt in die wässrige Phase auswirken.

In Abbildung 11.12 ist der simulierte Verlauf der Ausbeute an (R)-2-Oktanol in Abhängigkeit der eingestellten Phasenverhältnisse dargestellt. Es kann gezeigt werden, dass sich mit zunehmendem IL-Anteil der Anstieg der Ausbeute deutlich vermindert. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass sich mit der Anhebung des Phasenanteils auch die Menge an umzusetzendem Edukt erhöht. Zwar kann der Biokatalysator dadurch über einen längeren Zeitraum von einer hohen Edukt-Konzentration profitieren, da sich aber mit der Erhöhung des Phasenanteils auch die auf das Gesamtvolumen bezogene Biokatalysatormenge vermindert, reduziert sich die für das Gesamtsystem von außen beobachtete maximale Reaktionsgeschwindigkeit.



**Abbildung 11.12** Simulation des Ausbeuteverlaufs an (R)-2-Oktanol bei der zweiphasig geführten Ganzzell-Biotransformation von 600 mM 2-Oktanon mit *E.coli* BL21 LB-ADH CB-FDH für unterschiedliche IL-Phasenanteile im Vergleich zu experimentell ermittelten Ausbeuten ● mit 20% v/v [BMIM][NTF].

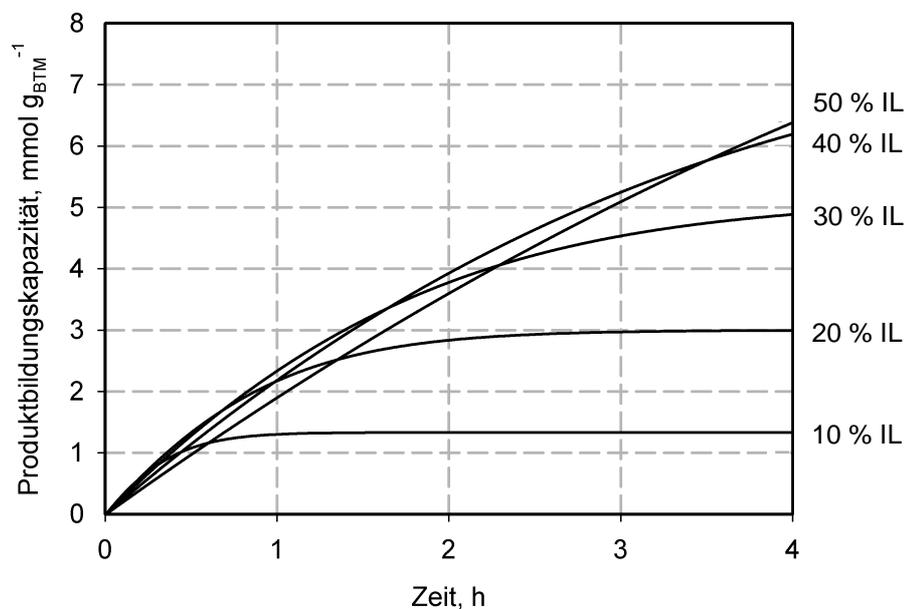
Eine Betrachtung der Raum-Zeit-Ausbeute, wie in Abbildung 11.13 dargestellt, bietet daher eine bessere Beurteilung. Sind Edukt und Produkt schlecht trennbar und sollte daher ein möglichst vollständiger Umsatz angestrebt werden, ließe sich von niedrigeren Phasenanteilen



**Abbildung 11.13** Simulation der Raum-Zeit-Ausbeute an (R)-2-Oktanol bei der zweiphasig geführten Ganzzell-Biotransformation von 2-Oktanon mit *E.coli* BL21 LB-ADH CB-FDH für unterschiedliche IL-Phasenanteile.

Teilen profitieren, wie zum Beispiel ein Vergleich der RZA für 10 % IL nach anderthalb Stunden ( $7 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) mit der für 20 % IL nach vier Stunden ( $5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) beweist. Sind allerdings Ausbeuten von unter 80 % akzeptabel, wären auch größere Phasenverhältnisse konkurrenzfähig. Diese Zusammenhänge gelten aber nur so lange, wie auch die anderen Parameter konstant gehalten werden. Erfolgt zum Beispiel eine Anpassung der Biokatalysatorkonzentration in Abhängigkeit des IL-Phasenanteils dürfte die Raum-Zeit-Ausbeute von Ansätzen mit hohem Phasenverhältnis deutlich verbessert werden.

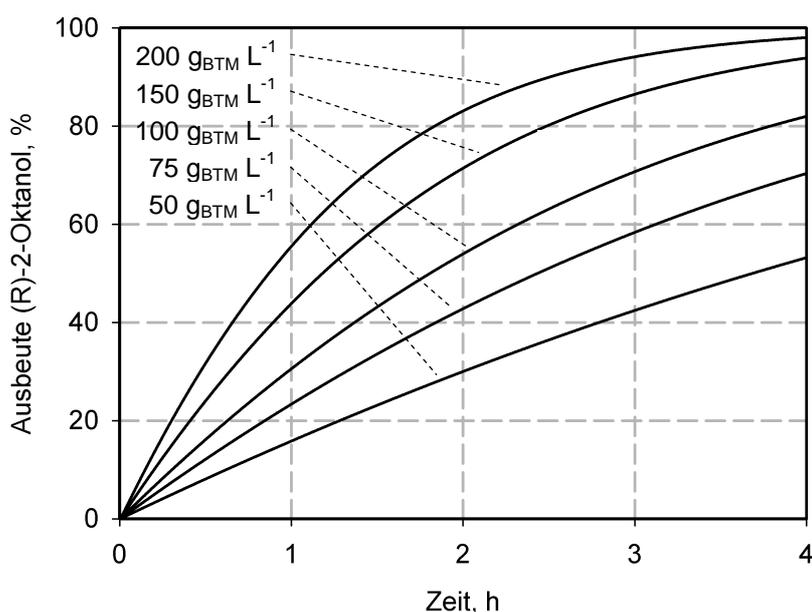
Die in Abbildung 11.14 dargestellte Produktbildungskapazität verdeutlicht, dass mit steigendem Phasenanteil und gleichzeitig sinkender Biokatalysatormenge der Biokatalysator deutlich besser ausgenutzt werden kann. Dies setzt allerdings voraus, dass während der Ganzzell-Biotransformation keine Inhibierungen auftreten.



**Abbildung 11.14** Simulation der Produktbildungskapazität an (R)-2-Oktanol bei der zweiphasig geführten Ganzzell-Biotransformation von 2-Oktanon mit *E.coli* BL21 LB-ADH CB-FDH für unterschiedliche IL-Phasenanteile.

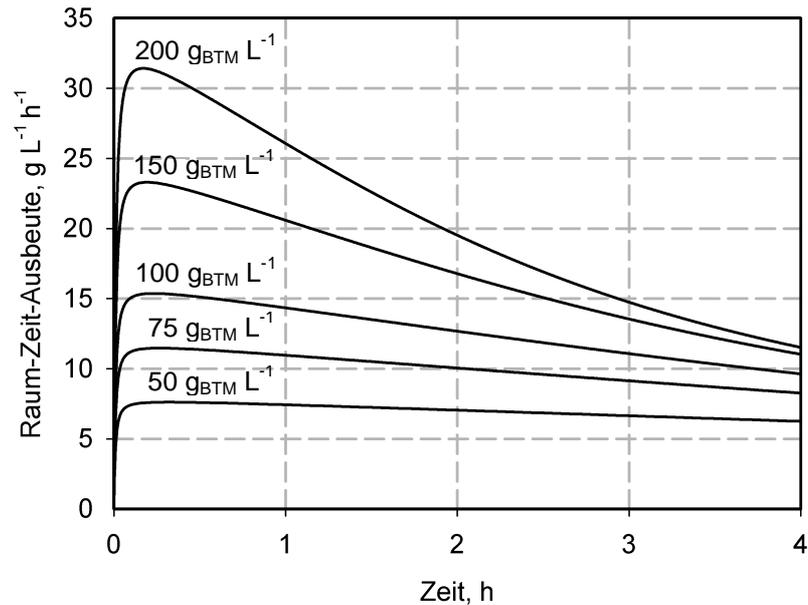
### 11.3.4 Einfluss der Biokatalysator-Konzentration

Wie bei den vorangegangenen Simulationen festgestellt worden war, können höhere IL-Phasenverhältnisse nur dann konkurrenzfähig sein, wenn gleichzeitig auch die Biokatalysator-Konzentration angepasst wird. In den nachfolgenden Simulationen sollte daher näher untersucht werden, inwieweit sich bei einem IL-Phasenanteil von 50 % die Variation der Biokatalysator-Konzentration von  $50 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  bis  $200 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  auswirkt. In Abbildung 11.15 erfolgt eine Darstellung der Simulationsergebnisse für den Verlauf der Ausbeute.



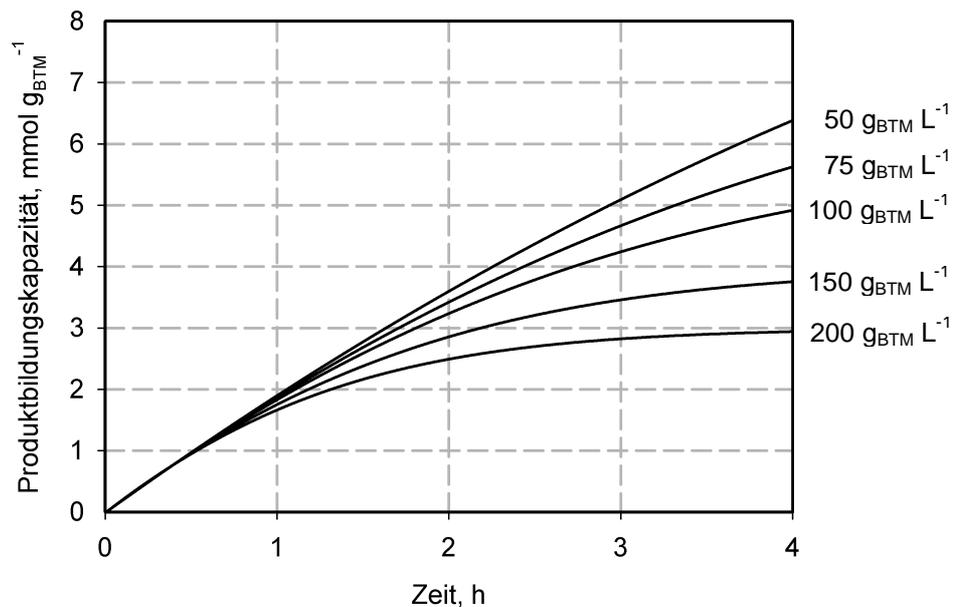
**Abbildung 11.15** Simulation des Ausbeuteverlaufs an (R)-2-Oktanol bei der zweiphasig geführten Ganzzell-Biotransformation von 600 mM 2-Oktanon mit *E.coli* BL21 LB-ADH CB-FDH und 50 % [BMIM][NTF] für unterschiedliche Biokatalysator-Konzentrationen.

Mit der Simulation kann bestätigt werden, dass sich durch Erhöhung der Biokatalysator-Konzentration die Biotransformation signifikant verbessern lässt. Mit  $200 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  kann bereits nach vier Stunden ein fast vollständiger Umsatz erreicht werden. Die in Abbildung 11.16 dargestellten Raum-Zeit-Ausbeuten an (R)-2-Oktanol verdeutlichen zudem, dass sich von höheren Biokatalysator-Konzentrationen über die gesamte Reaktionsdauer profitieren lässt. Vergleicht man die im Standardsystem mit 20 % [BMIM][NTF] bei vollständiger Umsetzung erreichte Raum-Zeit-Ausbeute ( $6,5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) mit der hier für 50 % IL und  $200 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  nach vier Stunden generierten ( $12 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), lässt sich eine Verbesserung um knapp 85 % feststellen. Eine Optimierung der zweiphasig geführten Biotransformation müsste daher darauf abzielen, bei der Reaktion ein möglichst hohes Phasenverhältnis mit einer vertretbar hohen Biokatalysator-Konzentration einzustellen. Das setzt allerdings voraus,



**Abbildung 11.16** Simulation des Raum-Zeit-Ausbeute an (R)-2-Oktanol bei der zweiphasig geführten Ganzzell-Biotransformation von 600 mM 2-Oktanon mit *E.coli* BL21 LB-ADH CB-FDH für unterschiedliche Biokatalysator-Konzentrationen  $c_x$ .

dass die Leistungsfähigkeit des Biokatalysators ähnlich gut ausgenutzt werden kann, wie im Referenzsystem mit 20 % [BMIM][NTF]. Bei Betrachtung der in Abbildung 11.17 dargestellten Produktbildungskapazitäten kann dies aber bestätigt werden. Mit einem Wert von  $3 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}$  zeigt der Ansatz mit einem IL-Phasenanteil von 50 % und einer Biomasse-Konzentration von  $200 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  ein dem Referenzsystem identisches Ergebnis.



**Abbildung 11.17** Simulation der Produktbildungskapazität an (R)-2-Oktanol bei der zweiphasig geführten Ganzzell-Biotransformation von 600 mM 2-Oktanon mit *E.coli* BL21 LB-ADH CB-FDH für unterschiedliche Biokatalysator-Konzentrationen  $c_x$ .

## 11.4 Diskussion

Die beispielhafte Modellierung einer zweiphasig geführten Ganzzell-Biotransformation im Satzverfahren erlaubte die Abschätzung der 2-Oktanon- und (R)-2-Oktanol-spezifischen Permeabilitätskoeffizienten und somit anschließend auch die Simulation der einzelnen Konzentrationen von 2-Oktanon und (R)-2-Oktanol in der ionischen Flüssigkeit, in der wässrigen Phase und in der Zelle. Anhand dieser Ergebnisse wurde deutlich, dass die maximale intrazelluläre 2-Oktanon-Konzentration zu Beginn der Biotransformation bereits deutlich unter  $K_m$  liegt. Die intrazelluläre (R)-2-Oktanol-Konzentration akkumuliert in den ersten Minuten zunächst und erreicht mit  $11,28 \text{ mmol L}^{-1}$  ein 400fach höheres Maximum, als die 2-Oktanon-Konzentration. Dies könnte unter Umständen erklären, weshalb es bei den Biotransformationen (siehe Abbildung 10.3b) in den ersten Minuten teilweise zur verstärkten Bildung des unerwünschten Enantiomers kommt.

Der simulierte Verlauf der Stofftransportgeschwindigkeit und der Enzym-Kinetik verdeutlichte, dass die Ganzzell-Biotransformation vornehmlich durch den Transport von 2-Oktanon aus der wässrigen Phase in die Zelle limitiert wird. Infolgedessen kann die Aktivität der intrazellulär vorliegenden Alkoholdehydrogenase auch nicht vollständig ausgenutzt werden.

Da keine ökonomische Zielfunktion vorhanden war und daher auch keine Prozessoptimierung erfolgen konnte, wurde stattdessen eine Variablenstudie anhand eines Referenzprozesses durchgeführt. Mit Hilfe der Simulation unterschiedlicher Reaktionsbedingungen konnte gezeigt werden, dass durch die Auswahl einer ionischen Flüssigkeit mit einem niedrigeren Verteilungskoeffizienten oder durch die Erhöhung der Eduktstartkonzentration bzw. Biokatalysator-Konzentration sich die Stofftransport bedingte Limitierung der Ganzzell-Biokatalyse verringern lässt. Dies setzt allerdings voraus, dass die höheren Edukt- und somit auch Produkt-Konzentrationen in der wässrigen Phase keinen negativen Einfluss auf den Biokatalysator ausüben und dass im Falle einer höheren Biokatalysator-Konzentration dann auch nicht der Stofftransport aus der IL in die wässrige Phase limitierend für die Biokatalyse wird. Ein höherer Phasenanteil an ionischer Flüssigkeit ist zu wählen, wenn aufgrund der Restlöslichkeit von IL in Wasser der Verlust bei mehrfachen Einsatz der IL minimiert werden soll. In dem Fall sollte dann aber auch die Biokatalysator-Konzentration erhöht werden. Die Simulationsergebnisse haben hier zeigen können, dass ein IL-Phasenanteil von 50 % bei gleichzeitiger Anhebung der Biomasse-Konzentration auf  $200 \text{ g L}^{-1}$  die Effizienz der Biotransformation nochmals deutlich verbessert. Allerdings gilt dies auch nur unter der Voraussetzung, dass der Stofftransport aus der IL in die wässrige Phase nicht limitierend wird.

## 12 Leitlinien zur Auswahl geeigneter ionischer Flüssigkeiten für die Ganzzell-Biokatalyse

Aus den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen wurden Leitlinien entwickelt, mit Hilfe derer sich die große Anzahl an kommerziell zur Verfügung stehenden ionischen Flüssigkeiten hinsichtlich ihrer Eignung für die Ganzzell-Biokatalyse eingrenzen lässt. Unter genauerer Betrachtung der einzelnen Auswahl- und Bewertungskriterien, werden diese im Folgenden detailliert dargestellt.

### ***Grundlegende Auswahlkriterien***

Anhand physikalischer Eigenschaften gilt es zunächst eine Vorauswahl derjenigen ionischen Flüssigkeiten zu treffen, die sich für den Einsatz als zweite Lösungsmittelphase potentiell eignen. Da sich eine zweiphasige Prozessführung nur mit ILs umsetzen lässt, die sich nicht mit der wässrigen Phase mischen, bildet diese Eigenschaft das erste Ausschlusskriterium. Ein Schmelzpunkt unter 30°C wird durch die bei Raumtemperatur stattfindende Anwendung bedingt, wie sie die meisten Ganzzell-Biotransformationen erfordern. Aufgrund ihres entscheidenden Einflusses auf die Dispergierqualität und somit auch auf die Stofftransportlimitierungen sollte die Viskosität der mit Wasser gesättigten IL  $400 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$  nicht überschreiten. Eine Dichte von mindestens  $1,2 \text{ g mL}^{-1}$  ist dagegen erforderlich, um nach der Biotransformation eine einfache Phasentrennung auch im Schwerfeld zu erlauben. Werden diese grundlegenden Auswahlkriterien berücksichtigt, kann die Anzahl an ILs deutlich reduziert werden.

### ***Wasserlöslichkeit***

Da es bisher noch kein etabliertes und wirtschaftliches Verfahren zur Abtrennung von ionischen Flüssigkeiten aus einer wässrigen Phase gibt, entscheidet die Wasserlöslichkeit der IL darüber, wie hoch in einem zweiphasigen Prozess der Verlust ausfällt. Aufgrund der

hohen Preise für ionische Flüssigkeiten bestimmt die Wasserlöslichkeit damit auch direkt die ökonomische Effizienz des Verfahrens. Eine exemplarische Betrachtung der Biotransformation mit 20 % v/v [BMIM] [PF<sub>6</sub>] (Wasserlöslichkeit ~ 20 g L<sup>-1</sup>) verdeutlicht mit einem Verlust von 5,8 % je Biokatalyse im Satzverfahren die große Bedeutung. Zwar ließe sich durch eine Erhöhung des IL-Phasenanteils beispielsweise auf 50 % der Verlust auf 1,5 % reduzieren, die im Abwasser aber weiterhin vorliegende hohe Konzentration von 20 g L<sup>-1</sup> dürfte jedoch eine gesonderte Abwasser-Behandlung erfordern. Wählt man dagegen mit [HMIM][NTF] eine IL mit niedrigerer Löslichkeit von 1,7 g L<sup>-1</sup> aus, kann bei einem IL-Phasenanteil von 20 % v/v bzw. 50 % v/v der Verlust an IL auf 0,5 % bzw. 0,1 % begrenzt werden. Sofern daher keine Möglichkeit zur kostengünstigen Abtrennung von gelöster ionischer Flüssigkeit aus einer wässrigen Phase zur Verfügung steht, sollte die Wasserlöslichkeit von ILs nicht mehr als 5 g L<sup>-1</sup> betragen.

### ***Bioabbaubarkeit***

Aufgrund ihrer Restlöslichkeit in Wasser werden ionische Flüssigkeiten mit der wässrigen Phase über die Prozessgrenzen hinaus ausgetragen. Um eine Akkumulation in der Umwelt zu vermeiden, muss daher eine ausreichende Bioabbaubarkeit gewährleistet sein. Die momentan kommerziell zur Verfügung stehenden nicht mit Wasser mischbaren ionischen Flüssigkeiten bieten bisher nur eine schlechte Abbaubarkeit (Garcia *et al.* 2005). Aus diesem Grund gilt es neue ILs zu entwickeln, die diesen Nachteil nicht mehr aufweisen. Als potentielle Kation-Kandidaten einer leichter abbaubaren IL gelten Morpholinium- und Ammonium-Derivate. Halogenierte Anionen sind wenn möglich in Zukunft zu vermeiden.

### ***Biokompatibilität und Toxizität***

Ionische Flüssigkeiten, die bei zweiphasig geführten Ganzzell-Biotransformationen als Edukt-Reservoir und *in situ*-Extraktionsmittel Verwendung finden sollen, müssen gegenüber den verwendeten Mikroorganismen eine ausreichende Biokompatibilität aufweisen, um eine Schädigung der Zellmembran und somit einen Austritt des Cofaktors aus den Zellen zu vermeiden. Die Untersuchung der Membranintegrität bietet daher ein aussagekräftiges Kriterium, um die ionischen Flüssigkeiten hinsichtlich ihrer Eignung zu beurteilen. Die derzeit kommerziell verfügbaren Analyseverfahren sind allerdings in vielen Fällen für Anwendungen mit ionischen Flüssigkeiten nicht geeignet. Die ausreichende Biokompatibilität von ionischen Flüssigkeiten kann daher bislang nur über die Ausbeuten bei exemplarisch durchgeführten Biotransformationen abgeschätzt werden.

Die in der Literatur für verschiedene Mikroorganismen zur Beurteilung der Toxizität von ionischen Flüssigkeiten veröffentlichten effektiven Konzentrationen  $EC_{50}$  bieten keine aussagekräftigen Hinweise, inwieweit die ILs für eine Ganzzell-Biotransformation geeignet sind. So konnten in dieser Arbeit für ILs mit hoher aquatischer Toxizität wie [BMIM]- und [HMIM][PF<sub>6</sub>] (Garcia *et al.* 2005) außerordentlich gute Ausbeuten erzielt werden. Im Hinblick auf die ökologischen Aspekte sollten im Allgemeinen aber dennoch die ionische Flüssigkeiten bevorzugt werden, die eine geringe aquatische Toxizität besitzen.

### **Verteilungskoeffizienten**

Der Verteilungskoeffizient von Edukt/Produkt zwischen der IL und der wässrigen Phase beschreibt die Fähigkeit der ionischen Flüssigkeit, die Konzentration der oftmals toxischen Reaktanden in der wässrigen Phase herabzusetzen und somit den Biokatalysator vor einer Schädigung zu schützen. Er ist somit auch ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung der Eignung von ionischen Flüssigkeiten. Die Höhe des optimalen Verteilungskoeffizienten variiert aber mit dem Reaktionssystem. Sind Edukt/Produkt weniger schädlich für den Ganzzell-Biokatalysator kann die Reaktionsgeschwindigkeit von einem kleineren Verteilungskoeffizienten profitieren, da dieser eine höhere Edukt-Konzentration in der wässrigen Phase gewährleistet. Gilt es aber ein toxisches Edukt umzusetzen, sollten diejenigen ILs bevorzugt werden, die einen höheren Verteilungskoeffizienten aufweisen. Ist das Produkt toxischer als das Edukt und/oder soll von höheren Prozessausbeuten profitiert werden, muss sich die Auswahl geeigneter ionischer Flüssigkeiten dagegen an den deutlich geringeren Produkt-spezifischen Verteilungskoeffizienten orientieren.

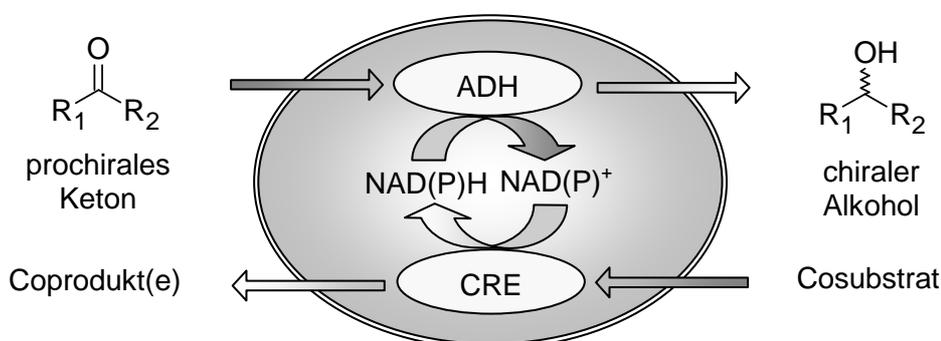
### **Chemische Ausbeuten**

Die Ausbeute bei exemplarischen Umsetzungen liefert das aussagekräftigste Kriterium zur Beurteilung der Eignung von ionischen Flüssigkeiten für Ganzzell-Biotransformationen, da jede einzelne IL im Zusammenspiel der drei Einflussfaktoren Biokompatibilität, Verteilungskoeffizient und Edukt-/Produkt-Toxizität betrachtet werden kann. Werden die Biotransformationen unter identischen Bedingungen parallel durchgeführt, kann zudem ein direkter Vergleich der eingesetzten ionischen Flüssigkeiten erfolgen. Ab welcher Ausbeute eine IL sich allerdings als geeignet oder ungeeignet einstufen lässt, kann nur in Abhängigkeit des jeweiligen Reaktionssystems beurteilt werden. So ließ sich zum Beispiel für Propiophenon, aufgrund der niedrigen relativen Propiophenon-spezifischen Aktivität der LB-ADH, mit den gleichen ILs, die mit 4-CL-AP eine gute Ausbeute gezeigt hatten, nur ein Bruchteil der 4-CL-AP-Ausbeute erzielen. Ein allgemeingültiger Richtwert kann daher nicht definiert werden.

### 13 Zusammenfassung und Ausblick

Die Herstellung chiraler Alkohole über eine asymmetrische Ganzzell-Biokatalyse kann den hohen Anforderungen an die Enantiomerenreinheit auf besonders ökonomische und effektive Weise gerecht werden. In vielen Fällen wird die Effizienz dieser Prozesse aber durch geringe Wasserlöslichkeit, Instabilität oder Toxizität der Edukte und Produkte gegenüber dem Biokatalysator herabgesetzt. Zur Lösung des Problems bietet sich eine zweiphasige Prozessführung unter Verwendung von ionischen Flüssigkeiten (IL) als Eduktreservoir und *in situ*-Extraktionsmittel an. Da bisher aber nur eine geringe Anzahl an nicht mit Wasser mischbaren ionischen Flüssigkeiten bezüglich ihrer Eignung für Ganzzell-Biotransformationen untersucht worden ist, sollte ein Ziel dieser Arbeit sein, weitere geeignete ionische Flüssigkeiten zu identifizieren und den unterschiedlichen Einfluss ihrer Anionen und Kationen auf die Ganzzell-Biokatalyse abzuschätzen. Zusätzlich sollte eine exemplarische Modellierung einer Ganzzell-Biokatalyse erste Optimierungsansätze hinsichtlich verschiedener Prozessparameter liefern.

Die modernen Methoden der Gentechnik erlauben die Konstruktion neuartiger Ganzzell-Biokatalysatoren, die eine gegenüber dem Wildtyp deutlich gesteigerte Aktivität aufweisen. Von den hohen Reaktionsgeschwindigkeiten der heterolog exprimierten Enzyme kann allerdings nur profitiert werden, wenn gleichzeitig auch ein cofaktorregenerierendes Enzym exprimiert wird (Abbildung 13.1).



**Abbildung 13.1** Schematische Darstellung der intrazellulären Cofaktorregenerierung durch ein cofaktorregenerierendes Enzym (CRE) am Beispiel der asymmetrischen Reduktion eines prochiralen Ketons zum chiralen Alkohol mit Hilfe einer Alkoholdehydrogenase (ADH) in einem Ganzzell-Biokatalysator.

Die Eignung von verschiedenen Cofaktorregenerierungssystemen für den Einsatz in einem Ganzzell-Biokatalysator ist bisher noch wenig untersucht. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit sollte daher sein, die Leistungsfähigkeit von vier rekombinanten *E.coli*-Stämmen zu untersuchen, die sich nur durch das Cofaktorregenerierungssystem unterscheiden (Tabelle 13.1).

**Tabelle 13.1** In dieser Arbeit verwendete rekombinante *E.coli*-Stämme (ADH: Alkoholdehydrogenase, GDH: Glukosedehydrogenase, G6PDH: Glukose-6-Phosphatdehydrogenase, FDH: Formiatdehydrogenase).

<i>E.coli</i> -Stamm	Alkoholdehydrogenase	Cofaktorregenerierungsenzym
<i>E.coli</i> BL21 LB-ADH BS-GDH	<i>Lactobacillus brevis</i> ADH	<i>Bacillus subtilis</i> GDH
<i>E.coli</i> BL21 LB-ADH LM-G6PDH	<i>Lactobacillus brevis</i> ADH	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> G6PDH
<i>E.coli</i> BL21 LB-ADH MV-FDH	<i>Lactobacillus brevis</i> ADH	<i>Mycobacterium vaccae</i> FDH
<i>E.coli</i> BL21 LB-ADH CB-FDH	<i>Lactobacillus brevis</i> ADH	<i>Candida boidinii</i> FDH

Die Entwicklung von vier Satzverfahren im 5 L-Maßstab gewährleistete die Verfügbarkeit der Biokatalysatoren mit außergewöhnlich hohen Aktivitäten. Im Vergleich zu den von Pfründer (2005) mit *Lactobacillus kefir* im Zulaufverfahren erzielten Ergebnissen konnte die ADH-bezogene Raum-Zeit-Ausbeute für alle vier *E.coli*-Stämme um ein Vielfaches verbessert werden. Durch die zusätzliche Entwicklung eines Zulaufverfahrens für die Herstellung von *E.coli* BL21 LB-ADH MV-FDH ließ sich die Raum-Zeit-Ausbeute an Biomasse gegenüber dem Satzverfahren um 70 % verbessern, bezogen auf die Aktivitäten von ADH und FDH sogar verdoppeln.

Die Abschätzung der Biokompatibilität von insgesamt 21 nicht mit Wasser mischbaren ionischen Flüssigkeiten (Tabelle 13.2) erfolgte über die Bestimmung der Membranintegrität mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Methoden. Da allerdings nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Ergebnisse aufgrund einer bisher unbekanntem Interaktion mit einzelnen Ionspezies verfälscht werden, können diese Resultate zur Beurteilung ionischer Flüssigkeiten nur begrenzt herangezogen werden. Aufgrund fehlender Alternativen muss daher eine Abschätzung der Biokompatibilität über die Ausbeuten exemplarischer Biotransformationen erfolgen.

Hinsichtlich ihrer Verteilungskoeffizienten für verschiedene prochirale Ketone (Tabelle 13.3) zeigen alle ionischen Flüssigkeiten mit Verteilungskoeffizienten von  $\log D = 2,5 - 3$  eine gute Eignung. Die deutlich geringer ausfallenden Produkt-spezifischen Verteilungskoeffizienten erlauben dagegen eine Differenzierung. Demnach sind ionische Flüssigkeiten mit [FAP]-Anion den korrespondierenden mit [PF6]- bzw. [NTF]-Anion unterlegen.

**Tabelle 13.2** In dieser Arbeit verwendete ionische Flüssigkeiten.

Kation	Anion	Kation	Anion	Kation	Anion
[BMIM]	[PF6]	[HMIM]	[FAP]	[(MOE)MPL]	[FAP]
[HMIM]	[PF6]	[EWTMG]	[FAP]	[(NEMM)MOE]	[NTF]
[BMIM]	[NTF]	[(E2OH)MIM]	[NTF]	[(NEMM)MOE]	[FAP]
[HMIM]	[NTF]	[(EOE)MMO]	[NTF]	[(EO2E)MPL]	[NTF]
[BMPL]	[NTF]	[(MOP)MPI]	[NTF]	[(EO2E)MPL]	[FAP]
[HMPL]	[NTF]	[(P3OH)PYR]	[NTF]	[(NEMM)EO2E]	[NTF]
[BMPL]	[FAP]	[(MOE)MPL]	[NTF]	[(NEMM)EO2E]	[FAP]

Sämtliche Edukte und Produkte der sechs berücksichtigten Reaktionssysteme (Tabelle 13.3) ließen sich in den untersuchten ILs bis mindestens 600 mM lösen. Somit war es in den späteren Biotransformationen auch möglich, die Edukte in einer entsprechend hohen Konzentration in der ionischen Flüssigkeit vorzulegen.

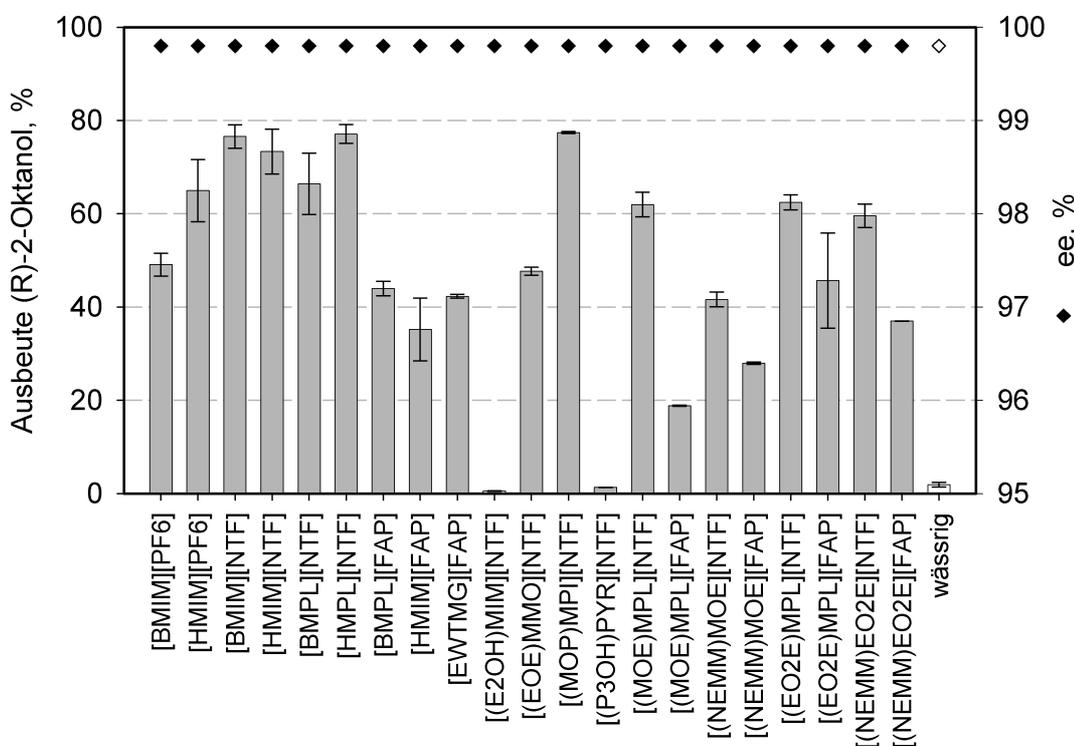
**Tabelle 13.3** In dieser Arbeit berücksichtigte asymmetrische Keton-Reduktionen.

prochirales Keton		chiraler Alkohol
4-Chlor-Acetophenon	————→	(R)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol
$\alpha$ -Chlor-Acetophenon	————→	(S)- $\alpha$ -Chlor-1-Phenylethanol
Acetophenon	————→	(R)-1-Phenylethanol
Propiophenon	————→	(R)-1-Phenyl-1-Propanol
4-Chlor-Acetessigsäureethylester	————→	(S)-4-Chlor-3-Hydroxybuttersäureethylester
2-Oktanon	————→	(R)-2-Oktanol

Zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit unterschiedlicher Cofaktorregenerierungssysteme wurden exemplarische Biotransformationen mit den in Tabelle 13.1 aufgelisteten rekombinanten *E.coli*-Stämmen durchgeführt. Die asymmetrische Reduktion von 4-Chlor-Acetophenon zu (R)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol diente als Referenzreaktionssystem. Wie erwartet konnte bestätigt werden, dass sich GDH für eine Ganzzell-Biotransformation nicht eignet, da Glukose beim Transport über die Zellmembran zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert wird und somit für GDH nur zugänglich ist, wenn eine Schädigung der Zellmembran vorliegt. Die Annahme, dass G6PDH in der Zelle eine bessere Eignung zur Cofaktorregenerierung aufweist, konnte widerlegt werden. Trotz hoher spezifischer Aktivitäten ließen sich nur minimale Ausbeuten erzielen. Die Formiatdehydrogenasen sind dagegen für den Ganzzell-Biokatalysator optimal geeignet. Mit ihnen ließen sich innerhalb von nur einer

Stunde Ausbeuten von 60 % bis 80 % erzielen, bei Enantiomerenüberschüssen von über 99,8 %. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass das für die Regenerierung benötigte Cosubstrat Formiat ohne aktiven Transport direkt von der Zelle aufgenommen wird. Zudem entsteht als einziges Nebenprodukt gasförmiges Kohlendioxid, welches sich nicht im Umsetzungspuffer anreichert und dadurch bewirkt, dass das Gleichgewicht der cofaktorregenerierenden Reaktion auf der Seite von NADH liegt. Gegenüber einer GDH bzw. G6PDH bieten Formiatdehydrogenasen somit entscheidende Vorteile und sollten daher im Ganzzell-Biokatalysator bevorzugt eingesetzt werden.

Die asymmetrische Reduktion der fünf weiteren prochiralen Ketone (Tabelle 13.3) konnte den Nachweis erbringen, dass die Leistungsfähigkeit der Cofaktorregenerierung auch bei der Umsetzung anderer Edukte nicht negativ beeinflusst wird.



**Abbildung 13.2** Chemische Ausbeute an (R)-2-Oktanol und Enantiomerenüberschuss nach einstündiger Umsetzung von 600 mM 2-Oktanon mit 50 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup> *E.coli* BL21 LB-ADH CB-FDH bei 30°C und 350 min<sup>-1</sup> mit 20 % v/v IL im Vergleich zum einphasig-wässrigen Ansatz.

Die in Abbildung 13.2 dargestellten Ausbeuten an (R)-2-Oktanol nach einstündiger Umsetzung von 600 mM 2-Oktanon verdeutlichen, dass von den 21 untersuchten ionischen Flüssigkeiten nur [(E2OH)MIM]- und [(P3OH)PYR][NTF] den Biokatalysator nachhaltig schädigen und daher definitiv nicht für einen Einsatz bei Biotransformationen in Frage kommen. Ionische Flüssigkeiten mit [FAP]-Anion liefern im Allgemeinen deutlich niedrigere

Ausbeuten als die korrespondierenden ILs mit [PF6]- und [NTF]-Anion. Die restlichen 12 ionischen Flüssigkeiten sind dagegen für eine Anwendung geeignet.

Mit der Übertragung der zweiphasig geführten Ganzzell-Biotransformation in den 200 mL-Maßstab konnte bewiesen werden, dass sich die Ergebnisse der 1,4 mL-Biotransformationen auch in einem größeren Maßstab reproduzieren lassen. Beispielsweise ließ sich der chirale Alkohol (R)-4-Cl-PE bei einer asymmetrischen Reduktion von 4-Cl-AP, unter Verwendung von 20 % v/v [BMIM][NTF] mit einer Ausbeute von 99 %, einem Enantiomerenüberschuss von 99,4 % und einer Raum-Zeit-Ausbeute von  $150 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  im einfachen Satzverfahren herstellen. Dieses Beispiel belegt auf eindrucksvolle Weise das große Potential einer zweiphasigen Prozessführung mit ionischen Flüssigkeiten als Eduktreservoir und *in situ*-Extraktionsmittel.

Eine Modellierung der zweiphasig geführten Ganzzell-Biotransformation im Satzverfahren erlaubte die Simulation der extra- und intrazellulären Edukt- und Produkt-Konzentrationen, sowie den Verlauf der Stofftransportgeschwindigkeit und der Enzymkinetik. Die Ergebnisse verdeutlichten, dass der Stofftransport von Edukt aus der wässrigen Phase in die Zelle der reaktionslimitierende Schritt der Ganzzell-Biotransformation ist.

Da keine ökonomische Zielfunktion vorhanden war und daher auch keine Prozessoptimierung erfolgen konnte, erfolgte mit Hilfe des identifizierten Modells eine Variablenstudie anhand eines Referenzprozesses. Die Simulation unterschiedlicher Reaktionsbedingungen konnte zeigen, dass durch die Auswahl einer ionischen Flüssigkeit mit einem niedrigeren Verteilungskoeffizienten oder durch die Erhöhung der Eduktstartkonzentration bzw. Biokatalysator-Konzentration sich die Stofftransport bedingte Limitierung der Ganzzell-Biokatalyse verringern lässt. Dies setzt allerdings voraus, dass die höheren Edukt- und somit auch Produkt-Konzentrationen in der wässrigen Phase keinen negativen Einfluss auf den Biokatalysator ausüben und dass im Falle einer höheren Biokatalysator-Konzentration dann auch nicht der Stofftransport aus der IL in die wässrige Phase limitierend für die Biokatalyse wird. Ein höherer Phasenanteil an ionischer Flüssigkeit ist zu wählen, wenn aufgrund der Restlöslichkeit von IL in Wasser der Verlust bei mehrfachen Einsatz der IL minimiert werden soll. In dem Fall sollte dann aber auch die Biokatalysator-Konzentration erhöht werden. Entsprechende Simulationen haben den Nachweis erbracht, dass eine Erhöhung des IL-Phasenanteils auf 50 % in Kombination mit einer Anhebung der Biomasse-Konzentration dann auch die Raum-Zeit-Ausbeute der Biotransformation deutlich verbessern könnte.

### *Ausblick*

Die Simulation der zweiphasig geführten Ganzzell-Biotransformation im einfachen Satzverfahren mit ionischen Flüssigkeiten als Eduktreservoir und *in situ*-Extraktionsmittel hat weitere Optimierungspotentiale hinsichtlich verschiedener Prozessparameter aufzeigen können. Da eine experimentelle Validierung aber noch aussteht, sollte durch exemplarische Biotransformation überprüft werden, ob und inwieweit sich in der Praxis von den vorhergesagten Strategien profitieren lässt.

Aufgrund ihres hohen Preises gelten ionische Flüssigkeiten als Investitionsgut, die eine Wiederverwendung erfordern. Dies setzt allerdings voraus, dass eine möglichst schonende Produktabtrennung erfolgt, die zu keiner nachteiligen Veränderung der ionischen Flüssigkeit führt. Bei der wiederholten Wiederverwendung der IL darf zudem keine Störstoff-Akkumulation auftreten, die die Effizienz der Biotransformation einschränkt. Außerdem sollten die Verluste an ionischer Flüssigkeit über die wässrige Phase minimiert werden. Dies könnte zum einen durch die Auswahl von ILs mit besonders niedriger Restlöslichkeit in Wasser geschehen oder aber durch eine Anhebung des IL-Phasenverhältnisses.

Aber auch mit einer niedrigen Restlöslichkeit werden ionische Flüssigkeiten im Allgemeinen mit der wässrigen Phase immer über die Prozessgrenzen hinaus ausgetragen. Die Bioabbaubarkeit der ionischen Flüssigkeiten ist daher ein weiterer wichtiger Aspekt, der bei zukünftigen Untersuchungen stärkere Berücksichtigung finden sollte, um eine spätere Akkumulation in der Umwelt zu vermeiden. Da in der Literatur bezüglich der Abbaubarkeit noch keine ausreichenden Daten publiziert worden sind, kann eine dahingehende Bewertung der ionischen Flüssigkeiten bisher noch nicht erfolgen.

Um optimale Betriebspunkte über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten zu können, sollte es zudem das langfristige Ziel sein, ein kontinuierliches Verfahren zu entwickeln. Dies würde gleichzeitig auch die Möglichkeit bieten, die Raum-Zeit-Ausbeute nochmals wesentlich zu erhöhen. Hier kommt neben der Minimierung der IL-Verluste besonders der Stabilität der eingesetzten Ganzzell-Biokatalysatoren eine besondere Bedeutung zu. Zudem wird zu untersuchen sein, inwieweit sich nach einer längeren Prozessdauer die Phasentrennung sowie die Abtrennung des Biokatalysators von der ionischen Flüssigkeit allein durch das natürliche Schwerfeld umsetzen lässt.

## 14 Literaturverzeichnis

**Adams MJ**, Basak AK, Gover S, Rowland P, Levy HR (1993): Site-directed mutagenesis to facilitate X-ray structural studies of *Leuconostoc mesenteroides* glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Prot Sci* 2, 859-862.

**Aki SNVK**, Brennecke JF, Samanta A (2001): How polar are room-temperature ionic liquids? *Chem Commun* 413-414.

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

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

**Anthony JL**, Maginn EJ, Brennecke JF (2001): Solution Thermodynamics of Imidazolium-Based Ionic Liquids and Water. *J Phys Chem B* 105, 10942-10949.

**Baumann MD**, Daugulis AJ, Jessop PG (2005): Phosphonium ionic liquids for degradation of phenol in a two-phase partitioning bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 67, 131-137.

**Bertau M, Burli M** (2000): Enantioselective microbial reduction with baker's yeast on an industrial scale. *Chimia* 54(9), 503-507.

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

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

**Bisswanger H** (2000): Enzymkinetik – Theorie und Methoden- Wiley-VCH, Weinheim, 126-131.

**Blattner FR**, Plunkett III G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden

MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y (1997): The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, no. 5331, 1453-1462.

**Blommel PG**, Becker K, Fx BG (2006): Factorial Design Improvement of Auto-Induction Media. Poster: [http://www.uwstructuralgenomics.org/presentations/PPCW\\_06\\_blommel\\_poster.pdf](http://www.uwstructuralgenomics.org/presentations/PPCW_06_blommel_poster.pdf)

**Bommarius AS**, Riebel BR (2004): Biocatalysis. Wiley-VCH, Weinheim, 1-14.

**Boon JA**, Levisky JA, Pflug JL, Wilkes JS (1986): Friedel-Crafts reactions in ambient-temperature molten salts. *J Org Chem* 51, 480-483.

**Bonhôte P**, Dias AP, Papageorgiou N, Kalyanasundaram K, Grätzel M (1996): Hydrophobic Highly Conductive Ambient-Temperature Molten Salts. *Inorg Chem* 35, no. 5, 1168-1178.

**Bränden CJ**, Jörnvall H, Eklund H, Furugren B (1975): Alcohol dehydrogenases, 103-190. In Boyer PD (ed.): The enzymes, 3<sup>rd</sup> ed, Vol11. Academic Press, New York, NY.

**Breuer M**, Ditrich K, Habicher T, Hauer B, Keßeler M, Stürmer R, Zelinski T (2004): Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angew Chem Int Ed Engl* 43(7), 788-824.

**Buque EM**, Chin-Joe I, Straathof AJJ, Jongejan JA, Heijnen JJ (2002): Immobilization affects the rate and enantioselectivity of 3-oxo ester reduction by baker's yeast. *Enzyme Microb Technol* 31(5), 656-664.

**Chemgapedia:** <http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/stoffwechsel/glykolyse.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/stoffwechsel/glykolyse/ablauf.vscml.html>

**Chin-Joe I**, Haberland J, Straathof AJJ, Jongejan JA, Liese A, Heijnen JJ (2002): Reduction of ethyl 3-oxobutanoate using non-growing baker's yeast in a continuously operated reactor with cell retention. *Enzyme Microb Tech* 31(5):665-672.

**Cornmell RJ**, Winder CL, Schuler S, Goodacre R, Stephens G (2008): Using a biphasic ionic liquid/water reaction system to improve oxygenase-catalysed biotransformation with whole cells. *Green Chem* 10 685-691.

**Cross J** (1994): Introduction to Cationic Surfactants. *Cationic Surfactants: Analytical and Biological Evaluation*, ed. Cross J, Singer EJ, Marcel Dekker, New York, 3-28.

**Cull SG**, Holbrey JD, Vargas-Mora V, Seddon KR, Lye GJ (2000): Room-Temperature Ionic Liquids as Replacements for Organic Solvents in Multiphase Bioprocess Operations. *J Biotechnol Bioeng* 69, 227-233.

**Dörfler HD** (1994): Grenzflächen und Kolloidchemie. Wiley-VCH, Weinheim, 13-42.

**Eckstein M**, Villela Filho M, Liese A, Kragl U (2004): Use of an ionic liquid in a two-

phase-system to improve an alcohol dehydrogenase catalysed reduction. *Chem Commun* 1084-1085.

**Ernst M**, Kaup B, Müller M, Bringer-Meyer S, Sahm H (2005): Enantioselective reduction of carbonyl compounds by whole-cell biotransformation, combining a formate dehydrogenase and a (R)-specific alcohol dehydrogenase. *Appl Microbiol Biotechnol* 66, 629-634.

**Faber K** (1997): Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook. Springer Verlag, Berlin, 1-24.

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

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

**Fry SE**, Pienta JN (1985): Effects of molten-salts on reactions-nucleophilic aromatic-substitution by halide-ions in molten dodecyltributylphosphonium salts. *J Am Chem Society* 107, 6399 – 6400.

**Fujita Y**, Ramaley R, Freese E (1977): Location and Properties of Glucose Dehydrogenase in Sporulating Cells and Spores of *Bacillus subtilis*. *J Biol* 132(1), 282-293.

**Galkin A**, Kulakova L, Tishkov V, Esaki N, Soda K (1995): Cloning of formate dehydrogenase gene from a methanol-utilizing bacterium *Mycobacterium vaccae* N10. *Appl Microbiol Biotechnol* 44, 479-483.

**Ganzhorn AJ**, Green DW, Hershey AD, Gould RM, Plapp BV (1987): Kinetic characterization of Yeast Alcohol Dehydrogenases. *J Biolog Chem* 262, 8, 3754-3761.

**Garcia MT**, Gathergood N, Scammels PJ (2005): Biodegradable ionic liquids – Part II. Effect of the anion and toxicology. *Green Chem* 7, 9-14.

**Goldberg K**, Edegger K, Kroutil W, Liese A (2006): Overcoming the thermodynamic limitation in asymmetric hydrogen transfer reactions catalyzed by whole cells. *Biotechnol Bioeng* 95(1),192-198.

**Goldberg K**, Schroer K, Lütz S, Liese A (2007): Biocatalytic ketone reduction – a powerful tool for the production of chiral alcohols – part II: whole cell reductions. *Appl Microbiol Biotechnol* 76, 249-255.

**Gordon CM** (2001): New developments in catalysis using ionic liquids. *Appl Catalysis A* 222, 102-117.

**Green KD**, Gill IS, Khan JA, Vulfson EN (1996): Microencapsulation of yeast cells

and their use as a biocatalyst in organic solvents. *Biotechnol Bioeng* 49(5), 535-543.

**Gröger H**, Chamouleau F, Orologas N, Rollmann C, Drauz K, Hummel W, Weckbecker A, May O (2006): Enantioselective reduction of ketones with „Designer cells“ at high substrate concentrations: Highly efficient access to functionalized optically active alcohols. *Angew Chem Int Ed* 45(34), 5677-5681.

**Gupta A**, Tschentscher A, Bobkova M (2007): Verfahren zur enantioselektiven enzymatischen Reduktion von Ketoverbindungen. Patent WO/2007/036257.

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

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

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

**Hildebrandt P**, Musidlowska A, Bornscheuer UT, Altenbuchner J (2002): Cloning, functional expression and biochemical characterization of a stereoselective alcohol dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens* DSM50106. *Appl Microbiol Biotechnol* 59(4-5), 483-487.

**Himeda Y**, Onozawa-Komatsuzaki N, Sugihara H, Arakawa H, Kasuga K (2003): Transfer hydrogenation of a variety of ketones catalyzed by rhodium complexes in aqueous solution and their application to asymmetric reduction using chiral Schiff base ligands. *J Mol Catal A Chem* 195(1-2), 95-100.

**Holbrey JD**, Rogers RD (2003): Physicochemical Properties of Ionic Liquids. *Ionic Liquids in Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, 41-55.

**Holtzhauer M** (1997): Biochemische Labormethoden. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 191-203.

**Honda K**, Ishige T, Kataoka M, Shimizu S (2006): Microbial and Enzymatic Processes for the Production of Chiral Compounds. *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries* 529–546, Taylor and Francis, New York.

**Howarth J**, James P, Dai J (2001): Immobilized Baker's yeast reduction of ketones in an ionic liquid, [bmim]PF<sub>6</sub> and water mix. *Tetrahedron Lett* 42, 7517-7519.

**Hummel W**, Riebel B (2000): Alcohol dehydrogenase and its use for the enzymatic production of chiral hydroxyl compounds. US-Patent US6037158.

**Ishige T**, Honda K, Shimizu S (2005): Whole organism biocatalysis. *Curr Op Chem Biol* 9 174-180.

**Itakura K**, Hirose T, Crea R, Riggs AD, Heyneker HL, Bolivar F, Boyer HW (1977): Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science* 198, no.4321, 1056-063.

**Jenzsch M**, Gnoth S, Beck M, Kleinschmidt M, Simutis R, Lübbert A (2006): Open-loop control of the biomass concentration within the growth phase of recombinant protein production processes. *J Biotechnol* 127, 84-94.

**Kaar JL**, Jesionowski AM, Berberich JA, Moulton R, Russell AJ (2003): Impact of ionic liquid physical properties on lipase activity and stability. *J Am Chem Soc* 125, 4125-4131.

**Kaftzik N**, Wasserscheid P, Kragl U (2002): Use of ionic liquids to increase the yield and enzyme stability in the  $\beta$ -galactosidase catalysed synthesis of N-acetyllactosamine. *Organ Proc Res Dev* 6, 553-557.

**Kato N**, Sahm H, Wagner F (1979): Steady-state kinetics of formate dehydrogenase and formate dehydrogenase from a methanol-utilizing yeast, *Candida boidinii*. *Biochim Biophys Acta* 566, 12-20.

**Kim KW**, Song B, Choi MY, Kim MJ (2001): Biocatalysis in ionic liquids: markedly enhanced enantioselectivity of lipase. *Org Lett* 3, 1507-1509.

**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. *Appl microbiol biotechnol* 55(5), 590-595.

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

**Kohlmann C**, Greiner L, Lütz S (2008): *persönliche Mitteilung*.

**Kopetzki E**, Schumacher G (1988): Method for the production of proteins in soluble form. Patent EP0300425.

**Korz DJ**, Rinas U, Hellmuth K, Sanders EA, Deckwer WD (1995): Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 39, 59-65.

**Kosjek B**, Stampfer W, Pogorevc M, Goessler W, Faber K, Kroutil W (2004): Purification and Characterization of a Chemotolerant Alcohol Dehydrogenase Applicable to Coupled Redox Reactions. *Biotechnol Bioeng* 86, 1, 55-62.

**Kragl U**, Eckstein M, Kaftzik N (2002): Enzyme catalysis in ionic liquids. *Curr Opin Biotechnol* 13, 55-571.

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

**Lampel KA**, Uratani B, Chaudhry GR, Ramaley RF, Rudikoff S (1986):

Characterization of the Developmentally Regulated *Bacillus subtilis* Glucose Dehydrogenase Gene. *J Bacteriol* 166(1), 238-243.

**Lau RM**, van-Rantwijk F, Seddon KR, Sheldon RA (2000): Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids. *Organ Lett* 2, 4189-4191.

**Lengeler JW**, Drews G, Schlegel HG (1999): Biology of the Prokaryotes. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 51-52, 55-58, 125, 209-210.

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

**Liese A**, Seelbach K, Wandrey C (2000<sup>a</sup>): Industrial Biotransformations. Wiley VCH, Weinheim, 58-63, 98-171.

**Liese A**, Villela Filho M (2000<sup>b</sup>): Production of fine chemicals using biocatalysis. *Curr Opin Biotech* 10, 6, 595-603.

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

**Lou WY**, Zong MH, Smith TJ (2006): Use of ionic liquids to improve whole-cell biocatalytic asymmetric reduction of acetyltrimethylsilane for efficient synthesis of enantiopure (S)-1-trimethylsilylethanol. *Green Chem* 8, 147-155.

**Lozano1 P**, de Diego T, Guegan JP, Vaultier M, Iborra JL (2001): Stabilization of a  $\alpha$ -chymotrypsin by ionic liquids in transesterification reactions. *Biotechnol Bioeng* 75, 563-569.

**Lozano2 P**, de Diego T, Carrie D, Vaultier M, Iborra JL (2001): Overstabilization of *Candida Antarctica* lipase B by ionic liquids in ester synthesis. *Biotechnol Lett* 23, 1529-1533.

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

**Matsuda T**, Yamagishi Y, Koguchi S, Iwai N, Kitazume T (2006): An effective method to use ionic liquids as reaction media for asymmetric reduction by *Geotrichum candidum*. *Tetrahedron Lett* 47, 4619-4622.

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

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

**Maurel C**, Reizer J, Schroeder JI, Chrispeels MJ, Saier Jr MH (1994): Functional

characterization of the Escherichia coli glycerol facilitator, GlpF, in Xenopus oocytes. *J Biol Chem* 269 (16), 11869-11872.

**Meindersma GW**, Maase M, De Haan AB (2007): Ionic Liquids. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

**Michaelis L**, Menten ML (1913): Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem*, Berlin 49, 333-369.

**Michal G** (1999): Biochemical Pathways. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 117-118.

**Muldoon MJ**, Gordon CM, Dunkin IR (2001): Investigations of solvent-solute interactions in room temperature ionic liquids using solvatochromic dyes. *J Chem Soc, Perkin Trans 2*, 433-435.

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

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

**Nanduri VB**, Hanson RL, Goswami A, Wasylyk JM, LaPorte TL, Katipally K, Chung HJ, Patel RN (2001): Biochemical Approaches to the Synthesis of Ethyl 5-(S)-Hydroxyhexanoate and 5-(S)-Hydroxyhexanenitril. *Enzyme Microb Tech* 28, 632-636.

**Nernst W** (1891): Verteilung eines Stoffes zwischen zwei Lösungsmitteln und zwischen Lösungsmittel und Dampfraum. *Z phys Chem* 8(1), 110-139.

**Niefind K**, Müller J, Riebel B, Hummel W, Schomburg D (2003): The crystal structure of R-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* suggests the structural basis of its metal dependency. *J Mol Biol* 327(2), 317-328.

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

**Olive C**, Levy HR (1971<sup>a</sup>): Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* PHYSICAL STUDIES. *J Biol Chem* 246(7), 2043-2046.

**Olive C**, Levy HR (1971<sup>b</sup>): Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* KINETIC STUDIES. *J Biol Chem* 246(7), 2047-2057.

**Park S**, Kazlauskas RJ (2001): Improved preparation and use of room-temperature ionic liquids in lipase-catalyzed enantio- and regioselective acylations. *J Org Chem* 66, 8395-8401.

**Park S**, Kazlauskas RJ (2003): Biocatalysis in ionic liquids – advantages beyond green technology. *Curr Opin Biotechnol* 14, 432-437.

**Patel RN**, McNamee CG, Banerjee A, Howell JM, Robinson RS, Szarka LJ (1992): Stereoselective Reduction of  $\beta$ -Keto Esters by *Geotrichum candidum*. *Enzyme Microb Tech* 14, 731-738.

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

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

**Pfründer H**, Amidjojo M, Kragl U, Weuster-Botz D (2004): Efficient Whole-cell Biotransformations in a Biphasic Ionic Liquid/Water System. *Angew Chem Int Ed* 43, 4529-4531.

**Pfründer H** (2005): Ganzzell-Biokatalyse in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten. *Dissertation*, Technische Universität München.

**Pfründer H**, Jones R, Weuster-Botz D (2006): Water immiscible ionic liquids as solvents for whole cell biocatalysis. *J Biotechnol* 124, 182-190.

**Plapp BV**, Brooks RL, Shore JD (1973): Horse Liver Alcohol Dehydrogenase. *J Biol Chem* 248, 10, 3470-3475.

**Popov VO**, Lamzin VS (1994): NAD<sup>+</sup>-dependent formate dehydrogenase. *Biochem J* 302, 625-643.

**Ramaley RF**, Vasantha N (1983): Glycerol protection and purification of *Bacillus subtilis* glucose dehydrogenase. *J Biol Chem* 258, 12558-12565.

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

**Ranke J** (2007): Wasserlöslichkeit von ionischen Flüssigkeiten, bestimmt per HPLC gemäß OECD Guideline 105. *Persönliche Mitteilung*.

**Ranke J**, Müller A, Bottin-Weber U, Stock F, Stolte S, Arning J, Störmann R, Jastorff B (2007): Lipophilicity parameters for ionic liquid cations and their correlation to in vitro cytotoxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67, 3, 430-438.

**Ranke, J**, Othman A, Fan P, Müller AB (2008): Explaining Ionic Liquid Water Solubility In Terms of Cation and Anion Hydrophobicity. *In Druck*.

**Rautenstrauch V**, Hoang-Cong X, Churlaud R, Abdur-Rashid K, Morris RH (2003):

Hydrogenation versus transfer hydrogenation of ketones: Two established ruthenium systems catalyze both. *Chemistry-A European Journal* 9(20), 4954-4967.

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

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

**Robinson J**, Osteryoung RA (1979): An Electrochemical and Spectroscopic Study of Some Aromatic Hydrocarbons in the Room Temperature Molten Salt System Aluminum Chloride-n-Butylpyridinium Chloride. *J Am Chem Soc* 101, 323-327.

**Rodriguez S**, Kayser MM, Stewart JD (2001): Highly stereoselective reagents for beta-keto ester reductions by genetic engineering of baker's yeast. *J Am Chem Soc* 123(8), 1547-1555.

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

**Rosen TC**, Daußmann T (2004): Biocatalyst vs. Chemical Catalyst for asymmetric reduction. *Chim. Oggi/Chemistry Today* [Suppl. on Chiral catalysis], 43-45.

**Rowland P**, Basak AK, Gover S, Levy HR, Adams MJ (1994): The three-dimensional structure of glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* refined at 2.0 Å resolution. *Structure* 2(11), 1073-1087.

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

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

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

**Schroer K**, Tacha E, Lütz S (2007): Process Intensification for Substrate-Coupled Whole Cell Ketone Reduction by In Situ Acetone Removal. *Org Process Res Dev* 11, 836-841.

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

**Seddon KR** (1999): Ionic Liquids: Designer Solvents? *The international George Papatheodorou Symposium: Proceedings*, Patras, 131-135.

**Sheldon RA**, Lau RM, Sorgedraeger MJ, van-Rantwijk F, Seddon KR (2002): Biocatalysis in ionic liquids. *Green Chem* 4, 147-151.

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

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

**Stolte S**, Arning J, Bottin-Weber U, Müller A, Pitner WR, Welz-Biermann U, Jastorff B, Ranke J (2007<sup>a</sup>): Effects of different head groups and functionalised side chains on the cytotoxicity of ionic liquids. *Green Chem* 9, 760-767.

**Stolte S**, Matzke M, Arning J, Bösch A, Pitner WR, Welz-Biermann U, Jastorff B, Ranke J (2007<sup>b</sup>): Effects of different head groups and functionalised side chains on the aquatic toxicity of ionic liquids. *Green Chem* 9, 1170-1179.

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

**Struhalla M**, Fietz C (2005): Feinchemie braucht Weiße Biotechnologie. *Transkript* 12(11), 47-48.

**Studier W** (2005): Protein induction by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expr Purif* 42, 207-234.

**Suarez PAZ**, Einloft S, Dullius JEL, De Souza RF, Dupont J (1998): Synthesis and physical-chemical properties of ionic liquids based on 1-n-butyl-3-methylimidazolium cation. *J Chim Phys Phys-Chim Biol* 95, 1626-1639.

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

**Tan AWI**, Fischbach M, Huebner H, Buchholz R, Hummel W, Daußmann T, Wandrey C, Liese A (2006): Synthesis of Enantiopure (5R)-Hydroxyhexane-2-one with Immobilized Whole Cells of *Lactobacillus kefir*. *Appl Microbiol Biotechnol* 71, 289-293.

**Techalive**: [http://techalive.mtu.edu/meec/module03/images/e\\_coli.gif](http://techalive.mtu.edu/meec/module03/images/e_coli.gif)

**Tishkov VI**, Popov VO (2004): Catalytic Mechanism and Application of Formate Dehydrogenase. *Biochem (Moscow)* 69(11), 1252-1267.

**van-Rantwijk F**, Lau RM, Sheldon RA (2003): Biocatalytic transformations in ionic liquids. *Trends Biotechnol* 21, 3, 131-138.

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

**Walden P** (1914): Über die Molekulargröße und elektrische Leitfähigkeit einiger geschmolzener Salze. *Bull Acad Impér Sci St Petersburg*, 405-422.

**Wasserscheid P**, Keim W. (2000): Ionic Liquids – New „Solutions“ for Transition Metal Catalysis. *Angew Chem Int Ed* 39, 3772-3789.

**Wasserscheid P**, Boesmann A, Van Hal R (2003): Halogenfreie Ionische Flüssigkeiten. Patent WO/2003/074494

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

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

**Weuster-Botz D**, Puskeiler R, Kusterer A, Kaufmann K, John GT, Arnold M (2005): Methods and milliliter scale devices for high-throughput bioprocess design. *Bio-process Biosyst Eng* 28, 109-119.

**Weuster-Botz D** (2007): Process Intensification of Whole-Cell Biocatalysis with Ionic Liquids. *Chem Rec* 6, 334-340.

**Wilkes JS**, Zaworotko MJ (1992): Air and water stable 1-ethyl-3-methylimidazolium based ionic liquids. *J Chem Soc Chem Commun.* (13), 965-967.

**Wills M**, Hannedouche J (2002): New methodology for the asymmetric reduction of ketones. *Curr Opin Drug Discov Dev* 5(6), 881-891.

**Yang Z**, Pan W (2005): Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis. *Enz Microb Technol* 37, 19-28.

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

## 15 Abkürzungsverzeichnis

**Tabelle 15.1** Für die Kationen ionischer Flüssigkeiten verwendete Abkürzungen

<b>Kation</b>	
[BMIM]	1-Butyl-3-methylimidazolium
[HMIM]	1-Hexyl-3-methylimidazolium
[BMPL]	1-Butyl-1-methylpyrrolidinium
[HMPL]	1-Hexyl-1-methylpyrrolidinium
[EWTMG]	N,N,N',N'-Tetramethyl-N''-ethylguanidinium
[(E2OH)MIM]	1-(2-Hydroxyethyl)-3-methylimidazolium
[(EOE)MMO]	4-(2-Ethoxyethyl)-4-methylmorpholinium
[(MOP)MPI]	1-(3-Methoxypropyl)-1-methylpiperidinium
[(P3OH)PYR]	N-(3-hydroxypropyl)pyridinium
[(MOE)MPL]	1-(2-Methoxyethyl)-1-methylpyrrolidinium
[(NEMM)MOE]	Ethyl-dimethyl-2-methoxyethylammonium
[(EO2E)MPL]	1-(Ethoxycarbonyl)methyl-1-methylpyrrolidinium
[(NEMM)EO2E]	Ethyl-dimethyl-(ethoxycarbonyl)methylammonium

**Tabelle 15.2** Für die Anionen ionischer Flüssigkeiten verwendete Abkürzungen

<b>Anion</b>	
[PF6]	Hexafluorosphat
[NTF]	Bis(trifluormethylsulfonyl)imid
[FAP]	Tris(pentafluorethyl)trifluorosphat

**Tabelle 15.3** Abkürzungen chemischer Formeln, Namen, etc.

<b>Abkürzung</b>	
ADH	Alkoholdehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
AP	Acetophenon
ATP	Adenosintriphosphat
[BF <sub>4</sub> ]	Tetrafluorborat
BS	<i>Bacillus subtilis</i>
C	Kohlenstoff
CB	<i>Candida boidinii</i>
CR	Carbonylreduktase
CRE	Cofaktor regenerierendes Enzym
4-Cl-ACE	4-Chlor-Acetessigsäureethylester
$\alpha$ -Cl-AP	$\alpha$ -Chlor-Acetophenon
4-Cl-AP	4-Chlor-Acetophenon
4-Cl-HBE	4-Chlor-3-Hydroxybuttersäureethylester
4-Cl-PE	1-(4-Chlor-Phenyl)ethanol
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
EC <sub>50</sub>	effektive Konzentration
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)
FADH <sub>2</sub>	Flavin-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
FDH	Formiatdehydrogenase
GC	Gaschromatographie
GDH	Glukosedehydrogenase
G6PDH	Glukose-6-Phosphatdehydrogenase
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser

HPLC	Hochdruck-Flüssigchromatographie
IL	Ionische Flüssigkeit
KP <sub>i</sub> -Puffer	Kaliumphosphat-Puffer
LB	<i>Lactobacillus brevis</i>
LB-Medium	Luria broth, Komplexmedium
LM	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
[MeSO <sub>4</sub> ]	Methylsulfat
[MMIM]	1-Methyl-3-methylimidazolium
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -Butylether
MV	<i>Mycobacterium vaccae</i>
NAD(P) <sup>+</sup>	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid(phosphat) (oxidierte Form)
NAD(P)H	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid(phosphat) (reduzierte Form)
O <sub>2</sub>	molekularer Sauerstoff
PE	1-Phenylethanol
PP-ON	Propiophenon
PP-OH	1-Phenyl-1-Propanol
RT	Raumtemperatur
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
% v/v	Volumenprozent

---

**Tabelle 15.4** Prozessgrößen der Ganzzell-Biokatalyse und des mikrobiellen Wachstums

Abkürzung / Symbol	Einheit	Begriff
A	-	Absorption
b	m	Länge des Lichtwegs
c	g L <sup>-1</sup> oder mol L <sup>-1</sup>	Konzentration
EA	U = μmol min <sup>-1</sup>	Enzymaktivität
ee	%	Enantiomerenüberschuss
f <sub>x</sub>	g <sub>BTM</sub> L <sup>-1</sup> OD <sup>-1</sup>	Korrelationsfaktor

---

---

$k_{La}$	$s^{-1}$	volumetrischer Stoffübergangskoeffizient
$K_S$	$mol\ L^{-1}$	Sättigungskonzentration
$\log D$	-	Verteilungskoeffizient IL/Puffer
$\log P$	-	Verteilungskoeffizient n-Oktanol/Wasser
$m$	$g$	Masse
$\dot{m}$	$g\ h^{-1}$	Zudosierungsrate (Massestrom)
$M$	$mol\ L^{-1} = M$	Molarität
$n$	- oder mol	Zellzahl oder Stoffmenge
$OD$	-	optische Dichte
$OTR$	$mol\ L^{-1}\ h^{-1} = g\ L^{-1}\ h^{-1}$	Sauerstofftransferrate
$OUR$	$mol\ L^{-1}\ h^{-1} = g\ L^{-1}\ h^{-1}$	Sauerstoffaufnahme
$PBK$	$mol\ g_{BTM}$	Produktbildungskapazität
$pO_2$	%	Sauerstoffpartialdruck
$q$	$g\ g_{BTM}\ h^{-1}$	Aufnahmerate
$RZA$	$g\ L^{-1}\ h^{-1}$	Raum-Zeit-Ausbeute
$RZA_{EA}$	$U\ L^{-1}\ h^{-1}$	Raum-Zeit-Ausbeute der Enzymaktivität
$t$	s oder min	Zeit
$t_d$	s	Verdopplungszeit
$V$	L	Volumen
$\dot{V}$	$L\ h^{-1}$	Volumenstrom
$\nu$	-	stöchiometrischer Faktor
$V_{mol}$	$L\ mol^{-1}$	Molvolumen idealer Gase
$X_E$	%	Umsatz
$x$	%	Gasanteil in Luft Molenbruch
$Y_{X,S}$	$g_{BTM}\ g^{-1}$	Ertragskoeffizient
$\epsilon$	$L\ mol^{-1}\ mm^{-1}$	molarer Extinktionskoeffizient
$\eta_P$	%	Ausbeute
$\mu$	$h^{-1}$	spezifische Wachstumsrate

---

**Tabelle 15.5** Indizes der Prozessgrößen der Ganzzell-Biokatalyse und des mikrobiellen Wachstums

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

**Tabelle 15.6** Größen der Tropfenbildung, des Stofftransports und der enzymatischen Reaktion

Abkürzung / Symbol	Einheit	Begriff
a	$m^{-1}$	spezifische Phasengrenzfläche
A	$cm^2$	Zellmembranoberfläche
c	$g L^{-1}$ oder $mol L^{-1}$	Konzentration
c*	$g L^{-1}$ oder $mol L^{-1}$	Gleichgewichtskonzentration
D (logD)	-	Verteilungskoeffizient
d	cm	Membrandicke
d <sub>32</sub>	m	Sauterdurchmesser
D	$m^2 s^{-1}$	Diffusionskoeffizient
d <sub>R</sub>	m	Rührerdurchmesser
D <sub>R</sub>	m	Innendurchmesser des Rührkesselreaktors
ETR <sub>max</sub>	$mol L^{-1} s^{-1}$	Edukttransferrate

---

Fr	-	Froudezahl
g	$\text{m s}^{-1}$	Erdbeschleunigung
h	m	Einbauhöhe des Rührers vom Reaktorboden
H	m	Höhe des Rührkesselreaktors
J	$\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$	Permeations-Flußdichte
k	$\text{s}^{-1}$	Geschwindigkeitskonstante
K	-	Verteilungskoeffizient
$K_m$	$\text{mol L}^{-1}$	Halbsättigungskonzentration
$K_i$	$\text{mol L}^{-1}$	Dissoziations- oder Hemmkonstante
$K_g$		Gleichgewichtskonstante
MG	$\text{g mol}^{-1}$	Molekulargewicht
MV	$\text{L mol}^{-1}$	Molekularvolumen
n	-	Anzahl der Tropfen
$\dot{n}$	$\text{mol s}^{-1}$	Stoffstrom
$N_R$	$\text{s}^{-1}$	Rührerdrehzahl
P	$\text{cm}^3 \text{g}^{0,25} \text{mol}^{-1} \text{s}^{-0,5}$	Parachor
$P_d$	$\text{cm s}^{-1}$	Permeabilitätskoeffizient
$q_3$	$\text{m}^{-1}$	Volumen-Verteilungsdichte
$Q_3$	-	Volumen-Verteilungssumme
Re	-	Reynoldszahl
Sc	-	Schmidzahl
Sh	-	Sherwoodzahl
v	$\text{mol s}^{-1}$	Reaktionsgeschwindigkeit
V	L	Volumen
$V_1$ und $V_2$	$\text{mol s}^{-1}$	Maximalgeschwindigkeit der Reaktion
$V_i$	-	Viskositätskennzahl
We	-	Weberzahl
$\beta$	$\text{m s}^{-1}$	Stoffübergangskoeffizient
$\eta$	Pa s	dynamische Viskosität

---

$\delta_k$	m	Grenzschichtdicke
$\nu$	$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$	kinematische Viskosität
$\rho$	$\text{kg m}^3$	Dichte
$\sigma$	$\text{N m}^{-1} = \text{kg s}^{-2}$	Grenzflächen-, Oberflächenspannung
$\varphi$	-	Phasenanteil
$\Phi$	-	Assoziationsparameter

---

**Tabelle 15.7** Indizes der Tropfenbildung, des Stofftransports und der enzymatischen Reaktion

Index	Begriff
E	Edukt
d	disperse Phase
i	Fraktion i oder Komponente i
k	kontinuierliche Phase
LM	Lösungsmittel
m	Membran
max	Maximalwert unter definierten Bedingungen
P	Produkt
R	Rührer
w	Wasser

---

**Tabelle 15.8** Zur Modellierung verwendete Größen

Abkürzung / Symbol	Einheit	Begriff
$a_x$	$\text{dm}^2 \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$	spezifische Zellmembranfläche
A	$\text{dm}^2$	Zellmembranoberfläche
c	$\text{mol L}^{-1}$	Konzentration
D	-	Verteilungskoeffizient
J	$\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$	Permeations-Flußdichte

---

$J_{\text{BTM}}$	$\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{s}^{-1}$	modifizierte Permeations-Flußdichte
$K_m$	$\text{mol L}^{-1}$	Halbsättigungskonzentration
$\dot{n}$	$\text{mol s}^{-1}$	Stoffstrom
$P_d$	$\text{cm s}^{-1}$	Permeabilitätskoeffizient
$P_{\text{BTM}}$	$\text{L g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{s}^{-1}$	modifizierter Permeabilitätskoeffizient
$t$	s	Zeit
$v$	$\text{mol s}^{-1}$	Reaktionsgeschwindigkeit
$V$	L	Volumen
$v_x$	$\text{L g}_{\text{BTM}}^{-1}$	spezifisches Volumen des Biokatalysators
$\varphi$	-	Phasenanteil

**Tabelle 15.9** Indizes der Tropfenbildung, des Stofftransports und der enzymatischen Reaktion

Index	Begriff
BTM	Biotrockenmasse
E	Edukt
d	disperse Phase
G	Gesamt
H <sub>2</sub> O	Wasser
i	Zeitintervall i
IL	ionische Flüssigkeit
P	Produkt
Z	Zelle

**Tabelle 15.10** Besonderheiten der verwendeten Einheiten

Einheit	Besonderheit
cm	In der Fachliteratur wird für die Bezeichnung einer Länge in den Einheiten der Permeations-Flußdichte, des Diffusionskoeffizienten und des Parachor üblicherweise die Einheit Zentimeter anstelle von Meter verwendet.

dm / dm <sup>2</sup>	Abweichend von der biotechnologischen Fachliteratur wird in dieser Arbeit bei der Modellierung für die Bezeichnung einer Länge / Fläche in den Einheiten der modifizierten Permeations-Flußdichte / der spezifischen Zellmembranfläche die Einheit dm / dm <sup>2</sup> anstelle von m bzw. cm / m <sup>2</sup> bzw. cm <sup>2</sup> verwendet, um eine direkte Verknüpfung der Modell-Gleichungen zu erlauben.
g	In der biotechnologischen Fachliteratur wird für die Bezeichnung einer Masse üblicherweise die Einheit Gramm anstelle von Kilogramm verwendet.
h	In der biotechnologischen Fachliteratur wird für die Bezeichnung einer Zeit in den Einheiten von OUR, OTR, $\mu$ , q üblicherweise die Einheit Stunde anstelle von Sekunde verwendet.
L	In der biotechnologischen Fachliteratur wird die Einheit Liter mit großem L geschrieben, um Verwechslungen mit der Zahl 1 zu vermeiden. Konsequenterweise erfolgt auch die Verwendung von mL, $\mu$ L etc.. Bei der Angabe von Konzentrationen und Volumina ist es üblich, Liter anstelle von Kubikmeter zu verwenden.
M	In der biotechnologischen Fachliteratur wird für die Bezeichnung einer Konzentration gleichwertig die Einheit M (Molarität) oder mol L <sup>-1</sup> verwendet.
min	In der biotechnologischen Fachliteratur wird für die Bezeichnung einer Zeit gleichwertig die Einheit Minute oder Sekunde verwendet.
Units	In der biotechnologischen Fachliteratur wird für die Bezeichnung einer Enzymaktivität häufig noch die Einheit Units verwendet. Die korrekte Einheit lautet allerdings kat (katal) und ist definiert als mol s <sup>-1</sup> .

---

## 16 Anhang

### 16.1 Geräte, Chemikalien und Kultivierungsmedien

#### 16.1.1 Geräte

**Tabelle 16.1** Allgemeine Laborgeräte

Analytische Waage Explorer 10 mg-210 g	Ohaus, Gießen
Analytische Waage Explorer 5 g-32 kg	Ohaus, Gießen
Blutzucker-Messgerät Accu-Chek mit Sensorstäbchen Accu-Chek Sensor Comfort	Roche Diagnostics, Mannheim
Einstrahlphotospektrometer Spectronic Genesys 20	Thermo Electron, Dreieich
Fluoreszenz-Mikrotiterplattenphotometer Fluostar Galaxy	BMG Labtechnologies, Offenburg
Kühlbrutschrank KB 400	Binder, Tuttlingen
Kühlzentrifuge Biofuge Stratos	Kendro-Heraeus, Langenselbold
Mehrfachrührplatz Multipoint 15	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Mehrfachrührplatz Variomag Poly 15	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Mikrotiterplattenphotometer EL 808	Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall
pH-Elektrode BlueLine 14 pH	Schott, Mainz
pH-Meter CG 843	Schott, Mainz
Photospektrometer Genesys 20	Thermo Spectronic, Neuss
Schüttelinkubator Multitron	Infors, Einsbach
Schwingarmmühle MM200	Retsch, Haan
Standzentrifuge Rotixa 50 RS	Hettich, Tuttlingen
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg

Tischzentrifuge Mikro 20	Hettich, Tuttlingen
Trockenschrank E 28	Binder, Tuttlingen

**Tabelle 16.2** Rührkesselreaktor Labfors

Labfors 7,5 L Klein-Fermenter-System (Infors, Einsbach)	5 L maximales Reaktionsvolumen Wassertemperierung über Glasdoppelmantel 3-fach-6-Blattscheibenrührer mechanische Gleitringdichtung, Obenantrieb Schikanenkorb mit 4 Strömungsbrechern Begasungsrohr mit 11 Löchern (0,4 mm Durchmesser) Begasung über Massendurchflussmesser geregelt Reaktorgewicht über eine Waage erfassbar
Software Iris-NT Pro Version 4.11	Infors, Einsbach
pH-Elektrode HA405-DPA-SC-S8	Mettler-Toledo, Giessen
pO <sub>2</sub> -Sensor InPro 6000	Mettler-Toledo, Giessen
Abgasanalytik EasyLine (O <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> )	ABB, Frankfurt
Peristaltische Zulaufpumpe BVP Standard mit Pumpenkopf Master- flex Easy-Load MF 0313/738	Ismatech Laboratoriumstechnik, Wertheim-Mondfeld Marprene-Schlauch: Innendurchmesser 1,6 mm, Wandstärke 1,6 mm (Watson-Marlow, Rommerskirchen)
Zulaufmittel-Waage GC35EDE-S	Sartorius, Göttingen

**Tabelle 16.3** Gaschromatograph, Trennsäulen, Gase

Gaschromatograph CP-3800	Varian, Darmstadt
Injektor 1079 PTV	temperaturprogrammierbar, standardmäßig 250°C
Splitregelung	elektronische Flusskontrolle (EFC), standardmäßig Split- Reduktion auf 5 vor 0,01 min und nach 0,5 min
FID-Detektor	standardmäßig 250°C, Brenngase Wassers toff und Luft, Make-up-Gas Helium (= Trägergas)
Software Star Version 5.51	Varian, Darmstadt
Probengeber CombiPal	CTC Analytics, Zwingen, Schweiz
Trennsäule BGB-174	BGB Analytik, Schlossböckelheim Länge 30 m, Innendurchmesser 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm

Trennsäule BGB-175	BGB Analytik, Schlossböckelheim Länge 30 m, Innendurchmesser 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm
Trennsäule Lipodex E	Macherey Nagel, Düren Länge 25 m, Innendurchmesser 0,32 mm
Helium 99.999 % v/v	Air Liquide, Krefeld
Wasserstoff 99.999 % v/v	Air Liquide, Krefeld
Luft (gefiltrert)	Druckluft-Hausleitung

**Tabelle 16.4** Einzelteile des mL-Reaktorsystems „Mehrfachrührplatz“

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

## 16.1.2 Chemikalien

**Tabelle 16.5** Allgemeine Chemikalien

Chemikalie	Reinheitsgrad	Hersteller	Produktnummer
Ammoniak-Lösung	≥ 25 %	Roth	5460
Ampicillin Natriumsalz	≥ 99 %	Roth	HP62
Borsäure	≥ 99,8 %	Merck	100165
Calciumchlorid	99 %	Merck	102378
Calciumsulfat * 2 H <sub>2</sub> O	≥ 99 %	Roth	P741.1
Carbenicillin Dinatriumsalz	≥ 90 %	Roth	6344
Casein-Pepton	-	Merck	102239
Clerol FBA 265	-	Cognis	-
Cobaltchlorid	≥ 99,8 %	Fluka	60818

D-Glukose*H <sub>2</sub> O	-	Merck	108342
Eisen(III)chlorid * 6 H <sub>2</sub> O	99 %	Merck	103943
Glycerin	87 %	Merck	104091
Hefeextrakt (mikrobiol.)	-	Merck	111926
Isopropanol	> 99 %	Merck	818766
Kaliumcarbonat	≥ 99,5 %	Merck	104924
Kaliumdihydrogenphosphat	≥ 99 %	Roth	3907
di-Kaliumhydrogenphosphat	≥ 99 %	Roth	P749.2
Kanamycinsulfat	-	Roth	T832
Kupferchlorid * 2 H <sub>2</sub> O	≥ 99 %	Merck	102733
Laktose * H <sub>2</sub> O	-	Roth	8921
Magnesiumsulfat * 7 H <sub>2</sub> O	≥ 99,5 %	Merck	105886
Mangan(II)chlorid * 4 H <sub>2</sub> O	≥ 99 %	Merck	105927
NAD * x H <sub>2</sub> O	~ 98 %	Roth	AE11
NADH-Dinatriumsalz	≥ 98 %	Roth	AE12
NADP-Dinatriumsalz	≥ 97 %	BioChemika	93205
NADPH-Tetranatriumsalz	≥ 90 %	BioChemika	93220
Natriumchlorid	≥ 99 %	Roth	P029
Natriumformiat	≥ 98 %	Fluka	71540
Natriummolybdat	≥ 99,5 %	Merck	105621
Natriumselenit	99 %	Aldrich	21,448-5
Nickelchlorid * 6 H <sub>2</sub> O	> 98 %	Merck	106717
PopCulture®	-	Novagen	71092
Salzsäure	32 %	Merck	100319
Zinksulfat * 7 H <sub>2</sub> O	≥ 99,5 %	Merck	108883

---

**Tabelle 16.6** Edukte und Produkte der Biokatalyse

<b>Edukt / Produkt</b>	<b>Reinheitsgrad</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Produktnummer</b>
AP	> 98 %	Merck	800028
4-Cl-ACE	> 98 %	Merck	818571
$\alpha$ -Cl-AP	$\geq$ 98 %	Fluka	77460
4-Cl-AP	> 98 %	Merck	802605
(R)-4-Cl-HBE	$\sim$ 96 %	Aldrich	460516
(S)-4-Cl-HBE	$\sim$ 96 %	Aldrich	460524
(R)- $\alpha$ -Cl-PE	$\geq$ 97 %	Fluka	25903
(S)- $\alpha$ -Cl-PE	$\geq$ 97 %	Fluka	25905
(R,S)-4-Cl-PE	> 97 %	Merck	814834
2-Oktanon	$\geq$ 98 %	Merck	820926
(R,S)-2-Oktanol	> 97 %	Merck	820925
(R)-2-Oktanol	99 %	Aldrich	147990
(R,S)-PE	$\geq$ 96 %	Fluka	77850
(S)-PE	$\geq$ 98,5 %	Fluka	05512
PP-ON	$\geq$ 99 %	Fluka	82050
PP-OH	$\geq$ 97 %	Aldrich	111309
(R)-PP-OH	99 %	Aldrich	256331

**Tabelle 16.7** Ionische Flüssigkeiten

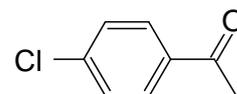
<b>Ionische Flüssigkeit</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Produktnummer</b>
[BMIM][PF6]	Merck	490050
[HMIM][PF6]	Merck	490065
[BMIM][NTF]	Merck	490092
[HMIM][NTF]	Merck	490031
[BMPL][NTF]	Merck	490046

[HMPL][NTF]	Merck	490100
[BMPL][FAP]	Merck	490084
[HMIM][FAP]	Merck	490078
[EWTMG][FAP]	Merck	490129
[(E2OH)MIM][NTF]	Merck	490263
[(EOE)MMO][NTF]	Merck	490261
[(MOP)MPI][NTF]	Merck	490265
[(P3OH)PYR][NTF]	Merck	490264
[(MOE)MPL][NTF]	Merck	IOLI-JE-313
[(MOE)MPL][FAP]	Merck	IOLI-JE-793
[(NEMM)MOE][NTF]	Merck	490262
[(NEMM)MOE][FAP]	Merck	IOLI-JE-772
[(EO2E)MPL][NTF]	Merck	IOLI-JE-783
[(EO2E)MPL][FAP]	Merck	IOLI-JE-784
[(NEMM)EO2E][NTF]	Merck	IOLI-JE-782
[(NEMM)EO2E][FAP]	Merck	IOLI-JE-796

### 16.1.3 Eigenschaften der eingesetzten Ketone und Alkohole

4-Chlor-Acetophenon (4-Cl-AP),

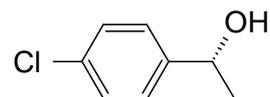
CAS 99-91-2



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

(R)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol ((R)-4-Cl-PE),

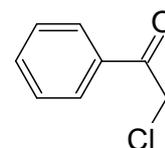
CAS 3391-10-4 (R,S)



				Quelle
Molekulargewicht	MG	156,61	$\text{g mol}^{-1}$	Merck
Dichte (20°C)	$\rho$	1,17	$\text{g cm}^{-3}$	Merck
Molekularvolumen	MV	133,9	$\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$	aus MG und $\rho$
Siedepunkt	$T_b$	80-82	°C	Merck

 $\alpha$ -Chlor-Acetophenon ( $\alpha$ -Cl-AP),

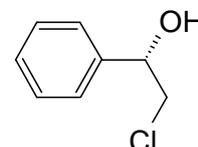
CAS 532-27-4



				Quelle
Molekulargewicht	MG	154,59	$\text{g mol}^{-1}$	Sigma
Dichte (25°C)	$\rho$	1,324	$\text{g cm}^{-3}$	Sigma
Molekularvolumen	MV	116,76	$\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$	aus MG und $\rho$
Schmelzpunkt	$T_m$	54-56	°C	Lancaster
Siedepunkt	$T_b$	243-244	°C	Lancaster

(S)- $\alpha$ -Chlor-1-Phenylethanol ((S)- $\alpha$ -Cl-PE),

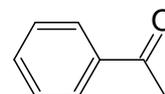
CAS 70111-05-6 (S), (56751-12-3 (R))



				Quelle
Molekulargewicht	MG	156,61	$\text{g mol}^{-1}$	Sigma
Dichte (20°C)	$\rho$	1,185	$\text{g cm}^{-3}$	Sigma
Molekularvolumen	MV	132,16	$\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$	aus MG und $\rho$
Siedepunkt (5 Torr)	$T_b$	110-112	°C	Lancaster

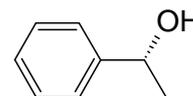
Acetophenon (AP),

CAS 98-86-2



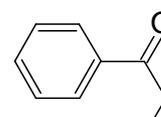
				Quelle
Molekulargewicht	MG	120,15	$\text{g mol}^{-1}$	Sigma
Dichte (20°C)	$\rho$	1,03	$\text{g cm}^{-3}$	Sigma
Molekularvolumen	MV	116,65	$\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$	aus MG und $\rho$
Schmelzpunkt	$T_m$	19-20	°C	Sigma
Siedepunkt	$T_b$	202	°C	Sigma
Dampfdruck (25°C)	$P_v$	0,45	Torr	Sigma

(R)-1-Phenylethanol ((R)-PE),  
CAS 1517-69-7 (R), (1445-91-6 (S))



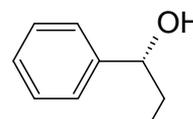
				Quelle
Molekulargewicht	MG	122,16	$\text{g mol}^{-1}$	Sigma
Dichte (20°C)	$\rho$	0,9986	$\text{g cm}^{-3}$	Sigma
Molekularvolumen	MV	122,33	$\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$	aus MG und $\rho$
Schmelzpunkt	$T_m$	9-11	°C	Sigma
Siedepunkt (10 Torr)	$T_b$	88-89	°C	Sigma

Propiophenon (PP-ON),  
CAS 95-55-0



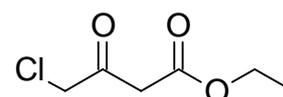
				Quelle
Molekulargewicht	MG	134,18	$\text{g mol}^{-1}$	Sigma
Dichte (20°C)	$\rho$	1,009	$\text{g cm}^{-3}$	Sigma
Molekularvolumen	MV	132,98	$\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$	aus MG und $\rho$
Schmelzpunkt	$T_m$	17-19	°C	Sigma
Siedepunkt	$T_b$	218	°C	Sigma
Dampfdruck (50°C)	$P_v$	1	Torr	Sigma

(R)-1-Phenyl-1-Propanol ((R)-PP-OH),  
CAS 1565-74-8 (R), (613-87-6 (S))



				Quelle
Molekulargewicht	MG	136,19	$\text{g mol}^{-1}$	Sigma
Dichte (20°C)	$\rho$	0,993	$\text{g cm}^{-3}$	Sigma
Molekularvolumen	MV	135,20	$\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$	aus MG und $\rho$
Siedepunkt	$T_b$	218-220	°C	Sigma

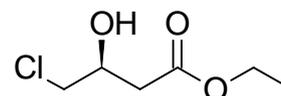
4-Chlor-Acetessigsäureethylester (4-Cl-ACE),  
CAS 638-07-3



				Quelle
Molekulargewicht	MG	164,59	$\text{g mol}^{-1}$	Merck
Dichte (20°C)	$\rho$	1,21	$\text{g cm}^{-3}$	Merck
Molekularvolumen	MV	136,0	$\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$	aus MG und $\rho$
Schmelzpunkt	$T_m$	-8	°C	Merck

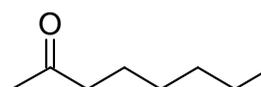
Siedepunkt	$T_b$	220	°C	Merck
Dampfdruck	$P_v$	0,1	hPa	Merck
Dynamische Viskosität (20°C)	$\eta$	4,72	mPa s	Amidjojo (2004)
Kinematische Viskosität (20°C)	$\nu$	$3,9 \cdot 10^{-6}$	$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$	Amidjojo (2004)
Oberflächenspannung (20°C)	$\sigma$	34,8	$\text{g s}^2$	Amidjojo (2004)

(S)-4-Chlor-3-Hydroxybuttersäureethylester ((S)-4-Cl-HBE),  
CAS 86728-85-0 (S), (90866-334 (R))



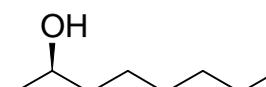
				Quelle
Molekulargewicht	MG	166,66	$\text{g mol}^{-1}$	Sigma
Dichte (20°C)	$\rho$	1,19	$\text{g cm}^{-3}$	Sigma
Molekularvolumen	MV	140,1	$\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$	aus MG und $\rho$
Siedepunkt	$T_b$	93-95	°C	Sigma

2-Oktanon,  
CAS 111-13-7



				Quelle
Molekulargewicht	MG	128,22	$\text{g mol}^{-1}$	Merck
Dichte (20°C)	$\rho$	0,82	$\text{g cm}^{-3}$	Merck
Molekularvolumen	MV	156,4	$\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$	aus MG und $\rho$
Schmelzpunkt	$T_m$	-16	°C	Merck
Siedepunkt	$T_b$	172-173	°C	Merck

(R)-2-Oktanol,  
CAS 123-96-6 (R), (6169-06-8 (S))



				Quelle
Molekulargewicht	MG	130,23	$\text{g mol}^{-1}$	Merck
Dichte (20°C)	$\rho$	0,82	$\text{g cm}^{-3}$	Merck
Molekularvolumen	MV	158,8	$\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$	aus MG und $\rho$
Schmelzpunkt	$T_m$	-39	°C	Merck
Siedepunkt	$T_b$	179	°C	Merck
Dampfdruck (50°C)	$P_v$	0,25	hPa	Merck

### 16.1.4 Kultivierungsmedien

Sämtliche Medienbestandteile wurden entweder für 20 min bei 121°C autoklaviert oder aber, wenn es sich um instabile Medienkomponenten handelte, mit einem entsprechenden Filter sterilfiltriert und dem autoklavierten Medium direkt zugegeben.

**Tabelle 16.8** LB-Medium für die *E.coli*-Anzucht im Schüttelkolben

Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
Pepton aus Casein	10 g L <sup>-1</sup>	Glukose*H <sub>2</sub> O	6 g L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt	5 g L <sup>-1</sup>	Antibiotika	50 mg L <sup>-1</sup>
NaCl	5 g L <sup>-1</sup>		

Die Komplexbestandteile wurden zusammen mit NaCl in 90 % des Endvolumens gelöst, auf einen pH von 6,8 eingestellt und autoklaviert. Glukose\*H<sub>2</sub>O wurde als 10-fach konzentrierte Stammlösung (60 g L<sup>-1</sup>) separat autoklaviert. Die Vereinigung beider Lösungen erfolgte anschließend unter sterilen Bedingungen. Das zur Selektion für den einzelnen *E.coli*-Stamm erforderliche Antibiotikum wurde in einer 100-fach konzentrierten Lösung sterilfiltriert zugegeben.

**Tabelle 16.9** Komplexmedium für die *E.coli*-Anzucht im Satzverfahren

Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
Pepton aus Casein	20 g L <sup>-1</sup>	NaCl	5 g L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt	20 g L <sup>-1</sup>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g L <sup>-1</sup>
Glukose*H <sub>2</sub> O	30 g L <sup>-1</sup>	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	1 g L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13 g L <sup>-1</sup>	NH <sub>4</sub> Cl	0,2 g L <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 g L <sup>-1</sup>	Antibiotika	100 mg L <sup>-1</sup>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	6 g L <sup>-1</sup>	Clerol 265	0,1 mL L <sup>-1</sup>

Alle Mediumbestandteile, bis auf Glukose und Antibiotika, wurden in 90 % des Endvolumens gelöst, auf einen pH von 6,8 eingestellt, in den Rührkesselreaktor gegeben und

mit diesem autoklaviert. Glukose\*H<sub>2</sub>O wurde als 10-fach konzentrierte Stammlösung (300 g L<sup>-1</sup>) separat autoklaviert und anschließend mit Hilfe einer Schlauchpumpe steril in den Reaktor gefördert. Die Zugabe des zur Selektion für den einzelnen *E.coli*-Stamm erforderlichen Antibiotikums erfolgte als sterilfiltrierte 100-fach konzentrierte Lösung.

**Tabelle 16.10** modifiziertes Autoinduktionsmedium für die *E.coli*-Anzucht im Schüttelkolben

Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
Pepton aus Casein	10 g L <sup>-1</sup>	Glycerin	5 g L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt	5 g L <sup>-1</sup>	Glukose*H <sub>2</sub> O	0,5 g L <sup>-1</sup>
NaCl	5 g L <sup>-1</sup>	Laktose*H <sub>2</sub> O	2 g L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,9 g L <sup>-1</sup>	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,5 g L <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0 g L <sup>-1</sup>	Spurenelemente	1 mL L <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> Cl	2,7 g L <sup>-1</sup>	Antibiotika	100 mg L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,7 g L <sup>-1</sup>		

Pepton, Hefeextrakt und NaCl wurden in 96 % des Endvolumens gelöst, in den Schüttelkolben gegeben und mit diesem autoklaviert. Der Puffer (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl und Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), sowie die C-Quelle (Glycerin, Glukose, Laktose) wurden als 50-fach konzentrierte Stammlösungen separat autoklaviert. Ebenso die 500-fach konzentrierte MgSO<sub>4</sub>-Lösung und die 1000-fach konzentrierte Spurenelementlösung. Alle Lösungen wurden anschließend zusammen mit der 100-fach konzentrierten steril-gefilterten Antibiotikalösung dem Grundmedium zugegeben.

Die 1000-fach konzentrierte Spurenelementlösung setzte sich aus 50 mM FeCl<sub>3</sub>, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM ZnSO<sub>4</sub>, 2 mM CoCl<sub>2</sub>, 2 mM CuCl<sub>2</sub>, 2 mM NiCl<sub>2</sub>, 2 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 2 mM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> und 2 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> zusammen. Zur Herstellung dieser Lösung war es zunächst erforderlich, Eisen(III)-chlorid, separat von den anderen Spurenelementen, durch ausreichende Zugabe von konzentrierter Salzsäure in VE-Wasser zu lösen. Erst dann erfolgte die Zugabe der restlichen Spurenelemente. Waren sämtliche Salze vollständig gelöst, wurde die Spurenelementlösung mit VE-Wasser auf das gewünschte Volumen aufgefüllt und anschließend autoklaviert.

**Tabelle 16.11** modifiziertes Autoinduktionsmedium für die *E.coli*-Anzucht im Satzverfahren

Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
Pepton aus Casein	10 g L <sup>-1</sup>	Glycerin	15 g L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt	5 g L <sup>-1</sup>	Glukose*H <sub>2</sub> O	6 g L <sup>-1</sup>
NaCl	5 g L <sup>-1</sup>	Laktose*H <sub>2</sub> O	4 g L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,9 g L <sup>-1</sup>	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	1,25 g L <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0 g L <sup>-1</sup>	Spurenelemente	1 mL L <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> Cl	2,7 g L <sup>-1</sup>	Antibiotika	100 mg L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,7 g L <sup>-1</sup>	Clerol 265	0,1 mL L <sup>-1</sup>

Pepton, Hefeextrakt und NaCl wurden in 94 % des Endvolumens gelöst, dem Reaktor zugegeben und mit diesem autoklaviert. Der Puffer (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl und Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), sowie die C-Quelle (Glycerin, Glukose, Laktose) wurden als 50- bzw. 25-fach konzentrierte Stammlösungen separat autoklaviert. Ebenso die 500-fach konzentrierte MgSO<sub>4</sub>-Lösung und die 1000-fach konzentrierte Spurenelementlösung. Alle Lösungen wurden anschließend zusammen mit der 100-fach konzentrierten sterilgefilterten Antibiotikallösung und dem autoklavierten Antischaummittel Clerol 265 mit Hilfe von sterilen Spritzen über ein Septum dem Grundmedium zugegeben.

**Tabelle 16.12** Komplexmedium für die *E.coli*-Anzucht im Zulaufverfahren

Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
Pepton aus Casein	10 g L <sup>-1</sup>	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,7 g L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt	5 g L <sup>-1</sup>	Glukose*H <sub>2</sub> O	6 g L <sup>-1</sup>
NaCl	5 g L <sup>-1</sup>	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	1,25 g L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,9 g L <sup>-1</sup>	Spurenelemente	1 mL L <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0 g L <sup>-1</sup>	Antibiotika	100 mg L <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> Cl	2,7 g L <sup>-1</sup>	Clerol 265	0,1 mL L <sup>-1</sup>

Die Herstellung erfolgte analog zu dem oben beschriebenen Autoinduktionsmedium.

**Tabelle 16.13** Glukose-Zulaufmedium für die *E.coli*-Anzucht im Zulaufverfahren

Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
Pepton aus Casein	10 g L <sup>-1</sup>	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,05 g L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt	20 g L <sup>-1</sup>	Glukose*H <sub>2</sub> O	400 g L <sup>-1</sup>
NaCl	5 g L <sup>-1</sup>	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	2,5 g L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,85 g L <sup>-1</sup>	Spurenelemente	2 mL L <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,00 g L <sup>-1</sup>	Antibiotika	100 mg L <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> Cl	4,05 g L <sup>-1</sup>	Clerol 265	0,1 mL L <sup>-1</sup>

Pepton, Hefeextrakt und NaCl wurden in 20 %, Glukose in 75 % des Endvolumens gelöst und anschließend separat autoklaviert. Der 50-fach konzentrierte Puffer (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl und Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), sowie die 500-fach konzentrierte MgSO<sub>4</sub>-Lösung und die 1000-fach konzentrierte Spurenelementlösung wurden ebenfalls separat autoklaviert. Alle Lösungen wurden anschließend zusammen mit der 100-fach konzentrierten sterilgefilterten Antibiotikallösung und dem autoklavierten Antischaummittel Clerol 265 steril vereinigt

**Tabelle 16.14** Glycerin-Zulaufmedium für die *E.coli*-Anzucht im Zulaufverfahren

Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
Pepton aus Casein	10 g L <sup>-1</sup>	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,05 g L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt	20 g L <sup>-1</sup>	Glycerin	400 g L <sup>-1</sup>
NaCl	5 g L <sup>-1</sup>	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	2,5 g L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,85 g L <sup>-1</sup>	Spurenelemente	2 mL L <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,00 g L <sup>-1</sup>	Antibiotika	100 mg L <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> Cl	4,05 g L <sup>-1</sup>	Clerol 265	0,1 mL L <sup>-1</sup>

Die Herstellung erfolgte analog zu dem oben beschriebenen Glukose-Zulaufmedium.

## 16.2 Eigenschaften ionischer Flüssigkeiten

### 16.2.1 Stoffdaten ionischer Flüssigkeiten

**Tabelle 16.15** Stoffdaten ionischer Flüssigkeiten (Merck Datenbank ionische Flüssigkeiten)

Ionische Flüssigkeit	Molekulargewicht g mol <sup>-1</sup>	Dichte g mL <sup>-1</sup>	Schmelzpunkt °C	kinematische Viskosität mm <sup>2</sup> s
[BMIM][PF6]	284,19	1,37	12	281,0
[HMIM][PF6]	312,24	1,30		547,7
[BMIM][NTF]	419,37	1,44	< -50	41,75
[HMIM][NTF]	447,42	1,37	-9	44,02
[BMPL][NTF]	422,41	1,40	-6	71,50
[HMPL][NTF]	450,47	1,34	< -50	108,0
[BMPL][FAP]	587,28	1,59	4	184,0
[HMIM][FAP]	612,29	1,56	-14	74,30
[EWTMG][FAP]	589,25	1,60		108,80
[(E2OH)MIM][NTF]	407,31			
[(EOE)MMO][NTF]	440,38			
[(MOP)MPI][NTF]	452,44			
[(P3OH)PYR][NTF]	418,34			
[(MOE)MPL][NTF]				
[(MOE)MPL][FAP]				
[(NEMM)MOE][NTF]	412,37			
[(NEMM)MOE][FAP]				
[(EO2E)MPL][NTF]				
[(EO2E)MPL][FAP]				
[(NEMM)EO2E][NTF]				
[(NEMM)EO2E][FAP]				

## 16.2.2 Verteilungskoeffizienten von Ketonen und Alkoholen

**Tabelle 16.16** gemittelte Verteilungskoeffizienten  $\log D$  von 4-Cl-AP und 4-Cl-PE zwischen verschiedenen ionischen Flüssigkeiten und verschiedenen Umsetzungspuffern.

Ionische Flüssigkeit	Umsetzungspuffer mit 0,2 M Glukose		Umsetzungspuffer mit 1 M Natriumformiat	
	4-Cl-AP	4-Cl-PE	4-Cl-AP	4-Cl-PE
[BMIM][PF6]	2,56	1,84	2,86	2,05
[HMIM][PF6]	2,72	1,95	3,08	2,21
[BMIM][NTF]	2,74	2,02	2,95	2,24
[HMIM][NTF]	2,83	2,03	3,01	2,25
[BMPL][NTF]	2,65	2,00	2,89	2,22
[HMPL][NTF]	2,70	2,04	2,97	2,26
[BMPL][FAP]	2,71	1,57	2,94	1,76
[HMIM][FAP]	2,90	1,72	3,13	1,93
[EWTMG][FAP]	2,94	1,82	3,22	2,10
[(E2OH)MIM][NTF]	2,25	1,75	2,66	2,11
[(EOE)MMO][NTF]	2,52	1,81	2,83	2,14
[(MOP)MPI][NTF]	2,61	2,05	2,95	2,38
[(P3OH)PYR][NTF]	2,23	2,19	2,77	2,67
[(MOE)MPL][NTF]	2,45	1,90	2,99	2,34
[(MOE)MPL][FAP]	2,67	1,55	3,06	1,94
[(NEMM)MOE][NTF]	2,55	1,74	2,86	2,22
[(NEMM)MOE][FAP]	2,51	1,44	2,96	1,81
[(EO2E)MPL][NTF]	2,45	1,77	2,89	2,16
[(EO2E)MPL][FAP]	2,57	1,41	3,04	1,81
[(NEMM)EO2E][NTF]	2,29	1,68	2,84	2,10
[(NEMM)EO2E][FAP]	2,66	2,64	2,95	1,70

**Tabelle 16.17** gemittelte Verteilungskoeffizienten  $\log D$  von 2-Oktanon und 2-Oktanol zwischen verschiedenen ionischen Flüssigkeiten und Natriumformiat-Umsetzungspuffer.

Ionische Flüssigkeit	Umsetzungspuffer mit 1 M Natriumformiat	
	2-Oktanon	2-Oktanol
[BMIM][PF6]	2,61	1,97
[HMIM][PF6]	2,89	2,27
[BMIM][NTF]	2,96	2,17
[HMIM][NTF]	3,06	2,31
[BMPL][NTF]	2,97	2,23
[HMPL][NTF]	3,09	2,23
[BMPL][FAP]	3,12	1,79
[HMIM][FAP]	3,44	2,48
[EWTMG][FAP]	3,72	2,70
[(E2OH)MIM][NTF]	2,79	2,40
[(EOE)MMO][NTF]	2,96	2,21
[(MOP)MPI][NTF]	2,99	2,28
[(P3OH)PYR][NTF]	2,70	2,52
[(MOE)MPL][NTF]	2,76	2,03
[(MOE)MPL][FAP]	3,21	2,08
[(NEMM)MOE][NTF]	2,77	2,03
[(NEMM)MOE][FAP]	3,19	2,08
[(EO2E)MPL][NTF]	3,00	2,44
[(EO2E)MPL][FAP]	3,37	2,22
[(NEMM)EO2E][NTF]	3,01	2,27
[(NEMM)EO2E][FAP]	3,32	2,08

**Tabelle 16.18** gemittelte Verteilungskoeffizienten  $\log D$  von verschiedenen Ketonen und Alkoholen zwischen verschiedenen ionischen Flüssigkeiten und Natriumformiat-Umsetzungspuffer.

Ionische Flüssigkeit	$\alpha$ -Cl-AP	$\alpha$ -Cl-PE	AP	PE
[BMIM][PF6]	3,16	2,13	2,45	1,56
[HMIM][PF6]	3,25	2,19	2,53	1,68
[BMIM][NTF]	3,06	2,20	2,48	1,75
[HMIM][NTF]	3,08	2,20	2,52	1,75
[BMPL][NTF]	2,87	1,85	2,41	1,92
[HMPL][NTF]	2,93	1,88	2,45	1,73

**Tabelle 16.19** gemittelte Verteilungskoeffizienten  $\log D$  von verschiedenen Ketonen und Alkoholen zwischen verschiedenen ionischen Flüssigkeiten und Natriumformiat-Umsetzungspuffer.

Ionische Flüssigkeit	PP-ON	PP-OH	4-Cl-ACE	4-Cl-HBE
[BMIM][PF6]	2,83	1,93	1,93	1,26
[HMIM][PF6]	2,95	2,05	2,03	1,33
[BMIM][NTF]	3,04	2,15	1,86	1,27
[HMIM][NTF]	3,07	2,22	1,93	1,29
[BMPL][NTF]	3,00	2,18	1,89	1,21
[HMPL][NTF]	3,17	2,22	1,91	1,22