

Ganzzellbiotransformationen mit rekombinanten *Escherichia coli* zur Synthese chiraler Alkohole

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin
Kirsten Schroer
aus Moers

Berichter: Universitätsprofessor Dr. C. Wandrey
Universitätsprofessor Dr. W. Hartmeier

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Mai 2008

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Abstract

Whole cell biotransformation processes are of special interest for the synthesis of chiral compounds since microorganisms offer some advantages in comparison to chemical catalysts or even isolated enzymes. Due to their internal production of cofactors biotransformation processes using whole cell catalysts can be operated without addition of external cofactors. In this study recombinant *Escherichia coli* cells were applied as biocatalysts for the reduction of ketones. By the expression of suitable alcohol dehydrogenases (*adh*) both enantiomers of chiral alcohols can be produced.

The syntheses of enantiopure (*R*)-3-hydroxybutyrate and (*S*)-3-hydroxybutyrate were carried out in continuously operated biotransformation processes with membrane retention of the whole cell biocatalysts. Recombinant *E. coli* expressing *adh* from *Lactobacillus brevis* turned out to be stable during biotransformation processes with substrate-coupled cofactor regeneration even when exceedingly high concentration of substrate and cosubstrate were applied. In contrast to that processes with enzyme-coupled cofactor regeneration affects the biocatalyst stability more intensely.

For the substrate-coupled approach further investigations deal with the application of *in situ* acetone removal techniques in whole cell transformation processes. Stripping, pervaporation and extraction with an ionic liquid were applied as strategies for *in situ* acetone removal. In all cases higher conversion was achieved by overcoming thermodynamic and kinetic limitations. The pervaporation procedure turned out to be the most gentle method of acetone removal which only causes negligible damage to the whole cell biocatalysts. It was also applied for continuously operated biotransformation processes.

For the knowledge of whole cell biocatalysts it is desirable to quantify intracellular concentrations of cofactors during a biotransformation process. A new method for quantification of several intracellular metabolites was developed and now transferred to biotransformation processes with recombinant *E. coli*. The concentrations of intracellular cofactor concentrations were determined during the reduction of methyl acetoacetate and 2,5-hexanedione with substrate-coupled cofactor regeneration by oxidation of 2-propanol.

Die praktischen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden in der Zeit von August 2004 bis Oktober 2007 am Institut für Biotechnologie 2 im Forschungszentrum Jülich durchgeführt.

Ich möchte mich an dieser Stelle bei einer Reihe von Personen bedanken, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit sehr viel Unterstützung geboten haben.

Mein Dank gilt:

Prof. Dr. C. Wandrey für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit, für die hervorragenden Arbeitsbedingungen am IBT-2, für die interessanten Diskussionen und Ratschläge sowie das Interesse am Fortgang meiner Arbeit,

Prof. Dr. W. Hartmeier, Institut für Biotechnologie der RWTH Aachen, für die freundliche Übernahme des Koreferats,

Dr. Stephan Lütz für die gute Betreuung dieser Arbeit, die hilfreichen Diskussionen und wertvollen Tipps sowie für die Motivation und persönliche Unterstützung,

Ursula Mackfeld für die vielen guten Ideen, ihren Enthusiasmus und ihre wertvolle Unterstützung bei der Laborarbeit,

Eva Tacha für das unerschöpfliche Engagement während ihrer Diplomarbeit,

Stephanie Corsten für ihre tatkräftige Mitarbeit,

Marieke Scheffen, Christoph Kreer, Tim Lahmann und Stefan Haese für ihr Interesse an meiner Arbeit und ihren motivierten Einsatz,

Lilia Härter und Heike Offermann für jede Menge Unterstützung im Labor und außerhalb davon, gute Ratschläge und motivierende Worte,

meinen Bürokolleginnen für die vielen wertvollen Diskussionen, die stets gute Atmosphäre und dafür, dass sie meinen Humor teilen,

allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Technische Biokatalyse“ für das hervorragende Arbeitsklima, die stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und immensen Spaß bei der alltäglichen Laborarbeit

Dr. Marco Oldiges für die gute Zusammenarbeit bei der Cofaktor-Analytik, hilfreiche Ratschläge und Diskussionen sowie das Interesse an meiner Arbeit,

allen Mitgliedern der Fermentationsgruppe für wertvolle Hilfestellung von A wie Autoklav bis Z wie Zentralstoffwechsel,

Marianne Hess für ihre stets hilfsbereite und liebenswürdige Art,

allen weiteren Mitgliedern des IBT-2 für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit,

Dr. Stephanie Bringer-Meyer, Carsten Bäumchen und Florian Heuser, Institut für Biotechnologie 1, für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit,

Prof. Dr. W. Hummel, Institut für Molekulare Enzymtechnologie, und Prof. Dr. J. Pietruszka, Institut für Bioorganische Chemie, für gute Zusammenarbeit innerhalb des BMBF-Projektes „Designer-Bugs“,

ebenso Dr. Thomas Daußmann und Dr. Jörg Hennemann, Julich Chiral Solutions, sowie Dr. Rupert Pfaller, Dr. Jürgen Stohrer und Dr. Günter Wich (Wacker Chemie AG) für die gute Zusammenarbeit innerhalb dieses Projektes,

Dr. Bruno Zelic, Universität Zagreb, für wertvolle Einblicke in die Kunst des Modellierens von Enzymkinetiken, hilfreiche Diskussionen und das Interesse an meiner Arbeit,

Prof. Dr. Marion Ansorge-Schumacher, TU Berlin, für die Bereitstellung der *CpCR*,

den Damen und Herren der mechanischen und elektronischen Werkstätten des IBTs sowie den Betreuern der Computer für ihren wichtigen Beitrag zu komfortablen Arbeitsbedingungen,

Dr. Ivy Tan dafür, dass sie mir die Eingewöhnung im IBT so leicht gemacht hat,

meiner Familie und Marian für den unerschütterlichen Glauben, dass ich alles schaffen kann.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Synthese chiraler Alkohole	1
1.2	Biokatalysatoren zur Synthese chiraler Alkohole	5
1.2.1	Enzyme	5
1.2.2	Ganzzellbiokatalysatoren	6
1.2.2.1	Wildtyp-Mikroorganismen	6
1.2.2.2	Rekombinante Mikroorganismen	7
2	Zielsetzung	9
3	Kontinuierliche Biotransformationsprozesse	11
3.1	Einleitung	11
3.2	Kontinuierliche Biotransformationen	13
3.2.1	Synthese von (<i>R</i>)-Methylhydroxybutyrat	13
3.2.2	Synthese von (<i>S</i>)-Methylhydroxybutyrat	19
3.2.2.1	<i>E. coli</i> (rekombinante Alkohol-Dehydrogenase aus <i>Thermoanaerobacter spec.</i>)	19
3.2.2.2	<i>E. coli</i> (rekombinante Carbonyl-Reduktase aus <i>Candida parapsilosis</i>)	23
3.3	Übertragung auf andere Substrate	26
3.4	Alternative Cofaktorregenerierung	29
3.5	Zusammenfassung	33
4	Biotransformationsprozesse mit <i>in situ</i>-Acetonabtrennung	35
4.1	Einleitung	35
4.2	Stripping	38
4.3	Pervaporation	40
4.4	2-Phasensysteme	44
4.5	Übergeordnete Betrachtung	48

4.6	Kontinuierliche Prozesse mit Acetonentfernung	50
4.7	Zusammenfassung	58
5	Intrazelluläre Cofaktorkonzentrationen	61
5.1	Einleitung	61
5.2	Modellierung der Reaktionsverläufe für isolierte Alkohol-Dehydrogenase aus <i>Lactobacillus brevis</i>	63
5.3	Beurteilung der Methoden	65
5.3.1	Stabilität der Cofaktoren	65
5.3.2	Bestimmung der maximalen Cofaktorkonzentrationsänderung	66
5.4	Cofaktor-Konzentrationen bei Biotransformations-Prozessen	68
5.4.1	Methylacetoacetat-System	68
5.4.2	Hexandion-System	70
5.5	Einfluss der Reaktanden auf die Cofaktorstabilität	72
5.6	Zusammenfassung	75
6	Diskussion und Ausblick	77
6.1	Rekombinante <i>Escherichia coli</i> als Ganzzell-Biokatalysatoren	77
6.2	Cofaktor-Regenerierungs-Methoden	78
6.3	Reaktionstechnik bei Ganzzellbiotransformationsprozessen	82
6.4	Cofaktor-Analytik	83
6.5	Ausblick	85
7	Zusammenfassung	87
8	Material und Methoden	89
8.1	Materialien	89
8.1.1	Geräte und Labormaterialien	89
8.1.2	Chemikalien	90
8.1.3	Biologische Materialien	92
8.2	Kultivierung Mikroorganismen	92
8.3	Zellaufschluss	93
8.4	Zellpermeabilisierung	93
8.5	Analytik	94
8.5.1	Gaschromatografie	94
8.5.2	Flüssigchromatografie mit Tandem-Massenspektrometrie	96
8.5.3	Fotometrie	97
8.6	Biotransformationen	98

8.6.1	Ganzzellbiotransformationen	98
8.6.1.1	Probenahme	98
8.6.1.2	Kontinuierliche Biotransformationen	98
8.6.1.3	Biotransformationen in Satzreaktoren	98
8.6.1.4	Strippen	98
8.6.1.5	Pervaporation	99
8.6.1.6	2-Phasensysteme	99
8.6.2	Isolierte Enzyme	99
8.7	Produktaufarbeitung	100
8.7.1	Methylhydroxybutyrat	100
8.7.2	2,5-Hexandiol	100
A	Bestimmung der kinetischen Parameter für isolierte <i>LbADH</i>	110
A.1	NAD-System	110
A.2	NADP-System	111
B	Modellierung	113
B.1	Reaktionen mit isolierter Alkohol-Dehydrogenase aus <i>Lactobacillus brevis</i> im Satzreaktor	114
B.2	Kontinuierliche Ganzzell-Biotransformationsprozesse	115

Abbildungsverzeichnis

1.1	Anwendung chiraler Alkohole in der Pharma- und Agroindustrie	1
1.2	Retrosynthese chiraler Alkohole durch Biokatalysatoren	2
1.3	Reduktion von prochiralen Ketonen durch Alkoholdehydrogenasen	3
1.4	Substrat- und enzymgekoppelte Cofaktorregenerierung	3
3.1	Fließschema und Foto des CSTR-Reaktors für kontinuierliche Biotransformationen mit Zellrückhaltung	11
3.2	Reduktion von Methylacetoacetat mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung	12
3.3	Restanteil als Funktion der Verweilzeit	13
3.4	Substratüberschussinhibierung der <i>E. coli</i> -Zellen mit <i>LbADH</i> durch MAA und 2-Propanol	14
3.5	Stabilität der <i>E. coli</i> -Zellen mit <i>LbADH</i>	14
3.6	Kontinuierliche Reduktion von Methylacetoacetat durch <i>E. coli</i> mit <i>LbADH</i> und Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von 2-Propanol	16
3.7	Raum-Zeit-Ausbeute bei der kontinuierliche Reduktion von Methylacetoacetat durch <i>E. coli</i> mit <i>LbADH</i> und Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von 2-Propanol	17
3.8	Aufgereinigtes Produkt (<i>R</i>)-3-Methylhydroxybutyrat	19
3.9	Katalytische Aktivität der <i>E. coli</i> -Zellen mit ADH T in Abhängigkeit der MAA- und 2-Propanol-Konzentration	20
3.10	Kontinuierliche Reduktion von Methylacetoacetat durch <i>E. coli</i> mit ADH T und Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von 2-Propanol	21
3.11	Raum-Zeit-Ausbeute während der ontinuierlichen Reduktion von Methylacetoacetat durch <i>E. coli</i> mit ADH T und Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von 2-Propanol	22
3.12	Zweite kontinuierliche Reduktion von Methylacetoacetat durch <i>E. coli</i> mit ADH T und Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von 2-Propanol	23

3.13	Katalytische Aktivität der <i>E. coli</i> -Zellen mit <i>CpCR</i> in Abhängigkeit der MAA- und 2-Propanol-Konzentration	24
3.14	Kontinuierliche Reduktion von Methylacetoacetat durch <i>E. coli</i> mit <i>CpCR</i> und Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von 2-Propanol	25
3.15	Raum-Zeit-Ausbeute während der kontinuierliche Reduktion von Methylacetoacetat durch <i>E. coli</i> mit <i>CpCR</i> und Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von 2-Propanol	26
3.16	Kontinuierliche Reduktion von Butanon durch <i>E. coli</i> mit <i>LbADH</i> und Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von 2-Propanol	28
3.17	Raum-Zeit-Ausbeute während der kontinuierliche Reduktion von Butanon durch <i>E. coli</i> mit <i>LbADH</i> und Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von 2-Propanol	29
3.18	Biotransformation mit permeabilisierten Zellen im Batch-Ansatz und Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von Glucose	30
3.19	Kontinuierliche Reduktion von Methylacetoacetat und Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von Glucose	31
3.20	Kontinuierliche Reduktion von Methylacetoacetat und Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von Formiat	33
4.1	Reaktionsschem der Reduktion von 2,5-Hexandion mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung	36
4.2	Biokatalytische Reduktion von 2,5-Hexandion mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung	36
4.3	Abhängigkeit des Umsatzes und der Ausbeute vom 2-Propanol-Überschuss	37
4.4	Einfluss von Aceton auf die katalytische Aktivität von <i>E. coli</i> (<i>LbADH</i>) . .	38
4.5	Fließschema und Foto des Bioreaktors für Biotransformationen mit Acetonabtrennung durch Strippen	39
4.6	Abnahme der Acetonkonzentration durch Strippen	39
4.7	Reduktion von 2,5-Hexandion mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung und Acetonabtrennung durch Strippen	40
4.8	Trennprinzip der Pervaporation	41
4.9	Fließschema und Foto des Pervaporationsreaktors	41
4.10	Massenflüsse durch verschiedene Pervaporationsmembranen	42
4.11	Selektivitäten der verschiedenen Pervaporationsmembranen	43
4.12	Reduktion von 2,5-Hexandion mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung und Acetonabtrennung durch Pervaporation	43
4.13	Biotransformation in wässrig-organischen Zweiphasen-Systemen	44

4.14	Strukturformel der ionischen Flüssigkeit [BMIM][(CF ₃ SO ₂) ₂ N]	45
4.15	Reaktionsschema der Reduktion von 1-Phenyl-2-Propanon mit substratgekoppelter Cofaktor-Regenerierung	46
4.16	Acetonkonzentrationen in den wässrigen und nicht-wässrigen Phasen	47
4.17	Umsätze in den zweiphasigen Systemen	47
4.18	Acetonkonzentration während der Reduktion von 2,5-Hexandion mit substratgekoppelter Cofaktor-Regenerierung	48
4.19	Stabilitäten der <i>E. coli</i> -Zellen bei Biotransformationen mit verschiedenen Methoden der Acetonabtrennung	49
4.20	Fließschema und Foto des CSTR-Reaktors mit Pervaporationseinheit	50
4.21	Kontinuierliche Reduktion von 2,5-Hexandion durch <i>E. coli</i> (<i>LbADH</i>) mit substratgekoppelter Cofaktor-Regenerierung und <i>in situ</i> Aceton-Abtrennung durch Pervaporation	52
4.22	Raum-Zeit-Ausbeutewährend der kontinuierlichen Reduktion von 2,5-Hexandion durch <i>E. coli</i> (<i>LbADH</i>) mit substratgekoppelter Cofaktor-Regenerierung und <i>in situ</i> Aceton-Abtrennung durch Pervaporation	53
4.23	Aufgereinigtes (2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-Hexandiol	54
4.24	Kontinuierliche Reduktion von 2,5-Hexandion durch <i>E. coli</i> (<i>CpCR</i>) mit substratgekoppelter Cofaktor-Regenerierung und <i>in situ</i> Aceton-Abtrennung durch Pervaporation	55
4.25	Raum-Zeit-Ausbeute während der kontinuierlichen Reduktion von 2,5-Hexandion durch <i>E. coli</i> (<i>CpCR</i>) mit substratgekoppelter Cofaktor-Regenerierung und <i>in situ</i> Aceton-Abtrennung durch Pervaporation	56
4.26	Kinetische Parameter der isolierten <i>CpCR</i> bei der Reduktion von 2,5-Hexandion und (<i>S</i>)-5-Hydroxyhexan-2-on	57
4.27	Kinetische Parameter des rekombinanten <i>E. coli</i> -Stammes mit <i>LbADH</i> für die Reduktion von 2,5-Hexandion und (<i>R</i>)-5-Hydroxyhexan-2-on	58
5.1	LC-MS/MS-Analytik der Cofaktoren	62
5.2	Biokatalytische Reduktion von Methylacetoacetat durch rek. <i>E. coli</i>	62
5.3	Biotransformationen mit isolierter <i>LbADH</i> für die Modell-Validierung	64
5.4	Stabilität der Cofaktoren während des Zellaufschlusses	65
5.5	Bestimmung der maximal zu erwartenden Änderung des Verhältnisses von oxidierten und reduzierten Cofaktoren	67
5.6	Cytosolische Cofaktorkonzentrationen bei Inkubation in Methylacetoacetat, 2-Propanol und ohne Biotransformation	68

5.7	Extrazelluläre Substrat- und Produktkonzentrationen bei der Reduktion von MAA durch <i>E. coli</i> (<i>LbADH</i>)	69
5.8	Cytosolische Cofaktorkonzentrationen bei der Reduktion von MAA durch <i>E. coli</i> (<i>LbADH</i>)	70
5.9	Extrazelluläre Konzentrationen der Reaktanden bei der Reduktion von 2,5-Hexandion durch <i>E. coli</i> (<i>LbADH</i>) mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von 2-Propanol	71
5.10	Cytosolische Cofaktor-Konzentrationen bei der Reduktion von 2,5-Hexandion durch <i>E. coli</i> (<i>LbADH</i>) mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von 2-Propanol	71
5.11	Restkonzentrationen der Cofaktoren nach Inkubation unter Prozessbedingungen	73
5.12	Intrazelluläre Konzentrationen der Cofaktoren nach Inkubation unter Prozessbedingungen	74
6.1	Cofaktor-Shuttling zwischen zwei Enzymen	80
6.2	Cofaktor-Retention bei substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung	80
B.1	Sensitivitätsanalyse des Modells für die Reduktion von MAA mit rek. <i>E. coli</i> (<i>LbADH</i>)	113

Tabellenverzeichnis

1.1	Prozesse mit isolierten Alkoholdehydrogenasen	5
1.2	Keton-Reduktionen durch Wildtyp-Mikroorganismen	7
1.3	Keton-Reduktionen durch rekombinante <i>Escherichia coli</i>	8
3.1	Prozessbedingungen bei der kontinuierlichen Reduktion von MAA und Cofaktor-Regenerierung durch 2-Propanol-Oxidation	15
3.2	Kenngößen der kontinuierlichen Reduktion von MAA durch <i>E. coli</i> mit <i>LbADH</i> und Cofaktor-Regenerierung durch 2-Propanol-Oxidation	18
3.3	Deaktivierungskonstanten während der kontinuierlichen Reduktion von MAA durch <i>E. coli</i> mit <i>LbADH</i> und Cofaktor-Regenerierung durch 2-Propanol-Oxidation	18
3.4	Prozessbedingungen bei der kontinuierlichen Reduktion von MAA und Cofaktor-Regenerierung durch 2-Propanol-Oxidation durch <i>E. coli</i> (ADH T) .	20
3.5	Kenngößen der kontinuierlichen Reduktion von MAA durch <i>E. coli</i> mit ADH T und Cofaktor-Regenerierung durch 2-Propanol-Oxidation	21
3.6	Prozessbedingungen bei der kontinuierlichen Reduktion durch <i>E. coli</i> (ADH T) von MAA und Cofaktor-Regenerierung durch 2-Propanol-Oxidation	22
3.7	Kenngößen der zweiten kontinuierlichen Reduktion von MAA durch <i>E. coli</i> mit ADH T und Cofaktor-Regenerierung durch 2-Propanol-Oxidation .	23
3.8	Prozessbedingungen bei der kontinuierlichen Reduktion von MAA durch <i>E. coli</i> (<i>CpCR</i>) und Cofaktor-Regenerierung durch 2-Propanol-Oxidation .	24
3.9	Kenngößen der kontinuierlichen Reduktion von MAA durch <i>E. coli</i> mit <i>CpCR</i> und Cofaktor-Regenerierung durch 2-Propanol-Oxidation	25
3.10	Deaktivierungskonstanten während der kontinuierlichen Reduktion von MAA durch <i>E. coli</i> mit <i>CpCR</i> und Cofaktor-Regenerierung durch 2-Propanol-Oxidation	26
3.11	Prozessbedingungen bei der kontinuierlichen Reduktion von Butanon durch <i>E. coli</i> (<i>LbADH</i>) und Cofaktor-Regenerierung durch 2-Propanol-Oxidation	27

3.12	Kenngrößen der kontinuierlichen Reduktion von Butanon durch <i>E. coli</i> mit <i>LbADH</i> und Cofaktor-Regenerierung durch 2-Propanol-Oxidation	28
3.13	Prozessbedingungen bei der kontinuierlichen Reduktion von MAA und Cofaktor-Regenerierung durch Glucose-Oxidation	31
3.14	Kenngrößen der kontinuierlichen Reduktion von MAA und Cofaktor-Regenerierung durch Glucose-Oxidation	32
3.15	Prozessbedingungen bei der kontinuierlichen Reduktion von MAA und Cofaktor-Regenerierung durch Formiat-Oxidation	32
3.16	Kenngrößen der kontinuierlichen Reduktion von MAA und Cofaktor-Regenerierung durch Formiat-Oxidation	33
4.1	Verteilungskoeffizienten von Aceton und 2-Propanol	45
4.2	Verteilungskoeffizienten von 2,5-Hexandion und 2,5-Hexandiol	45
4.3	Verteilungskoeffizienten von 1-Phenyl-2-Propanon und 1-Phenyl-2-Propanol	46
4.4	Prozessbedingungen bei der kontinuierlichen Reduktion von 2,5-Hexandion durch <i>E. coli</i> (<i>LbADH</i>) mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung und Acetonabtrennung durch Pervaporation	51
4.5	Prozesskennzahlen bei der kontinuierlichen Reduktion von 2,5-Hexandion durch <i>E. coli</i> (<i>LbADH</i>) mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung und <i>in situ</i> Aceton-Abtrennung durch Pervaporation	53
4.6	Prozessbedingungen bei der kontinuierlichen Reduktion von 2,5-Hexandion durch <i>E. coli</i> (<i>CpCR</i>) mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung und Acetonabtrennung durch Pervaporation	54
4.7	Kenngrößen der kontinuierlichen Reduktion von 2,5-Hexandion durch <i>E. coli</i> mit <i>CpCR</i> und Cofaktor-Regenerierung durch 2-Propanol-Oxidation	57
5.1	Restkonzentration der Cofaktoren nach Inkubation unter Zellaufschluss-Bedingungen	66
6.1	Intrazelluläre Cofaktorkonzentrationen von <i>E. coli</i> (<i>LbADH</i>)	81
6.2	<i>ttn</i> für den Cofaktor bei verschiedenen kontinuierlichen Biotransformationsprozessen	81
6.3	Katalysatorausnutzung bei kontinuierlichen Biotransformationen mit rek. <i>E. coli</i>	83
8.3	Verwendete Plasmide	92
8.4	Zusammensetzung LB-Medium	92
8.5	Allgemeine GC-Parameter	94
8.6	Temperaturprofile der verwendeten GC-Methoden	95

8.7	Allgemeine GC-Parameter für die <i>ee</i> -Bestimmung von MHB	96
8.8	Allgemeine GC-Parameter für die <i>ee</i> - und <i>de</i> -Bestimmung von 2,5-Hexandiol	96
8.9	Parameter LC-MS/MS	97
8.10	Gradientenprofil für LC-Trennung	97
8.11	Verwendete Pervaporationsmembranen	99

Abkürzungsverzeichnis

Ace	Aceton
ADH	Alkoholdehydrogenase
ADH T	ADH aus <i>Thermoanaerobacter spec.</i>
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
BMIM	1-Butyl-3-Methylimidazolium
Chl ^R	Chloramphenicol-Resistenz
CpCR	Carbonylreductase aus <i>Candida parapsilosis</i>
CSTR	Continuously operated stirred tank reactor
d	Tage (days)
EMR	Enzym-Membran-Reaktor
FDH	Formiatdehydrogenase
GC	Gaschromatografie
GDH	Glucosedehydrogenase
GLF	Glucose-Faszilitator
h	Stunden (hours)
i. D.	innerer Durchmesser
KP _i -Puffer	Kalium-Phosphat-Puffer
LbADH	ADH aus <i>Lactobacillus brevis</i>
LC	Flüssigchromatografie
M	mol/L
MAA	Methylacetoacetat
MHB	3-Methylhydroxybutyrat
MS	Massenspektroskopie
MTBE	<i>tert</i> -Butylmethylether
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form
NADP	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat, reduzierte Form
P	Produkt
PPO	1-Phenyl-2-Propanon
PPOH	1-Phenyl-2-Propanol
2-Prop	2-Propanol
PV	Pervaporation
rek	rekombinant
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)

Symbolverzeichnis

ϵ	Extinktionskoeffizient für NAD(P)H	6220 cm ² /mmol
η	Ausbeute	[-]
τ	Verweilzeit	[h ⁻¹]
χ	Umsatz	[-]
BFG	Biofeuchtgewicht	[g/L]
BTG	Biotrockengewicht	[g/L]
<i>de</i>	Diastereomerenüberschuss	[%]
<i>ee</i>	Enantiomerenüberschuss	[%]
<i>J</i>	Massenfluss	[g*m ⁻² *h ⁻¹]
<i>k_{des}</i>	Deaktivierungskonstante	[d ⁻¹]
<i>k_{GG}</i>	Gleichgewichtskonstante	[-]
<i>k_m</i>	Michaelis-Menten-Konstante	[mmol/L]
<i>k_i</i>	Inhibierungskonstante	[mmol/L]
<i>m</i>	Verteilungskoeffizient	[-]
R	Retention	[-]
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute	[g*L ⁻¹ *d ⁻¹]
<i>S</i>	Selektivität	[-]
<i>t</i>	Zeit	[min], [h]
<i>ttn</i>	total turnover number	[mol/mol]
V	Volumen	[mL], [L]
<i>v_{max}</i>	maximale Reaktionsgeschwindigkeit	[U/g]

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Synthese chiraler Alkohole

Optisch aktive Substanzen sind wichtige Produktklassen für die Synthese vieler Pharma- und Agrowirkstoffe (Breuer et al., 2004). Der Weltmarkt für enantiomerenreine Wirkstoffe wird auf 140 Milliarden US\$ geschätzt und entspricht damit 40% des totalen Wirkstoffmarktes von 440 Milliarden US\$ (Frost und Sullivan, 2003). Die Gruppe der chiralen sekundären Alkohole spielt dabei eine besondere Rolle. Eine Studie von Lonza (Meyer et al., 1997) zeigt, dass ca. 40% der chiralen Zentren in Pharmaprodukten Hydroxy-Gruppen als funktionelle Gruppen haben. Abbildung 1.1 zeigt Beispiele für Intermediate in der Pharma- und Agroindustrie, die aus chiralen Alkoholen hervorgegangen sind.

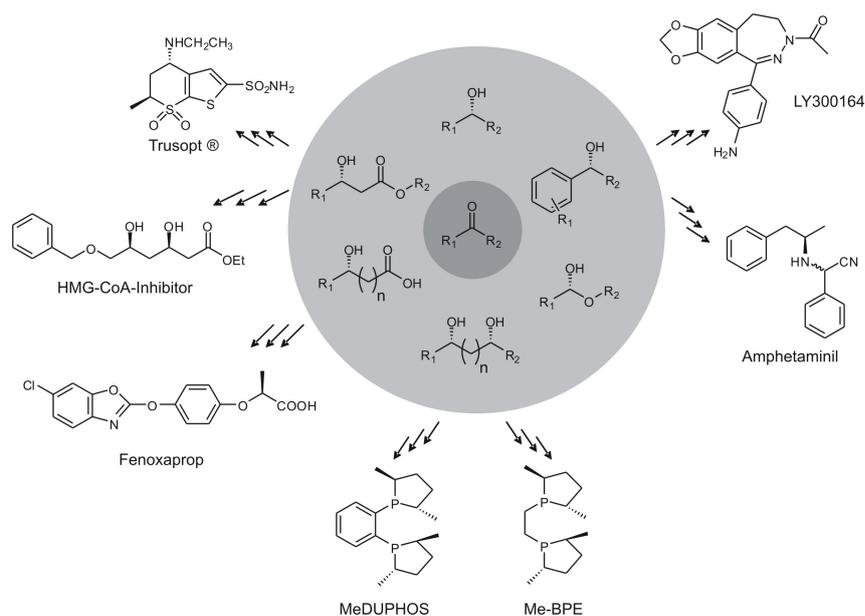


Abbildung 1.1: Anwendung chiraler Alkohole in der Pharma- und Agroindustrie

1.1. SYNTHESE CHIRALER ALKOHOLE

Für die Herstellung chiraler Alkohole sind folgende Syntheserouten als klassische chemische Verfahren etabliert:

- Asymmetrische Hydrierung von Ketonen
- CBS-Boranreduktion
- Kinetische Racematspaltung durch Epoxidhydrolyse
- Kinetische Racematspaltung von Alkoholen mit organischen Katalysatoren

Viele industriell im technischen Maßstab durchgeführte Reduktionen mit chemischen Methoden erfolgen durch Hydrierung in Gegenwart eines Schwermetallkatalysators bei erhöhter Temperatur und Druck (Gelpke et al., 1999; Wolfson et al., 2001). Teilweise wird zur Reduktion der Ketogruppe auch das giftige und umweltbelastende Boran verwendet (Hirau, 1981; Corey, 1987). Somit haben chemische Methoden erhebliche ökologische Nachteile gegenüber biokatalytischen Methoden, die sich meist durch eine höhere Nachhaltigkeit und auch durch eine höhere optische Reinheit der Produkte auszeichnen.

Neben etablierten chemischen Methoden haben sich in industriellem Maßstab zahlreiche biokatalytische Methoden durchgesetzt (Honda et al., 2006). Abbildung 1.2 zeigt Syntheserouten für die Darstellung chiraler Alkohole (Goldberg et al., 2007a). Dazu können Enzyme verschiedener Klassen zum Einsatz kommen. Die Biokatalysatoren können dabei als isolierte Enzyme oder ganze Zellen verwendet werden.

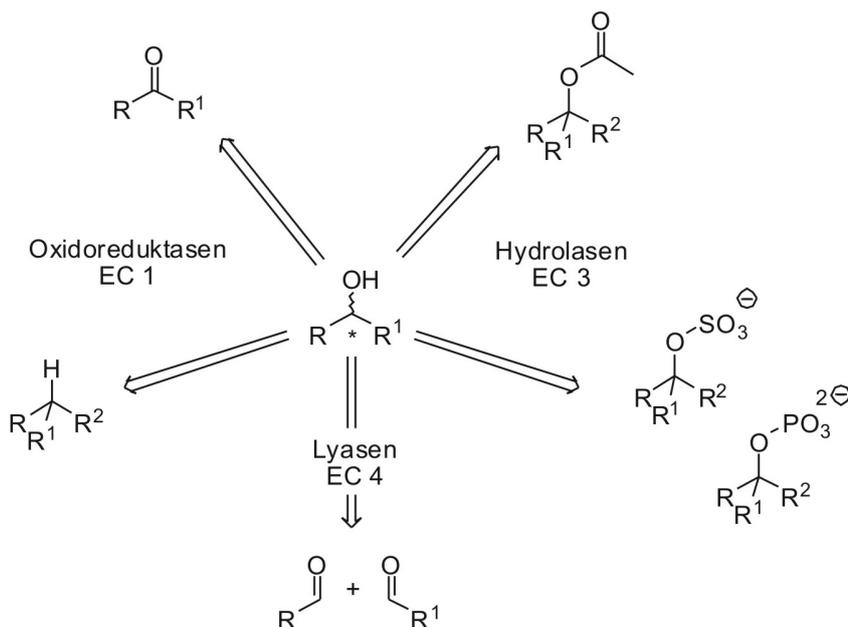


Abbildung 1.2: Retrosynthese chiraler Alkohole durch Biokatalysatoren

In den letzten Jahrzehnten hat insbesondere die biokatalytische Synthese chiraler Alkohole durch Alkoholdehydrogenasen (ADHs) an Bedeutung gewonnen (Breuer et al., 2004; Goldberg et al., 2007a; Liese et al., 2005; Buchholz und Gröger, 2006). ADHs benötigen Cofaktoren wie β -1,4-Nikotinamidadenindinukleotid (NADH) oder β -1,4-Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) als Elektronendonator und sind in der Lage, die enantioselektive Reduktion von Ketonen zu sekundären Alkoholen zu katalysieren (Abbildung 1.3).

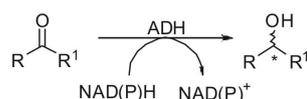


Abbildung 1.3: Reduktion von prochiralen Ketonen durch Alkoholdehydrogenasen

Da der Einsatz stöchiometrischer Mengen der Cofaktoren NADH oder NADPH nicht wirtschaftlich ist, ist es erforderlich, den Cofaktor regenerierende Reaktionen zu etablieren (Wandrey, 2004; Wichmann und Vasic-Racki, 2005; Lütz, 2006). Die Regenerierung von NADH und NADPH kann durch chemische, elektrochemische, photochemische und enzymatische Methoden erfolgen. Des Weiteren besteht bei Ganzzell-Biokatalysatoren die Möglichkeit, NADH und NADPH durch Verstoffwechslung von Glucose oder anderen Kohlenstoffquellen zu regenerieren (Goldberg et al., 2007b).

Für die enzymatische Cofaktor-Regenerierung stehen zwei Methoden zur Auswahl: die substrat-gekoppelte und die enzym-gekoppelte Cofaktor-Regenerierung (Hummel und Kula, 1989) (Abbildung 1.4). Die substrat-gekoppelte Cofaktor-Regenerierung ist dadurch gekennzeichnet, dass sowohl die Produktionsreaktion als auch die den Cofaktor regenerierende Reaktion von ein und derselben Alkoholdehydrogenase katalysiert werden. Bei der enzym-gekoppelten Cofaktor-Regenerierung wird ein zweites Enzym (z. B. Formiatdehydrogenase, Glucosedehydrogenase oder auch Hydrogenasen (Mertens et al., 2003)) für die Regenerierung des Cofaktors verwendet.

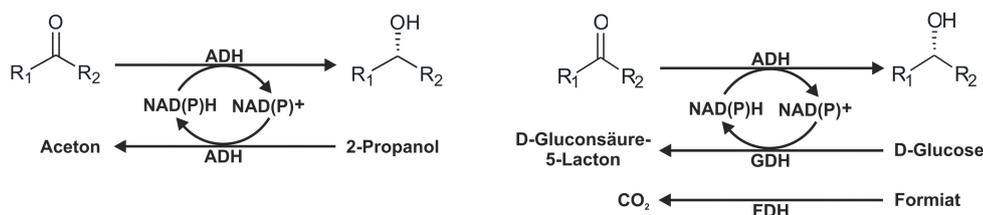


Abbildung 1.4: Reduktion von Ketonen durch Alkoholdehydrogenase mit substrat-gekoppelter (links) und enzym-gekoppelter Cofaktorregenerierung (rechts). ADH: Alkoholdehydrogenase, GDH: Glucosedehydrogenase, FDH: Formiatdehydrogenase.

Die beiden häufigsten Methoden der enzymatischen Cofaktor-Regenerierung (durch FDH oder GDH) haben sowohl Vor- als auch Nachteile. Bei der Anwendung zweier Enzyme für die biokatalytische Ketonreduktion mit enzym-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung ist es möglich, dass beide Enzyme unterschiedliche Reaktionsbedingungen benötigen und durch unterschiedliche spezifische Aktivitäten charakterisiert sind. Des Weiteren kann die Cofaktorpräferenz für beide Enzyme unterschiedlich sein.

Die Oxidation von Formiat zu CO_2 durch Formiatdehydrogenase (Hummel und Kula, 1989) ist als Cofaktorregenerierungsmethode bei der Produktion von *L-tert*-Leucin industriell etabliert (Bommarius et al., 1995). Das Coprodukt CO_2 kann leicht aus dem Reaktionsansatz entfernt werden, was eine günstige thermodynamische Gleichgewichtslage des Reaktionssystems bewirkt ($k_{GG} \approx 15000$) (Liese et al., 2005). Weitere Vorteile sind die gute Verfügbarkeit und niedrige Kosten der FDH und des Cosubstrats Formiat. Ein Nachteil ist die Tatsache, dass die meisten FDHs die nicht-phosphorylierte Form des Cofaktors präferieren (Shaked und Whitesides, 1980; Seelbach et al., 1996; Tishkov et al., 1999) was oft nicht der Cofaktorpräferenz des Produktionsenzym entspricht. Ein Ansatz, diesen Nachteil zu umgehen, ist der Einsatz von Transhydrogenasen, die Reduktionsäquivalente zwischen NADH und NADPH übertragen können (Weckbecker und Hummel, 2004).

Glucosedehydrogenasen sind in den meisten Fällen NADPH-abhängig (Kizaki et al., 2001). Durch die Hydrolyse des Coprodukts Gluconolacton zur korrespondierenden Säure ist auch diese Methode der Cofaktor-Regenerierung durch ein günstiges thermodynamisches Gleichgewicht gekennzeichnet. Ein Nachteil ist die Notwendigkeit der Permeabilisierung, wenn ganze Zellen als Biokatalysator verwendet werden sollen (Kataoka et al., 1999).

Bei der substrat-gekoppelten Cofaktor-Regenerierung wird die den Cofaktor regenerierende Reaktion durch das Produktionsenzym katalysiert. Das Cosubstrat ist in vielen Fällen 2-Propanol, das zu Aceton oxidiert wird. Die Reversibilität der Transferhydrierung und die chemischen Potentiale der beteiligten Substrate bewirken eine thermodynamische Limitierung, die die Ausbeute limitiert (Stillger et al., 2002). Möglichkeiten, diese thermodynamische Limitierung zu überwinden, bestehen darin, das Coprodukt 2-Propanol im Überschuss zu dosieren bzw. das Produkt oder das Coprodukt Aceton aus dem Reaktionsansatz zu entfernen (Lye und Woodley, 1999; Stark und von Stockar, 2003; Takors, 2004; Buque-Taboada et al., 2006; Goldberg et al., 2006).

1.2 Biokatalysatoren zur Synthese chiraler Alkohole

1.2.1 Enzyme

Der Einsatz isolierter Alkoholdehydrogenasen zur Synthese chiraler Alkohole bietet im Vergleich zu Ganzzell-Biokatalysatoren einige Vorteile. Durch die Anwesenheit eines einzigen aufgereinigten Enzyms (bzw. zweier Enzyme bei Prozessen mit enzym-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung) können Nebenreaktionen vermieden werden und dadurch eine hohe optische Reinheit des gewünschten Enantiomers erzielt werden. Durch das Fehlen von Nebenprodukten erleichtert sich auch die Aufarbeitung des Produktes. Auf der anderen Seite sind die Biokatalysatoren oftmals hohen Substrat- und Produktkonzentrationen sowie organischen Lösungsmitteln ausgesetzt, was die Aktivität und die Stabilität herabsetzen kann (Liese et al., 1998; Schmid et al., 2001; Villela et al., 2003). Der größte Nachteil besteht wohl in der Notwendigkeit dem Prozess mit isolierten Enzymen Cofaktoren zuzusetzen. Insbesondere kontinuierlich betriebene Biotransformationsprozesse mit isolierten ADHs werden durch das Herauswaschen von Cofaktoren unwirtschaftlich.

In industriellem Maßstab sind sowohl Prozesse mit substrat-gekoppelter als auch enzym-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung etabliert. Tabelle 1.1 zeigt Beispiele für industrielle biokatalytische Synthesen chiraler Alkohole durch Ketonreduktion mit isolierten Alkoholdehydrogenasen.

Tabelle 1.1: Prozesse mit isolierten Alkoholdehydrogenasen

Prozess	Enzym-Kombination	Parameter
Produkt: (<i>R</i>)-Ethylhydroxybutyrat Acetonabtrennung durch Strippen (Rosen et al., 2004)	ADH (<i>Lactobacillus brevis</i>) Cosubstrat: 2-Propanol	RZA: $92 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Enzymverbrauch: $80 \text{ kU} \cdot \text{kg}_P^{-1}$
Produkt: (<i>R</i>)-2-Hydroxy-4-Phenylbutyrat EMR (Schmidt et al., 1992)	(<i>R</i>)-Lactat-NAD-Oxidoreduktase (<i>Staphylococcus epidermis</i>) FDH (<i>Candida boidinii</i>)	RZA: $410 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Enzymverbrauch: $150 \text{ U} \cdot \text{kg}_P^{-1}$
Produkt: (<i>R</i>)-3-(4-Fluorophenyl)-2-Hydroxypropanoat EMR, (Tao und McGee, 2002)	(<i>R</i>)-Lactat-NAD-Oxidoreduktase (<i>Staphylococcus epidermis</i>) FDH (<i>Candida boidinii</i>)	RZA: $560 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$

1.2.2 Ganzzellbiokatalysatoren

Mikrobielle Biotransformationen mit Bakterien oder Pilzzellen sind seit langem bekannt. Insbesondere Hefen wie die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* werden als Biokatalysatoren in Biotransformationsprozessen verwendet (Csuk, 1991; Breuer et al., 2004). Im Vergleich zu isolierten Enzymen haben Ganzzell-Biokatalysatoren einige andere Eigenschaften. Durch die umgebende Zellmembran liegen intrazelluläre Enzyme in ihrer natürlichen Umgebung vor, wodurch sie in der Regel eine höhere Stabilität aufweisen als bei der Anwendung als isolierte Enzyme. Für cofaktorabhängige Redoxreaktionen eignen sich Ganzzell-Biokatalysatoren besonders, da natürlicherweise Cofaktoren im Cytosol vorliegen. Nachteile ergeben sich durch das Vorhandensein unerwünschter Enzymaktivitäten, da der Ganzzell-Biokatalysator in der Regel eine Vielzahl von Enzymaktivitäten exprimiert (Nakamura und Matsuda, 2002; Faber, 2004)

1.2.2.1 Wildtyp-Mikroorganismen

Die besonderen Fähigkeiten einiger Mikroorganismen, bestimmte Biotransformationen mit großer Selektivität katalysieren zu können, sind schon zu Beginn des vergangenen Jahrhunderts beschrieben worden. Beispiele sind die Synthese von L-Ephedrin durch *Saccharomyces cerevisiae* (Neuberg und Hirsch, 1921), die Reichstein-Grüssner-Synthese von Vitamin C, an der *Acetobacter suboxydans* beteiligt ist, (Reichstein und Grüssner, 1934) und die 11 α -Hydroxylierung von Progesteron durch *Rhizopus arrhizus* (Peterson et al., 1952).

Tabelle 1.2 zeigt einige kürzlich beschriebene Keton-Reduktionen durch Wildtyp-Mikroorganismen. Es wird deutlich, dass dabei nicht immer so hohe optische Reinheiten wie bei Prozessen mit isolierten Enzymen erreicht werden. In den meisten Fällen wird eine Cofaktor-Regenerierung durch die Zugabe von Glucose erreicht, die verstoffwechselt wird. Durch Reaktionen des mikrobiellen Stoffwechsels werden die benötigten Redoxäquivalente geliefert und auf das angebotene zu reduzierende Substrat übertragen. Ein Vergleich der Tabellen 1.1 und 1.2 zeigt, dass die Prozesse mit Wildtyp-Ganzzellbiokatalysatoren in Bezug auf optische Reinheit und Raum-Zeit-Ausbeute Prozessen mit isolierten Enzymen unterlegen sein können.

Tabelle 1.2: Keton-Reduktionen durch Wildtyp-Mikroorganismen

Prozess	Organismus	Parameter
Produkt: (<i>S</i>)-5-Ethylhydroxyhexanoat (Nanduri et al., 2001)	<i>Pichia mentholica</i> Cofaktor-Regenerierung: Glucose-Verstoffwechslung	<i>ee</i> : 95%
Produkt: (<i>S</i>)-5-Ethylhydroxyhexanitril (Nanduri et al., 2001)	<i>Pichia mentholica</i> Cofaktor-Regenerierung: Glucose-Verstoffwechslung	<i>ee</i> : 95%
Produkt: (<i>S</i>)-4-Chlor-3-Hydroxybutyrat (Patel et al., 1992)	<i>Geotrichum candidum</i> Cofaktor-Regenerierung: keine	<i>ee</i> : 97%
Produkt: (2 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-Hexandiol (Bertau und Burli, 2000)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Cofaktor-Regenerierung: Glucose-Verstoffwechslung	<i>ee</i> : 99% <i>de</i> : 96%
Produkt: (2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-Hexandiol CSTR mit Zellrückhaltung (Haberland et al., 2002)	<i>Lactobacillus kefir</i> Cofaktor-Regenerierung: Glucose-Verstoffwechslung	<i>ee</i> : 99%, <i>de</i> : 99% RZA: 64 g*L ⁻¹ *d ⁻¹ Katalysatorausnutzung: 15 g _P *g _{BFG} ⁻¹
Produkt: (5 <i>R</i>)-Hydroxyhexan-2-on Plug-Flow-Reaktor (Tan et al., 2006)	<i>Lactobacillus kefir</i> Cofaktor-Regenerierung: Glucose-Verstoffwechslung	<i>ee</i> : 99% RZA: 87 g*L ⁻¹ *d ⁻¹ Katalysatorausnutzung: 0,7 g _P *g _{BFG} ⁻¹
Produkt: (<i>S</i>)-3-Ethylhydroxybutyrat CSTR mit Zellrückhaltung (Chin-Joe et al., 2002)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Cofaktor-Regenerierung: Glucose-Verstoffwechslung	<i>ee</i> : 98% RZA: 15 g*L ⁻¹ *d ⁻¹
Produkt: (<i>S</i>)-4-Chlor-3-Hydroxybutyrat (Amidjojo und Weuster-Botz, 2005)	<i>Lactobacillus kefir</i> Cofaktor-Regenerierung: 2-Propanol-Oxidation	<i>ee</i> : 99% RZA: 342 g*L ⁻¹ *d ⁻¹ Katalysatorausnutzung: 4 g _P *g _{BTG} ⁻¹

1.2.2.2 Rekombinante Mikroorganismen

Durch das Vorhandensein mehrerer Oxidoreduktasen mit unterschiedlichen Stereoselektivitäten innerhalb einer Mikroorganismenzelle ist die maximal erreichbare optische Reinheit des Biotransformationsproduktes oftmals limitiert (Rodriguez et al., 1999). Durch die gezielte Überexpression bestimmter Reduktasen in *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen und Deletion konkurrierender Reduktasen mit unerwünschter Enantioselektivität wurden modifizierte Hefezellen der „zweiten Generation“ geschaffen, die im Vergleich zu Wildtyp-Zellen einen deutlich höheren Enantiomerenüberschuss für zahlreiche chirale Alkohole lieferten (Rodriguez et al., 2001).

Die Expression von artfremden Alkoholdehydrogenasen in Mikroorganismen wie *Escherichia coli* stellt eine weitere Stufe bei der Entwicklung von Ganzzell-Biokatalysatoren dar. Neben der Expression einer Alkoholdehydrogenase wird oftmals auch ein zweites, den Cofaktor regenerierendes Enzym exprimiert. Tabelle 1.3 zeigt exemplarisch einige Keton-reduzierende Prozesse mit rekombinanten *Escherichia coli*-Zellen als Biokatalysator. Alle beschriebenen Prozesse wurden im Batch-Biotransformationsansatz durchgeführt.

Tabelle 1.3: Keton-Reduktionen durch rekombinante *Escherichia coli*

Prozess	Organismus, rek. Enzyme	Parameter
Produkt: (<i>S</i>)-4-Chlor-3-Hydroxybutyrat (Kizaki et al., 2001)	<i>E. coli</i> HB101 CR S1 (<i>Candida magnolia</i>) GDH (<i>Bacillus megaterium</i>)	<i>ee</i> : 99% Umsatz: 90%
Produkt: (<i>S</i>)-1-(4-Chlorphenyl)-Ethanol (Gröger et al., 2006)	<i>E. coli</i> DSM14459 ADH (<i>Rh. erythropolis</i>) GDH (<i>Bacillus subtilis</i>)	<i>ee</i> : 99,8% Umsatz: 94%
Produkt: (<i>R</i>)-1-(4-Phenoxyphenyl)-Ethanol (Gröger et al., 2006)	<i>E. coli</i> DSM14459 ADH (<i>Lactobacillus kefir</i>) GDH (<i>Thermopl. acidophilum</i>)	<i>ee</i> : 99,4% Umsatz: 95%
Produkt (<i>R</i>)-3-Methylhydroxybutyrat (Ernst et al., 2005)	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) ADH (<i>L. brevis</i>) FDH (<i>Mycobacterium vaccae</i>)	<i>ee</i> : 99% Produktivität: 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}_{BTG}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
Produkt: (2 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-Hexandiol Acetonabtrennung durch Strippen (Goldberg et al., 2006)	<i>E. coli</i> Tuner (DE3) ADH (<i>Rhodococcus ruber</i>) Cofaktor-Regenerierung: 2-Propanol-Oxidation	<i>ee</i> : 99% Umsatz: 100%

Kapitel 2

Zielsetzung

Ziel der Arbeit war die Durchführung von Ganzzell-Biotransformationsprozessen in verschiedenen Reaktor-Systemen. Als Biokatalysatoren kamen rekombinante *E. coli*-Stämme zum Einsatz, die rekombinante Alkoholdehydrogenasen exprimieren. Es sollten kontinuierliche Ganzzell-Biotransformationen etabliert werden, verschiedene Methoden der *in situ*-Acetonabtrennung auf Ganzzell-Biotransformationsprozesse sowie eine neue Methode der Quantifizierung intrazellulärer Cofaktorkonzentrationen bei Biotransformationsprozessen angewandt werden.

Die Aufgabenstellungen dieser Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Kontinuierliche Biotransformationen

- Synthese von (*R*)-3-Methylhydroxybutyrat und (*S*)-3-Hydroxybutyrat durch Verwendung von *E. coli*-Stämmen mit verschiedenen rekombinanten Alkoholdehydrogenasen, Erreichen möglichst guter Prozessparameter durch geeignete Reaktionsführung, Charakterisierung der Stabilität der Biokatalysatoren
- Vergleich zwischen substrat- und enzym-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung bei kontinuierlichen Ganzzell-Biotransformationsprozessen
- Übertragung auf weitere Substrate

In situ-Acetonabtrennung

- Reduktion von 2,5-Hexandion im batch-Ansatz mit Acetonabtrennung durch Strippen und Pervaporation, Reduktion von 1-Phenyl-2-Propanon im batch-Ansatz mit Acetonabtrennung durch Extraktion

-
- Charakterisierung der Stabilität von Ganzzell-Biokatalysatoren in Prozessen mit *in situ*-Acetonabtrennung
 - Kopplung von kontinuierlicher Biotransformation im CSTR und *in situ*-Acetonabtrennung durch Pervaporation, dabei Synthese von (2*R*,5*R*)- und (2*S*,5*S*)-Hexandiol durch Einsatz geeigneter *E. coli*-Stämme

Cofaktorpool-Analytik

- Bestimmung der intrazellulären Cofaktorkonzentrationen während der Reduktion von Methylacetoacetat und 2,5-Hexandion
- Kinetische Charakterisierung der isolierten *LbADH* zu Erstellung eines kinetischen Modells zur Beschreibung der intrazellulären Cofaktor-Konzentrationen während der Reduktion von Methylacetoacetat

Kapitel 3

Kontinuierliche Biotransformationsprozesse

3.1 Einleitung

In einem idealen kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktor (CSTR = continuously operated stirred tank reactor) sind keinerlei Gradienten innerhalb des Reaktors vorhanden. In einem solchen Reaktor stellt sich ein Fließgleichgewicht ein, das bewirkt, dass der Reaktor unter Auslaufbedingungen arbeitet. Infolgedessen ist dieses Reaktorsystem insbesondere für substratüberschussinhibierte Reaktionen geeignet (Chmiel, 2005), da überall im CSTR Auslaufbedingungen herrschen, also niedrige Substratkonzentrationen vorliegen. Die in diesem Kapitel beschriebenen Biotransformationen wurden in einem Reaktor mit Membranrückhaltung durchgeführt, wie in Abbildung 3.1 dargestellt.

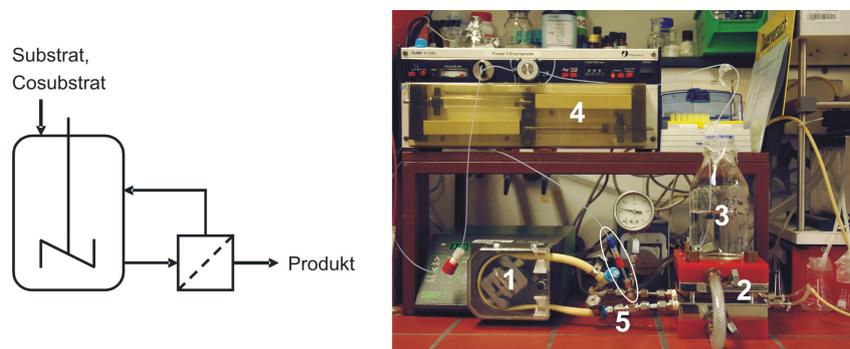


Abbildung 3.1: Fließschema und Foto des CSTR-Reaktors für kontinuierliche Biotransformationen mit Zellerückhaltung. 1: Schlauchpumpe für Zirkulation der Reaktionslösung, 2: Membranmodul mit Ultrafiltrationsmembran für Zellerückhaltung, 3: Substratvorlagegefäß, 4: Kolbenpumpe für Substratzufuhr, 5: Anschluss für Substratzufuhr.

Die verwendete Ultrafiltrationsmembran hat eine Ausschlussgröße von 10 kDa und ist somit auch für die Rückhaltung von isolierten Enzymen geeignet, deren Molekulargewicht in der Regel zwischen 10 und 150 kDa liegt (Lütz et al., 2005). Es zeigte sich, dass Membranen mit einer geringen molekularen Ausschlussgröße gut für kontinuierliche Biotransformationsprozesse mit Katalysatorrückhaltung geeignet sind, da es weniger schnell zu einem Blockieren der Membran kommt.

Dieses Kapitel beschreibt den Einsatz von rekombinanten *E. coli*-Zellen als Biokatalysatoren in kontinuierlich betriebenen Biotransformationsprozessen. Als Modellreaktion wurde die Reduktion von Methylacetoacetat ausgewählt (Abbildung 3.2). Die Cofaktor-Regenerierung erfolgte substrat-gekoppelt durch die Oxidation von 2-Propanol zum Coprodukt Aceton. Bei den Biokatalysatoren handelt es sich daher um *E. coli*-Zellen, die nur ein rekombinantes Protein, eine Alkoholdehydrogenase, überexprimieren.

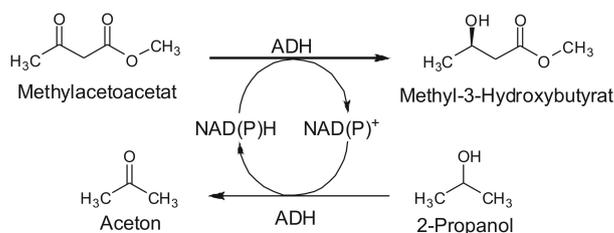


Abbildung 3.2: Reduktion von Methylacetoacetat mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung

Die durchgeführten Biotransformationsprozesse sollen hinsichtlich der Prozessparameter Raum-Zeit-Ausbeute, Katalysatorausnutzung und Katalysatorstabilität charakterisiert werden. Der Umsatz einer Biotransformation errechnet sich nach

$$X = \frac{c_{0,Substrat} - c_{t,Substrat}}{c_{0,Substrat}} \quad (3.1)$$

Die Ausbeute an Produkt in einer Biotransformation errechnet sich nach

$$\eta = \frac{c_{t,Produkt}}{c_{0,Substrat}} \quad (3.2)$$

Bei einer einstufigen Reaktion, wie der Reduktion von Methylacetoacetat, entspricht der Umsatz der Ausbeute, da jedes Molekül Substrat, das reduziert wird, direkt in ein Produktmolekül umgewandelt wird.

Ein wichtiger Unterschied zwischen kontinuierlich betriebenen Ganzzellbiotransformations-Prozessen und Prozessen mit isolierten Enzymen ist die Tatsache, dass bei Ganzzellbiotransformations-Prozessen auf die Zudosierung von Cofaktoren verzichtet werden

kann, da der Cofaktor natürlicherweise intrazellulär vorliegt und in den Zellen verbleibt, sofern die Zellen eine intakte Zellmembran besitzen. Die Integrität der Zellmembran hat somit bei kontinuierlich betriebenen Ganzzellbiotransformations-Prozessen eine besondere Bedeutung, da bei einer zerstörten Zellmembran die vorhandene Cofaktormenge innerhalb weniger Verweilzeiten ausgespült wird. Abbildung 3.3 zeigt das Auswaschverhalten von Molekülen in Abhängigkeit der Retention.

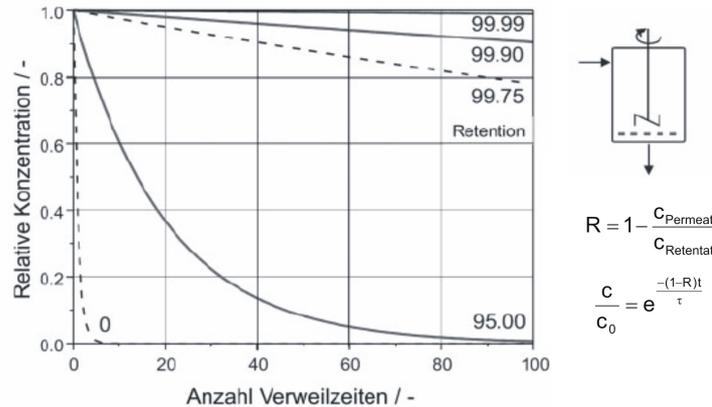


Abbildung 3.3: Restanteil als Funktion der Verweilzeit (Retention als Parameter) (Lütz et al., 2005)

Der Einsatz von Reaktoren mit Membranrückhaltung in der Ganzzell-Biokatalyse ist im Vergleich zu Prozessen mit isolierten Enzymen relativ selten und erstreckt sich bisher nur auf Prozesse mit Wildtyp-Mikroorganismen. Beispiele sind die Synthese von (2*R*,5*R*)-Hexandiol mit *Lactobacillus kefir* (Haberland et al., 2002) und die Reduktion von 3-Ethylloxobutyrat mit *Saccharomyces cerevisiae* (Chin-Joe et al., 2002).

3.2 Kontinuierliche Biotransformationen

3.2.1 Synthese von (*R*)-Methylhydroxybutyrat

Die Synthese des (*R*)-Form ist möglich, wenn *E. coli*-Zellen als Biokatalysator verwendet werden, die eine (*R*)-spezifische Alkoholdehydrogenase als rekombinantes Protein exprimieren. Die hier beschriebene kontinuierliche Biotransformation wurde mit *E. coli* durchgeführt, der die *LbADH* (Hummel, 1997) rekombinant überexprimiert. Aus den kinetischen Untersuchungen der isolierten *LbADH* (Anhang A) geht hervor, dass das Enzym sowohl durch das Substrat Methylacetoacetat als auch durch das Cosubstrat 2-Propanol leicht überschussinhibiert ist. Diese Inhibierungen zeigt auch der Ganzzell-Biokatalysator (Abbildung 3.4), weshalb sich der CSTR besonders anbietet.

3.2. KONTINUIERLICHE BIOTRANSFORMATIONEN

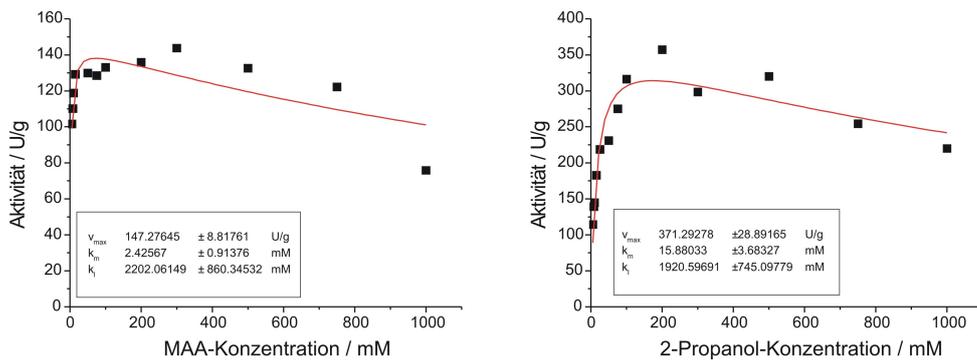


Abbildung 3.4: Substratüberschussinhibition der *E. coli*-Zellen mit *LbADH* durch MAA und 2-Propanol. Bedingungen: $V=10$ mL, 30°C , pH 6,0, $20 \text{ g}_{BFG}/\text{L}$ rek. *E. coli* (*LbADH*), $50 \text{ mmol}/\text{L}$ KP_i -Puffer, links: $200 \text{ mmol}/\text{L}$ 2-Propanol, rechts: $100 \text{ mmol}/\text{L}$ MAA.

Für die Durchführung kontinuierlicher Biotransformationen ist eine ausreichende Stabilität der verwendeten Biokatalysatoren von Bedeutung. In Voruntersuchungen wurde die Stabilität der rekombinanten *E. coli*-Zellen mit *LbADH* charakterisiert (Abbildung 3.5). Es wird deutlich, dass die Zellen durch eine extrem hohe Lagerstabilität gekennzeichnet sind. Nach einer Lagerung von 77 Tagen bei 4°C in $50 \text{ mmol}/\text{L}$ KP_i -Puffer, pH 6,0, ist noch eine Restaktivität von ca. 38% vorhanden. Die Inkubation unter Prozesstemperaturen (Abb. 3.5 links) bewirkt dagegen eine weitaus stärkere Deaktivierung der Biokatalysatoren.

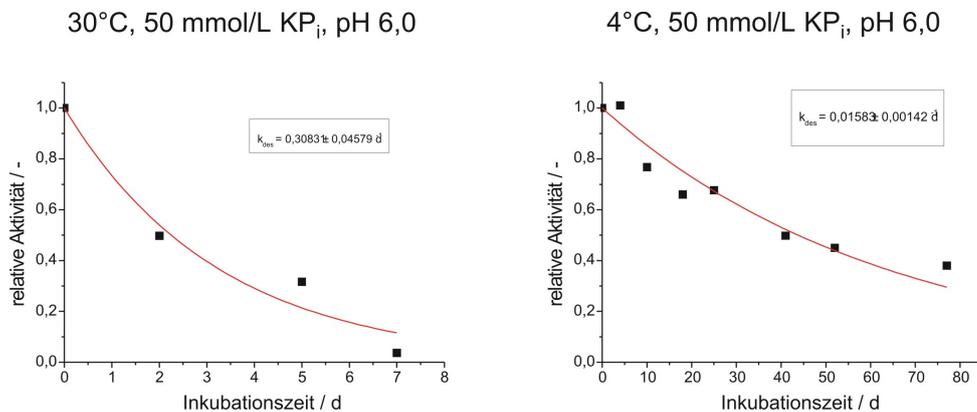


Abbildung 3.5: Stabilität der *E. coli*-Zellen mit *LbADH* bei Inkubation in $50 \text{ mmol}/\text{L}$ KP_i -Puffer, pH 6,0. Links: Inkubation bei 30°C (Prozessbedingungen). Rechts: Inkubation bei 4°C (Lagerbedingungen).

Tabelle 3.1 zeigt die Betriebsbedingungen, unter denen die kontinuierliche Biotransformation durchgeführt wurde. Die MAA-Konzentration wurde ausgehend von $0,1 \text{ mol}/\text{L}$ zu Beginn der Biotransformation schrittweise gesteigert. Das Cosubstrat 2-Propanol wurde im Überschuss zudosiert. Der Überschuss lag zwischen 1,12 (bei einer MAA-Konzentrationen von $2,5 \text{ mol}/\text{L}$) und 2 (bei MAA-Konzentrationen von $0,1$ bis $0,3 \text{ mol}/\text{L}$).

Tabelle 3.1: Prozessbedingungen bei der kontinuierlichen Reduktion von MAA und Cofaktor-Regenerierung durch 2-Propanol-Oxidation

Zeitspanne [Tage]	MAA-Konzentration	2-Propanol-Konzentration	Verweilzeit τ [h]	Biomasse-Konzentration
0 bis 1	0,1 mol/L	0,2 mol/L	0,5	50 g _{BFG} /L
1 bis 2	0,2 mol/L	0,4 mol/L	1	
2 bis 3	0,3 mol/L	0,6 mol/L	2	
3 bis 4	0,5 mol/L	0,8 mol/L	5	
4 bis 7,5	1 mol/L	1,3 mol/L	10	
7,5 bis 10	1,5 mol/L	1,8 mol/L	25	
10 bis 11			5	
11 bis 14	2 mol/L	2,3 mol/L	6,25	200 g _{BFG} /L
14 bis 16	2,5 mol/L	2,8 mol/L	10	270 g _{BFG} /L
16 bis 38	2,5 mol/L	2,8 mol/L		
38 bis 46	1,5 mol/L	1,8 mol/L		

Abbildung 3.6 zeigt den Umsatz im zeitlichen Verlauf. Abhängig von der eingesetzten Substrat-Konzentration wurden solche Verweilzeiten eingestellt, dass die Reaktion kinetisch limitiert ist und der Umsatz in einem Bereich zwischen 60 bis 80% lag. Der maximal erreichbare Umsatz bei zweifachem Überschuss an 2-Propanol liegt über 90% ($k_{GG} \approx 7,4$). Zu den Zeitpunkten $t = 10$ d und $t = 16$ d wurde jeweils Biomasse aus dem gleichen Fermentationsansatz (also mit gleicher katalytischer Ausgangsaktivität und gleichem Alter) nachdosiert, um die für den Umsatz von 60 bis 80% erforderlichen Verweilzeiten zu verkürzen.

3.2. KONTINUIERLICHE BIOTRANSFORMATIONEN

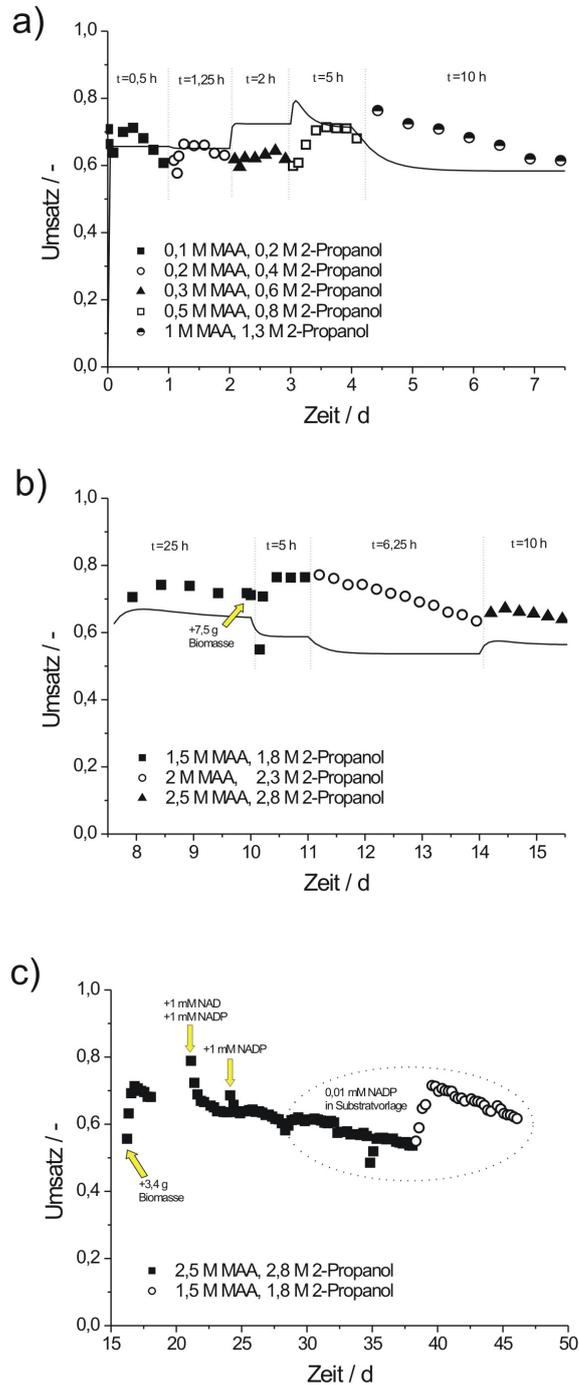


Abbildung 3.6: Kontinuierliche Reduktion von Methylacetoacetat durch *E. coli* mit *LbADH* und Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von 2-Propanol. Bedingungen: $V=50$ mL, 30°C , $\text{pH } 6,0$, 50 mmol/L KP_i -Puffer, 50 bis 270 $\text{g}_{\text{BFG}}/\text{L}$ rek. *E. coli* (*LbADH*), $0,1$ bis $2,5$ mol/L Methylacetoacetat, $0,2$ bis $2,8$ mol/L 2-Propanol. Die durchgezogene Linie zeigt die Simulation des Umsatzes aus der *in vitro*-Kinetik der isolierten *LbADH*.

Während des Prozesses sollte untersucht werden, ob die leichte Abnahme der katalytischen Aktivität, die durch die kontinuierliche lineare Abnahme des Umsatzes zum Ausdruck kommt, auf das Auswaschen von intrazellulären Cofaktoren zurückzuführen ist. Bis zum Zeitpunkt $t = 21$ d wurde der Prozess ohne die Zugabe von Cofaktoren betrieben; als Elektronencarrier lag hier ausschließlich die ursprüngliche Menge an intrazellulären Cofaktoren vor. Zu den Zeitpunkten $t = 21$ d und $t = 24$ d wurde, wie in Abbildung 3.6c gekennzeichnet, eine Cofaktorlösung als Puls in den Bioreaktor dosiert, so dass im Bioreaktor kurzzeitig NADP- und NAD-Konzentrationen von 1 mmol/L vorlagen. Es ist zu erkennen, dass dadurch kurzzeitig höhere Umsätze erzielt wurden, die wenige Verweilzeiten nach der Cofaktor-Dosierung dann wieder das Ausgangsniveau erreichten. Ab dem Zeitpunkt $t = 28$ d bis zum Ende des Prozesses wurde dann eine Substratlösung in den Bioreaktor geleitet, die nicht nur das Substrat MAA und das Cosubstrat 2-Propanol enthielt, sondern auch NADP in einer Konzentration von 0,01 mmol/L. In diesem Abschnitt des Versuches konnte eine weniger starke Abnahme des Umsatzes beobachtet werden als in dem Bereichen ohne externe Cofaktor-Dosierung.

Abbildung 3.7 zeigt die Raum-Zeit-Ausbeuten, die während des Prozesses erreicht wurden. Es ist zu erkennen, dass über einen langen Zeitraum von mehr als 25 Tagen eine Raum-Zeit-Ausbeute zwischen 400 und 700 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ erreicht wurde. Tabelle 3.2 zeigt die wichtigen Kenngrößen des beschriebenen kontinuierlichen Biotransformationsprozesses. Der ee -Wert wurde für das aufgereinigte Endprodukt bestimmt.

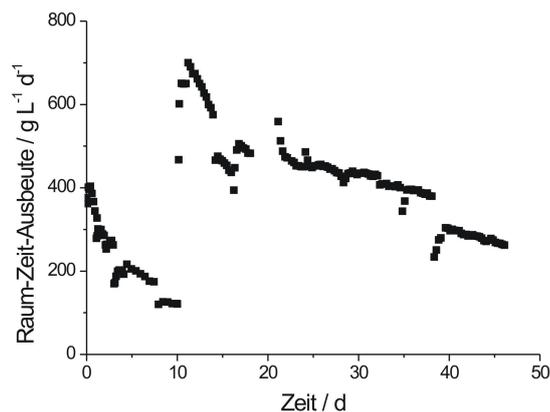


Abbildung 3.7: Raum-Zeit-Ausbeute bei der kontinuierliche Reduktion von Methylacetoacetat durch *E. coli* mit *LbADH* und Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von 2-Propanol. Bedingungen: $V=50$ mL, 30°C , pH 6,0, 50 mmol/L KP_i -Puffer, 50 bis 270 $\text{g}_{\text{BFG}}/\text{L}$ rek. *E. coli* (*LbADH*), 0,1 bis 2,5 mol/L Methylacetoacetat, 0,2 bis 2,8 mol/L 2-Propanol.

Tabelle 3.2: Kenngrößen der kontinuierlichen Reduktion von MAA durch *E. coli* mit *LbADH* und Cofaktor-Regenerierung durch 2-Propanol-Oxidation

Maximale Raum-Zeit-Ausbeute	700 g*L ⁻¹ *d ⁻¹
Maximaler Umsatz	0,78
Gesamte Produktmenge	797 g
<i>ee</i>	>99%
Katalysatorausnutzung	59,5 g _P /g _{BFG}

Neben den in Tabelle 3.2 gezeigten Parametern wurden die Deaktivierungskonstanten k_{des} für verschiedene Zeitabschnitte berechnet (Tabelle 3.3). Die Deaktivierungskonstante entspricht hier der linearen Abnahme des Umsatzes. Da die Reaktionsgeschwindigkeit vom Umsatz und der Restkonzentration des Substrats abhängig ist, handelt sich somit nicht um eine korrekte Bestimmung der Desaktivierungskonstanten, sondern um eine Näherung. Diese Näherung ist an dieser Stelle aber gerechtfertigt, da aufgrund der hohen Substratkonzentrationen davon ausgegangen werden kann, dass zu jedem Zeitpunkt des Biotransformationsprozesses eine Substratsättigung des Biokatalysators vorlag.

Aus den Werten geht hervor, dass die Stabilität des verwendeten Biokatalysators mit steigender Substrat- und Cosubstratkonzentration höher wird, was durch einen kleineren Wert für die Deaktivierungskonstante k_{des} widerspiegelt wird. Ab dem Zeitpunkt $t = 28$ d wurde dem Reaktionssystem Lösung zugeführt, die neben dem Substrat und dem Cosubstrat auch NADP in einer Konzentration von 0,01 mmol/L enthielt. Es ist zu erkennen, dass die Deaktivierung ab diesem Zeitpunkt geringer war. Daraus lässt sich schließen, dass der Aktivitätsverlust bis zu diesem Zeitpunkt zum Teil auf ein Auswaschen des intrazellulären Cofaktors zurückzuführen ist. Dennoch ist der Biokatalysator bis zum Zeitpunkt $t = 21$ d durch eine enorm hohe Membranintegrität gekennzeichnet, da bis zu diesem Zeitpunkt keinerlei Zugabe von Cofaktoren erfolgte.

Tabelle 3.3: Deaktivierungskonstanten während der kontinuierlichen Reduktion von MAA durch *E. coli* mit *LbADH* und Cofaktor-Regenerierung durch 2-Propanol-Oxidation

Zeitspanne [Tage]	MAA-Konzentration	2-Propanol-Konzentration	k_{des} [d ⁻¹]
4,5 bis 7,5	1 mol/L	1,3 mol/L	0,0503
11,2 bis 14	2 mol/L	2,3 mol/L	0,0488
14,5 bis 16	2,5 mol/L	2,8 mol/L	0,0367
28 bis 38	2,5 mol/L	2,8 mol/L	0,0094



Abbildung 3.8: Aufgereinigtes Produkt (*R*)-3-Methylhydroxybutyrat

3.2.2 Synthese von (*S*)-Methylhydroxybutyrat

Die Synthese von (*S*)-MHB wurde mit zwei verschiedenen *E. coli*-Stämme durchgeführt, die jeweils eine (*S*)-spezifische Alkoholdehydrogenase überexprimieren. Die im folgenden beschriebenen kontinuierlichen Biotransformationsprozesse mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von 2-Propanol zur Synthese von (*S*)-MHB wurden unter Zudosierung von definierten Konzentrationen an NADH oder NADPH durchgeführt, um eine maximale katalytische Aktivität der Ganzzell-Biokatalysatoren zu erreichen.

3.2.2.1 *E. coli* (rekombinante Alkohol-Dehydrogenase aus *Thermoanaerobacter spec.*)

Die (*S*)-spezifische Alkoholdehydrogenase aus *Thermoanaerobacter spec.* (Findrik et al., 2005) (ADH T) ist durch eine hohe Temperaturstabilität und die Präferenz für den phosphorylierten Cofaktor NADPH charakterisiert. Die rekombinanten *E. coli*-Zellen mit ADH T zeigen eine starke Substratüberschuss-Inhibierung durch das Methylacetoacetat (Abbildung 3.9). Generell weisen rekombinante *E. coli*-Zellen mit ADH T eine geringere spezifische Aktivität für die Reduktion von MAA auf als rekombinante Zellen mit *Lb*ADH. Dies kann zum einen an unterschiedlichen Aktivitäten der Enzyme und zum anderen an einer unterschiedlich starken Expressionsrate der rekombinanten Proteine liegen.

3.2. KONTINUIERLICHE BIOTRANSFORMATIONEN

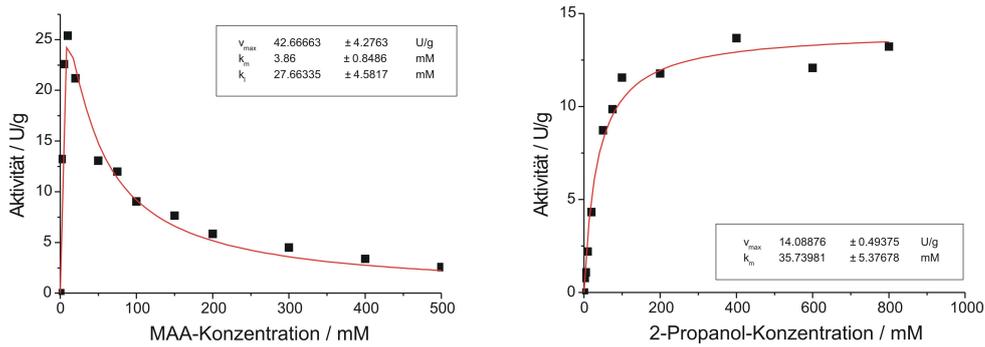


Abbildung 3.9: Katalytische Aktivität der *E. coli*-Zellen mit ADH T in Abhängigkeit der MAA- und 2-Propanol-Konzentration. Bedingungen: $V=1$ mL, 30°C , pH 6,0, 5 bis $40\text{ g}_{BFG}/\text{L}$ rek. *E. coli* (ADH T), 50 mmol/L KP_i -Puffer, links: 500 mmol/L 2-Propanol, rechts: 20 mmol/L MAA.

Mit diesem Biokatalysator ist analog zu der zuvor beschriebenen Synthese von (*R*)-MHB eine kontinuierliche Biotransformation im CSTR durchgeführt worden. Die Prozessparameter sind in Tabelle 3.4 aufgeführt. Abbildung 3.10 zeigt den Umsatz im zeitlichen Verlauf.

Tabelle 3.4: Prozessbedingungen bei der kontinuierlichen Reduktion von MAA und Co-faktor-Regenerierung durch 2-Propanol-Oxidation durch *E. coli* (ADH T)

Zeitspanne [Tage]	MAA-Konzentration	2-Propanol-Konzentration	Verweilzeit τ [h]	Biomasse-Konzentration
0 bis 1	0,5 mol/L	0,8 mol/L	1	225 g/L
1 bis 3	0,1 mol/L	0,2 mol/L	5	
3 bis 10			10	

Aus Abbildung 3.10 ist ersichtlich, dass die kontinuierliche Reduktion mit einer Substratkonzentration von $0,5\text{ mol/L}$ begonnen wurde, aber bei einer Verweilzeit von 1 h trotz der hohen Biokatalysatorbeladung nur ein geringer Umsatz erreicht wurde. Der geringe Umsatz kann durch die hohe Substratüberschussinhibierung verursacht worden sein (Vgl. Abb. 3.9). Erst nach dem Wechsel zu einer niedrigeren Substrat- und Cosubstratkonzentration und Verlängerung der Verweilzeit auf 5 h und anschließend auf 10 h konnte der Umsatz kurzzeitig bis auf 75% gesteigert werden. Während des Prozesses wurde insgesamt nur eine sehr geringen katalytische Aktivität der *E. coli*-Zellen beobachtet, vermutlich erfolgte eine Desaktivierung des Biokatalysators durch die hohen Substrat- und Cosubstratkonzentrationen. Infolgedessen war auch die während des Prozesses beobachtete Raum-Zeit-Ausbeute nur gering und lag fast die gesamte Prozessdauer bei etwa $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (Abbildung 3.11). Die wesentlichen Kennzahlen des beschriebenen CSTR-Prozessen mit *E. coli* mit ADH T sind in Tabelle 3.5 gezeigt. Die Deaktivierungskonstante

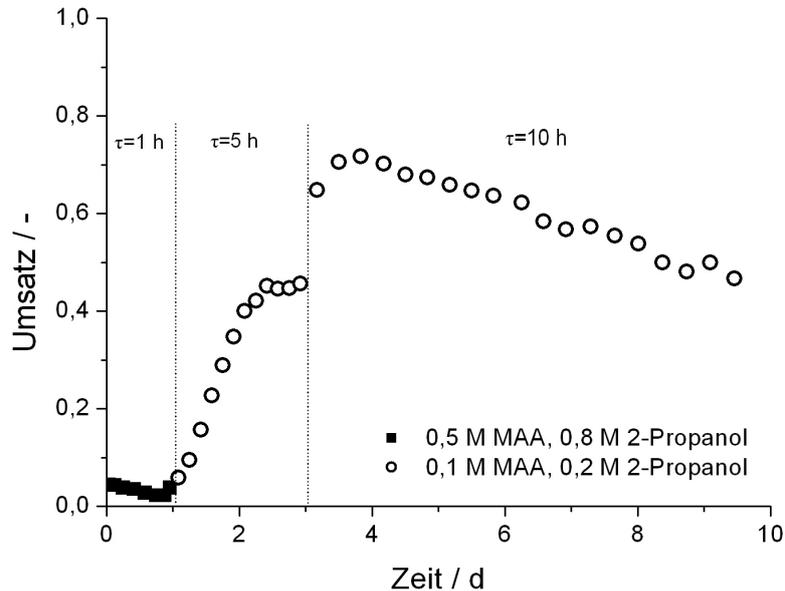


Abbildung 3.10: Kontinuierliche Reduktion von Methylacetoacetat durch *E. coli* mit ADH T und Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von 2-Propanol. Bedingungen: $V=50$ mL, 30°C , $\text{pH } 6,0$, 50 mmol/L KP_i -Puffer, 225 g_{BFG}/L rek. *E. coli* (ADH T), $0,1$ bis $0,5$ mol/L Methylacetoacetat, $0,2$ bis $0,8$ mol/L 2-Propanol, $0,01$ mmol/L NADPH

k_{des} wurde aus der linearen Abnahme des Umsatzes zwischen den Zeitpunkten $t = 4$ d und $t = 9,5$ d berechnet.

Tabelle 3.5: Kenngrößen der kontinuierlichen Reduktion von MAA durch *E. coli* mit ADH T und Cofaktor-Regenerierung durch 2-Propanol-Oxidation

Maximale Raum-Zeit-Ausbeute	$62 \text{ g}^*\text{L}^{-1}*\text{d}^{-1}$
Maximaler Umsatz	0,72
Gesamte Produktmenge	13,5 g
Katalysatorausnutzung	$1,19 \text{ g}_P/\text{g}_{BFG}$
Deaktivierungskonstante k_{des}	$0,0447 \text{ d}^{-1}$

Der zuvor beschriebene kontinuierliche Biotransformationsprozess wurde mit einer geringeren Anfangskonzentration an Methylacetoacetat und 2-Propanol wiederholt, um eine Inaktivierung durch hohe Substrat- und Cosubstratkonzentrationen auszuschließen. Die für diesen Versuch gewählten Prozessparameter sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst.

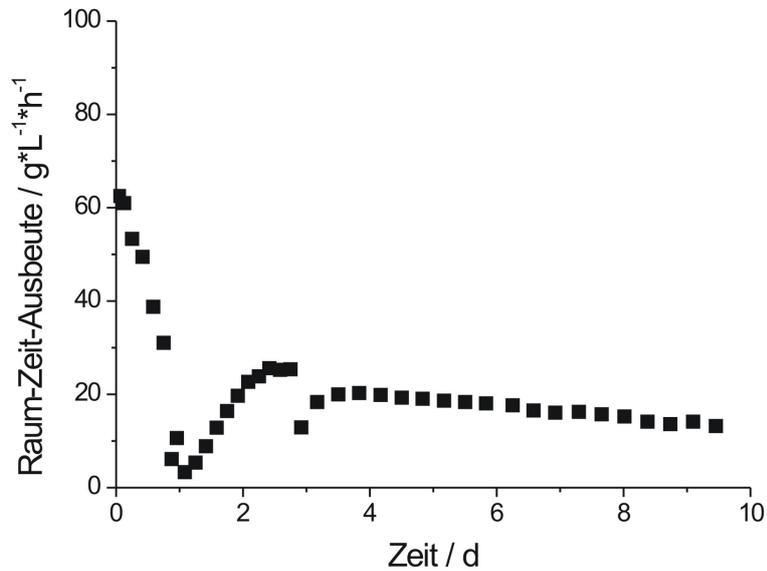


Abbildung 3.11: Raum-Zeit-Ausbeute während der kontinuierlichen Reduktion von Methylacetoacetat durch *E. coli* mit ADH T und Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von 2-Propanol. Bedingungen: V=50 mL, 30°C, pH 6,0, 50 mmol/L KP_i -Puffer, 225 g_{BFG}/L rek. *E. coli* (ADH T), 0,1 bis 0,5 mol/L Methylacetoacetat, 0,2 bis 0,8 mol/L 2-Propanol, 0,01 mmol/L NADPH

Tabelle 3.6: Prozessbedingungen bei der kontinuierlichen Reduktion durch *E. coli* (ADH T) von MAA und Cofaktor-Regenerierung durch 2-Propanol-Oxidation

Zeitspanne [Tage]	MAA-Konzentration	2-Propanol-Konzentration	Verweilzeit τ [h]	Biomasse-Konzentration
0 bis 1	0,1 mol/L	0,2 mol/L	1	120 g/L
1 bis 7			1,25	
7 bis 10			5	

Abbildung 3.12 zeigt sowohl den Umsatz während dieser zweiten kontinuierlichen Synthese von (*S*)-MHB durch *E. coli* mit ADH T als auch die während des Prozesses erreichte Raum-Zeit-Ausbeute. Es ist zu erkennen, dass ein maximaler Umsatz von 75% erreicht wurde. Interessant ist, dass der Umsatz von $t = 1$ d bis $t = 3$ d zunimmt. Dies könnte durch eine abnehmende Substratüberschussinhibierung erklärt werden. Die Raum-Zeit-Ausbeute war mit bis zu $170 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ wesentlich höher als im ersten kontinuierlichen CSTR-Lauf. Die Kenngrößen des Prozesses sind in Tabelle 3.7 aufgeführt. Die Deaktivierungskonstante k_{des} wurde aus der linearen Abnahme des Umsatzes zwischen den Zeitpunkten $t = 8$ d und $t = 9,8$ d berechnet.

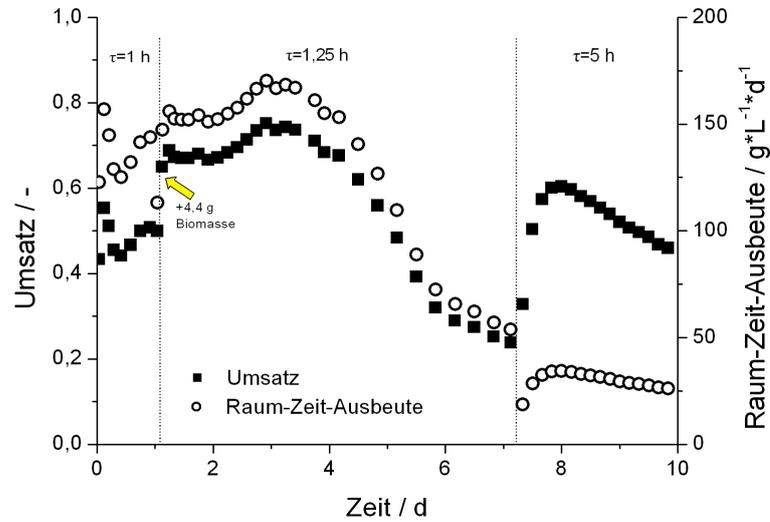


Abbildung 3.12: Zweite kontinuierliche Reduktion von Methylacetoacetat durch *E. coli* mit ADHT und Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von 2-Propanol. Bedingungen: $V=50$ mL, 30°C , $\text{pH } 6,0$, 50 mmol/L KP_i -Puffer, 120 $\text{g}_{\text{BFG}}/\text{L}$ rek. *E. coli* (ADHT), $0,1$ mol/L Methylacetoacetat, $0,2$ mol/L 2-Propanol, $0,01$ mmol/L NADPH

Tabelle 3.7: Kenngrößen der kontinuierlichen Reduktion von MAA durch *E. coli* mit ADHT und Cofaktor-Regenerierung durch 2-Propanol-Oxidation

Maximale Raum-Zeit-Ausbeute	$170 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$
Maximaler Umsatz	$0,75$
Gesamte Produktmenge	$59,1 \text{ g}$
Katalysatorausnutzung	$5,79 \text{ g}_P/\text{g}_{\text{BFG}}$
Deaktivierungskonstante k_{des}	$0,0824 \text{ d}^{-1}$

3.2.2.2 *E. coli* (rekombinante Carbonyl-Reduktase aus *Candida parapsilosis*)

Bei der Carbonyl-Reduktase aus *Candida parapsilosis* (*CpCR*) handelt es sich ebenfalls um eine (*S*)-selektive Alkoholdehydrogenase, die in der Lage ist, die Reduktion von Methylacetoacetat zu (*S*)-3-Methylhydroxybutyrat zu katalysieren. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Enzymen *LbADH* und ADHT besitzt dieses Enzym eine höhere Affinität zu dem nicht-phosphorylierten Cofaktor NADH (Peters et al., 1993). Rekombinante *E. coli*-Zellen, die *CpCR* überexprimieren, zeigen eine starke Substratüberschussinhibierung durch MAA und eine leichte 2-Propanol-Inhibierung (Abbildung 3.13).

3.2. KONTINUIERLICHE BIOTRANSFORMATIONEN

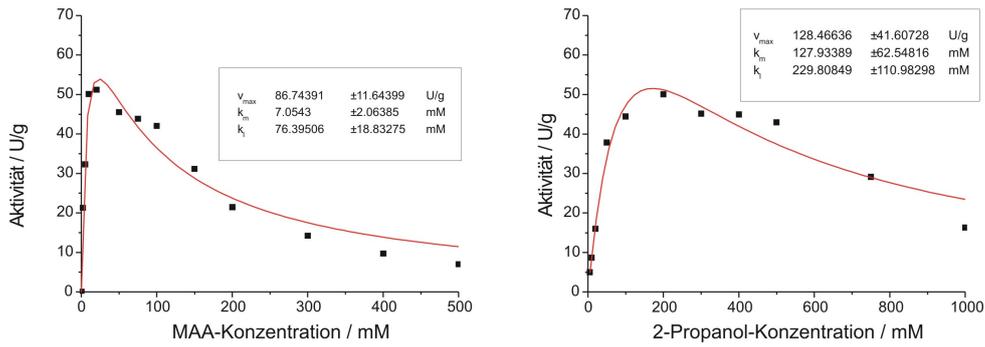


Abbildung 3.13: Katalytische Aktivität der *E. coli*-Zellen mit *CpCR* in Abhängigkeit der MAA- und 2-Propanol-Konzentration. Bedingungen: $V=1$ mL, 30°C , pH 6,0, 1 bis $10\text{ g}_{BFG}/\text{L}$ rek. *E. coli* (*CpCR*), 50 mmol/L KP_i -Puffer, links: 200 mmol/L 2-Propanol, rechts: 50 mmol/L MAA.

Analog zu den zuvor beschriebenen CSTR-Läufen wurde auch hier mit einer MAA-Konzentration von 100 mmol/L gestartet und dann die Substratkonzentration schrittweise erhöht. Die Prozessbedingungen des CSTR-Laufes mit *E. coli* (*CpCR*) sind in Tabelle 3.8 gezeigt.

Tabelle 3.8: Prozessbedingungen bei der kontinuierlichen Reduktion von MAA durch *E. coli* (*CpCR*) und Cofaktor-Regenerierung durch 2-Propanol-Oxidation

Zeitspanne [Tage]	MAA-Konzentration	2-Propanol-Konzentration	Verweilzeit τ [h]	Biomasse-Konzentration
0 bis 1	0,1 mol/L	0,2 mol/L	0,33	80 g/L
1 bis 2			0,125	
2 bis 5	0,2 mol/L	0,4 mol/L	0,5	
5 bis 7	0,3 mol/L	0,6 mol/L	2	

Abbildung 3.14 zeigt den Umsatz im zeitlichen Verlauf. Es ist zu erkennen, dass bei ansteigenden MAA-Konzentrationen die Deaktivierung zunimmt, was an der linearen Abnahme des Umsatzes erkennbar ist. Zwischen den Zeitpunkten $t = 1$ d und $t = 2$ d wurde aufgrund der kurzen Verweilzeit und des hohen Umsatzes eine hohe Raum-Zeit-Ausbeute zwischen 1850 und $1970\text{ g}^*\text{L}^{-1}\text{d}^{-1}$ erreicht. Die wesentlichen Kenngrößen des Prozesses sind in Tabelle 3.9 gezeigt. Der *ee*-Wert wurde für das aufgereinigte Endprodukt bestimmt.

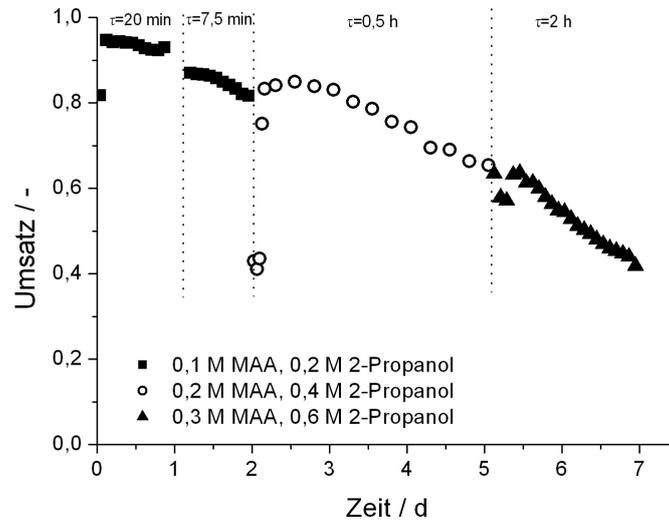


Abbildung 3.14: Kontinuierliche Reduktion von Methylacetoacetat durch *E. coli* mit *CpCR* und Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von 2-Propanol. Bedingungen: $V=50\text{ mL}$, 30°C , $\text{pH } 7,0$, $50\text{ mmol/L KP}_i\text{-Puffer}$, $80\text{ g}_{BFG}/\text{L}$ rek. *E. coli* (*CpCR*), $0,1$ bis $0,3\text{ mol/L}$ Methylacetoacetat, $0,2$ bis $0,6\text{ mol/L}$ 2-Propanol, $0,01\text{ mmol/L}$ NADH

Tabelle 3.9: Kenngrößen der kontinuierlichen Reduktion von MAA durch *E. coli* mit *CpCR* und Cofaktor-Regenerierung durch 2-Propanol-Oxidation

Maximale Raum-Zeit-Ausbeute	$1966\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$
Maximaler Umsatz	0,95
Gesamte Produktmenge	271 g
<i>ee</i>	>99%
Katalysatorausnutzung	$68\text{ g}_P/\text{g}_{BFG}$

Während der kontinuierlichen Reduktion von MAA durch *E. coli* mit *CpCR* zeigt sich, dass mit zunehmender Substrat- und Cosubstrat-Konzentration eine stärkere Deaktivierung eintritt. Tabelle 3.10 zeigt die Deaktivierungskonstanten k_{des} aus verschiedenen Abschnitten des CSTR-Laufes.

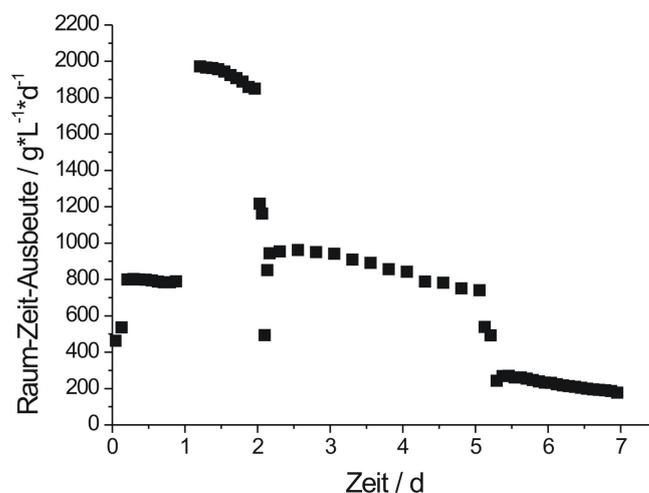


Abbildung 3.15: Raum-Zeit-Ausbeute während der kontinuierliche Reduktion von Methylacetoacetat durch *E. coli* mit *CpCR* und Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von 2-Propanol. Bedingungen: $V=50$ mL, 30°C , pH 7,0, 50 mmol/L KP_i -Puffer, $80 \text{ g}_{\text{BFG}}/\text{L}$ rek. *E. coli* (*CpCR*), 0,1 bis 0,3 mol/L Methylacetoacetat, 0,2 bis 0,6 mol/L 2-Propanol, 0,01 mmol/L NADH

Tabelle 3.10: Deaktivierungskonstanten während der kontinuierlichen Reduktion von MAA durch *E. coli* mit *CpCR* und Cofaktor-Regenerierung durch 2-Propanol-Oxidation

Zeitspanne [Tage]	MAA-Konzentration	2-Propanol-Konzentration	k_{des} [d^{-1}]
1 bis 2	0,1 mol/L	0,2 mol/L	0,0765
2,8 bis 5	0,2 mol/L	0,4 mol/L	0,0893
5,4 bis 7	0,3 mol/L	0,6 mol/L	0,1403

3.3 Übertragung auf andere Substrate

Die beschriebenen kontinuierlichen Biotransformationsexperimente haben gezeigt, dass rekombinante *E. coli*-Zellen als Biokatalysatoren zur kontinuierlichen Reduktion von Methylacetoacetat verwendet werden können. Die Wahl der rekombinant exprimierten Alkoholdehydrogenase bestimmt, ob das (*R*)- oder das (*S*)-Enantiomer synthetisiert wird. Die Ganzzell-Biokatalysatoren zeichnen sich z. T. durch eine extrem hohe Prozessstabilität aus. Im folgenden wird die kontinuierliche Reduktion von Butanon durch *E. coli* mit *LbADH* beschrieben. Analog zu den zuvor beschriebenen CSTR-Läufen wurde auch hier die Substrat- und Cosubstratkonzentration schrittweise erhöht. Tabelle 3.11 zeigt die Betriebsparameter der kontinuierlichen Reduktion von Butanon durch *E. coli* (*LbADH*).

Tabelle 3.11: Prozessbedingungen bei der kontinuierlichen Reduktion von Butanon durch *E. coli* (*LbADH*) und Cofaktor-Regenerierung durch 2-Propanol-Oxidation

Zeitspanne [Tage]	Butanon-Konzentration	2-Propanol-Konzentration	Verweilzeit τ [h]	Biomasse-Konzentration
0 bis 1	0,3 mol/L	0,6 mol/L	1	100 g/L
1 bis 2	0,5 mol/L	1	1,5	
2 bis 4	1 mol/L	2 mol/L	3	
4 bis 7	1,5 mol/L	3 mol/L	5	
7 bis 11	2 mol/L	3,5 mol/L	7	
11 bis 17			10	

Aufgrund des ungünstigeren thermodynamischen Gleichgewichtes ($k_{GG} \approx 0,6$) wird bei der Reduktion von Butanon und substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung weniger Umsatz erreicht als bei der Reduktion von Methylacetoacetat mit vergleichbarem stöchiometrischen Überschuss an 2-Propanol ($k_{GG} \approx 7,4$). Abbildung 3.16 zeigt den Umsatz während der kontinuierlichen Reduktion von Butanon durch *E. coli* (*LbADH*). Trotz des zweifachen Überschusses an 2-Propanol lag der Umsatz bei max. 52%. Die maximale Raum-Zeit-Ausbeute betrug $276 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (Abb. 3.17). Die Prozesskennzahlen des CSTR-Laufes sind in Tabelle 3.12 aufgeführt. Die Berechnung der Deaktivierungskonstanten k_{des} bezieht sich auf den Zeitraum $t = 7,8 \text{ d}$ bis $t = 8,8 \text{ d}$, bei dem extrem hohe Konzentrationen von 2 mol/L MAA und 3,5 mol/L 2-Propanol eingesetzt wurden. Es fällt auf, dass der verwendete Biokatalysator bei der Reduktion von Butanon eine ähnlich hohe Prozessstabilität aufwies wie bei der kontinuierlichen Reduktion von Methylacetoacetat. Dies ist an den ähnlichen Größenordnungen der Deaktivierungskonstanten zu erkennen.

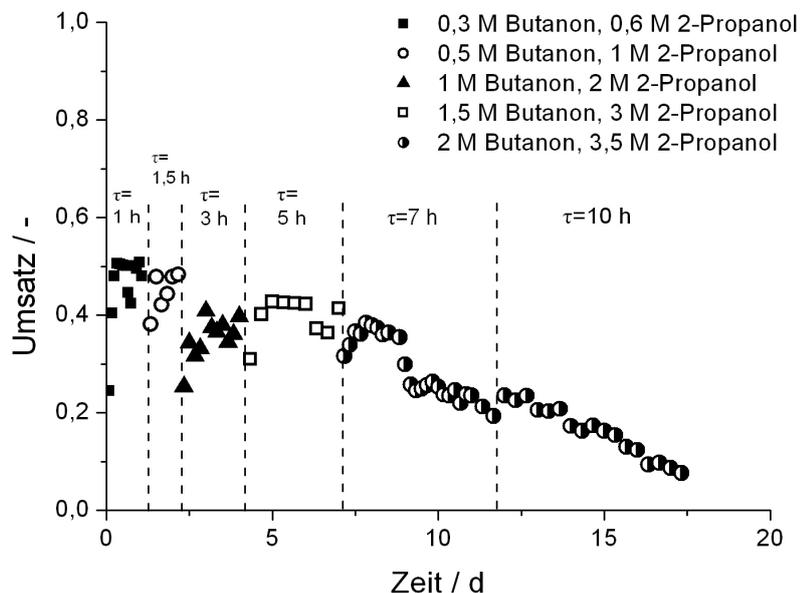


Abbildung 3.16: Kontinuierliche Reduktion von Butanon durch *E. coli* mit *LbADH* und Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von 2-Propanol. Bedingungen: $V=50$ mL, 30°C , $\text{pH } 6,0$, 50 mmol/L KP_i -Puffer, 100 g_{BFG}/L rek. *E. coli* (*LbADH*), $0,3$ bis 2 mol/L Butanon, $0,6$ bis $3,5$ mol/L 2-Propanol

Tabelle 3.12: Kenngrößen der kontinuierlichen Reduktion von Butanon durch *E. coli* mit *LbADH* und Cofaktor-Regenerierung durch 2-Propanol-Oxidation

Maximale Raum-Zeit-Ausbeute	$276 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$
Maximaler Umsatz	$0,52$
Gesamte Produktmenge	120 g
Katalysatorausnutzung	$24 \text{ g}_P / \text{g}_{BFG}$
Deaktivierungskonstante k_{des}	$0,0305 \text{ d}^{-1}$

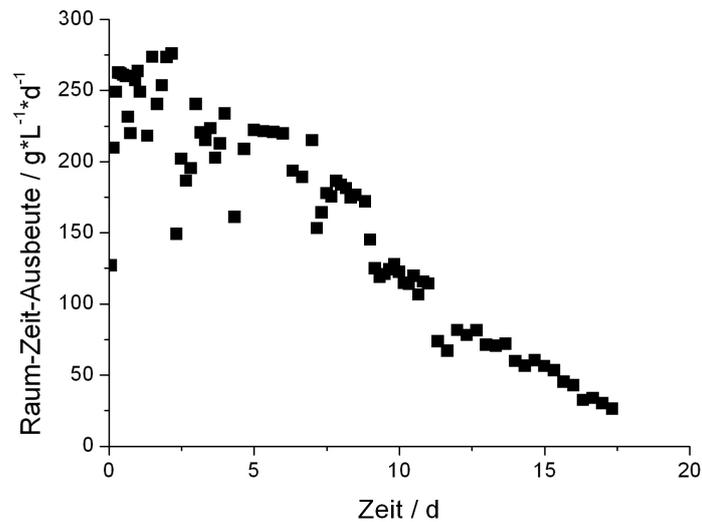


Abbildung 3.17: Raum-Zeit-Ausbeute während der kontinuierliche Reduktion von Butanon durch *E. coli* mit *LbADH* und Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von 2-Propanol. Bedingungen: $V=50$ mL, 30°C , $\text{pH } 6,0$, 50 mmol/L KP_i -Puffer, 100 g_{BF_G}/L rek. *E. coli* (*LbADH*), $0,3$ bis 2 mol/L Butanon, $0,6$ bis $3,5$ mol/L 2-Propanol

3.4 Alternative Cofaktorregenerierung

Die enzym-gekoppelte Cofaktor-Regenerierung durch Glucose-Dehydrogenase ist dadurch gekennzeichnet, dass die cofaktor-regenerierende Reaktion durch die Hydrolyse des Coprodukts Gluconolacton nahezu irreversibel ist und somit vollständigen Umsatz erlaubt. Ein Nachteil ist allerdings die Notwendigkeit die Ganzzell-Biokatalysatoren zu permeabilisieren, da Glucose beim Transport der Glucose über zelleigene Transportproteine in der Regel phosphoryliert wird und Glucose dem Cofaktor regenerierenden Enzym kaum zur Verfügung steht (Weckbecker und Hummel, 2004; Wichmann und Vasic-Racki, 2005; Goldberg et al., 2007a). Abbildung 3.18 zeigt Biotransformationsprozesse im Batch-Ansatz, bei denen permeabilisierte und intakte Zellen verwendet wurden und die Cofaktor-Regenerierung enzym-gekoppelt über die Oxidation von Glucose durch GDH stattfand.

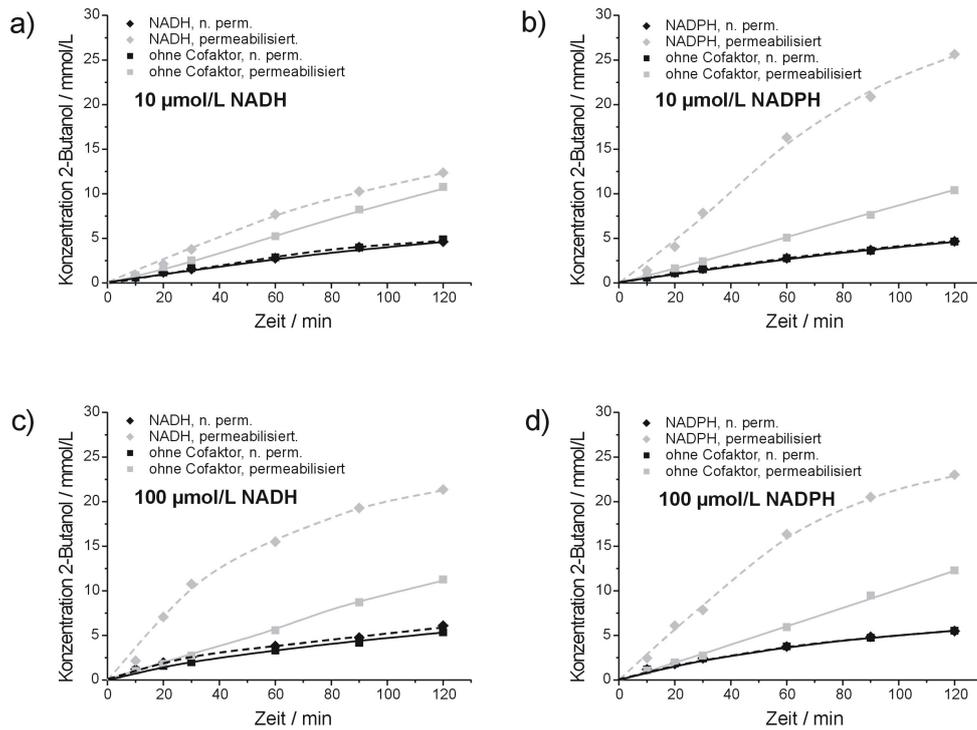


Abbildung 3.18: Biotransformation mit permeabilisierten Zellen im Batch-Ansatz, Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von Glucose und Zugabe von Cofaktoren. Bedingungen: $V=10\text{ mL}$, 30°C , $\text{pH } 6,0$ (1 mol/L NaOH), $50\text{ mmol/L KP}_i\text{-Puffer}$, $10\text{ g}_{BFG}/\text{L}$ rek. *E. coli* (*LbADH*, *GDH*), $0,1\text{ mol/L Butanon}$, $0,1\text{ mol/L Glucose}$

Es wird deutlich, dass in allen Fällen eine höhere Aktivität erreicht wurde, wenn permeabilisierte Zellen als Biokatalysatoren verwendet wurden. Dies ist durch die schnellere Zunahme des Produktes 2-Butanol zu erkennen. Die katalytische Aktivität der permeabilisierten Zellen konnte weiter durch die externe Zugabe von reduzierten Cofaktoren gesteigert werden. Dabei macht es bei geringen Cofaktor-Konzentrationen von $10\ \mu\text{mol/L}$ einen großen Unterschied, ob NADH oder NADPH zugegeben wird. Die katalytische Aktivität war aufgrund der Präferenz der *LbADH* für den phosphorylierten Cofaktor weitaus höher als bei Zugabe von NADH (Vgl. Abbildung 3.18a und 3.18b). Bei einer höheren Konzentration von $100\ \mu\text{mol/L}$ wurden dagegen nahezu identische katalytische Aktivitäten erreicht (Vgl. Abbildung 3.18c und 3.18d).

Eine Permeabilisierung von Ganzzell-Biokatalysatoren für kontinuierliche Prozesse ist nicht wünschenswert, da dadurch der Cofaktor aus den Zellen ausgewaschen wird und somit der Vorteil von Ganzzell-Biokatalysatoren, auf eine Zudosierung von Cofaktoren verzichten zu können, nicht mehr gegeben ist. Hier wurde ein rekombinanter *E. coli*-Stamm verwendet, der neben der *LbADH* und einer *GDH* aus *Bacillus megaterium* den Glucose-Faszilitator *GLF* aus *Zymomonas mobilis* (Weisser et al., 1995) exprimiert, der

eine höhere Glucose-Aufnahmerate in die Zelle bewirkt, ohne dass diese phosphoryliert wird.

Die Prozessbedingungen für die kontinuierliche Reduktion von Methylacetoacetat mit enzym-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung über Glucose-Oxidation sind in Tabelle 3.13 gezeigt. Abbildung 3.19 zeigt den Umsatz und die Raum-Zeit-Ausbeute im zeitlichen Verlauf dieses Versuches.

Tabelle 3.13: Prozessbedingungen bei der kontinuierlichen Reduktion von MAA und Cofaktor-Regenerierung durch Glucose-Oxidation

Zeitspanne [Tage]	MAA-Konzentration	Glucose-Konzentration	Verweilzeit τ [h]	Biomasse-Konzentration
0 bis 1	0,04 mol/L	0,2 mol/L	1	50 g/L

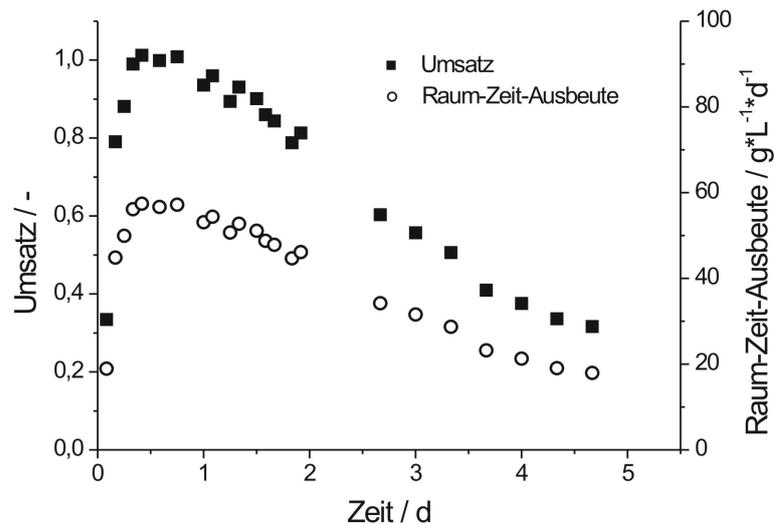


Abbildung 3.19: Kontinuierliche Reduktion von Methylacetoacetat und Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von Glucose. Bedingungen: $V=100$ mL, 30°C , pH 6,0 (1 mol/L NaOH), 50 mmol/L KP_i -Puffer, $50 \text{ g}_{\text{BFG}}/\text{L}$ rek. *E. coli* (*LbADH*, *GDH*, *GLF*), 0,04 mol/L MAA, 0,2 mol/L Glucose

Es ist zu erkennen, dass sich nach etwa 8 h ein Gleichgewicht eingestellt hat und für einen Zeitraum von etwa 10 h konstanter Umsatz erreicht wurde. An diesem Verlauf spiegelt sich wider, dass für die Erreichung eines Gleichgewichtes im CSTR in der Regel 5 Verweilzeiten benötigt werden. Nach ca. 1 Tag Prozessdauer ist eine kontinuierliche Abnahme des Umsatzes und damit auch mit der Raum-Zeit-Ausbeute zu beobachten. Tabelle 3.14 fasst die wesentlichen Kenngrößen dieses kontinuierlichen Prozesses zusammen. Die De-

aktivierungskonstante k_{des} wurde aus der linearen Abnahme des Umsatzes zwischen den Zeitpunkten $t = 1, 3$ d und $t = 3, 7$ d berechnet.

Tabelle 3.14: Kenngrößen der kontinuierlichen Reduktion von MAA und Cofaktor-Regenerierung durch Glucose-Oxidation

Maximale Raum-Zeit-Ausbeute	57,4 g*L ⁻¹ *d ⁻¹
Maximaler Umsatz	0,999
Gesamte Produktmenge	16,87 g
Katalysatorausnutzung	3,378 g _P /g _{BFG}
Deaktivierungskonstante k_{des}	0,219 d ⁻¹

Die enzym-gekoppelte Cofaktor-Regenerierung durch die Foriatdehydrogenase (FDH)-katalysierte Oxidation von Formiat ist eine weitverbreitete Methode in der Bioanalyse (Hummel und Kula, 1989; Seelbach et al., 1996; Tishkov et al., 1999). In industriellem Maßstab wird diese Methode der Cofaktor-Regenerierung bei der Produktion von *L-tert*-Leucin verwendet (Bommarius et al., 1995). Die Vorteile dieser Methode liegen bei der Entstehung von Kohlendioxid, dessen leichter Entfernbarkeit aus dem Bioreaktionsgemisch und, dadurch bedingt, bei der günstigen thermodynamischen Gleichgewichtslage des Reaktionssystems. Nachteile liegen bei der meist geringen Aktivität der FDH und der Präferenz für den nicht-phosphorylierten Cofaktor NAD, wodurch oft eine Inkompatibilität zwischen NADPH-abhängigem Produktionsenzym und dem NAD-abhängigen Cofaktorregenerierungs-Enzym vorliegt.

Die enzymgekoppelte Cofaktor-Regenerierung durch Formiat-Dehydrogenase (FDH) bei Ganzzell-Biotransformationsprozessen mit rekombinanten *E. coli* wurde umfangreich in der Dissertation von I. Tan untersucht (Tan, 2006). Es zeigte sich, dass rekombinante *E. coli*-Zellen, die *LbADH* und die *FDH* aus *Mycobacterium vaccae* (Galkin et al., 1995) exprimieren, die Reduktion von Methylacetoacetat katalysieren können. Bei der kontinuierlichen Biotransformation im CSTR trat jedoch eine rapide Deaktivierung des Biokatalysators auf (Schroer et al., 2007). Zu Vergleichszwecken soll dieser CSTR-Lauf hier nochmals aufgeführt werden. Die Prozessbedingungen sind in Tabelle 3.15 gezeigt.

Tabelle 3.15: Prozessbedingungen bei der kontinuierlichen Reduktion von MAA und Cofaktor-Regenerierung durch Formiat-Oxidation (Tan, 2006)

Zeitspanne [Tage]	MAA-Konzentration	Formiat-Konzentration	Verweilzeit τ [h]	Biomasse-Konzentration
0 bis 1	0,03 mol/L	0,0625 mol/L	1	30 g/L
1 bis 2				40 g/L

Abbildung 3.20 zeigt den Umsatz und die Raum-Zeit-Ausbeute im zeitlichen Verlauf. Es ist zu erkennen, dass nach Erreichen des Gleichgewichtsumsatzes nach etwa 5 Verweilzeiten eine Deaktivierung des Katalysators eintritt und der Umsatz linear abnimmt. Eine Zugabe von 10 g des Biokatalysators ließ den Umsatz kurzzeitig von 18% auf 30% ansteigen, die lineare Abnahme des Umsatzes setzte sich jedoch fort. Die wesentlichen Prozesskennzahlen dieses CSTR-Laufes sind in Tabelle 3.16 gezeigt.

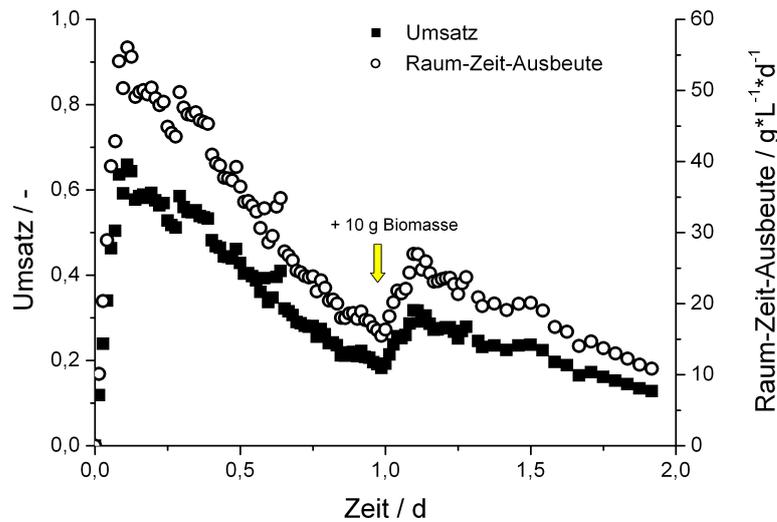


Abbildung 3.20: Kontinuierliche Reduktion von Methylacetoacetat und Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von Formiat. Bedingungen: $V=200\text{ mL}$, 30°C , $\text{pH } 6,0$ (5 mol/L HCl), $50\text{ mmol/L KP}_i\text{-Puffer}$, $30\text{ bis }40\text{ g}_{BFG}/\text{L}$ rek. *E. coli* (*LbADH*, *FDH*), $0,03\text{ mol/L MAA}$, $0,0625\text{ mol/L Na-Formiat}$ (Tan, 2006)

Tabelle 3.16: Kenngrößen der kontinuierlichen Reduktion von MAA und Cofaktor-Regenerierung durch Formiat-Oxidation (Tan, 2006)

Maximale Raum-Zeit-Ausbeute	$56\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$
Maximaler Umsatz	0,66
Gesamte Produktmenge	8,76 g
Katalysatorausnutzung	$1,095\text{ g}_P/\text{g}_{BFG}$
Deaktivierungskonstante k_{des}	$0,96\text{ d}^{-1}$

3.5 Zusammenfassung

Die wesentlichen Ergebnisse der durchgeführten kontinuierlichen Biotransformationen im Reaktorsystem mit Biokatalysatorrückhaltung (CSTR) lassen sich wie folgt zusammen-

fassen:

- Durch die Verwendung von rekombinanten *E. coli*-Zellen mit entsprechenden rekombinanten Alkoholdehydrogenasen ist die Synthese von (*R*)- und (*S*)-Alkoholen möglich.
- Die *in vitro*-Eigenschaften der rekombinanten Enzyme (z. B. kinetische Eigenschaften, Stabilität) prägen auch die Eigenschaften des Ganzzell-Biokatalysators.
- Der rekombinante *E. coli*-Stamm mit *LbADH* zeigte eine enorm hohe Prozessstabilität. Mit diesem Biokatalysator war eine Biotransformation unter extrem hohen MAA- und 2-Propanol-Konzentrationen möglich.
- Es konnte gezeigt werden, dass während der substrat-gekoppelten Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von 2-Propanol nur eine geringe Schädigung der Membranintegrität auftritt. Bei der kontinuierlichen Reduktion von MAA durch *E. coli* mit *LbADH* konnte lange Zeit ein hoher Umsatz ohne Zudosierung von externem Cofaktor stattfinden.
- Die hohe Prozessstabilität des *E. coli*-Stammes mit *LbADH* wurde auch bei der kontinuierlichen Reduktion von Butanon beobachtet.
- Bei kontinuierlichen Prozessen mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von 2-Propanol wurden weitaus höhere Stabilitäten der Ganzzell-Biokatalysatoren beobachtet als bei Prozessen mit enzym-gekoppelter Cofaktorregenerierung durch Formiat-Dehydrogenase oder Glucose-Dehydrogenase. Die höhere Stabilität ist wahrscheinlich auf eine bessere Retention des Cofaktors in den Zellen bei der substrat-gekoppelten Cofaktorregenerierung zurückzuführen.

Kapitel 4

Biotransformationsprozesse mit *in situ*-Acetonabtrennung

4.1 Einleitung

Die substrat-gekoppelte Cofaktor-Regenerierung ist dadurch gekennzeichnet, dass sowohl die eigentliche Produktreaktion als auch die den Cofaktor regenerierende Reaktion durch ein und denselben Biokatalysator umgesetzt wird. Die Konkurrenz von Substrat, Produkt, Cosubstrat und Coprodukt bewirkt eine thermodynamische Limitierung, die einen vollständigen Umsatz verhindert. Für die Regenerierung mit 2-Propanol lässt sich die Gleichgewichtslage durch folgende Gleichung beschreiben:

$$k_{GG} = \frac{[Produkt] \cdot [Aceton]}{[Substrat] \cdot [2 - Propanol]} \quad (4.1)$$

Demzufolge kann der Umsatz durch den Einsatz von hohen 2-Propanolkonzentrationen erzielt werden (Peters 1998). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Abtrennung des Nebenproduktes Aceton. Die Entfernung von Aceton aus einem Reaktionsgemisch kann über verschiedene Strategien erfolgen:

- Strippen
- Pervaporation
- Extraktion

Dieses Kapitel beschreibt den Einsatz der oben genannten Strategien für die Reduktion von Ketonen mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung durch *Escherichia coli*.

4.1. EINLEITUNG

Als Modellreaktion für Prozesse mit Aceton-Abtrennung durch Strippen und Pervaporation wurde die Reduktion von 2,5-Hexandion ausgewählt (Abb. 4.1). Bei der Reduktion von 2,5-Hexandion zum korrespondierenden Diol handelt es sich um eine Zweischiittreaktion. Aus diesem Grund wird das Cosubstrat 2-Propanol im zweifachen Überschuss benötigt.

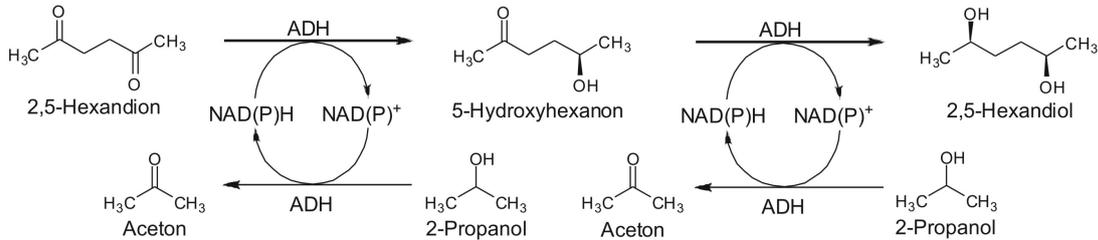


Abbildung 4.1: Reaktionsschem der Reduktion von 2,5-Hexandion mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung.

Abbildung 4.2 zeigt exemplarisch einen Konzentrationsverlauf für die Reduktion von 2,5-Hexandion zu (2*R*,5*R*)-Hexandiol mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung durch rekombinante *E. coli*-Zellen mit *LbADH*. Es ist zu erkennen, dass es trotz des 10fachen Überschusses an 2-Propanol lediglich zu einer Ausbeute von 54% in Bezug auf das Produkt (2*R*,5*R*)-Hexandiol kommt.

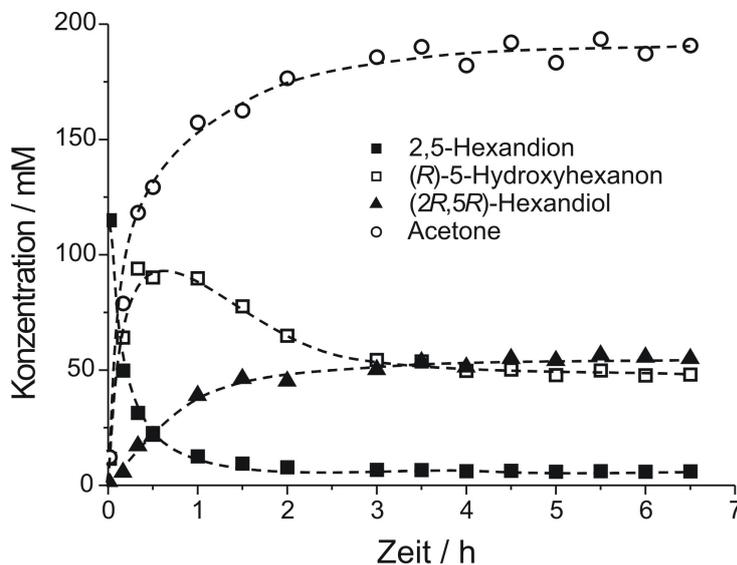


Abbildung 4.2: Biokatalytische Reduktion von 2,5-Hexandion mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung. Bedingungen: $V=10$ mL, 40°C , $\text{pH } 6,0$, 50 mmol/L KPi -Puffer, 50 g_{BF₃}/L rek. *E. coli* (*LbADH*), $0,1$ mol/L 2,5-Hexandion, 1 mol/L 2-Propanol.

Abbildung 4.3 zeigt, dass die Ausbeute und der Umsatz in dem beschriebenen Reaktionssystem durch einen stöchiometrischen Überschuss des Cosubstrats 2-Propanol gesteigert

werden können. Doch selbst bei einem 20fachen 2-Propanol-Überschuss lässt sich die Ausbeute an 2,5-Hexandiol lediglich auf etwa 70% steigern. Die Entfernung von Aceton aus dem Reaktionsgemisch ist bei einem solchen thermodynamisch stark limitierten Reaktionssystem erstrebenswert um die Ausbeute weiter zu steigern.

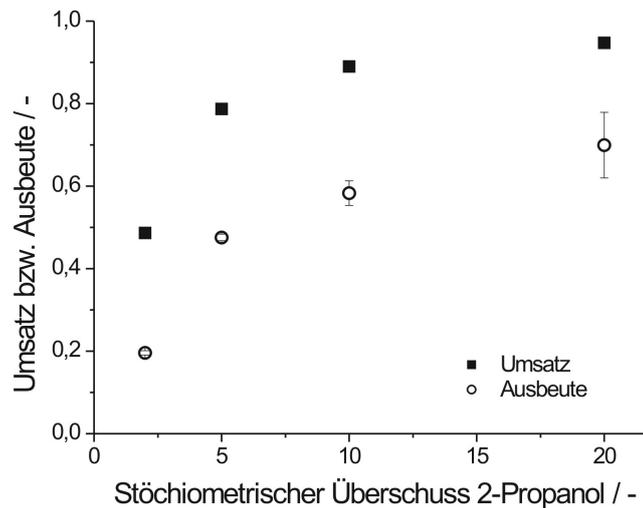


Abbildung 4.3: Abhängigkeit des Umsatzes und der Ausbeute vom 2-Propanol-Überschuss. Bedingungen: $V=1$ mL, 25°C , $\text{pH } 6,0$, 50 mmol/L KP_i -Puffer, 50 g_{BFG}/L rek. *E. coli* (*LbADH*), $0,1$ mol/L 2,5-Hexandion, variierende Konzentration 2-Propanol, Reaktionszeit=24 h.

Aus den in Abbildung 4.3 dargestellten Werten für den Umsatz und die Ausbeute lässt sich eine Gleichgewichtskonstante von $k_{GG} \approx 0,1$ bestimmen.

Neben der thermodynamischen Limitierung kommt es in substrat-gekoppelten Reaktionsansätzen außerdem zu einer negativen Beeinflussung der katalytischen Aktivität und der Stabilität der verwendeten Biokatalysatoren. Abbildung 4.4 zeigt den Einfluss von Aceton auf die katalytische Aktivität von *E. coli* (*LbADH*) bei der Reduktion von 2,5-Hexandion zu (2*R*,5*R*)-Hexandiol. Es ist zu erkennen, dass beide Teilreaktionen stark durch Aceton inhibiert werden.

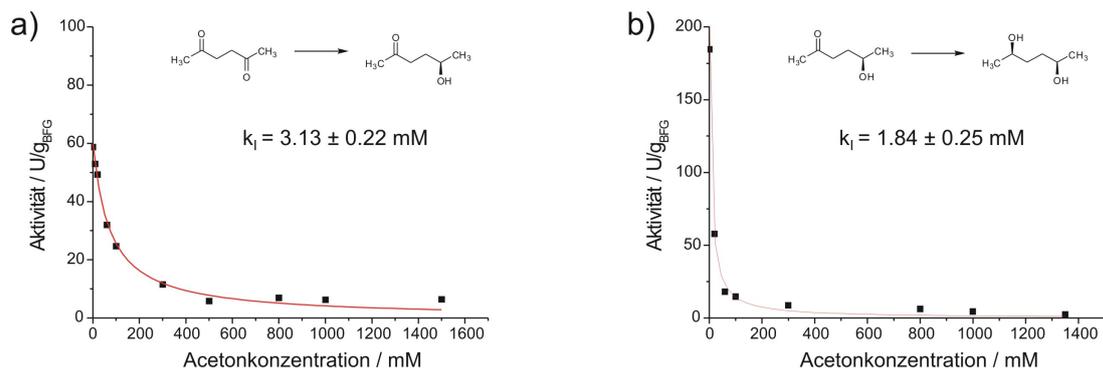


Abbildung 4.4: Einfluss von Aceton auf die katalytische Aktivität von *E. coli* (*LbADH*). Links: Reduktion von 2,5-Hexandion zu (*R*)-5-Hydroxyhexan-2-on. Bedingungen: $V=1$ mL, 40°C , pH 6,0, 50 mmol/L KP_i -Puffer, $2,5 \text{ g}_{\text{BFG}}/\text{L}$ rek. *E. coli* (*LbADH*), 0,2 mol/L 2,5-Hexandion, 0,5 mol/L 2-Propanol. Rechts: Reduktion von (*R*)-5-Hydroxyhexan-2-on zu (2*R*,5*R*)-Hexandiol. $V=1$ mL, 40°C , pH 6,0, 50 mmol/L KP_i -Puffer, $2,5 \text{ g}_{\text{BFG}}/\text{L}$ rek. *E. coli* (*LbADH*), 0,4 mol/L (*R*)-Hydroxyhexan-2-on, 0,5 mol/L 2-Propanol.

Im folgenden werden nun Biotransformations-Prozesse im Satzreaktor beschrieben, bei denen eine thermodynamische Limitierung durch *in situ*-Acetonabtrennung überwunden wurde.

4.2 Stripping

Bei der Methode des Strippens wird ein Inertgasstrom (z. B. Helium, Stickstoff, Druckluft) in die abzureichernde Lösung geleitet (Abb. 4.5). Aufgrund des niedrigen Dampfdrucks von Aceton wird dieses aus der Lösung getragen. Bei der Reaktionsführung ist zu berücksichtigen, dass auch die anderen Reaktionspartner, insbesondere 2-Propanol durch das Strippen ausgeht werden. Abbildung 4.6 zeigt die Abnahme der Acetonkonzentration im zeitlichen Verlauf.

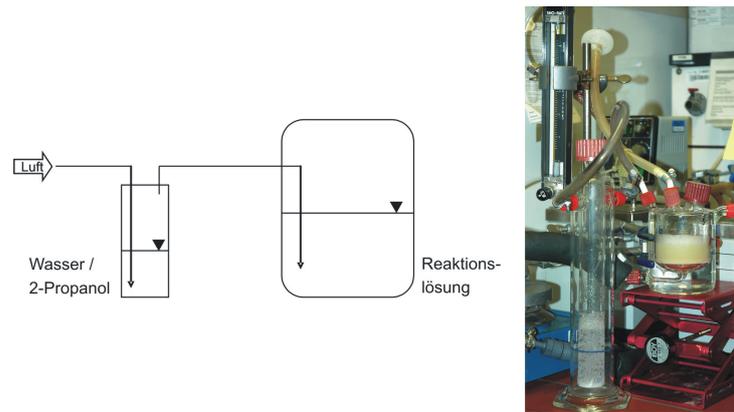


Abbildung 4.5: Fließschema und Foto des Bioreaktors für Biotransformationen mit Acetonabtrennung durch Strippen

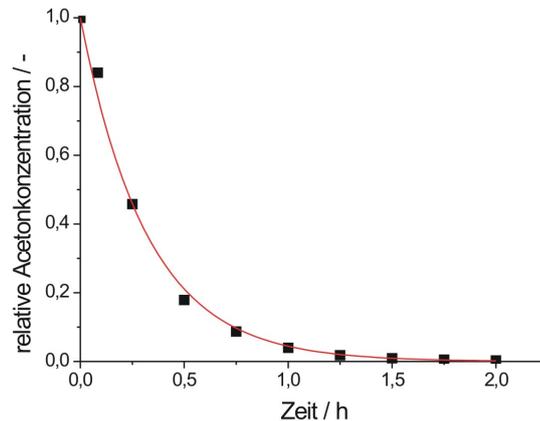


Abbildung 4.6: Abnahme der Acetonkonzentration durch Strippen. Bedingungen: $V=50$ mL, 40°C , pH 6,0, 50 mmol/L KP_i -Puffer, 50 mmol/L Aceton, Luftstrom: 1 L/min, Waschlösung: 50% (v/v) Wasser/2-Propanol, 50 mL.

Diese Methode der Acetonabtrennung wurde schon erfolgreich für enzymkatalysierte Reaktionen angewandt. Stillger et al. führten die Reduktion von 5-Oxohexansäureethylester durch Carbonylreduktase von *Candida parapsilosis* mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung durch. Der Umsatz konnte durch *in situ* Acetonantfernung von 75% auf 97% gesteigert werden (Stillger et al., 2002). Auch in industriellem Maßstab ist diese Methode der integrierten Acetonabtrennung etabliert, beispielsweise für die Synthese von (*R*)-Ethyl-3-Hydroxybutyrat und (*R*)-Methyl-3-Hydroxybutyrat mit isolierter *LbADH* (Rosen et al., 2004; Daußmann et al., 2006). Die Anwendung von integrierter Acetonabtrennung durch Strippen für Ganzzell-Biotransformationsprozesse ist durch Goldberg et al. beschrieben worden. Es wurden lyophilisierte *E. coli*-Zellen verwendet, die

als Produktionsenzym ADH-'A' aus *Rhodococcus ruber* DSM 44541 rekombinant exprimierten. Durch diese Strategie der Prozessführung konnten die Substrate Acetophenon, 4-(4-Hydroxyphenyl)butan-2-on (Himbeerketon) und 2,5-Hexandion vollständig zum entsprechenden Alkohol bzw. Diol umgesetzt werden (Goldberg et al., 2006).

Abbildung 4.7 zeigt die biokatalytische Reduktion von 2,5-Hexandion zum (2*R*,5*R*)-Hexandiol mit *E. coli* (*LbADH*). Es ist zu erkennen, dass die Acetonkonzentration durch das Strippen unter 75 mmol/L gehalten werden konnte. Um ein Austragen von 2-Propanol aus der Reaktionslösung zu verhindern, wurde der Luftstrom vor dem Eintritt in die Reaktionslösung durch ein Wasser/2-Propanol-Gemisch geleitet. Die Ausbeute an (2*R*,5*R*)-Hexandiol wurde durch die Acetonabtrennung von 54% auf über 95% gesteigert.

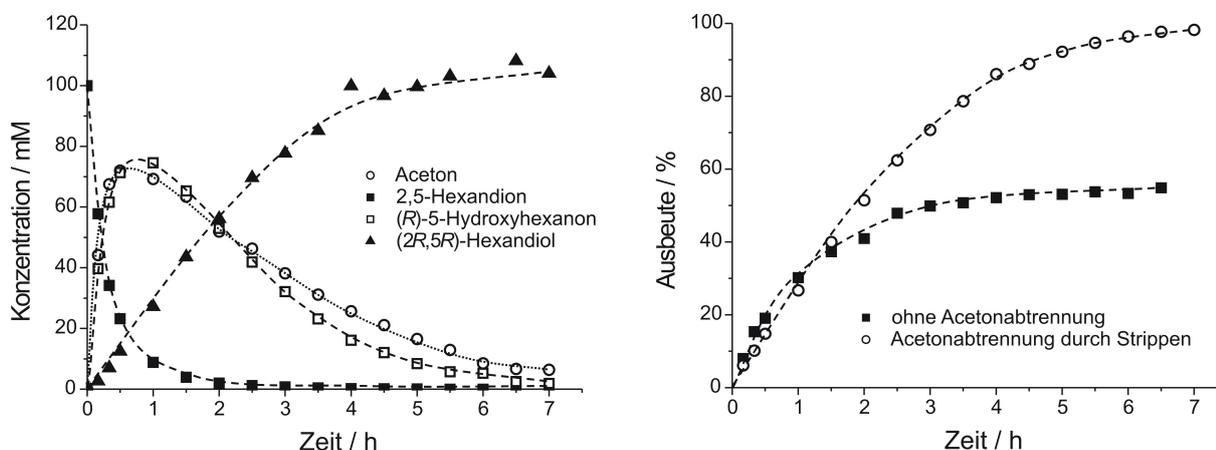


Abbildung 4.7: Reduktion von 2,5-Hexandion mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung und Acetonabtrennung durch Strippen. Bedingungen: $V=50$ mL, 40°C , pH 6,0, 50 mmol/L KP_i -Puffer, 50 $\text{g}_{\text{BFG}}/\text{L}$ rek. *E. coli* (*LbADH*), 0,1 mol/L 2,5-Hexandion, 1 mol/L 2-Propanol, Luftstrom 1 L/min.

4.3 Pervaporation

Bei der Pervaporation handelt es sich um ein Membrantrennverfahren, bei der die eine Seite einer porenlosen Polymermembran mit einer flüssigen Mischung verschiedener Komponenten in Kontakt ist, während auf der anderen Membranseite das Permeat in der Dampfphase entfernt wird. Der transmembrane Fluss wird durch einen Partialdruckgradienten über die Membran verursacht. Dieser kann durch Anlegen eines Vakuums auf der Permeat-Seite erreicht werden oder durch Vorbeiführen eines Trägergasstroms.

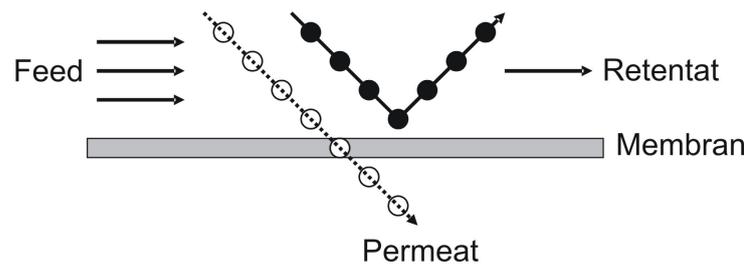


Abbildung 4.8: Trennprinzip der Pervaporation

In der Biotechnologie spielt die Pervaporation eine wichtige Rolle bei der Abtrennung von Fermentationsprodukten. So sind zahlreiche Fermentationsprozesse mit *Saccharomyces*-Arten beschrieben, bei denen das Hauptprodukt Ethanol mittels Pervaporation aus dem Prozess abgetrennt wird. Weitere Produkte sind Aceton, Butanol und 2-Propanol aus Fermentationsprozessen mit verschiedenen Arten von *Chlostridium* (Stark und von Stockar, 2003).

Die Reduktion von 2,5-Hexandion durch *E. coli* (*LbADH*) wurde in dem in Abb. 4.9 gezeigten Reaktor durchgeführt. Zuvor erfolgte eine Charakterisierung verschiedener Pervaporationsmembranen, indem die Massenflüsse J von Aceton, 2-Propanol und Wasser durch die Membran bestimmt wurden (Abb. 4.10). Bei den Bezeichnungen der Membranen handelt es sich um Bezeichnungen des Herstellers. Nähere Beschreibungen der Membranmaterialien und -eigenschaften finden sich in Kapitel 8.

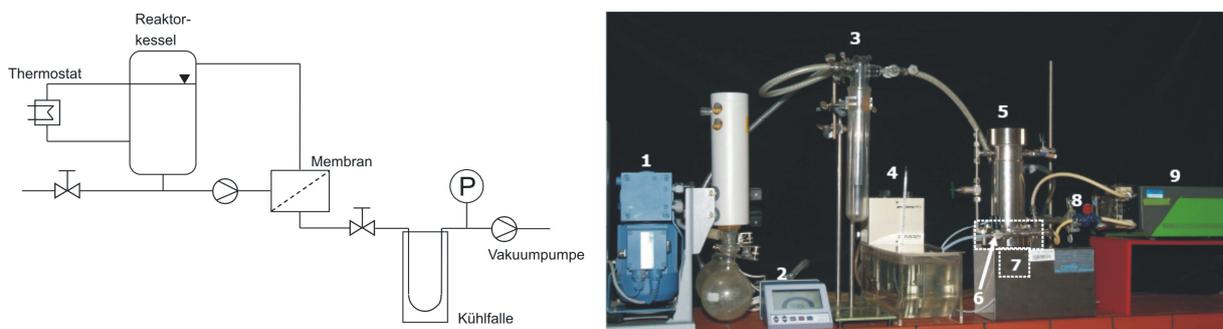


Abbildung 4.9: Fließschema und Foto des Pervaporationsreaktors. 1: Vakuumpumpe, 2: Vakuummesser und Anzeiger, 3: Kühlfalle, 4: Wasserbad, 5: Reaktionsraum, 6: Ablaufventil Feed, 7: Membraneinheit, 8: Probenahmeventil, 9: Schlauchpumpe für Zirkulation der Reaktionslösung

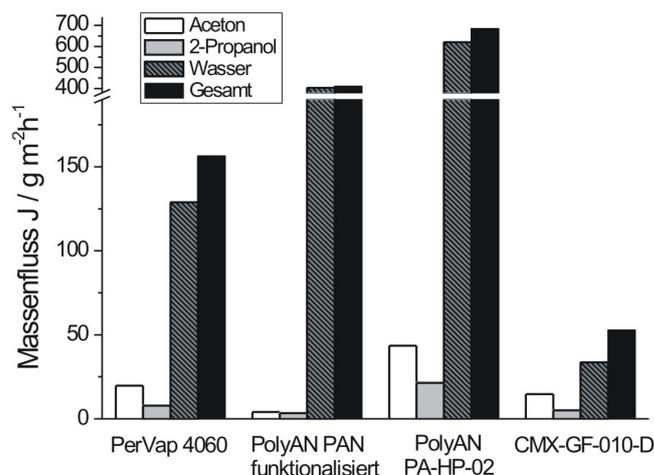


Abbildung 4.10: Massenflüsse durch verschiedene Pervaporationsmembranen. Bedingungen: $V=160$ mL, 40°C , $\text{pH } 6,0$, 50 mmol/L KP_i -Puffer, 50 mmol/L Aceton, 50 mmol/L 2-Propanol, Vakuum: 15 ± 3 mbar, Umwälzung: 300 mL/min

Es ist zu erkennen, dass neben dem Transmembranfluss von Aceton auch ein Massenfluss von 2-Propanol auftritt. Es kommt also während des Biotransformationsprozesses ähnlich wie beim Strippen zu einem Austrag des Cosubstrates 2-Propanol, der durch regelmäßige Nachdosierung kompensiert werden muss. Des Weiteren erfolgt eine Aufkonzentrierung aller Reaktanden und des Biokatalysators während des Biotransformationsprozesses durch den Flüssigkeitsverlust aufgrund des hohen Transmembranflusses von Wasser.

Des Weiteren wurden die Selektivitäten S der verschiedenen Membranen bestimmt (Abb. 4.11). Die Selektivität S für Aceton errechnet sich nach

$$S_{\text{Aceton}} = \frac{J_{\text{Aceton}}}{J_{2\text{-Propanol}}} \quad (4.2)$$

Für alle beschriebenen Biotransformationsprozesse mit integrierter Acetonabtrennung durch Pervaporation wurde die Pervaporationsmembran PolyAn PA-HP-02 verwendet, da diese den höchsten Aceton-Massenfluss bei gleichzeitig akzeptabler Selektivität aufweist.

Abbildung 4.12 zeigt die Biotransformation im Satzreaktor mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung und Acetonabtrennung mittels Pervaporation. Es ist zu erkennen, dass die Acetonkonzentration während der Reaktion nicht höher als 67 mmol/L ansteigt. Infolgedessen kommt es im Vergleich zum Batch-Prozess ohne Acetonabtrennung zu einer Steigerung der Ausbeute an $(2R,5R)$ -Hexandiol auf $>90\%$. Zu beachten ist, dass

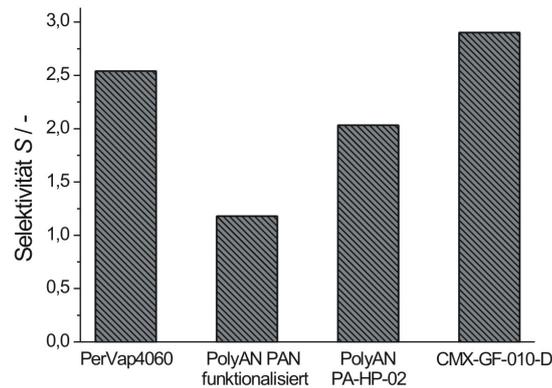


Abbildung 4.11: Selektivitäten der verschiedenen Pervaporationsmembranen

es durch den Wasserverlust während der Pervaporation (21%) zu einer Aufkonzentrierung aller Reaktanden kommt, der bei der Berechnung der Ausbeute berücksichtigt werden muss.

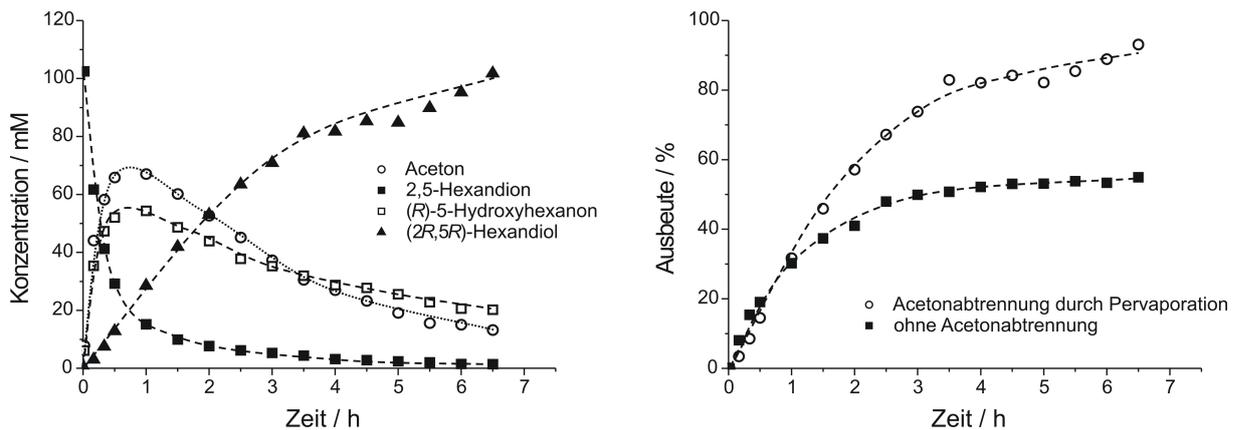


Abbildung 4.12: Reduktion von 2,5-Hexandion mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung und Acetonabtrennung durch Pervaporation. Bedingungen: $V=160$ bis 126 mL, 40°C , $\text{pH } 6,0$, 50 mmol/L KP_i -Puffer, 50 g_{BF_G}/L rek. *E. coli* (*LbADH*), $0,1$ mol/L 2,5-Hexandion, 1 mol/L 2-Propanol, Umwälzung 300 mL/min, Vakuum 15 ± 3 mbar

4.4 2-Phasensysteme

Ein häufig auftretendes Problem bei der Reduktion prochiraler Ketone zum chiralen Alkohol ist die geringe Löslichkeit vieler Substrate in wässriger Lösung. Eine Erhöhung der Substratlöslichkeit lässt sich durch den Zusatz von löslichkeitsvermittelnden Stoffen, z. B. organischen Lösungsmitteln, Cyclodextrinen oder ionischen Flüssigkeiten bewirken (Villela et al., 2003; Zelinski et al., 1999; Schumacher et al., 2006) oder auch durch den Einsatz von zweiphasigen Systemen (Liese et al., 1998; Villela et al., 2003). In einem zweiphasigen System sind der Biokatalysator und bei Prozessen mit isolierten Enzymen die Cofaktoren in der wässrigen Phase lokalisiert, während das hydrophobe Substrat in hoher Konzentration in der nicht-wässrigen Phase vorliegt. Aufgrund des Substratverbrauchs in der wässrigen Phase durch die biokatalytische Reaktion wird weiteres Substrat aus der nicht-wässrigen Phase heraus in die wässrige Phase nachgeliefert (Abbildung 4.13). Die Verteilung einer Substanz zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Lösungsmitteln wird durch den Verteilungskoeffizienten m beschrieben:

$$m = \frac{C_{\text{organische Phase}}}{C_{\text{wässrige Phase}}} \quad (4.3)$$

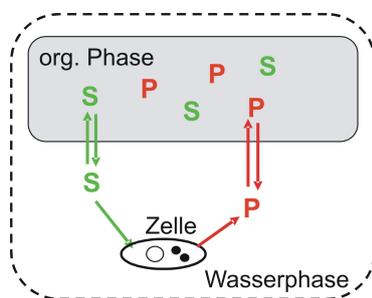


Abbildung 4.13: Biotransformation in wässrig-organischen Zweiphasen-Systemen

Die Wahl des nicht-wässrigen Lösungsmittels hat maßgeblichen Einfluss auf die Aktivität, die Stabilität und in manchen Fällen auch auf die Selektivität des Biokatalysators (Schöfer et al., 2001). Beispiele für die Reduktion von prochiralen Ketonen in zweiphasigen Systemen mit isolierten Enzymen und Ganzzell-Biokatalysatoren sind bekannt (Kruse et al., 1996; Liese et al., 1998; Villela et al., 2003; Eckstein et al., 2004; Kizaki et al., 2001; Pfruender et al., 2004).

Hier wurden Biotransformationen mit rekombinanten *E. coli*-Zellen (*LbADH*) in zwei verschiedenen zweiphasigen Systemen durchgeführt. Zum einen wurde *tert*-Butylmethylether (MTBE) als nicht-wässrige Phase verwendet. Die andere Biotransformation wurde in einem zweiphasigen System bestehend aus KP_i -Puffer und der ionischen Flüssigkeit

[BMIM][$(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}$] (1-Butyl-3-Methylimidazoliumbis((trifluormethyl)sulfonyl)amid) (Abbildung 4.14) durchgeführt. Diese beiden zweiphasigen Systeme wurden schon durch (Eckstein et al., 2004) für die Reduktion von 2-Oktanol mit isolierter *LbADH* untersucht. Durch die unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten von Aceton in beiden zweiphasigen Systemen (siehe Tabelle 4.1) wurden in beiden Systemen unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeiten und Umsätze erzielt.

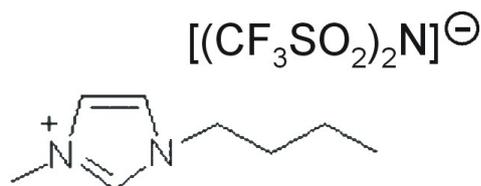


Abbildung 4.14: Strukturformel der ionischen Flüssigkeit [BMIM][$(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}$]

Tabelle 4.1: Verteilungskoeffizienten von Aceton und 2-Propanol (Eckstein et al., 2004)

System	2-Propanol	Aceton
MTBE / Puffer	1,0	1,1
[BMIM][$(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}$] / Puffer	0,4	2,0

Neben der Extraktion von Aceton in die nicht-wässrige Phase ist es für das Erreichen eines maximalen Umsatzes ebenso erforderlich das Produkt effektiv aus der wässrigen Phase in die nicht-wässrige Phase zu extrahieren. Die Verteilungskoeffizienten von 2,5-Hexandion und 2,5-Hexandiol für zweiphasige Systeme mit [BMIM][$(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}$]. Tabelle 4.2 zeigt, dass das Produkt 2,5-Hexandiol kaum in die nicht-wässrige Phase extrahiert wird. Aus diesem Grund ist die Reduktion von 2,5-Hexandion zu 2,5-Hexandiol eine denkbar ungeeignete Modellreaktion für die Anwendung eines zweiphasigen Systems mit den beschriebenen Komponenten.

Tabelle 4.2: Verteilungskoeffizienten von 2,5-Hexandion und 2,5-Hexandiol

System	2,5-Hexandion	2,5-Hexandiol
MTBE / Puffer	0,62	0,17
[BMIM][$(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}$] / Puffer	2,75	0,01

Daher wurde hier die Reduktion von 1-Phenyl-2-Propanon (PPO) mit rek. *E. coli*-Zellen durchgeführt (Abb. 4.15). Sowohl das Substrat als auch das Produkt (*R*)-1-Phenyl-2-Propanol (PPOH) sind durch einen hohen Verteilungskoeffizienten in den beiden untersuchten zweiphasigen Systemen gekennzeichnet (Tabelle 4.3), so dass Unterschiede im

erzielten Umsatz größtenteils durch die Verteilung von Aceton zwischen beiden Phasen verursacht wird.

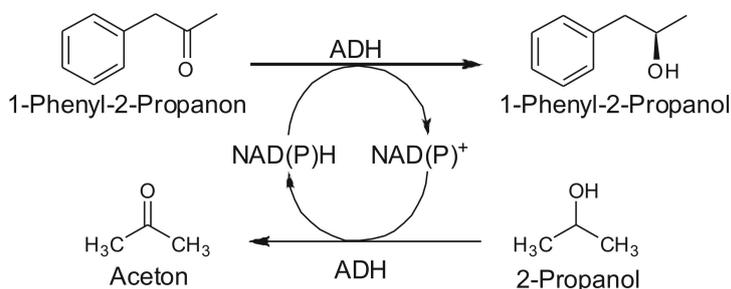


Abbildung 4.15: Reaktionsschema der Reduktion von 1-Phenyl-2-Propanon mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung

Tabelle 4.3: Verteilungskoeffizienten von 1-Phenyl-2-Propanon (PPO) und 1-Phenyl-2-Propanol (PPOH)

System	PPO	PPOH
MTBE / Puffer	51	42
[BMIM][[(CF ₃ SO ₂) ₂ N] / Puffer	120	26

Abbildung 4.16 zeigt die unterschiedlichen Acetonkonzentrationen, die bei der Reduktion von 1-Phenyl-2-Propanon in den zweiphasigen Systemen MTBE/Puffer und [BMIM][[(CF₃SO₂)₂N]/Puffer erreicht wurden. Die Verteilung von Aceton zwischen beiden Phasen der untersuchten zweiphasigen Systemen stimmt mit den Verteilungskoeffizienten in Tabelle 4.1 überein. Durch die Extraktion von Aceton aus der wässrigen Phase heraus wurde in dem zweiphasigen System mit der ionischen Flüssigkeit nahezu kompletter Umsatz erreicht. Im Gegensatz dazu wurde in dem zweiphasigen System MTBE/Puffer lediglich ein Umsatz von 24% erreicht (Abbildung 4.17).

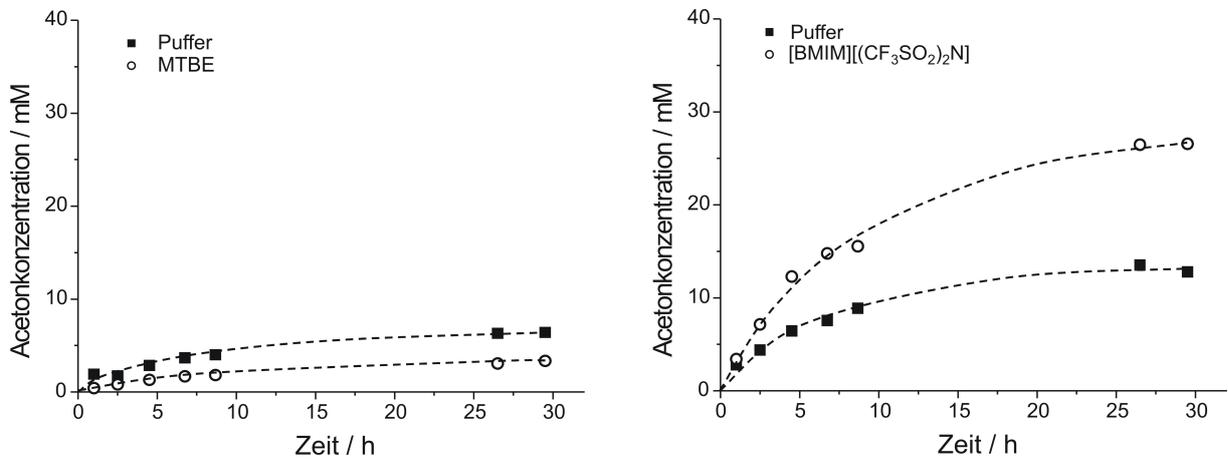


Abbildung 4.16: Acetonkonzentrationen in beiden Phasen bei der Reduktion von 1-Phenyl-2-Propanon in Puffer/MTBE (links) und Puffer/[BMIM][(CF₃SO₂)₂N] (rechts). Bedingungen: V=5 mL 50 mmol/L KP_i-Puffer, pH 6,0, 5 mL nicht-wässrige Phase, 25°C, 20 g_{BFG}/L rek. *E. coli* (*LbADH*), 0,02 mol/L 1-Phenyl-2-Propanon 0,4 mol/L 2-Propanol,

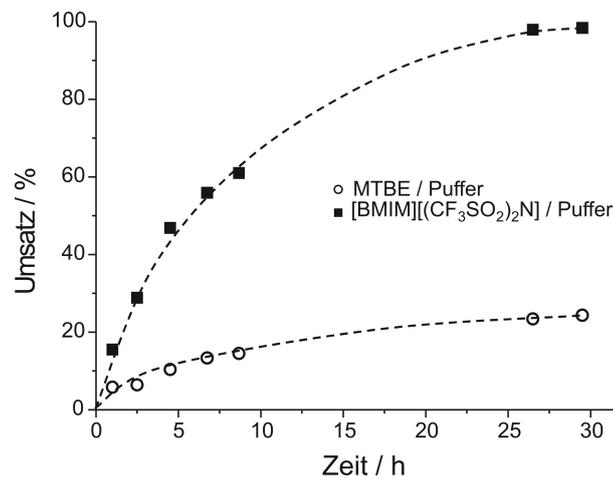


Abbildung 4.17: Umsätze in den zweiphasigen Systemen Puffer/MTBE und Puffer/[BMIM][(CF₃SO₂)₂N]. Bedingungen: V=5 mL 50 mmol/L KP_i-Puffer, pH 6,0, 5 mL nicht-wässrige Phase, 25°C, 20 g_{BFG}/L rek. *E. coli* (*LbADH*), 0,02 mol/L 1-Phenyl-2-Propanon 0,4 mol/L 2-Propanol,

4.5 Übergeordnete Betrachtung

Die beschriebenen Biotransformationsprozesse zeigen exemplarisch drei Strategien für die *in situ*-Acetonabtrennung aus Prozessen mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung. In allen Fällen konnte die Ausbeute des Produktes im Vergleich zu Prozessen ohne Acetonentfernung gesteigert werden.

Für die Prozesse mit *in situ*-Acetonentfernung durch Strippen und Pervaporation wurde die zweistufige Reduktion von 2,5-Hexandion zum (2*R*,5*R*)-Hexandiol untersucht. Abbildung 4.18 zeigt die während der Biotransformation auftretenden Acetonkonzentrationen. es ist erkennbar, dass während der Biotransformation ohne Acetonabtrennung eine Acetonkonzentration von ca. 190 mmol/L erreicht wurde. In Prozessen mit Acetonabtrennung konnten die Acetonkonzentration unter 75 mmol/L gehalten werden. Es ist weiterhin zu erkennen, dass der Verlauf der Acetonkonzentration in beiden Biotransformationen mit Acetonentfernung nahezu identisch ist. Unter den gewählten Bedingungen wurde das bei der Biotransformation entstehende Aceton mit derselben Rate aus dem Reaktionsansatz entfernt.

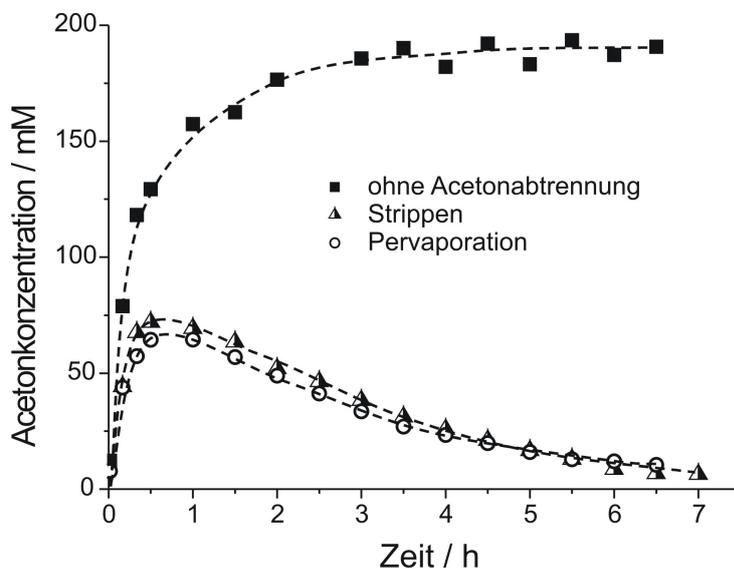


Abbildung 4.18: Acetonkonzentration während der Reduktion von 2,5-Hexandion mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung. Bedingungen: 40°C, pH 6,0, 50 mmol/L KP_i -Puffer, 50 g_{BFG}/L rek. *E. coli* (*LbADH*), 0,1 mol/L 2,5-Hexandion, 1 mol/L 2-Propanol, Pervaporation: Umwälzung 300 mL/min, Vakuum 15 ± 3 mbar, Strippen: Luftstrom 1 L/min.

Während der Biotransformationsprozesse mit *in situ*-Acetonabtrennung wurde die Stabilität der Biokatalysatoren untersucht. Dazu wurden die Biokatalysatoren unter Prozessbedingungen inkubiert die verbleibende katalytische Aktivität in regelmäßigen Abständen

bestimmt. Die relativen Stabilitäten der Biokatalysatoren bei Einsatz in verschiedenen Reaktorsystemen mit Acetonabtrennung sind in Abbildung 4.19 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die unterschiedlichen Strategien der Acetonentfernung die Stabilität der Ganzzell-Biokatalysatoren unterschiedlich stark beeinflussen. Die Pervaporation ist dabei die schonendste Methode, bei der 82% der Stabilität von Biokatalysatoren in Prozessen ohne Acetonabtrennung erreicht werden. Beim Strippen werden nur 25% der Stabilität beobachtet. Diese Unterschiede sind nicht auf Unterschiede in der auftretenden Acetonkonzentration zurückzuführen, da diese ja bei Prozessen mit Acetonabtrennung durch Strippen und bei Prozessen mit Pervaporation nahezu identisch waren.

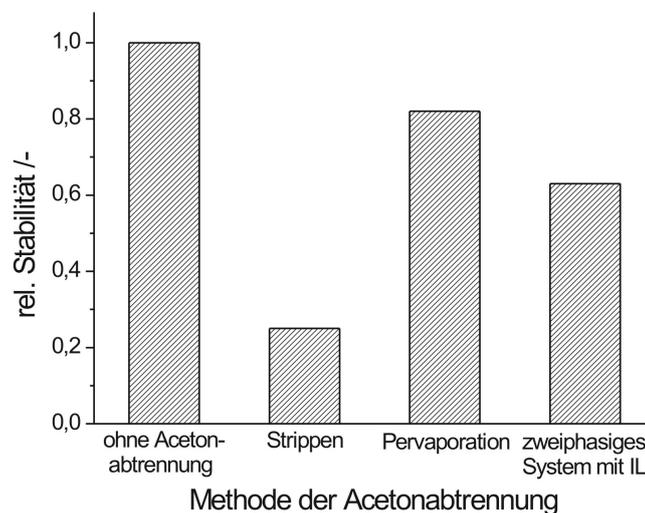


Abbildung 4.19: Stabilitäten der *E. coli*-Zellen bei Biotransformationen mit verschiedenen Methoden der Acetonabtrennung

Die Biotransformationsprozesse mit Acetonabtrennung durch Extraktion mit der ionischen Flüssigkeit [BMIM][$(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}$] wurde mit dem nicht wassermischbaren Phenylacetone als Modellsubstrat durchgeführt und ist somit nicht direkt mit den anderen beiden Methoden vergleichbar. Bei den Biotransformationsprozessen mit zweiphasigen Systemen wurde eine Phenylacetone-Konzentration von 20 mmol/L eingesetzt. Im Vergleich zu zweiphasigen Systemen mit MTBE konnten hier aufgrund des unterschiedlichen Verteilungsverhaltens von Aceton eine höhere Ausbeute bei Verwendung von [BMIM][$(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}$] als nicht-wässriger Phase erreicht werden. Dieses Beispiel zeigt, dass zweiphasige Systeme und insbesondere zweiphasige Systeme mit ionischen Flüssigkeiten sich als Reaktionsmedien für Systeme mit hohem Verteilungskoeffizienten eignen.

4.6 Kontinuierliche Prozesse mit Acetonentfernung

Der Einsatz von rekombinanten *E. coli*-Zellen als Biokatalysator in kontinuierlich betriebenen Biotransformationsprozessen ist bereits in Kapitel 3 für die Reduktion von Methylacetoacetat (MAA) und Butanon beschrieben worden. Die Reduktion von 2,5-Hexandion erfordert entweder einen hohen Überschuss des Cosubstrates 2-Propanol oder eine integrierte Entfernung des Nebenproduktes Aceton. Im folgenden werden kontinuierliche Reduktionen von 2,5-Hexandion beschrieben, bei denen eine Kombination aus CSTR und Pervaporationsreaktor zum Einsatz kam. Das entstandene Nebenprodukt Aceton wurde durch die Pervaporation kontinuierlich aus dem Reaktionsansatz entfernt und die thermodynamische Limitierung dieses Reaktionssystems dadurch überwunden.

Abbildung 4.20 zeigt das Fließschema und ein Foto des kontinuierlich betriebenen Bioreaktors mit Zellrückhaltung und Pervaporations-Einheit. Analog zu den in Kapitel 3 beschriebenen CSTR-Versuchen stellt auch hier die Schauchperipherie den eigentlichen Reaktionsraum dar. Das Membranmodul für die Pervaporationsmembran stellt für die kontinuierlichen Biotransformationsversuche mit $176,7 \text{ cm}^2$ eine größere Pervaporationsmembranfläche zur Verfügung als die zuvor beschriebene Reaktionsanlage für Biotransformationen mit Pervaporation im Satzreaktor (45 cm^2).

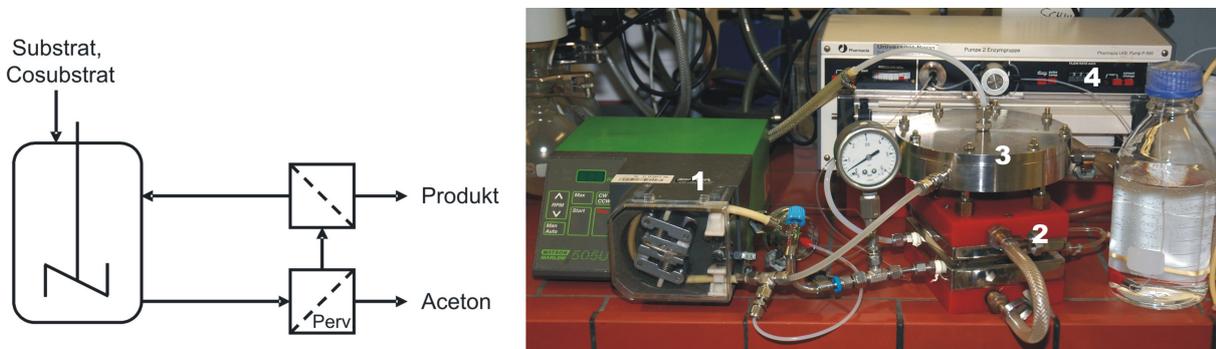


Abbildung 4.20: Fließschema und Foto des CSTR-Reaktors mit Pervaporations-Einheit. 1: Schlauchpumpe für Zirkulation der Reaktionslösung, 2: Membranmodul mit Ultrafiltrationsmembran für Zellrückhaltung, 3: Membranmodul mit Pervaporationsmembran, 4: Kolbenpumpe für Substratzufuhr.

Die erste kontinuierliche Reduktion von 2,5-Hexandion wurde mit rekombinanten *E. coli*-Zellen durchgeführt, die als Produktionsenzym die *LbADH* exprimieren und somit das (2*R*,5*R*)-Hexandiol synthetisieren. Die Prozessbedingungen sind in Tabelle 4.4 gezeigt. Es wurde mit einer Substratkonzentration von $0,1 \text{ mol/L}$ und fünffachem Überschuss an 2-Propanol gestartet und die Substratkonzentration dann im Verlauf des Prozesses auf

0,3 mol/L gesteigert. Abbildung 4.21 zeigt den Umsatz im zeitlichen Verlauf. Es ist zu beachten, dass die linke Abszisse den Anteil des Substrates 2,5-Hexandion, des Intermediates 5-Hydroxyhexanon oder des Produktes 2,5-Hexandiol an der Gesamtmenge von 2,5-Hexandion, 5-Hydroxyketon und 2,5-Hexandiol zeigt.

Tabelle 4.4: Prozessbedingungen bei der kontinuierlichen Reduktion von 2,5-Hexandion durch *E. coli* (*LbADH*) mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung und Acetonabtrennung durch Pervaporation

Zeitspanne [Tage]	Hexandion-Konzentration	2-Propanol-Konzentration	Verweilzeit τ [h]	Biomasse-Konzentration
0 bis 1	0,1 mol/L	0,5 mol/L	2	100 g _{BFG} /L
1 bis 2			2,67	
2 bis 3				
3 bis 4	0,3 mol/L	1 mol/L	4	200 g _{BFG} /L
4 bis 8		1,5 mol/L		
8 bis 9		3 mol/L		
9 bis 16				

In Abbildung 4.21 ist zu erkennen, dass die Acetonkonzentration in diesem kontinuierlichen Prozess durch die Pervaporation auf einer niedrigen Konzentration von etwa 50 mmol/L gehalten werden konnte, was einer Entfernung von bis zu über 90% entspricht (für den Zeitraum $t = 10$ bis $t = 13$ Tage). Während der ersten 3 Tage konnte eine Ausbeute von etwa 70% (2*R*,5*R*)-Hexandiol erreicht werden. Die Substratkonzentration wurde daraufhin auf 0,3 mol/L gesteigert. Durch eine Erhöhung des 2-Propanol-Überschusses konnte der Umsatz auf bis zu 77 % gesteigert werden. Dieser enorm hohe Umsatz konnte über etwa 3 Tage aufrecht erhalten werden. Da die Gleichgewichtskonstante des Reaktionssystems bekannt ist ($k_{GG} \approx 0,1$), lässt sich aus den gegebenen Isopropanol- und Acetonkonzentrationen für diesen Zeitraum die theoretisch zu erwartende Ausbeute errechnen. Diese liegt für den Zeitraum $t = 10$ bis $t = 13$ Tage bei etwa 91 %. Die Reaktion war in diesem Zeitraum also nicht thermodynamisch, sondern kinetisch limitiert. Durch eine Verlängerung der Verweilzeit hätte der Umsatz also noch etwas gesteigert werden können.

Ab dem Zeitpunkt $t = 12$ Tage zeigte sich dann eine hohe Deaktivierungsrate des Ganzzell-Biokatalysators. Die während des Prozesses erreichten Raum-Zeit-Ausbeuten sind in Abbildung 4.22 dargestellt. Es konnten Raum-Zeit-Ausbeuten zwischen 150 und 172 g*L⁻¹*d⁻¹ über ca. 3 Tage aufrecht erhalten werden.

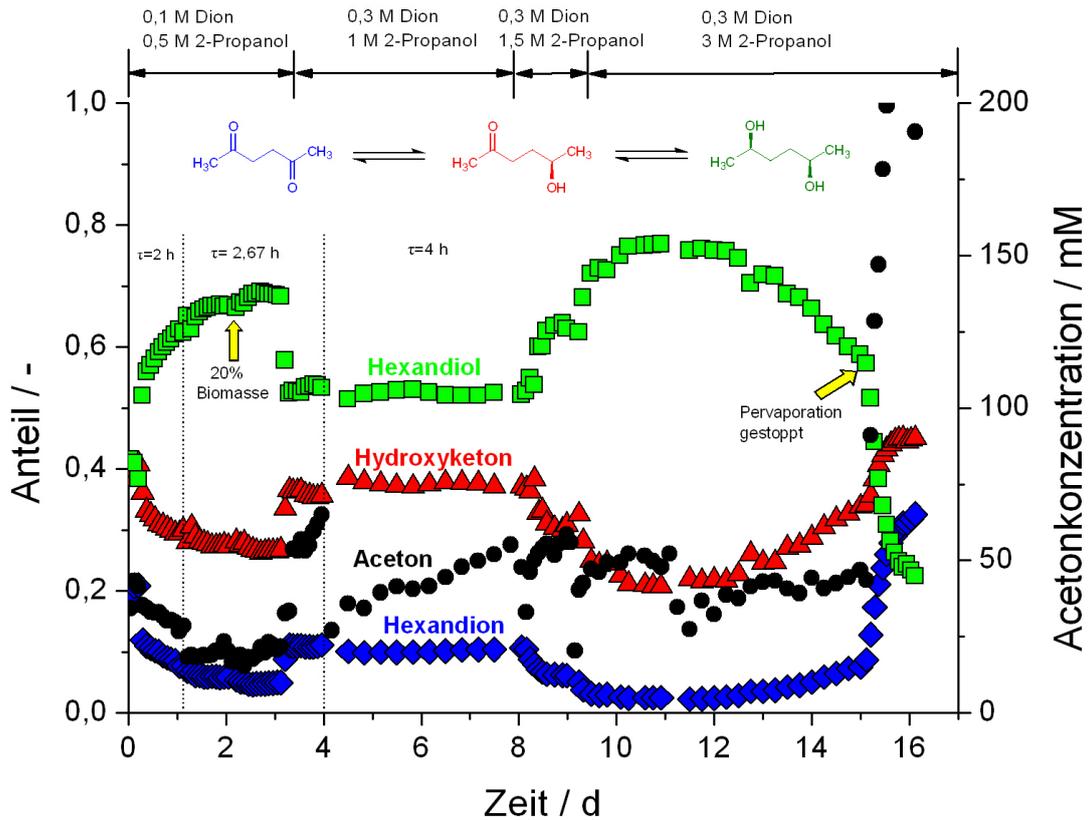


Abbildung 4.21: Kontinuierliche Reduktion von 2,5-Hexandion durch *E. coli* (LbADH) mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung und *in situ* Aceton-Abtrennung durch Pervaporation. Bedingungen: $V=80$ mL, 40°C , pH 6,0, 50 mmol/L KP_i -Puffer, 100 bis 200 $\text{g}_{\text{BFG}}/\text{L}$ rek. *E. coli* (LbADH), 0,1 bis 0,3 mol/L 2,5-Hexandion, 0,5 bis 3 mol/L 2-Propanol, 0,01 mmol/L NADP, Umwälzung 300 mL/min, Vakuum 100 ± 3 mbar

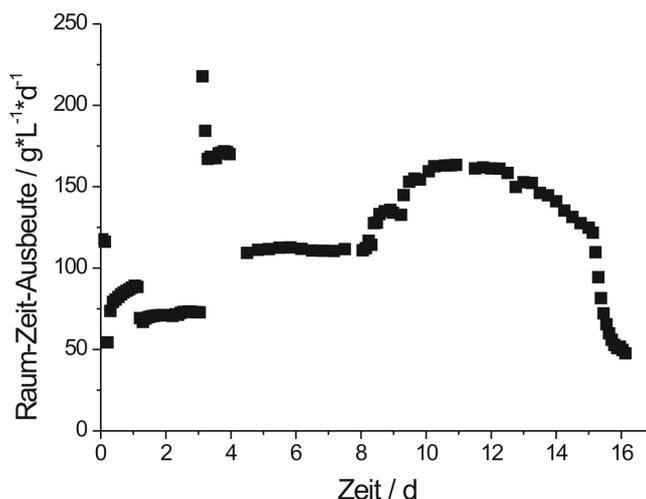


Abbildung 4.22: Raum-Zeit-Ausbeutewährend der kontinuierlichen Reduktion von 2,5-Hexandion durch *E. coli* (*LbADH*) mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung und *in situ* Aceton-Abtrennung durch Pervaporation. Bedingungen: $V=80$ mL, 40°C , pH 6,0, 50 mmol/L KP_i -Puffer, 100 bis 200 $\text{g}_{\text{BFG}}/\text{L}$ rek. *E. coli* (*LbADH*), 0,1 bis 0,3 mol/L 2,5-Hexandion, 0,5 bis 3 mol/L 2-Propanol, 0,01 mmol/L NADP, Umwälzung 300 mL/min, Vakuum 100 ± 3 mbar

Die wesentlichen Kennzahlen des beschriebenen Prozesses sind in Tabelle 4.5 aufgelistet. Die Berechnung der Deaktivierungskonstante bezieht sich auf die lineare Abnahme des Umsatzes zwischen den Zeitpunkten $t = 12$ und $t = 15$ Tagen. Die Bestimmung des ee - und de -Wertes erfolgte für das aufgereinigte Endprodukt.

Tabelle 4.5: Prozesskennzahlen bei der kontinuierlichen Reduktion von 2,5-Hexandion durch *E. coli* (*LbADH*) mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung und *in situ* Aceton-Abtrennung durch Pervaporation

max. Raum-Zeit-Ausbeute	$172 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$
max. Ausbeute Hexandiol	77%
Gesamtproduktmenge	287 g
ee , de	>99%
Katalysatorausnutzung	$17,9 \text{ g}_P/\text{g}_{\text{BFG}}$
Deaktivierungskonstante k_{des}	$0,0609 \text{ d}^{-1}$

Eine kontinuierliche Synthese von (2*R*,5*R*)-Hexandiol wurde schon, wie in der Einleitung erwähnt, durch Haberland beschrieben (Haberland et al., 2002; Haberland, 2003). Dort wurden Wildtyp-Zellen von *Lactobacillus kefir* eingesetzt. Die Cofaktor-Regenerierung erfolgte über die Verstoffwechslung von Glucose. Grundsätzlich sind trotz der beiden ver-



Abbildung 4.23: Aufgereinigtes (2*R*,5*R*)-Hexandiol

schiedenen Methoden der Cofaktor-Regenerierung und der verschiedenen verfahrenstechnischen Ansätze ähnliche Raum-Zeit-Ausbeuten, Katalysatorausnutzungen und optische Reinheiten erreicht worden (Vgl. Tabelle 1.2 und 4.5). Im Gegensatz dazu zeigten die verwendeten Biokatalysatoren große Unterschiede in der Stabilität. Mit den Wildtyp-Organismen von *L. kefir* konnten lediglich Prozesse mit einer Laufzeit von 5 Tagen betrieben werden. Die hier beschriebene kontinuierliche Synthese von (2*R*,5*R*)-Hexandiol hatte mit 16 Tagen eine 3 mal längere Laufzeit. Somit zeigt sich auch in einem kontinuierlichen Prozess mit *in situ*-Acetonabtrennung durch Pervaporation die hohe Stabilität der verwendeten rekombinanten *E. coli*-Zellen.

Des Weiteren erfolgte die Synthese von (2*S*,5*S*)-Hexandiol in demselben Reaktorsystem. Dafür wurde der rekombinante *E. coli*-Stamm mit *CpCR* als Katalysator verwendet. Die Prozessbedingungen für diese kontinuierliche Biotransformation sind in Tabelle 4.6 gezeigt.

Tabelle 4.6: Prozessbedingungen bei der kontinuierlichen Reduktion von 2,5-Hexandion durch *E. coli* (*CpCR*) mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung und Acetonabtrennung durch Pervaporation

Zeitspanne [Tage]	Hexandion-Konzentration	2-Propanol-Konzentration	Verweilzeit τ [h]	Biomasse-Konzentration
0 bis 1	0,1 mol/L	0,5 mol/L	1	80 g _{BFG} /L
1 bis 2			4	
2 bis 5		2 mol/L		107,5 g _{BFG} /L

Analog zu der zuvor beschriebenen kontinuierlichen Synthese von (2*R*,5*R*)-Hexandiol durch *E. coli* (*LbADH*) ist in Abbildung 4.24 der Anteil der Substanzen 2,5-Hexandion, 5-Hydroxyhexanon oder 2,5-Hexandiol an der Gesamtmenge von 2,5-Hexandion, 5-Hydroxyhexanon und 2,5-Hexandiol gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die Ausbeute

an (2*S*,5*S*)-Hexandiol lediglich bei maximal 29% lag. Diese geringe Ausbeute konnte auch durch die Erhöhung des Überschusses an 2-Propanol ab dem Zeitpunkt $t = 2$ d nicht gesteigert werden. Bei einem Substrat/2-Propanol-Verhältnis von 1:5 lag die Ausbeute an Hexandiol durchschnittlich bei unter 30%, der Anteil des Intermediats 5-Hydroxyhexanon betrug dagegen durchschnittlich 50%. Eine Steigerung des Substrat/2-Propanol-Verhältnisses auf 1:20 hat das Verhältnis der Anteile von 2,5-Hexandion, 5-Hydroxyhexanon und 2,5-Hexandiol nicht signifikant verändert. Da die gemessenen Acetonkonzentrationen mit weniger als 10 mmol/L schon sehr gering waren, konnte durch eine Steigerung der Acetonabtrennungsrate keine wesentliche Steigerung der Ausbeute mehr erwartet werden. Durch die hohen Konzentrationen an 2-Propanol trat eine Deaktivierung des Biokatalysators auf, was an der linearen Abnahme des 2,5-Hexandiol- und 5-Hydroxyhexanon-Anteils sowie der Zunahme des 2,5-Hexandion-Anteils zu erkennen ist.

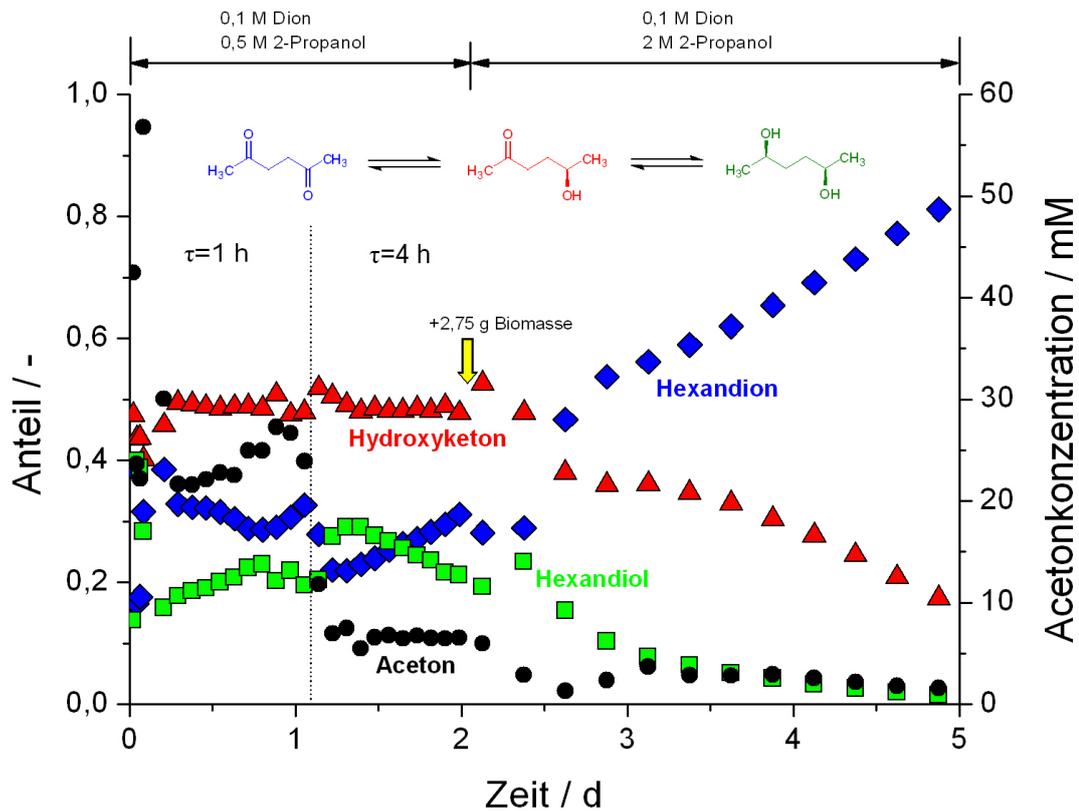


Abbildung 4.24: Kontinuierliche Reduktion von 2,5-Hexandion durch *E. coli* (*CpCR*) mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung und *in situ* Aceton-Abtrennung durch Pervaporation. Bedingungen: $V=80$ mL, 40°C , $\text{pH } 7,0$, 50 mmol/L KP_i -Puffer, 80 bis $107,5$ g_{BFG}/L rek. *E. coli* (*CpCR*), $0,1$ mol/L 2,5-Hexandion, $0,5$ bis 2 mol/L 2-Propanol, $0,01$ mmol/L NAD, Umwälzung 300 mL/min, Vakuum 100 ± 3 mbar

Die erreichten Raum-Zeit-Ausbeuten während der kontinuierlichen Reduktion von 2,5-Hexandion durch *E. coli* (*CpCR*) sind in Abbildung 4.25 dargestellt. Tabelle 4.7 zeigt die wesentlichen Kennzahlen des Prozesses. Die Berechnung der Deaktivierungskonstante bezieht sich auf die lineare Abnahme der Produktkonzentration zwischen den Zeitpunkten $t = 2$ und $t = 3,5$ Tagen. Die Bestimmung des ee - und de -Wertes erfolgte für das aufgereinigte Endprodukt.

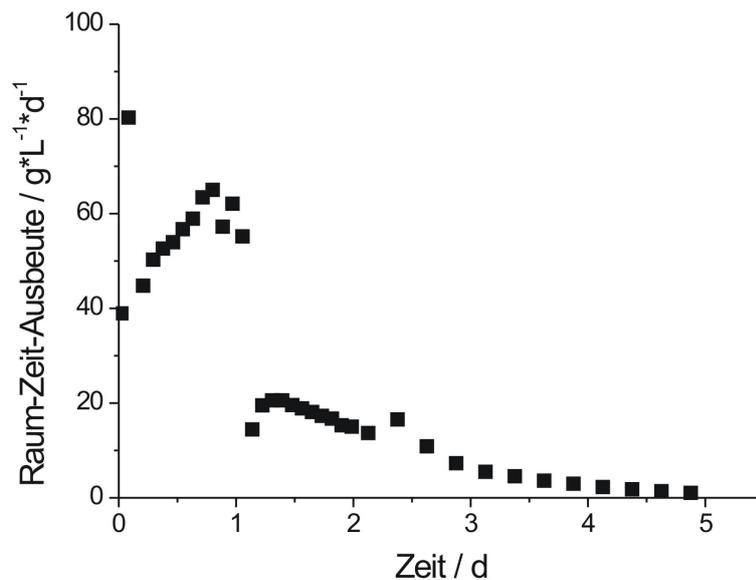


Abbildung 4.25: Raum-Zeit-Ausbeute während der kontinuierlichen Reduktion von 2,5-Hexandion durch *E. coli* (*CpCR*) mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung und *in situ* Aceton-Abtrennung durch Pervaporation. Bedingungen: $V=80$ mL, 40°C , $\text{pH } 7,0$, 50 mmol/L KPi -Puffer, 80 bis $107,5$ $\text{g}_{\text{BFG}}/\text{L}$ rek. *E. coli* (*CpCR*), $0,1$ mol/L 2,5-Hexandion, $0,5$ bis 2 mol/L 2-Propanol, $0,01$ mmol/L NAD, Umwälzung 300 mL/min, Vakuum 100 ± 3 mbar

Tabelle 4.7: Kenngrößen der kontinuierlichen Reduktion von 2,5-Hexandion durch *E. coli* mit *CpCR* und Cofaktor-Regenerierung durch 2-Propanol-Oxidation

max. Raum-Zeit-Ausbeute	65 g*L ⁻¹ *d ⁻¹
max. Ausbeute Hexandiol	29%
Gesamtproduktmenge	9,72 g
<i>ee</i> , <i>de</i>	>99%
Katalysatorausnutzung	1,13 g _P /g _{BFG}
Deaktivierungskonstante <i>k_{des}</i>	0,0609 d ⁻¹

In beiden beschriebenen kontinuierlichen Biotransformationen mit Acetonabtrennung durch Pervaporation wurde das Substrat 2,5-Hexandion in einer Zweischnitt-Reaktion zum korrespondierenden 2,5-Hexandiol reduziert. Durch Verwendung eines rekombinanten *E. coli*-Stammes, der die *LbADH* exprimiert, konnte (2*R*,5*R*)-Hexandiol synthetisiert werden, die Verwendung von *E. coli* mit rekombinanter *CpCR* lieferte das (2*S*,5*S*)-Hexandiol. Durch die Verwendung verschiedener Biokatalysatoren wurden in dem beiden kontinuierlichen Biotransformationsprozessen unterschiedliche Ausbeuten erzielt. Während die Verwendung von *E. coli* (*LbADH*) zu einer Hexandiol-Ausbeute von bis zu 77% führte, konnten in dem anderen Prozess mit *E. coli* (*CpCR*) maximal 29% erreicht werden. Der Großteil des Substrates 2,5-Hexandion wurde zwar zum Intermediat 5-Hydroxyhexanon reduziert, jedoch scheint der zweite Schritt limitiert zu sein, so dass es zu einer Anreicherung des Intermediats 5-Hydroxyhexanon kam, aber nur zu geringen Ausbeuten an (2*S*,5*S*)-Hexandiol, die auch durch effektive Acetonabtrennung nicht gesteigert werden konnte.

Die Betrachtung der kinetischen Eigenschaften beider Biokatalysatoren liefert eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ausbeuten in beiden kontinuierlichen Biotransformationsprozessen. Die isolierte *CpCR* wurde schon in der Doktorarbeit von S. Rissom für die Reduktion von 2,5-Hexandion verwendet und dort kinetisch charakterisiert (Rissom, 1999). Es zeigte sich, dass der zweite Schritt, die Reduktion des Intermediats 5-Hydroxyhexan zu (2*S*,5*S*)-Hexandiol weitaus langsamer ist als der erste Schritte, die Reduktion vom 2,5-Hexandion zum Intermediat 5-Hydroxyhexanon. Es ist anzunehmen, dass der rekombinante *E. coli*-Stamm mit *CpCR* einen ähnlichen Unterschied in den kinetischen Eigenschaften beider Teilreaktionen aufweist.

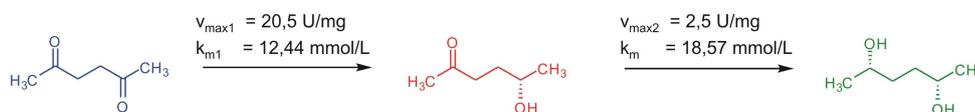


Abbildung 4.26: Kinetische Parameter der isolierten *CpCR* bei der Reduktion von 2,5-Hexandion und (*S*)-5-Hydroxyhexan-2-on (Rissom, 1999)

Die kinetischen Eigenschaften des rekombinanten *E. coli*-Stammes mit *LbADH* wurden für die Reduktion von 2,5-Hexandion und (*R*)-5-Hydroxyhexanon untersucht (Tacha, 2007). Es zeigte sich, dass der zweite Schritt die höhere Maximalgeschwindigkeit aufweist aber auch einen weitaus höheren k_m -Wert.

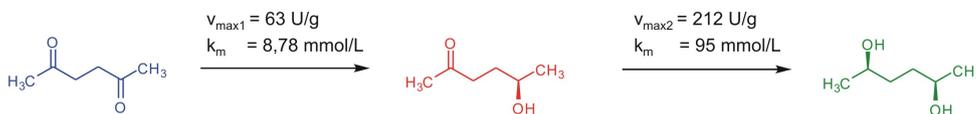


Abbildung 4.27: Kinetische Parameter des rekombinanten *E. coli*-Stammes mit *LbADH* für die Reduktion von 2,5-Hexandion und (*R*)-5-Hydroxyhexan-2-on

Damit unterscheiden sich die rekombinanten *E. coli*-Zellen mit *LbADH* ebenfalls von den durch Haberland untersuchten WT-Zellen von *L. kefir*. Dort war, ähnlich wie bei der Reaktion mit isolierter *CpCR* der zweite Schritt, die Reduktion von 5-Hydroxyhexanon zu 2,5-Hexandiol der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (Haberland, 2003).

Die hier beschriebenen kontinuierlichen Reduktionen wurden mit integrierter Pervaporations-einheit wurden wurden mit zwei verschiedenen Biokatalysatoren durchgeführt. Obwohl es sich um ein und dieselbe Reaktion handelt mit den gleichen thermodynamischen Eigenschaften, sind die Reaktionsverläufe deutlich unterschiedlich. Dieses Beispiel zeigt deutlich, wie ausschlaggebend die kinetischen Eigenschaften eines Biokatalysators für einen Reaktionsverlauf sein können.

4.7 Zusammenfassung

Die wesentlichen Ergebnisse der durchgeführten Biotransformationen *in situ*-Acetonabtrennung lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Es wurden drei Strategien der *in situ*-Acetonabtrennung aus Ganzzell-Biotransformationsprozessen beschrieben. In allen drei Fällen erfolgte eine Steigerung der Produktausbeute durch die Überwindung des thermodynamischen Gleichgewichtes.
- Dies ist das erste Beispiel für die Acetonabtrennung durch Pervaporation bei Ganzzellbiotransformationsprozessen.
- Pervaporation lässt sich als Methode der Acetonabtrennung bei kontinuierlich betriebenen Biotransformationsprozessen mit Katalysatorrückhaltung (CSTR) anwenden.

- Durch den Einsatz entsprechender *E. coli*-Zellen mit rekombinanten ADHs lassen sich dabei sowohl (*R*)- als auch (*S*)-Alkohole synthetisieren. Die kinetischen Eigenschaften der rekombinanten Enzyme und Ganzzell-Biokatalysatoren haben dabei entscheidenden Einfluss auf den Reaktionsverlauf.
- Dies ist das erste Beispiel für den Einsatz von Ganzzell-Biokatalysatoren in zweiphasigen Systemen mit der ionischen Flüssigkeit [BMIM][$(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}$].
- Die Pervaporation führt von allen untersuchten Methoden zur höchsten Stabilität der Bioatalysatoren.

Kapitel 5

Intrazelluläre Cofaktorkonzentrationen

5.1 Einleitung

Die Quantifizierung von intrazellulären Cofaktorkonzentrationen während eines Biotransformationsprozesses ist von besonderem Interesse. Das Verhältnis von oxidierten zu reduzierten Cofaktoren sowie das Verhältnis von phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Cofaktoren und Kenntnis über Metabolit-Konzentrationen des mikrobiellen Metabolismus können wichtige Erkenntnisse für die Charakterisierung und Verbesserung von Ganzzell-Biokatalysatoren liefern (Oldiges et al., 2007).

Verschiedene Methoden für die Quantifizierung intrazellulärer Cofaktor-Konzentrationen wurden bisher entwickelt. Zyklische Enzym-Assays (Bernofsky und Swan, 1973; Lilius et al., 1979) basieren auf der Bildung eines Farbstoffes und sind erfolgreich für die Quantifizierung intrazellulärer Cofaktorkonzentrationen angewandt worden (Walton und Stewart, 2004; Heuser et al., 2007; Wubbolts et al., 1990). Limitierungen ergeben sich durch die langen Zykluszeiten bei niedrigen Konzentrationen, die eine schlechte Reproduzierbarkeit bewirken. Des Weiteren sind HPLC-Methoden beschrieben (Mailing et al., 1998).

Eine noch höhere Sensitivität und zufriedenstellende Reproduzierbarkeit liefern LC-MS/MS-Methoden (van Dam et al., 2002; Luo et al., 2007). In der Fermentationsgruppe des IBT-2 ist eine LC-MS/MS-Methode für die Identifizierung und Quantifizierung von 29 verschiedenen Metaboliten des Zentralstoffwechsels entwickelt worden. Damit können Metabolite aus der Glycolyse, des Pentose-Phosphat-Wegs und des Citrat-Zyklus in Zellextrakten analysiert werden, darunter Zucker-Phosphate, Nukleotide und Carbonsäuren (Luo et al., 2007). Diese Analytik-Methode sowie die Methode für den Zellaufschluss und die Extraktion der intrazellulären Metabolite sollten für die Quantifizierung intrazellulärer Cofaktorkonzentrationen von Ganzzell-Biokatalysatoren angewendet werden.

5.1. EINLEITUNG

Abbildung 5.1 zeigt exemplarisch ein LC-Chromatogramm aller vier Cofaktoren NAD, NADP, NADH und NADPH sowie die Massenanalysen dieser Substanzen.

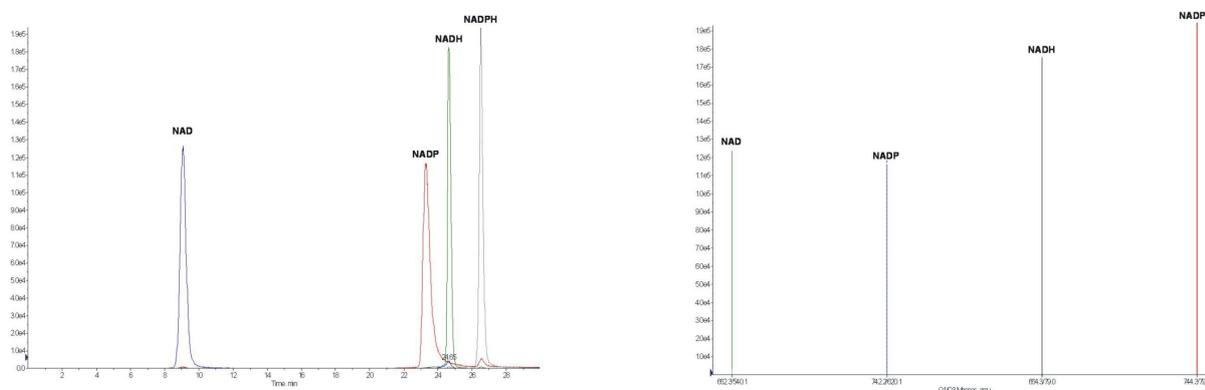


Abbildung 5.1: LC-MS/MS-Analytik der Cofaktoren. Links: LC-Chromatogramm. Rechts: Massenanalyse.

Neben der Quantifizierung intrazellulärer Cofaktorkonzentrationen während einer Biotransformation sollte eine Modellierung der theoretischen intrazellulären Cofaktorflüsse stattfinden. Die Modellierung von Enzymkinetiken ist eine hilfreiche Methode biokatalytische Prozesse zu beschreiben und zu verstehen und somit optimale Prozessbedingungen zu finden und Prozesse zu optimieren (Vasic-Racki et al., 2003). Beispiele für die Modellierung von enzymkatalysierten Reaktionen sind die Synthese von (*S*)-Phenylethanol durch ADH T (Findrik et al., 2005) und die Synthese chiraler Lactone durch Cyclohexanon-Monooxygenase (Hogan und Woodley, 2000).

Bei dem hier untersuchten Ganzzell-Biokatalysator handelt es sich um einen rekombinanten *E. coli*-Stamm, der die *LbADH* exprimiert. Die untersuchte Reaktion ist die Reduktion von Methylacetoacetat (MAA) zu (*R*)-3-Methylhydroxybutyrat. Die Cofaktor-Regenerierung fand im substrat-gekoppelten Ansatz über die Oxidation von 2-Propanol zu Aceton statt (5.2). Für die Simulation der theoretischen intrazellulären Cofaktorkonzentrationen wurden die kinetischen Eigenschaften der *LbADH* *in vitro* untersucht (Anhang A).

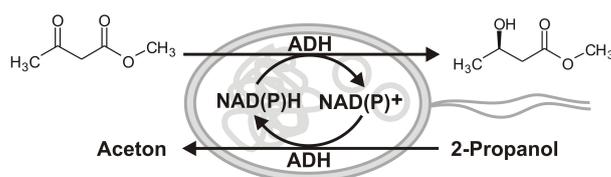


Abbildung 5.2: Biokatalytische Reduktion von Methylacetoacetat durch rek. *E. coli*

5.2 Modellierung der Reaktionsverläufe für isolierte Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus brevis*

Für die Simulation der intrazellulären Cofaktor-Konzentrationen während einer Biotransformation mit Cofaktor-Regenerierung wurde ein Modell erstellt, dass auf den kinetischen *in vitro*-Eigenschaften des rekombinanten Enzymes beruht. Zunächst wurde eine kinetische Charakterisierung der isolierten *LbADH* durchgeführt. Im Anschluss wurde für die in Abbildung 5.2 gezeigten Reaktionen ein Modell für das isolierte Enzym aufgestellt. Dies wurde an Biotransformationsprozesse mit isoliertem Enzym angepasst (Abb. 5.3). Mit diesem Modell sollte dann folgend eine Ganzzell-Biotransformation beschrieben werden. Bei der kinetischen Charakterisierung des isolierten Enzyms wurde sowohl die NAD(H)- als auch die NADP(H)-Abhängigkeit untersucht, da intrazellulär ein Gemisch aus allen Cofaktorformen vorliegt, das auf die Ganzzell-Biotransformation Einfluss nimmt. Die Ergebnisse der kinetischen Charakterisierung der isolierten *LbADH* sind in Anhang A aufgeführt.

Es zeigte sich, die untersuchten Teilreaktionen z. T. durch starke Substrat- oder Produktinhibierung gekennzeichnet sind. Dabei treten sowohl Inhibierungen durch die Alkohol- bzw. Ketonverbindung als auch durch den beteiligten Cofaktor auf. Des Weiteren spiegelte sich die Präferenz der *LbADH* für die phosphorylierte Form des Cofaktors wider. Die ermittelten k_m -Werte in Abhängigkeit von NADP oder NADPH liegen ca. einen Faktor 1000 niedriger als die entsprechenden k_m -Werte für das NAD(H)-System. Auffällig ist außerdem der hohe Wert für v_{max} bei der Reduktion von MAA mit NADH. Es ist möglich, dass bei der Bestimmung der kinetischen Parameter für die NAD(H)-abhängigen Reaktionen aufgrund der langsameren Reaktionsgeschwindigkeiten numerische Fehler aufgetreten sind. Die kinetischen Parameter für das NAD(H)-System sind somit kritisch zu betrachten. Nichtsdestotrotz können die so bestimmten Parameter durchaus bei der Modellierung von Ganzzell-Biotransformationsprozessen berücksichtigt werden, denn der Anteil der Substratmoleküle, der unter Verwendung des phosphorylierten Cofaktors umgesetzt wird, ist aufgrund der höheren Affinität der *LbADH* zu NADP(H) um etwa einen Faktor 1000 höher als der Anteil, der unter Verwendung von NAD bzw. NADH umgesetzt wird.

Aus den kinetischen Parametern wurde ein Modell entwickelt, dessen Massenbilanzen in Anhang B aufgeführt sind. Zur Verifizierung des Modells wurde mehrere Biotransformationsexperimente mit isolierter *LbADH* und variierenden Konzentrationen MAA, 2-Propanol, NADH und NADPH durchgeführt (Abb. 5.3). Die in den Biotransformationsansätzen gemessenen Konzentrationen der Reaktanden zeigten eine gute Übereinstim-

5.2. MODELLIERUNG DER REAKTIONSVERLÄUFE FÜR ISOLIERTE ALKOHOL-DEHYDROGENASE AUS *LACTOBACILLUS BREVIS*

mung mit den durch das Modell simulierten Werten, so dass das Modell als verifiziert angesehen werden kann.

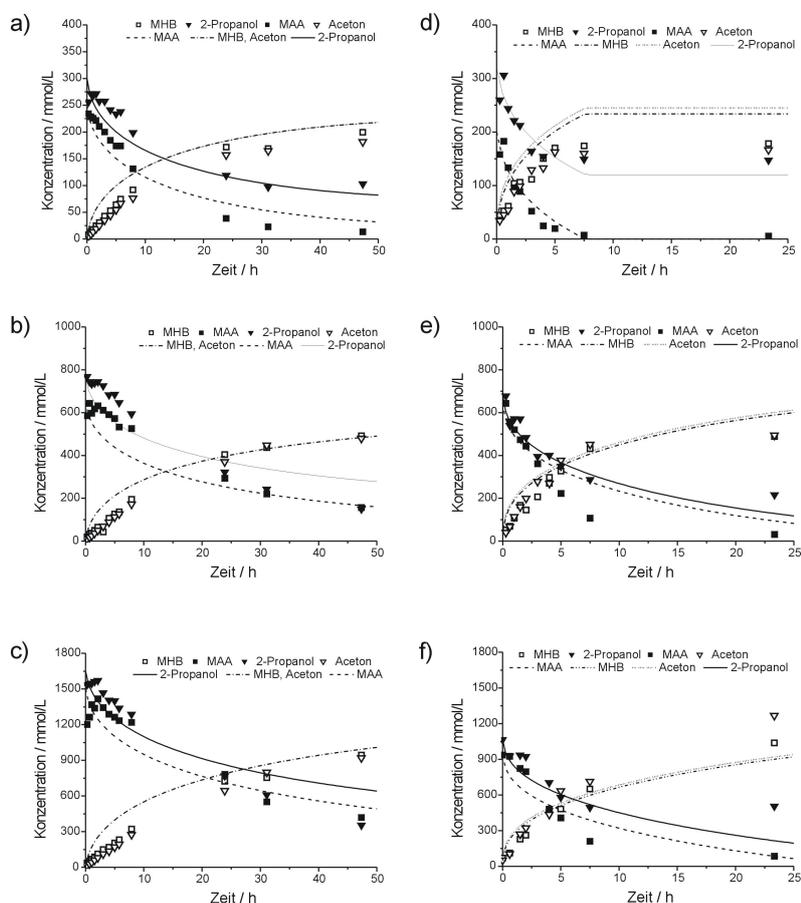


Abbildung 5.3: Biotransformationen mit isolierter *LbADH* für die Modell-Validierung. Anfangsbedingungen: A) 200 mmol/L MAA, 400 mmol/L 2-Propanol, 2 mmol/L NADH, 1,067 mg/mL *LbADH*; B) 600 mmol/L MAA, 900 mmol/L 2-Propanol, 2 mmol/L NADH, 2,13 mg/mL *LbADH*; C) 1000 mmol/L MAA, 1500 mmol/L 2-Propanol, 2 mmol/L NADH, 3,2 mg/mL *LbADH*; D) 200 mmol/L MAA, 400 mmol/L 2-Propanol, 0,2 mmol/L NADPH, 3,3 mg/mL *LbADH*; E) 600 mmol/L MAA, 900 mmol/L 2-Propanol, 0,2 mmol/L NADPH, 6,67 mg/mL *LbADH*; F) 1000 mmol/L MAA, 1500 mmol/L 2-Propanol, 0,2 mmol/L NADPH, 10 mg/mL *LbADH*. Alle Biotransformationen wurden in 50 mmol/L KP_i -Puffer mit 2 mmol/L $MgSO_4$ bei pH 6,0 und 30°C durchgeführt.

5.3 Beurteilung der Methoden

5.3.1 Stabilität der Cofaktoren

Die Stabilität der Cofaktoren während der Zellaufschlussprozedur wurde untersucht, indem eine definierte Lösung den vier Cofaktoren NAD, NADP, NADH und NADPH (Abb. 5.4, linke Seite) entsprechend des Protokolls für den Zellaufschluss (Abschnitt 8.3) mit Chloroform versetzt wurde und unter Bedingungen des Zellaufschlusses inkubiert wurde. Die Abweichung zwischen der Konzentrationen in der Ausgangslösung und den gemessenen Konzentrationen der Lösung nach Behandlung gemäß des Zellaufschlussprotokolls ist das Maß für die durch den Zellaufschluss verursachte Degradation der vier Cofaktoren. Die ermittelten Konzentrationen vor und nach der Inkubation unter Zellaufschluss-Bedingungen sind in Abb. 5.4 gezeigt.

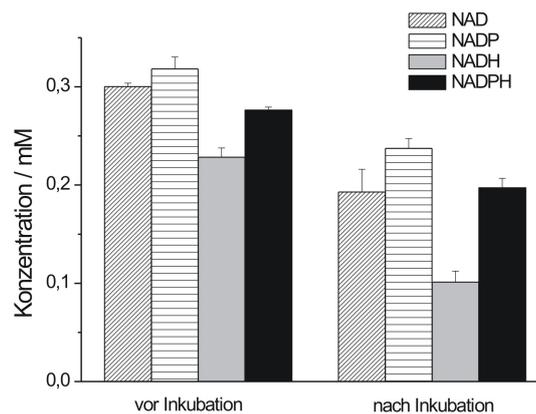


Abbildung 5.4: Stabilität der Cofaktoren während des Zellaufschlusses. Nicht-inkubierte Proben: Verdünnung 1:10 mit TE-Puffer. Inkubierte Proben: 200 μL Cofaktorlösung, 800 μL TE-Puffer, 1000 μL Methanol (\rightarrow Verdünnung 1:10), 2000 μL Chloroform, 2 h Inkubation bei 4°C. Gezeigt sind Mittelwerte aus dreifacher unabhängiger Inkubation.

Es zeigt sich, dass nach der Inkubation geringere Konzentrationen aller vier Cofaktoren im Vergleich zur Ausgangslösung gemessen wurden. Die verbliebenen Restkonzentrationen sind in Tabelle 5.1 gezeigt. Diese Verringerung der Cofaktorkonzentrationen durch die Zellaufschluss-Prozedur wurde für alle weiteren beschriebenen Untersuchungen an den intrazellulären Konzentrationen der Cofaktoren mit eingerechnet.

Tabelle 5.1: Restkonzentration der Cofaktoren nach Inkubation unter Zellaufschluss-Bedingungen und Degradation

Substanz	Restkonzentration	Degradation
NAD	64,3%	35,7%
NADP	74,6%	25,4%
NADH	44,3%	55,7%
NADPH	71,4%	28,6%

Es ist zu beachten, dass zur Beurteilung der Cofaktor-Stabilität während des Zellaufschlusses eine wässrige Lösung mit Cofaktoren mit Zellaufschlusspuffer, Methanol und Chloroform versetzt und inkubiert wurde. Die Cofaktoren kamen somit in direkten Kontakt mit organischen Lösungsmitteln. Es ist möglich, dass die Cofaktoren während eines Zellaufschlusses weitaus stärker durch die umgebende Membran vor den Einflüssen des Zellaufschlusses geschützt sind und somit der Einfluss der Zellaufschluss-Bedingungen auf die Stabilität der Cofaktoren tatsächlich geringer ist.

5.3.2 Bestimmung der maximalen Cofaktorkonzentrationsänderung

Um die Grenzwerte der Konzentrationsänderungen während eines Biotransformationsprozesses zu ermitteln, wurden Biotransformationsexperimente ohne Cofaktor-Regenerierung durchgeführt und die intrazellulären Cofaktorkonzentrationen nach dem Zellaufschluss bestimmt. Es wurden drei verschiedene Biotransformationsexperimente durchgeführt (Abb. 5.5). Zum einen wurden rekombinante *E. coli*-Zellen (*LbADH*) direkt nach der Fermentation aufgeschlossen. Dieser Ansatz stellt die Referenz dar und liefert die Konzentrationen der intrazellulären Cofaktoren vor Beginn eines Biotransformationsprozesses.

Die zwei weiteren Biotransformationsansätze liefern die zu erwartenden maximalen Konzentrationen der reduzierten bzw. oxidierten Cofaktoren. Zum einen wurden rekombinante *E. coli*-Zellen (*LbADH*) in Methylacetoacetat (MAA) inkubiert. Ein Teil des MAA wird zu (*R*)-3-Methylhydroxybutyrat reduziert, wobei NADPH und NADH zu NADP bzw. NAD oxidiert werden. Aufgrund der nicht stattfindenden Cofaktor-Regenerierung in diesem Ansatz ist zu erwarten, dass der Cofaktorpool dieser Zellen in Richtung der oxidierten Cofaktoren verlagert wird. Die intrazellulären Konzentrationen der oxidierten Cofaktoren sollten in diesen Zellen höher sein als Zellen, die in einem Ansatz mit Cofaktorregenerierung inkubiert werden.

Im dritten Ansatz wurden genau die gegenteiligen Reaktionsbedingungen eingestellt. Die

Zellen wurden lediglich in 2-Propanol inkubiert, wodurch zu erwarten ist, dass der intrazelluläre Cofaktorpool in Richtung der reduzierten Cofaktoren verlagert wird.

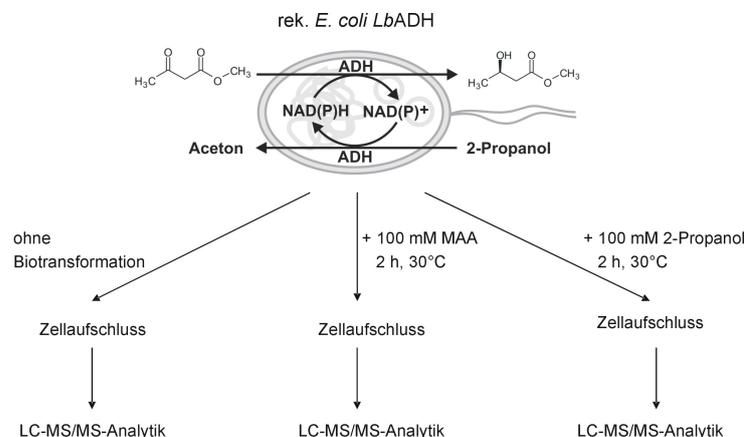


Abbildung 5.5: Bestimmung der maximal zu erwartenden Änderung des Verhältnisses von oxidierten und reduzierten Cofaktoren

Die ermittelten intrazellulären Konzentrationen aller vier Cofaktoren aus dem in Abbildung 5.5 gezeigten Experiment sind in Abbildung 5.6 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass alle vier Formen der Cofaktoren in allen Ansätzen gemessen werden konnten. Die Konzentrationen von NAD, NADP und NADH lagen dabei in allen drei Ansätzen in derselben Größenordnung. Die größte Variation wurde bei NADPH gemessen. Erwartungsgemäß wurde in den in 2-Propanol inkubierten Zellen die höchste NADPH-Konzentration gemessen. Es fällt auf, dass die Konzentration der oxidierten Cofaktoren in allen Fällen weitaus höher ist als die der reduzierten Cofaktoren. Dies ist -zumindest für metabolisch aktive Zellen- zu erwarten. Um die Glycolyse, den Hauptstoffwechselweg für den Abbau von Glucose überhaupt thermodynamisch zu ermöglichen, muss der „reductive energy charge“ ($\text{NADH}/(\text{NAD}+\text{NADH})$) einen Wert von weniger als 0,018 haben (von Stockar et al., 2006). Nach den hier bestimmten Konzentrationen direkt nach der Fermentation beträgt dieser Wert etwa 0,0055.

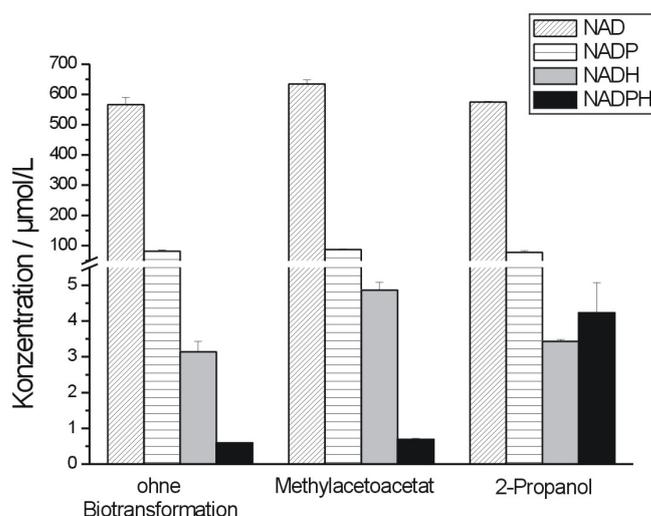


Abbildung 5.6: Cytosolische Cofaktorkonzentrationen bei Inkubation in Methylacetoacetat, 2-Propanol und ohne Biotransformation. Gezeigt sind Mittelwerte aus doppelt unabhängig voneinander inkubierten und aufgeschlossenen Zellen.

5.4 Cofaktor-Konzentrationen bei Biotransformations-Prozessen

5.4.1 Methylacetoacetat-System

Es wurde ein Biotransformationsexperiment mit rek. *E. coli*-Zellen (*LbADH*) als Biokatalysator durchgeführt. Während der Reduktion von MAA mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung durch die Oxidation von 2-Propanol wurde in regelmäßigen Abständen Biomasse aus dem Reaktionsansatz entnommen, ein Zellaufschluss durchgeführt und die intrazellulären Cofaktorkonzentrationen mittels LC-MS/MS-Analytik bestimmt. Die extrazellulären Konzentrationen der Biotransformations-Reaktanden wurden mittels GC bestimmt. Der Reaktionsverlauf ist in Abbildung 5.7 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Reaktion unter den gegebenen Reaktionsbedingungen nach etwa 3 Stunden einen Gleichgewichtszustand erreicht hat.

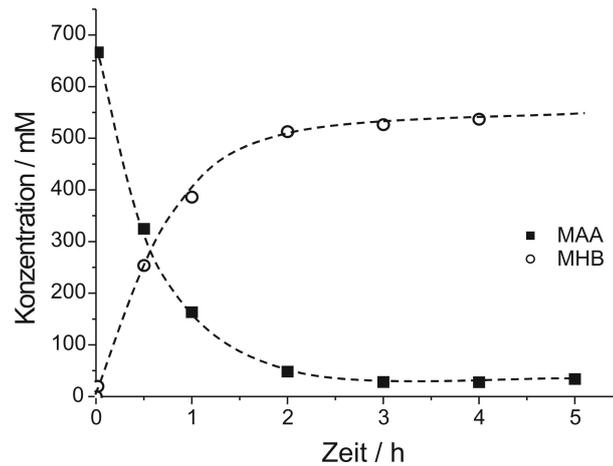


Abbildung 5.7: Extrazelluläre Substrat- und Produktkonzentrationen bei der Reduktion von MAA durch *E. coli* (*LbADH*). Bedingungen: $V=130$ mL, 30°C , $\text{pH } 6,0$, 50 mmol/L KP_i -Puffer, 100 $\text{g}_{\text{BFG}}/\text{L}$ rek. *E. coli* (*LbADH*), $0,6$ mol/L MAA, $0,9$ mol/L 2-Propanol. Linien sind als optische Orientierung eingezeichnet.

Abbildung 5.8 zeigt die während des in Abbildung 5.7 dargestellten Reaktionsverlaufes beobachteten cytosolischen Cofaktorkonzentrationen. Anhand des zuvor erstellten Modells wurden die in diesem Versuch zu erwartenden intrazellulären Cofaktorkonzentrationen auch simuliert. Als Startwerte für die intrazellulären Cofaktorkonzentrationen wurden die in Abb. 5.6 (ohne Biotransformation) ermittelten Werte angenommen. Die intrazelluläre Konzentration an *LbADH* lässt sich aus der Annahme abschätzen, dass etwa die Hälfte der Biotrockenmasse aus Protein besteht (Muttzall, 1993) und die Expression der *LbADH* in diesen Zellen etwa 30% des Gesamtproteins ausmacht (Hennemann, 2007). Somit kann für die Simulation von Ganzzell-Biotransformationsprozessen mit einer *LbADH*-Konzentration von 1 mg/mL gerechnet werden. Die simulierten Werte für die cytosolischen Cofaktorkonzentrationen sind neben den gemessenen Werten in Abbildung 5.8 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die durch LC-MS/MS-Analytik ermittelten cytosolischen Konzentrationen weitgehend mit den simulierten Werten übereinstimmen. Die größte Abweichung ergibt sich für die intrazellulären NAD-Konzentrationen. Laut Simulation sollte die intrazelluläre NAD-Konzentration nach ca. 30 Minuten einen konstanten Wert von etwa 550 $\mu\text{mol}/\text{L}$ betragen. Die LC-MS/MS-Messungen ergaben jedoch eine kontinuierliche Abnahme der intrazellulären NAD-Konzentration. Für die Konzentration des anderen oxidierten Cofaktors NADP wurde ein weitgehend konstanter Wert von ca. 40 $\mu\text{mol}/\text{L}$ beobachtet.

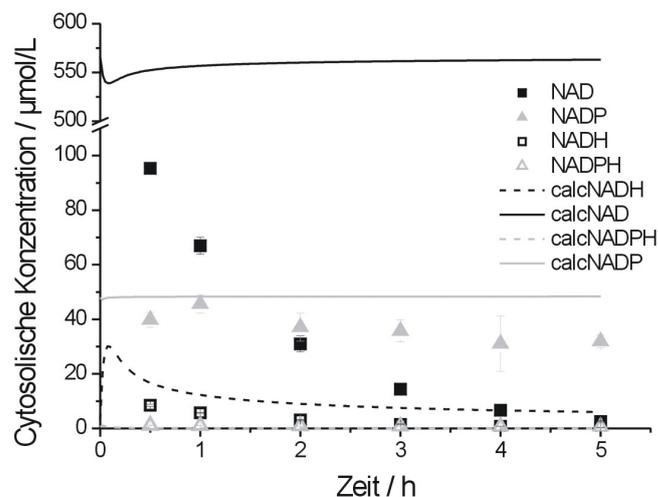


Abbildung 5.8: Cytosolische Cofaktorkonzentrationen bei der Reduktion von MAA durch *E. coli* (*LbADH*). Bedingungen: $V=130$ mL, 30°C , pH 6,0, 50 mmol/L KP_i -Puffer, 100 $\text{g}_{\text{BFG}}/\text{L}$ rek. *E. coli* (*LbADH*), $0,6$ mol/L MAA, $0,9$ mol/L 2-Propanol. Linien sind berechnete Werte. Durchgezogene Linien: NAD (schwarz), NADP (grau); gestrichelte Linien: NADH (schwarz), NADPH (grau).

5.4.2 Hexandion-System

Dieselben Untersuchungen zu intrazellulären Cofaktorkonzentrationen während eines Ganzzellbiotransformations-Prozesses wurde auch für die Reduktion von 2,5-Hexandion durchgeführt. In Kapitel 4 wurde bereits dargestellt, dass bei dieser zweistufigen Reduktion zum 2,5-Hexandiol eine starke thermodynamische Limitierung vorliegt, die durch Anwendung von Methoden zur *in situ*-Acetonabtrennung überwunden werden kann. Es wurden Biotransformationen zur Reduktion von 2,5-Hexandion mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung durchgeführt und die intrazellulären Cofaktorkonzentrationen unter Bedingungen mit und ohne Acetonabtrennung durch Pervaporation bestimmt.

Abbildung 5.9 zeigt die während der Prozesse auftretenden extrazellulären Konzentrationen der Reaktanden 2,5-Hexandion, (2*R*,5*R*)-Hexandiol, des Intermediats (*R*)-5-Hydroxyhexanon und Aceton. Es ist zu erkennen, dass in dem Prozess mit Pervaporation das entstehende Aceton entfernt wurde und höhere Konzentrationen des Produktes (2*R*,5*R*)-Hexandiol entstanden.

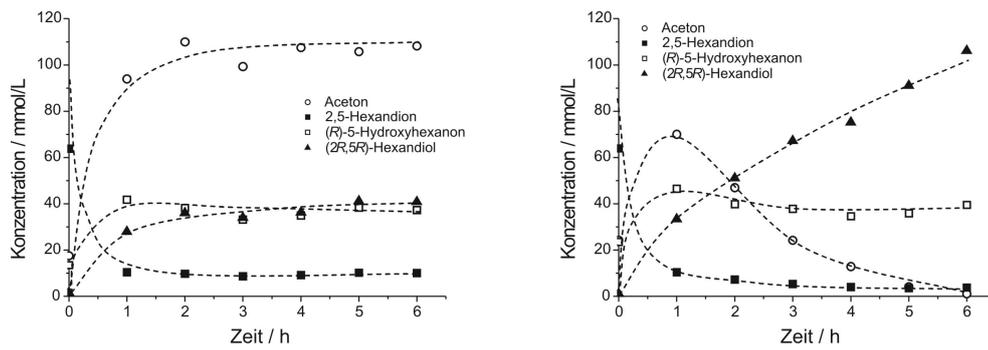


Abbildung 5.9: Extrazelluläre Konzentrationen der Reaktanden bei der Reduktion von 2,5-Hexandion durch *E. coli* (*LbADH*) mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von 2-Propanol. Links: ohne *in situ*-Acetonabtrennung. Rechts: *in situ*-Acetonabtrennung durch Pervaporation. Bedingungen: $V=160$ mL, 40°C , pH 6,0, 50 mmol/L KP_i -Puffer, $100\text{ g}_{\text{BFG}}/\text{L}$ rek. *E. coli* (*LbADH*), 0,1 mol/L 2,5-Hexandion, 0,5 mol/L 2-Propanol, Umwälzung 300 mL/min, Vakuum 15 ± 3 mbar. Linien sind optische Hilfen.

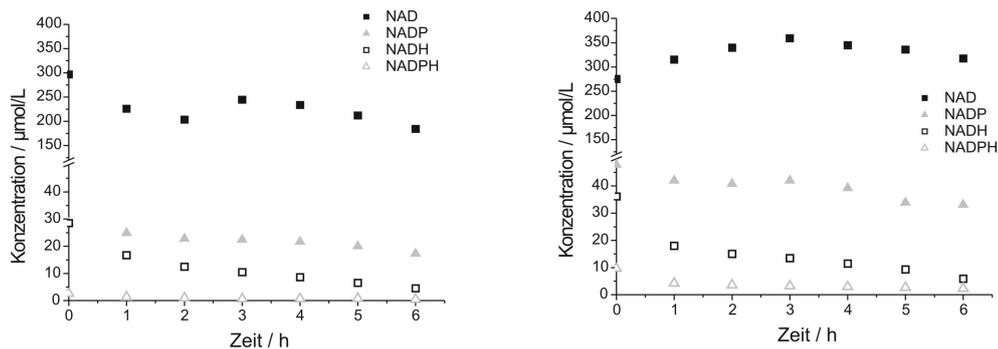


Abbildung 5.10: Cytosolische Cofaktor-Konzentrationen bei der Reduktion von 2,5-Hexandion durch *E. coli* (*LbADH*) mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von 2-Propanol. Links: ohne *in situ*-Acetonabtrennung. Rechts: *in situ*-Acetonabtrennung durch Pervaporation. Bedingungen: $V=160$ mL, 40°C , pH 6,0, 50 mmol/L KP_i -Puffer, $100\text{ g}_{\text{BFG}}/\text{L}$ rek. *E. coli* (*LbADH*), 0,1 mol/L 2,5-Hexandion, 0,5 mol/L 2-Propanol, Umwälzung 300 mL/min, Vakuum 15 ± 3 mbar

Abbildung 5.10 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung der cytosolischen Cofaktor-Konzentrationen. In diesem Fall fand keine Simulation der Cofaktorkonzentrationen statt. Es ist zu erkennen, dass die Konzentrationen aller vier Cofaktoren etwa dasselbe Größenverhältnis aufweisen wie bei der Reduktion von Methylacetoacetat. Dabei ist ein wesentlicher Unterschied zwischen dem Prozess mit Acetonabtrennung durch Pervaporation und dem ohne Acetonabtrennung, dass die NADP- und auch die NADPH-Konzentration bei dem Prozess mit der Acetonabtrennung höher sind. Die NADP-Konzentration ist ähnlich wie bei der Reduktion von MAA auf einem relativ konstanten Wert von ca. $25\ \mu\text{mol/L}$

bzw. $40 \mu\text{mol/L}$ bei der Biotransformation mit Pervaporation. Die Konzentrationen der reduzierten Cofaktoren NADH und NADPH liegt bei beiden Ansätzen niedriger als die Konzentrationen der oxidierten Cofaktoren und zeigt eine leichte Abnahme während des Prozesses. Die größte Abweichung zur Reduktion von MAA besteht in der intrazellulären Konzentration von NAD. Während bei der Reduktion von MAA eine rapide Abnahme der NAD-Konzentration auftrat, wurde hier in beiden Fällen eine relativ konstante NAD-Konzentration detektiert.

Die signifikanten Unterschiede beim Verlauf der NAD-Konzentrationen legen den Schluss nahe, dass NAD durch die Reaktionsbedingungen, die bei der Reduktion von MAA auftreten, instabiler ist als bei den Reaktionsbedingungen während der Reduktion von 2,5-Hexandion. Aus diesem Grund wurde die Stabilität der Cofaktoren unter Prozessbedingungen noch eingehender untersucht.

5.5 Einfluss der Reaktanden auf die Cofaktorstabilität

Zur Untersuchung der Cofaktorstabilität während der biokatalytischen Reduktion von Methylacetoacetat wurde eine Lösung mit allen vier Cofaktoren NAD, NADP, NADH und NADPH (Startkonzentrationen siehe Abb. 5.11, links) zu Pufferlösung gegeben, die verschiedene Konzentrationen der Substrate und Produkte der Biotransformation enthielt. Nach fünfstündiger Inkubation, die der Reaktionsdauer des in Kapitel 5.3 beschriebenen Biotransformationsprozesses entspricht, wurden die Lösungen 1:100 mit Pufferlösung verdünnt und die verbleibende Cofaktorkonzentration mittels LC-MS/MS bestimmt. Abbildung 5.11 zeigt das Ergebnis der Stabilitätsuntersuchungen.

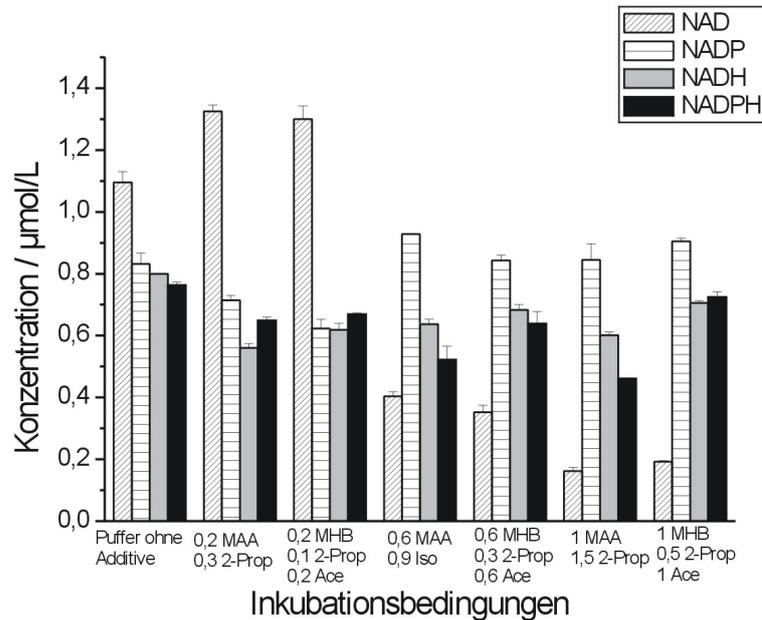


Abbildung 5.11: Restkonzentrationen der Cofaktoren nach Inkubation unter Prozessbedingungen. Bedingungen: Inkubationsdauer 5 h, 50 mmol/L KP_i -Puffer, pH 6,0, 30°C, definierte Konzentrationen MAA, MHB, 2-Propanol und Aceton. Die Zahlen geben die Konzentration der betreffenden Substanz während der Inkubation in mol/L an. Ausgangskonzentrationen: NAD 1,095 µmol/L, NADP 0,832 µmol/L, NADH 0,8 µmol/L, NADPH 0,763 µmol/L.

Es wird deutlich, dass die verschiedenen untersuchten Konzentrationen der Biotransformations-Reaktanden den stärksten Einfluss auf den Cofaktor NAD haben. Während die Konzentrationen der anderen drei Cofaktoren NADP, NADH und NADPH bei allen untersuchten Bedingungen ähnliche Werte liefern, nimmt die verbliebene Konzentration von NAD gerade bei den höheren Konzentrationen drastisch ab. Bei den ersten beiden Ansätzen werden noch etwa gleich hohe Konzentrationen wie bei der Standardprobe (Inkubation ohne Addition von Biotransformationsreaktanden) gemessen. Dass die Konzentrationen etwas über der NAD-Konzentration des Standards liegen, kann auf experimentelle Ungenauigkeiten zurückgeführt werden, da in einem sehr kleinen Maßstab von 1 mL gearbeitet wurde und die verwendeten Pipetten nicht auf die Dosierung von organischen Lösungen geeicht sind.

Ein ähnliches Bild ergab sich auch bei der Bestimmung der intrazellulären Cofaktorkonzentrationen von *E. coli*-Zellen, die 5 Stunden lang unter hohen MAA- und 2-Propanolkonzentrationen inkubiert wurden (Abbildung 5.12). Es ist zu erkennen, dass auch hier die NAD-Konzentration durch die Inkubation in MAA und 2-Propanol rapide

abnahm. Die Konzentrationen der anderen Cofaktoren blieb dagegen weitgehend konstant. In der die Zellen während der Inkubation umgebenden Lösung wurde nach einer Inkubationsdauer von 5 Stunden kein NAD detektiert, was die Schlussfolgerung zulässt, dass die Abnahme an NAD ausschließlich durch chemische Degradation verursacht wird und der Cofaktor nicht durch eine zerstörte Zellmembran durch aus der Zelle austritt.

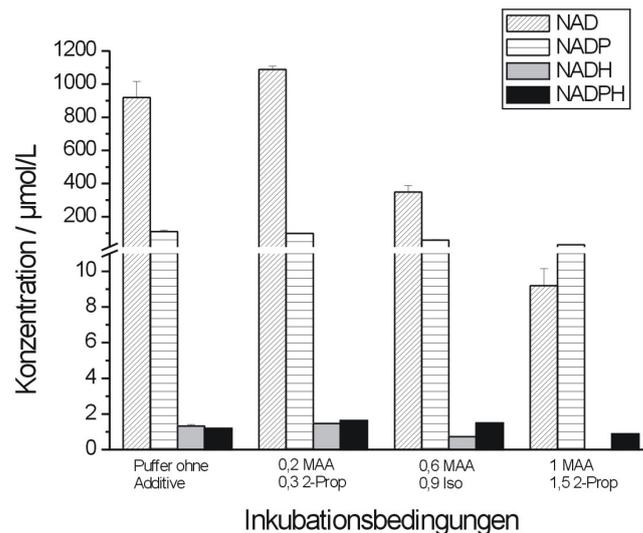


Abbildung 5.12: Intrazelluläre Konzentrationen der Cofaktoren nach Inkubation unter Prozessbedingungen. Bedingungen: Inkubationsdauer 5 h, 50 mmol/L KP_i -Puffer, pH 6,0, 30°C, definierte Konzentrationen MAA und 2-Propanol. Die Zahlen geben die Konzentration der betreffenden Substanz während der Inkubation in mol/L an.

Die Stabilitäten der Cofaktoren in Gegenwart verschiedener pH-Werte, Puffer und Temperaturen war Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (Johnson und Tuazon, 1977; Laercio et al., 1998). Generell wird für NADPH eine geringere Stabilität postuliert als für die nicht-phosphorylierte Form NADH (Wu et al., 1986). Erstaunlicherweise wurde in den hier beschriebenen Inkubationsexperimenten die geringste Stabilität für NAD beobachtet. Dies bedeutet, dass die Cofaktor-Stabilität oft unter nicht-relevanten Prozessbedingungen betrachtet wird und sich, je nach auftretenden Konzentrationen an Substraten und Produkten von der Cofaktor-Stabilität in reinen Pufferlösungen unterscheiden kann.

5.6 Zusammenfassung

Die wesentlichen Ergebnisse dieses Kapitels lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Alle vier Formen der Cofaktoren zeigen eine hohe Stabilität während des Zellaufschlusses, so dass die beschriebene Methode des Zellaufschlusses für die Untersuchung von intrazellulären Cofaktoren geeignet ist.
- Die Inkubation der Zellen in Anwesenheit eines Substrates der Biotransformation ohne Regenerierung der Cofaktoren hat gezeigt, dass sich die Konzentrationen der Cofaktoren während eines Biotransformationsprozesses so ändern, dass zu jedem Zeitpunkt der Biotransformation alle Cofaktoren quantifiziert werden können.
- Es wurde ein Modell erstellt, dass die durch *LbADH* katalysierte Reduktion von MAA mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von 2-Propanol beschreiben kann. Es können die Konzentrationsänderungen aller Reaktanden sowie der Cofaktoren berechnet werden und zwar sowohl für Prozesse mit isolierter *LbADH* als auch für Ganzzell-Biotransformationsprozesse.
- Während der Reduktion von MAA mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung durch rek. *E. coli*-Zellen mit *LbADH* wurden die intrazellulären Konzentrationen der Cofaktoren bestimmt. Die ermittelten Konzentrationen stimmen weitgehend mit der Modell-Vorhersage überein. Abweichungen ergaben sich für die NAD-Konzentration, die während der Biotransformation stark abnahm.
- Die intrazellulären Cofaktor-Konzentrationen wurden während der Reduktion von 2,5-Hexandion mit und ohne Acetonabtrennung durch Pervaporation bestimmt. Es ergaben sich ähnliche Konzentrationsverläufe für die intrazellulären Konzentrationen wie bei der Reduktion von MAA. Eine drastische Abnahme der NAD-Konzentration trat hier nicht auf. Die beiden Ansätze mit und ohne Acetonabtrennung zeigten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der intrazellulären Cofaktorkonzentrationsverläufe.
- Die Abnahme der intrazellulären NAD-Konzentration bei der Reduktion von MAA kann durch chemische Degradierung von NAD erklärt werden.

Kapitel 6

Diskussion und Ausblick

Das folgende Kapitel enthält eine übergeordnete Betrachtung der beschriebenen Untersuchungen zu Ganzzell-Biotransformationsprozessen mit rekombinanten *E. coli*. Dabei soll die Effizienz der verwendeten Ganzzell-Biokatalysatoren in den jeweiligen Reaktorsystemen beurteilt werden.

6.1 Rekombinante *Escherichia coli* als Ganzzell-Biokatalysatoren

Ein wesentlicher Vorteil der Verwendung isolierter Enzyme in biokatalytischen Prozessen liegt in der Vermeidung von Nebenreaktionen. Bei Ganzzell-Biotransformationsprozessen kann die Gesamtheit der intrazellulären Enzyme mit den angebotenen Substraten eine Reaktion eingehen. Davon ist insbesondere die Enantiomerenreinheit des Produktes betroffen. Der Vergleich von Prozessen mit Wildtyp-Mikroorganismen und rekombinanten *Escherichia coli*, wie in der Einleitung dargestellt, zeigt, dass durch eine Überexpression von rekombinanten Alkoholdehydrogenasen in *E. coli* Ganzzell-Katalysatoren geschaffen werden können, die aufgrund des hohen Expressionslevels der ADH und der resultierenden katalytischen Aktivität zufriedenstellende Enantiomeren- und Diastereomerenreinheiten des Produktes ermöglichen (siehe Vergleich der Tabellen 1.2 und 1.3).

Die hier beschriebenen Synthesen von Methylhydroxybutyrat und Hexandiol waren ebenfalls durch hohe *ee*- und *de*-Werte von über 99% gekennzeichnet, was auf die hohe Expressionsrate der rekombinanten Proteine zurückzuführen ist. So kann mit dem hier verwendeten Expressionswirt der *LbADH* ein Anteil der *LbADH* von ca. 30% am Gesamtprotein erreicht werden (Hennemann, 2007).

Der größte Vorteil bei der Verwendung ganzer Zellen als Biokatalysatoren liegt wohl bei

der Anwesenheit intrazellulär Cofaktoren, so dass im Prinzip auf die Zudosierung externer Cofaktoren verzichtet werden kann. Dieser Vorteil spiegelt sich insbesondere bei den hier beschriebenen kontinuierlichen Biotransformationsexperimenten mit *E. coli* (*LbADH*) wider. Die Reduktion von MAA durch *E. coli* (*LbADH*) ist über einen Zeitraum von 28 Tagen ohne Zugabe von externem Cofaktor ausgekommen. Dies lässt darauf schließen, dass die verwendeten *E. coli*-Zellen während des Prozesses über eine weitgehend intakte Zellmembran verfügen, da sonst ein schnelleres Auswaschen des Cofaktor-Pools zu beobachten gewesen wäre. Die Untersuchung der Membranintegrität und der Vitalität sowie der intrazellulären Cofaktor-Pools während kontinuierlicher Biotransformationen würde sicherlich wertvolle Informationen über den biologischen Zustand der Biokatalysatoren geben, war im Rahmen dieser Arbeit aber nicht reproduzierbar möglich, da es bei den CSTR-Läufen zu einer Anhäufung der Biomasse im Inneren des verwendeten Membranmoduls kam, so dass eine Quantifizierung des Biokatalysators sowie Untersuchungen zur Vitalität und Membranintegrität während der Prozesse nicht möglich war.

6.2 Cofaktor-Regenerierungs-Methoden

Ganzzell-Biokatalysatoren bieten die Möglichkeit verbrauchte Redoxäquivalente wie NADH und NADPH über Reaktionen des Metabolismus durch Verstoffwechslung von Glucose oder anderen Kohlenstoffquellen nachzuliefert. Diese Form der Cofaktor-Regenerierung ist vor allem für Prozesse mit Wildtyp-Mikroorganismen als Biokatalysator beschrieben worden (siehe Tabelle 1.2), aber auch Beispiele für rekombinante Stämme von *Pseudomonas sp.* und *E. coli* sind beschrieben worden (Park et al., 2006, 2007).

Die durch Haberland und Chin-Joe beschriebenen kontinuierlichen Reduktionen von Ketonverbindungen (Chin-Joe et al., 2002; Haberland et al., 2002) wurden mit Wildtyp-Mikroorganismen und Glucose-Verstoffwechslung als Methode der Cofaktor-Regenerierung durchgeführt. Es wurden dabei bei kontinuierlichen Prozessen Raum-Zeit-Ausbeuten von 15 bzw. $64 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ erreicht (Vgl. Tabelle 1.2). Eine Problematik liegt in dem Phänomen, dass ein großer Teil der durch die Verstoffwechslung von Glucose erzeugten Redoxäquivalente nicht für die gewünschte Biotransformations-Reaktion, der Reduktion der Keton-Verbindung, genutzt wird, sondern in Reaktionen des Metabolismus verbraucht wird. J. Haberland konnte zeigen, dass bei der Reduktion von 2,5-Hexandion durch *L. kefir* lediglich 15% der angebotenen Redoxäquivalente für die Reduktion des Diketons genutzt wird (Haberland, 2003).

Weitere Probleme dieser Methode der Cofaktor-Regenerierung ergeben sich durch die Synthese von Stoffwechsel-Nebenprodukten wie Lactat, Acetat und Ethanol, die zum einen

inhibierende Effekte auf den Stoffwechsel und somit auf die Synthese von Redoxäquivalenten haben können, sich zum anderen als störend bei der Produktaufarbeitung erweisen können.

Die Regenerierung verbrauchter Cofaktoren durch ein bestimmtes rekombinant überexprimiertes Enzym ist eine Weiterentwicklung von Ganzzell-Biokatalysatoren. Wie in der Einleitung ausgeführt, ist die Cofaktor-Regenerierung als substrat-gekoppelter oder enzym-gekoppelter Ansatz möglich. Die substrat-gekoppelte Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von 2-Propanol wurde für Biotransformationen mit *L. kefir* (Amidjojo und Weuster-Botz, 2005) beschrieben. Dort wurden eine hohe Raum-Zeit-Ausbeute von $342 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ und ein *ee* von 99% erreicht, was die effizientere Nutzung der Redoxäquivalente widerspiegelt.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Biotransformationen sind ebenfalls dadurch gekennzeichnet, dass sämtliche regenerierten Cofaktoren für die Reduktion der angebotenen Keton-Verbindung genutzt wurden. Für die Stabilität der Biokatalysatoren macht es dabei einen wesentlichen Unterschied, ob die Cofaktor-Regenerierung im substrat-gekoppelten oder im enzym-gekoppelten Ansatz stattfindet. Die beschriebenen kontinuierlichen Biotransformationen zeigten deutlich, dass bei der enzym-gekoppelten Cofaktor-Regenerierung durch Formiatdehydrogenase oder Glucosedehydrogenase eine weitaus stärkere Deaktivierung der Biokatalysatoren stattfand, die vermutlich auf ein Auswaschen des Cofaktors zurückzuführen ist. Dieser Effekt ist bei der Cofaktor-Regenerierung durch Formiatdehydrogenase stärker als bei der Cofaktor-Regenerierung durch Glucosedehydrogenase (Zum Vergleich siehe Deaktivierungskonstanten in den Tabellen 3.16, 3.14 und 3.3).

Die Betrachtung der Stabilität während der kontinuierlichen Prozesse führt zu der Annahme, dass es durch die substrat-gekoppelte Cofaktor-Regenerierung eine stärkere Retention des Cofaktors innerhalb der Zelle gibt als bei enzym-gekoppelten Prozessen, bei denen der Cofaktor offensichtlich schneller ausgewaschen wird. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens ist, dass der Cofaktor dadurch, dass er bei der substrat-gekoppelten Cofaktor-Regenerierung nicht zwischen zwei Enzymen hin und her pendelt, eine stärkere Retention an der Alkoholdehydrogenase zeigt. Abbildung 6.1 zeigt schematisch die Bewegungen, die ein Cofaktormolekül zwischen zwei Enzymen bei der enzym-gekoppelten Cofaktor-Regenerierung zurücklegt.

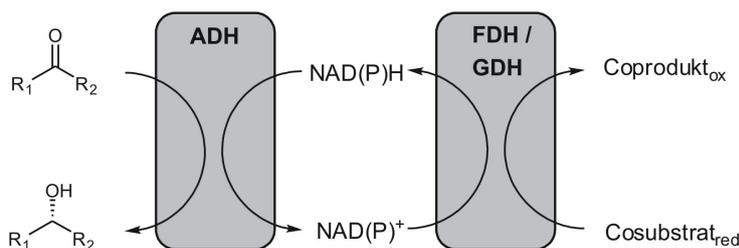


Abbildung 6.1: Cofaktor-Shuttling zwischen zwei Enzymen bei der enzym-gekoppelten Cofaktor-Regenerierung

Bei der substrat-gekoppelten Cofaktor-Regenerierung hingegen ist es theoretisch möglich, dass ein Cofaktor-Molekül, nachdem es oxidiert wurde und seine Elektronen auf das angebotene Keton übertragen hat, am Enzym verbleibt, bis es durch die Oxidation von 2-Propanol durch dasselbe Enzym wieder reduziert und somit regeneriert wird (siehe Abbildung 6.2). Für diese Annahme spricht auch der Theorell-Chance-Mechanismus, nach dem Alkohol-Dehydrogenasen in der Regel arbeiten. Demnach kann es deutlich unterschiedliche Zeitkonstanten für die Bindung von Substraten und Cofaktoren am Enzym geben (Bisswanger, 2000).

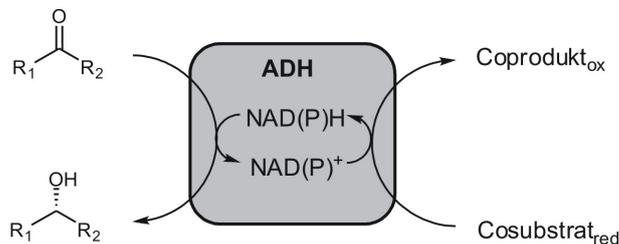


Abbildung 6.2: Cofaktor-Retention bei substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung

Für die Stabilität der Biokatalysatoren in kontinuierlich betriebenen Biotransformationsprozessen ist es somit vorteilhafter, die Cofaktor-Regenerierung im substrat-gekoppelten Ansatz durchzuführen. Dies hat allerdings den großen Nachteil, dass es durch die Einstellung eines Gleichgewichtes zu einer thermodynamischen Limitierung kommt, die einen kompletten Umsatz verhindert. Diese kann aber, wie gezeigt, durch Methoden der integrierten Acetonabtrennung, wie der Pervaporation, auch bei kontinuierlichen Biotransformationsprozessen überwunden werden.

Durch die neue Analytik-Methode zur Bestimmung der intrazellulären Cofaktorkonzentrationen ist es nun möglich, die gesamte eingesetzte Cofaktormenge in einem Biotransformationsprozess zu bestimmen. Die Bestimmung der Cofaktorkonzentrationen von rekombinanten *E. coli*-Zellen mit *LbADH* lieferte nach einer Fermentation die in Tabelle 6.1 gezeigten Werte.

Tabelle 6.1: Intrazelluläre Cofaktorkonzentrationen von *E. coli* (*LbADH*)

Cofaktor	Konzentration
NAD	452,8 nmol/g _{BFG}
NADP	38,24 nmol/g _{BFG}
NADH	2,512 nmol/g _{BFG}
NADPH	0,472 nmol/g _{BFG}
Gesamtpool	494,024 nmol/g _{BFG}

Mit diesen intrazellulären Cofaktorkonzentrationen lässt sich eine total turnover number *ttn* für die Cofaktoren bei Ganzzell-Biotransformationsprozessen bestimmen. Sie gibt an, wie viele Moleküle Produkt pro Molekül Cofaktor hergestellt werden und sollte für technische Anwendungen mit isolierten Enzymen bei einem Wert von über 1000 liegen (Dellweg et al., 1992). Die Bestimmung der *ttn* ist dann möglich, wenn kein externer Cofaktor während des Prozesses zugegeben wurde. Für die hier durchgeführten kontinuierlichen Biotransformationsprozesse, bei denen keine Zudosierung von externem Cofaktor stattfand, lassen sich die in Tabelle 6.2 gezeigten *ttns* für den Cofaktor berechnen. Die Berechnung fand unter der Annahme statt, dass alle verwendeten Biokatalysatoren vor Beginn der Biotransformation die in Tabelle 6.1 gezeigten intrazellulären Cofaktorkonzentrationen aufweisen. Es wurde jeweils die gebildete Produktmenge bezogen auf die gesamte Cofaktormenge (phosphoryliert und nicht-phosphoryliert) berechnet.

Tabelle 6.2: *ttn* für den Cofaktor bei kontinuierlichen Biotransformationsprozessen

Substrate	Enzyme	<i>ttn</i> / mol _P /mol _{Cofaktor}
MAA, 2-Propanol	<i>LbADH</i>	550000
Butanon, 2-Propanol	<i>LbADH</i>	655000
MAA, Glucose	<i>LbADH</i> , GDH, GLF	29000
MAA, Formiat	<i>LbADH</i> , FDH	18600

In Übereinstimmung mit den hohen Raum-Zeit-Ausbeuten und der guten Katalysatorausnutzung bei den kontinuierlichen Biotransformationen mit dem rekombinanten *E. coli*-Stamm mit *LbADH* sind bei den beschriebenen Prozessen auch sehr hohe *ttns* für den Cofaktor erzielt worden. Die berechneten *ttns* für die Prozesse mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung liegen um etwa einen Faktor 20 niedriger.

Aus den in Tabelle 6.1 gezeigten Werten für die intrazellulären Cofaktor-Pools lässt sich eine Retention der Cofaktoren innerhalb der Zellen während einer kontinuierlichen Biotransformation im CSTR abschätzen. Aus Abbildung 3.6 geht hervor, dass der dort beschriebene Prozess über einen Zeitraum von 18 Tagen ohne die Zudosierung von externem Cofaktor betrieben wurde. Unter den eingestellten Betriebspunkten entsprach dies

einer Prozessdauer von ca. 4000 Verweilzeiten. Wenn nun die Annahme getroffen wird, dass zur Erreichung der hier aufgetretenen Umsätze zu diesem Zeitpunkt die intrazelluläre Konzentration an NADP/NADPH mindestens die doppelte Konzentration des größten k_m -Wertes betragen hat ($16 \mu\text{mol/L}$ für die Oxidation von 2-Propanol, siehe Anhang A), dann lässt sich die Retention dieser Cofaktoren nach der in Abbildung 3.3 gezeigten Gleichung ausrechnen. Nach Tabelle 6.1 betrug der NADP/NADPH-Pool zu Beginn der kontinuierlichen Reduktion $38,7 \text{ nmol/g}_{BFG}$, was einer intrazellulären Konzentration von $48,4 \mu\text{mol/L}$ entspricht. Unter der Annahme, dass die intrazelluläre Konzentration an NADP/NADPH nach 4000 Verweilzeiten noch $32 \mu\text{mol/L}$ betragen hat, ergibt sich eine Retention R von 0,99989. Obwohl diese Zahl nur eine grobe Abschätzung darstellt, wird dennoch die hohe Retention der Cofaktoren innerhalb der Zellen bei der substratgekoppelten Cofaktor-Regenerierung deutlich.

6.3 Reaktionstechnik bei Ganzzellbiotransformationsprozessen

Die in dieser Arbeit beschriebenen kontinuierlichen Biotransformationen sind die ersten Beispiele für den Einsatz rekombinanter Mikroorganismen für Reduktionen von Keton-Verbindungen im CSTR-Reaktor. Es konnte gezeigt werden, dass rekombinante *E. coli*-Zellen in solchen Prozessen eine enorm hohe Prozessstabilität aufweisen können und, je nach Wahl des rekombinanten Enzyms, sowohl die Synthese des (*R*)-Enantiomers als auch des (*S*)-Enantiomers eines chiralen Alkohols möglich ist. Dabei ist es möglich, Raum-Zeit-Ausbeuten zu erreichen, die in der Größenordnung von Prozessen mit isolierten Enzymen liegen (Vgl. Tabelle 1.1). Dabei haben die kinetischen Eigenschaften der rekombinant exprimierten Alkoholdehydrogenasen großen Einfluss auf die Eigenschaften des Ganzzell-Biokatalysators, so dass die Prozessbedingungen, insbesondere die Substrat- und Cosubstratkonzentrationen individuell gewählt werden müssen. Des Weiteren spielt die Methode der Cofaktor-Regenerierung eine maßgebliche Rolle für die Stabilität der Biokatalysatoren. Es zeigte sich, dass bei der substratgekoppelten Cofaktor-Regenerierung eine weitaus höhere Stabilität der Biokatalysatoren beobachtet wird als bei der enzymgekoppelten.

Die substratgekoppelte Cofaktor-Regenerierung durch Oxidation von 2-Propanol hat gegenüber der enzymgekoppelten Cofaktor-Regenerierung den großen Nachteil der thermodynamischen Limitierung, diese kann jedoch durch geeignete Methoden der Acetonabtrennung überwunden werden. Im Batch-Ansatz wurden drei Methoden der Acetonabtrennung für Ganzzell-Biotransformationsprozesse angewendet. In allen Fällen konnte durch diese Strategie eine Steigerung des Umsatzes erzielt werden. Die Methoden der Acetonabtren-

nung wirken sich unterschiedlich auf die Stabilität der verwendeten Biokatalysatoren aus. Es stellte sich heraus, dass bei der Acetonabtrennung durch Pervaporation eine enorm hohe Stabilität der Biokatalysatoren erreicht wird. Diese Arbeit ist das erste Beispiel für Acetonabtrennung durch Pervaporation in Ganzzell-Biotransformationsprozessen. Die Abtrennung des Nebenproduktes Aceton mittels Pervaporation ist auch in kontinuierlichen Biotransformationsprozessen möglich, so dass thermodynamisch schwierige Reaktionen, wie die zweistufige Reduktion von 2,5-Hexandion zu 2,5-Hexandiol im kontinuierlichen Ansatz möglich ist.

Für die beschriebenen kontinuierlichen Biotransformationen ist die Katalysatorausnutzung berechnet worden. Unter der Annahme, dass das Trockengewicht 20% des Feuchtgewichtes bei *E. coli* ausmachen, davon 50% aus Protein bestehen und 30% des Gesamtproteins aus dem rekombinant überexprimierten Enzym bestehen, lässt sich eine Biokatalysatorausnutzung berechnen, die sich auf die produzierende ADH bezieht. Tabelle 6.3 zeigt die Biokatalysatorausnutzungen der verschiedenen in dieser Arbeit durchgeführten kontinuierlichen Biotransformationen.

Tabelle 6.3: Katalysatorausnutzung bei kontinuierlichen Biotransformationen mit rek. *E. coli*

Reaktor	Substrate	rek. Enzyme	Katalysatorausnutzung
CSTR	MAA, 2-Propanol	<i>LbADH</i>	1980 g_P/g_{ADH}
CSTR	Butanon, 2-Propanol	<i>LbADH</i>	800 g_P/g_{ADH}
CSTR (1)	MAA, 2-Propanol	ADH T	40 g_P/g_{ADH}
CSTR (2)	MAA, 2-Propanol	ADH T	190 g_P/g_{ADH}
CSTR	MAA, 2-Propanol	<i>CpCR</i>	2240 g_P/g_{ADH}
CSTR	MAA, Glucose	<i>LbADH</i> , GDH, GLF	340 g_P/g_{ADH}
CSTR	MAA, Formiat	<i>LbADH</i> , FDH	66 g_P/g_{ADH}
CSTR+PV	2,5-Hexandion, 2-Propanol	<i>LbADH</i>	590 g_P/g_{ADH}
CSTR+PV	2,5-Hexandion, 2-Propanol	<i>CpCR</i>	36 g_P/g_{ADH}

Es wird deutlich, dass bei manchen Prozesse extrem hohe Werte für die ADH-bezogene Katalysatorausnutzung erreicht wurden. Aus industrieller Sicht lohnt sich ein Prozess mit isoliertem Enzym dann, wenn eine Katalysatorausnutzung über 100 g_P/g_{ADH} erreicht wird (Lütz, 2007). Dieser Wert wurde in einigen der hier beschriebenen Prozesse um ein Vielfaches überschritten.

6.4 Cofaktor-Analytik

Der Einsatz einer neuen LC-MS/MS-Methode für die Quantifizierung intrazellulärer Metabolite ist hier das erst Mal auf die Quantifizierung von intrazellulären Cofaktoren bei

Ganzzell-Biotransformationsprozesse angewendet worden. Es konnte gezeigt werden, dass diese Methode sehr gut für die Bestimmung intrazellulärer Cofaktor-Konzentrationen geeignet ist und reproduzierbar angewendet werden kann. Diese Analytik-Methode wird somit in Zukunft sicherlich wichtige Beiträge zum Verständnis von Ganzzell-Biokatalysatoren liefern, insbesondere im Hinblick auf die Verfügbarkeit intrazellulärer Cofaktoren.

Bei den hier untersuchten Biotransformationen zeigte sich, dass die Konzentrationen der reduzierten Cofaktoren während des gesamten Biotransformationsprozesses im Vergleich zu den oxidierten Cofaktoren sehr niedrig war ($\text{NADPH} < 5 \mu\text{mol/L}$, $\text{NADH} < 20 \mu\text{mol/L}$) und somit nur wenige Redoxäquivalente für die gewünschte Reaktion zur Verfügung stehen. Die kinetischen Eigenschaften des untersuchten rekombinanten Enzyms *LbADH* zeigten aber, dass genau dies die Bedingungen sind, unter denen die *LbADH* bevorzugt arbeitet.

In Voruntersuchungen wurde gezeigt, dass die vier verschiedenen Cofaktoren während des Zellaufschlusses unterschiedlich stark geschädigt werden. Diese Degradierung wurde bei der Quantifizierung intrazellulärer Cofaktor-Konzentrationen berücksichtigt und mit eingerechnet. Es ist dabei allerdings möglich, dass die Cofaktoren beim Zellaufschluss durch die umgebende Membran weitaus besser vor dem Kontakt mit organischem Lösungsmittel geschützt sind als angenommen und daher die intrazellulären Cofaktor-Konzentrationen in der Realität noch höhere Werte annehmen als hier bestimmten. Andererseits ist nicht sichergestellt, dass durch die angewandten Methoden wirklich der gesamte Cofaktor-Pool erfasst wird. Es ist denkbar, dass nicht der gesamte Cofaktor-Pool im Cytosol vorliegt, sondern auch etwas der vorhandenen Cofaktoren an Enzymen gebunden vorliegt und somit nicht unbedingt durch die Extraktion während des Zellaufschlusses mit erfasst wird. Die Frage, inwieweit die gewonnenen Werte für intrazelluläre Cofaktor-Konzentrationen den tatsächlichen Bedingungen im Cytosol entsprechen, kann daher an dieser Stelle nicht hinreichend beantwortet werden.

Nichtsdestotrotz kann die Dynamik von intrazellulären Cofaktor-Konzentrationen mit der angewandten Methode gut verfolgt werden. Hier sind hier erste Verläufe für intrazelluläre Cofaktor-Konzentrationen bei Ganzzell-Biotransformationen gezeigt worden. Bei dem Prozess mit *E. coli* (*LbADH*) gibt es eine gute Übereinstimmung mit dem kinetischen Modell des isolierten Enzyms. Bei der Modellentwicklung ist die Annahme getroffen worden, dass die Zellmembran keine Diffusionsbarriere für die Substrate und Produkte des Biotransformationsprozesses darstellt und die intra- und extrazellulären Konzentrationen der Substrate und Produkte identisch sind. Die Tatsache, dass es sowohl bei dem hier

beschriebenen Transformationsexperiment als auch in dem in Abbildung 3.6 gezeigten CSTR-Lauf eine gute Übereinstimmung zwischen berechneten und gemessenen Werten gibt, bestätigt diese Vermutung.

6.5 Ausblick

Diese Arbeit zeigt Beispiele dafür, wie robust und vielseitig rekombinante *E. coli*-Zellen sein können. Durch den hohe Expressionslevel der rekombinanten Enzyme ist es möglich, eine hohe Enantiomerenreinheit des Produktes zu erzielen und Nebenprodukte zu vermeiden. Somit können sie durchaus mit isolierten Enzymen konkurrieren und sind diesen hinsichtlich der natürlicherweise vorhandenen intrazellulären Cofaktoren sogar überlegen. Sie stellen somit eine Weiterentwicklung von Ganzzell-Biotransformationen dar, die vielfach schon industrielle Anwendung finden und sicherlich weitere Verbreitung finden werden.

Eine weitere Entwicklung von Ganzzell-Biokatalysatoren liegen in der Anwendung von Methoden für das „genetic engineering.“ Durch die gerichtete Optimierung von rekombinanten Enzymen und die anschließende Expression dieser Enzyme in Wirtsorganismen wie *E. coli* oder anderen leicht zu kultivierenden Mikroorganismen werden sicherlich noch leistungsfähigere Ganzzell-Biokatalysatoren geschaffen werden und das Substratspektrum von Ganzzell-Biokatalysatoren erweitert werden. Eine weitere Möglichkeit der Optimierung von Ganzzell-Biokatalysatoren liegen in der Erhöhung der intrazellulären Cofaktor-Produktion und der Verbesserung der Substrat- und Cosubstrat-Aufnahmerate in die Zelle. Der hier untersuchte rek. *E. coli*-Stamm mit *LbADH* zeigt aufgrund der extrem kleinen k_m -Werte für NADP(H)-abhängige Reaktionen schon eine recht gute Cofaktorausnutzung. Die Sensitivitätsanalyse des kinetischen Modells (Abb. B.1) postuliert keine signifikante Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit bei einer Erhöhung der intrazellulären Cofaktorkonzentrationen. Bei Ganzzell-Biokatalysatoren mit anderen Produktionsenzymen kann eine Erhöhung der intrazellulären Cofaktor-pools aber durchaus zu höheren katalytischen Aktivitäten führen.

Die Quantifizierung intrazellulärer Cofaktor-Konzentrationen ist ein wesentlicher Schlüssel bei der weiteren Optimierung von Ganzzell-Biokatalysatoren. Durch die Verknüpfung von kinetischen Eigenschaften der exprimierten Enzyme und Analytik der intrazellulären Cofaktor-Pools ist es möglich geworden, enzymatische Prozesse im Inneren der Zelle zu beschreiben. Dadurch können limitierende Schritte, z. B. die Regenerierung von verbrauchten Redoxäquivalenten, aufgedeckt werden. Die LC-MS/MS-Technik macht es dabei möglich, radioaktiv markierte Cosubstrate wie deuteriertes Formiat oder 2-Propanol einzusetzen und intrazelluläre Flüsse von markierten Redoxäquivalenten zu verfolgen.

Kapitel 7

Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit war die Etablierung von Ganzzell-Biotransformationsprozessen mit rekombinanten *E. coli*-Zellen. Es sollten zum einen kontinuierliche Prozesse mit möglichst hohen Prozessparametern wie Raum-Zeit-Ausbeute, Katalysatorausnutzung und *ee* durchgeführt werden. Des Weiteren sollten verschiedene Methoden der *in situ*-Acetonabtrennung auf Ganzzell-Biotransformationsprozesse angewandt werden und intrazelluläre Cofaktorkonzentrationen während der Biotransformationsprozesse mittels LC-MS/MS-Analytik verfolgt werden. Die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich wie folgt zusammen fassen:

Kontinuierliche Biotransformationsprozesse

- Die kontinuierliche Reduktion von Ketonen durch rekombinante Ganzzell-Biokatalysatoren wurde hier erstmals beschrieben.
- Durch die Verwendung von *E. coli*-Stämmen mit entsprechenden rekombinanten Alkoholdehydrogenasen lassen sich sowohl (*R*)-als auch (*S*)-Alkohole synthetisieren.
- Die Ganzzell-Biokatalysatoren zeigen in Biotransformationsprozessen mit substratgekoppelter Cofaktor-Regenerierung eine weitaus höhere Stabilität als bei Prozessen mit enzym-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung. Daraus ergibt sich die Vermutung, dass es durch die substrat-gekoppelte Cofaktor-Regenerierung zu einer höheren Retention der Cofaktoren im Cytosol kommt.

In situ-Acetonabtrennung

- Die Abtrennung des Nebenproduktes Aceton ist durch Strippen, Pervaporation und Extraktion mit der ionischen Flüssigkeit [BMIM][(CF₃SO₂)₂N] bei Ganzzell-Biotransformationsprozessen möglich.
- Dies ist das erste beschriebene Beispiel für die Kombination aus Ganzzellbiokatalyse mit rek. *E. coli*-Zellen und Acetonabtrennung durch Pervaporation bzw. [BMIM][(CF₃SO₂)₂N].
- Die Biokatalysatoren zeigten die höchste Stabilität bei der Acetonabtrennung durch Pervaporation.
- Die Acetonabtrennung durch Pervaporation ist auch in kontinuierliche betriebenen Biotransformaten mit Zellrückhaltung (CSTR) möglich.

Cofaktorpool-Analytik

- Die Beschriebenen Methoden der LC-MS/MS-Analytik und des Zellaufschlusses eignen sich für die Quantifizierung intrazellulärer Cofaktorkonzentrationen während eines Biotransformationsprozesses.
- Die Cofaktorkonzentrationen während der Reduktion von MAA und substratgekoppelter Cofaktor-Regenerierung zeigten eine hohe Übereinstimmung mit dem zuvor aus der *in vitro*-Kinetik des isolierten Enzymes entwickelten Modell.
- Die intrazellulären Cofaktor-Konzentrationen wurden des Weiteren für bei der Reduktion von 2,5-Hexandion mit und ohne Acetonabtrennung durch Pervaporation bestimmt.
- Dies sind die ersten Beispiele für die Quantifizierung intrazellulärer Cofaktorkonzentrationen durch LC-MS/MS bei Ganzzell-Biotransformationsprozessen.

Kapitel 8

Material und Methoden

8.1 Materialien

8.1.1 Geräte und Labormaterialien

Agilent Technologies GmbH, Waldborn	GC-System 6890 ChemStation Software 8.0 Autosampler 7683 HPLC-System 1200
Applied Biosciences, Concord, Kanada	API 4000 Tripel-Quadrupol- Messenspektrometer
Beckman Coulter GmbH, Krefeld	Zentrifuge AV-J20XP Zentrifugenrotor AJ 14 Zentrifugenröhrchen 250 mL
Brand GmbH & Co. KG, Wertheim	PMMA Semi-Mikroküvetten
Brooks Instruments, Veerendahl, Niederlande	Rotameter
Büchi Labortechnik, Konstanz	Rotationsverdampfer Rotavapour R-114 Vakuumpumpe Vac V-513
Chrompack, Middelburg, Niederlande	GC-Kapillarsäule: CP-Chirasil-Dex CB
CMCelfa, Seewen-Schwyz, Schweiz	Umkehrosmose-Anlage P-28 Autosampler CombiPal
Eppendorf, Hamburg	Zentrifuge 5415 D Thermomixer comfort
Fedegari Autoclavi Spa, Italien	Autoklav 4507 E
Heraeus, Hanau	Multifuge 3 S-R Sterilwerkbank HERASafe 1540V10

8.1. MATERIALIEN

IKA-Labortechnik, Staufen	Magnetrührer RET-G
Lauda GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen	Wasserbad mgw lauda M3
Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren	GC-Kapillarsäule: Permabond CW 20 M
	GC-Kapillarsäule: Lipodex E
Metrohm, Herisau, Schweiz	Dosimat 665
	Impulsomat 614
	pH-Meter 691
Pall GmbH, Dreieich	Ultrafiltrationskassette
	Ultrafiltrationsmembran Omega, 10 kDa
Pharmacia LKB, Freiburg	Wechselkolbenpumpe P 500
	Fraktionssammler SuperFrac
Phenomenex, Aschaffenburg	HPLC-Säule: Synergi Fusion RP
PolyAN, Berlin	Pervaporationsmembran PA-HP-02
Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg	Spektrophotometer UV-160
Vacuubrand, Wertheim	Membranpumpe MZ 2C
Watson-Marlow GmbH, Rommerskirchen	Schlauchpumpe 505 U

8.1.2 Chemikalien

Aldrich, Steinheim	1-Phenyl-2-Propanon
	1-Phenyl-2-Propanol
Biosolve, Valkenswaard, Niederlande	Methanol
Cognis, Monheim am Rhein	Antischaummittel Biospumex 153K
Fluka, Neu-Ulm	Butanon
	(<i>R</i>)-2-Butanol
	(<i>S</i>)-2-Butanol
	Casein-Pepton, pankreatisch verdaut
	Ethylendiamintetraessigsäure
	Glucose
	2,5-Hexandion
	Kaliumdihydrogenphosphat
	Methylacetoacetat
	(<i>R</i>)-3-Methylhydroxybutyrat
	(<i>S</i>)-3-Methylhydroxybutyrat
	Tributylamin
	Trifluoressigsäureanhydrid
	Tris(Hydroxymethyl-)Aminomethan

Julich Chiral Solutions, Jülich	(2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-Hexandiol (2 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-Hexandiol NADH (Dinatriumsalz) NADP (Dinatriumsalz) NADPH (Tetranatriumsalz)
KMF Laborchemie, Lohmar	Aceton Dikaliumhydrogenphosphat Ethylacetat Kaliumhydroxid Natriumchlorid Natriumhydroxid 2-Propanol Salzsäure
Merck, Darmstadt	<i>n</i> -Butanol <i>tert</i> -Butylmethylether (MTBE) Chloramphenicol Chloroform Essigsäure Hefeextrakt Kieselgel 60 Magnesiumsulfat-Heptahydrat NAD (freie Säure)
Roth, Karlsruhe	Carbenicillin (Dinatriumsalz) Isopropylthiogalactosid (IPTG)
Sigma, Neu-Ulm	Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB)
Solvent Innovation, Köln	1-Butyl-3-Methylimidazoliumbis- (trifluormethyl)sulfonyl)amid

8.1.3 Biologische Materialien

Es wurden rekombinante *Escherichia coli*-Stämme mit den in Tabelle 8.3 gezeigten Plasmiden verwendet und durch molekularbiologische Standardmethoden (Hanahan, 1983) in die Expressionswirte transformiert.

Tabelle 8.3: Verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz, Quelle
pBTac- <i>LBadh</i>	Amp ^R , <i>adh</i> aus <i>L. brevis</i>	(Ernst et al., 2005)
pET24a- <i>Tadh</i>	Amp ^R , <i>adh</i> aus <i>Thermoanaerobacter spec.</i>	Julich Chiral Solutions
pBTac- <i>LBadh-gdh</i>	Amp ^R , <i>adh</i> aus <i>L. brevis</i> <i>gdh</i> aus <i>Bacillus subtilis</i>	Wacker Chemie AG
pKK223-3 <i>CPadh</i>	Amp ^R , <i>adh</i> aus <i>C. parapsilosis</i>	RWTH Aachen
pZY507- <i>glf</i>	Chl ^R , <i>glf</i> aus <i>Zymomonas mobilis</i>	(Weisser et al., 1995)

Als Expressionswirte für die Enzyme *LbADH*, *ADH T* und *CpCR* diente *E. coli* BL21 Star (DE3) (Invitrogen, Karlsruhe). Der Ganzzell-Biokatalysator für die Prozesse mit enzymgekoppelter Cofaktor-Regenerierung durch Glucosedehydrogenase war *E. coli* BL21 Star $\Delta yjaA \Delta yrfE::pncB$ (Heuser et al., 2007) mit den Plasmiden pBTac-*LBadh-gdh* und pZY507-*glf*.

Isolierte *LbADH* (EC 1.1.1.2) mit einer spezifischen Aktivität von 9,3 U/mg wurde von Julich Chiral Solutions bezogen.

8.2 Kultivierung Mikroorganismen

Die Kultivierung aller Bakterienstämme erfolgte in modifiziertem Luria Bertani (LB)-Medium (Miller, 1972) mit der folgenden Zusammensetzung:

Tabelle 8.4: Zusammensetzung des Kulturmediums

Substanz	Konzentration
Glucose * H ₂ O	4 g/L
Caseinpepton	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	10 g/L

Die Glucose wurde getrennt von allen anderen Medienkomponenten autoklaviert um eine Maillard-Reaktion zu verhindern. Die Medienbestandteile wurden nach dem Abkühlen miteinander vereinigt. Die entsprechende Antibiotikumlösung wurde durch einen Sterilfilter (Durchmesser 0,2 μm) filtriert und zu einer Endkonzentration von 50 mg/L ins Medium

gegeben. Als Vorkultur wurden 50 mL des Mediums in einen 250 mL-Erlenmeyerkolben gegeben und mit 500 μ L einer Kryokultur beimpft. Die Kultivierung der Vorkultur erfolgte über Nacht bei 30°C und 150 rpm im Schüttelinkubator. Als Hauptkultur wurden 200 mL des Mediums in einen 1 L-Erlenmeyerkolben gegeben und mit 500 μ L der Vorkultur beimpft. Es wurde 6 Stunden lang bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von IPTG-Lösung zu einer Endkonzentration von 0,2 mmol/L um die Expression der rekombinanten Proteine zu induzieren. Die Temperatur wurde für die Phase der Proteinexpression auf 27°C gesenkt und die Biomasse weitere 18 Stunden bei 150 rpm inkubiert.

Das Abernten der Zellen erfolgte durch Zentrifugation (20 min, 8000 rpm, 4°C, Beckmann Coulter Avanti J-20 XP). Die Zellen wurden einmal mit 50 mmol/L KP_i -Puffer, pH 6,0 gewaschen. Nach dem Abernten wurde die Biomasse mit 50 mmol/L KP_i -Puffer, pH 6,0 auf eine Biomassekonzentration von 100 g_{BFG}/L eingestellt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

8.3 Zellaufschluss

Für den Zellaufschluss wurde Zellsuspension, die 1 g Biofeuchtmasse enthielt, abzentrifugiert (10 min, 5850 rpm, 4°C, Multifuge 3 S-R, Heraeus). Das Pellet wurde in 1 mL kaltem TE-Puffer (10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, pH 7,0, 4°C) und 1 mL kaltem Methanol (-20°C) resuspendiert. Das Pellet wurde gelegentlich beim Resuspendieren im Eisbad abgekühlt. Anschließend folgte die Zugabe von 2 mL kaltem Chloroform (-20°C). Nach einer Inkubation von 2 h bei 4°C wurde der Ansatz zentrifugiert (10 min, 5850 rpm, 4°C, Multifuge 3 S-R, Heraeus), damit eine Phasentrennung erfolgt. Die Methanolphase (Überstand) wurde für die LC-MS/MS-Analytik verwendet.

8.4 Zellpermeabilisierung

Für die Permeabilisierung der Zellmembran wurden 2 mL einer Zellsuspension zentrifugiert (5 min, 13200 rpm, Zentrifuge 5415 D, Eppendorf), der Überstand verworfen und das Pellet in 2 mL einer 0,5%igen (w/v) CTAB-Lösung resuspendiert. Nach einer 60minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut zentrifugiert (5 min, 13200 rpm, Zentrifuge 5415 D, Eppendorf) und das Pellet in 2 mL 50 mmol/L KP_i -Puffer, pH 6,0, resuspendiert.

8.5 Analytik

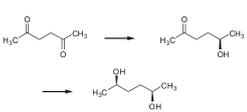
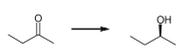
8.5.1 Gaschromatografie

Die Quantifizierung aller Substrate und Produkte der Biotransformationen sowie 2-Propanol und Aceton wurde an einem Agilent HP-6890 A-Gaschromatografen mit einer Carbowax Permabond 20M-Säule (50 m x 0,32 mm i. D.) durchgeführt. Die Betriebsparameter des Gaschromatografen sind in Tabelle 8.5 aufgeführt. Je nach untersuchtem Substrat-Produkt-Paar wurden verschiedene Temperaturprofile verwendet, die in Tabelle 8.6 dargestellt sind. Um den Injektionsfehler des Autosamplers zu eliminieren, wurde für alle Messungen *n*-Butanol als interner Standard verwendet. Alle Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit einer 50 mmol/L *n*-Butanol-Lösung versetzt.

Tabelle 8.5: Allgemeine GC-Parameter

Trägergas	Wasserstoff
Detektor	Flammenionisationsdetektor
Säulenvordruck	1 bar
Injektionsvolumen	1 μL

Tabelle 8.6: Temperaturprofile der verwendeten GC-Methoden

Reaktionssystem	Temperaturprofil	Retentionszeiten
	70°C, 6 min 25°C/min → 160°C 160°C, 3 min	Aceton 1,7 min 2-Propanol 2,2 min <i>n</i> -Butanol 5,6 min Methylacetoacetat 9,9 min Methylhydroxybutyrat 10,5 min
	50°C, 5 min 40°C/min → 160°C 160°C, 9 min	Aceton 2,0 min 2-Propanol 3,2 min <i>n</i> -Butanol 6,9 min 2,5-Hexandion 9,9 min 5-Hydroxyhexan-2-on 11,2 min Hexandiol 14,9 min
	50°C, 4 min 40°C/min → 100°C 100°C, 4 min	Aceton 2,0 min Butanon 2,8 min 2-Propanol 3,2 min 2-Butanol 4,8 min <i>n</i> -Butanol 6,3 min
	50°C, 5 min 40°C/min → 160°C 160°C, 9 min	Aceton 2,0 min 2-Propanol 3,2 min <i>n</i> -Butanol 6,9 min 1-Phenyl-2-Propanon 10,2 min 1-Phenyl-2-Propanol 10,9 min

Die Bestimmung der Enantiomerenreinheit von Methylhydroxybutyrat und 2,5-Hexandiol erfolgte nach den von I. Tan und J. Haberland entwickelten Methoden (Tan, 2006; Haberland, 2003).

Die Enantiomerenreinheit von (*R*)- und (*S*)-3-Methylhydroxybutyrat wurde mit einem Agilent HP-6890 A-Gaschromatografen mit einer Lipodex E-Säule (25 m x 0,25 mm i. D.) durchgeführt. Die Betriebsparameter des Gaschromatografen sind in Tabelle 8.7 aufgeführt.

Tabelle 8.7: Allgemeine GC-Parameter für die *ee*-Bestimmung von MHB

Trägergas	Wasserstoff
Detektor	Flammenionisationsdetektor
Säulenvordruck	0,6 bar
Injektionsvolumen	1 μL

Der Ofen wurde auf 75°C geheizt und über einen Zeitraum von 25 Minuten konstant gehalten. Typische Retentionszeiten waren (*S*)-MHB 8,6 Minuten, (*R*)-MHB 10,8 Minuten und MAA 17,5 Minuten.

Die Enantiomerenreinheit und Diastereomerenreinheit von (*2R,5R*)- und (*2S,5S*)-Hexandiol wurden mit einem Agilent HP-6890 A-Gaschromatografen mit einer CP-Chirasil-Dex CB-Säule (25 m x 0,32 mm i. D.) durchgeführt. Die Betriebsparameter des Gaschromatografen sind in Tabelle 8.8 aufgeführt.

Tabelle 8.8: Allgemeine GC-Parameter für die *ee*- und *de*-Bestimmung von 2,5-Hexandiol

Trägergas	Wasserstoff
Detektor	Flammenionisationsdetektor
Säulenvordruck	1 bar
Injektionsvolumen	1 μL

Der Ofen wurde auf 55°C geheizt und über einen Zeitraum von 20 Minuten konstant gehalten. Typische Retentionszeiten waren (*2S,5S*)-Hexandiol 10,5 Minuten und (*2R,5R*)-Hexandiol 10,5 Minuten. Vor dem GC-Lauf wurden die Analyten wie folgt derivatisiert: Das kristalline Hexandiol wurde in 600 μL Chloroform gelöst, mit 100 μL Trifluoressigsäureanhydrid versetzt und 15 Minuten auf 60°C erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel abdestilliert. Die Probe wurde nach erneuter Aufnahme in Chloroform analysiert.

8.5.2 Flüssigchromatografie mit Tandem-Massenspektrometrie

Die Quantifizierung der intrazellulären Cofaktorkonzentrationen wurde mit dem API 4000 LC-MS/MS-System (AB/MDS Sciex, Applied Biosciences) durchgeführt. Die Betriebsparameter sind in Tabelle 8.9 gezeigt. Das Gradientenprofil für die LC-Trennung ist in Tabelle 8.10 dargestellt.

Tabelle 8.9: Parameter LC-MS/MS

LC	Agilent 1200 Series Säule: Phenomenex Synergi Hydro RP Laufmittel A: 15 mmol/L Tributylamin, 10 mmol/L Essigsäure Laufmittel B: Methanol Injektionsvolumen: 10 μ L Temperatur: 22°C Fluss: 0,2 mL/min
MS/MS	Applied Biosystems API 4000 Modus: Multiple Reaction Monitoring Ionisierung: Electro spray ionization (ESI) ESI-Quellspannung: -2 bis -4 kV Polarität: negativ Fragmentierung: LINAC collision cell Vakuum: $0,9 \times 10^{-5}$ torr

Tabelle 8.10: Gradientenprofil für LC-Trennung

Zeit (min)	Fließrate (μ L/min)	A (%)	B (%)
5	200	80	20
10	200	68	32
15	200	65	35
20	200	40	60
25	200	10	90
40	200	0	100

8.5.3 Fotometrie

Die Bestimmung der katalytischen Aktivität der isolierten *LbADH* erfolgte fotometrisch (Spektrofotometer UV-1601, Shimadzu). Es wurde die zeitliche Änderung der NADH- bzw. NADPH-Konzentration über das Lambert-Beer'sche Gesetz anhand der Extinktionsänderung bei 340 nm bestimmt. Der molare Extinktionskoeffizient für NADH und NADPH beträgt $\varepsilon = 6220 \text{ cm}^2 \text{ mmol}^{-1}$.

8.6 Biotransformationen

8.6.1 Ganzzellbiotransformationen

8.6.1.1 Probenahme

200 μL der Reaktionslösung wurden aus dem Biotransformationsansatz entnommen und bei 16000 rpm für 30 s zentrifugiert (Zentrifuge 5415 D, Eppendorf) um die Biomasse abzutrennen. Um eine weitere Reaktion durch freies Enzym zu verhindern, wurde der Überstand in ein zweites Eppendorfreaktionsgefäß gegeben und 60 s bei 99°C inkubiert (ThermoStat plus, Eppendorf). Die Probe wurde nach Abkühlen auf Eis für die Analytik per Gaschromatografie verwendet.

8.6.1.2 Kontinuierliche Biotransformationen

Die kontinuierlichen Biotransformationsprozesse wurden im Maßstab von 50 bis 200 mL durchgeführt. Für die Zellrückhaltung wurde eine Omega Ultrafiltrationsmembran (Pall) mit einem molekularen cut-off von 10 kDa verwendet. Eine ausreichende Durchmischung der Reaktionslösung wurde durch Umwälzung mit einer Schlauchpumpe (505 U, Watson-Marlow) erreicht. Die Zugabe von Substratlösung erfolgte mit variierenden Flussraten über eine Kolbenpumpe (P500, Pharmacia).

8.6.1.3 Biotransformationen in Satzreaktoren

Die Ganzzell-Biotransformationsprozesse im Satzreaktor-Verfahren wurden, je nach Maßstab, entweder in Eppendorfreaktionsgefäßen in einem Schüttelinkubator (ThermoStat plus, Eppendorf) oder in ummantelten Glasgefäßen, die über ein Wasserbad (M3, Lauda) temperiert wurden, durchgeführt.

8.6.1.4 Strippen

Die Biotransformationsprozesse mit Acetonabtrennung durch Strippen wurden im 50 mL-Maßstab in einem Glasreaktionsgefäß mit einer porösen Glasfritte durchgeführt (Glaswerkstatt des Forschungszentrum Jülich). Die Begasung der Reaktionslösung erfolgte vom Boden durch die poröse Glasfritte mit einem Luftstrom von 1 L/min Druckluft. Die Fließrate des Luftstroms wurde durch ein Rotameter (Sho-rate, Brooks Instruments) bestimmt. Um ein Austragen von 2-Propanol aus dem Reaktionsgemisch zu verhindern, wurde der Luftstrom zuvor durch ein Gemisch aus 2-Propanol und Wasser (50%v/v) geleitet. Zur Verringerung der Schaumbildung wurde ein Tropfen Antischaum (Biospumex 153K, Cognis GmbH) zur Reaktionslösung gegeben.

8.6.1.5 Pervaporation

Die Biotransformationsprozesse mit Acetonabtrennung durch Pervaporation wurden in einer Umkehrosmose-Anlage (P-28, cmcelfa) im Maßstab von 160 mL durchgeführt. Der Boden des Reaktionsraums liefert eine Fläche von 44,2 cm², über die durch die Pervaporationsmembran die Acetonabtrennung stattfinden konnte. Eine ausreichende Durchmischung der Reaktionslösung wurde durch Umwälzung mit einer Schlauchpumpe (505 U, Watson-Marlow) erreicht. Während des Biotransformationsprozesses wurde ein Vakuum von 15 mbar erzeugt (Membranpumpe MZ 2C, Vacuubrand).

Tabelle 8.11: Verwendete Pervaporationsmembranen

Name	Hersteller	Material
PolyAN	PolyAN GmbH	Polydimethylsiloxan
PolyAN funktionalisiert	PolyAN GmbH	Polyacrylnitril Funktionspolymer
Pervap 4060	Sulzer Chemtec GmbH	Polydimethylsiloxan
CMX-GF-010-D	cm-celfa	Polysiloxan

8.6.1.6 2-Phasensysteme

Die Biotransformationsexperimente in zweiphasigen Systemen wurden im 10 mL-Maßstab durchgeführt. Rekombinante *E. coli*-Zellen, 1-Phenyl-2-Propanon und 2-Propanol wurden mit 50 mmol/L KP_i-Puffer, pH 6,0, zu einem Volumen von 5 mL aufgefüllt. Anschließend wurden 5 mL der nicht-wässrigen Phase zugegeben. Die Biotransformation erfolgte unter Raum-Temperatur.

8.6.2 Isolierte Enzyme

Die Batch-Biotransformationsprozesse für die Validierung des kinetischen Modells für *LbADH* wurden im 1 mL-Maßstab in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei 30°C im Schüttelinkubator durchgeführt (ThermoStat plus, Eppendorf). Die Konzentrationen der Biotransformation-Reaktanden wurden mittels Gaschromatografie bestimmt. Dazu wurden 50 µL der Reaktionslösung aus dem Reaktionsgefäß entnommen und 60s lang bei 99°C erhitzt (ThermoStat plus, Eppendorf) um das Enzym zu deaktivieren. Nach dem Abkühlen wurden 20 µL der Reaktionslösung mit 80 µL zweifach destilliertem Wasser verdünnt und zusammen mit 100 µL des internen Standards (50 mmol/L *n*-Butanol) in ein Analytikvial gegeben.

8.7 Produktaufarbeitung

8.7.1 Methylhydroxybutyrat

Die Aufarbeitung von Methylhydroxybutyrat erfolgte durch kontinuierliche Extraktion (über Nacht) mit Ethylacetat. Aus der resultierenden organischen Phase wurde das Lösungsmittel sowie Aceton und 2-Propanol durch Vakuum-Destillation (Rotationsverdampfer Rotavapour R-114 und Vakuumpumpe Vac V-513, Büchi Labortechnik) bei 30 mbar und 40°C entfernt. Die verbliebenen Komponenten wurden durch mehrere Destillations-schritte unter leichtem Vakuum von 100 mbar voneinander getrennt.

8.7.2 2,5-Hexandiol

Die Aufarbeitung von 2,5-Hexandiol begann ebenfalls mit einer kontinuierlichen Extraktion in Ethylacetat. Aus der resultierenden organischen Phase wurde das Lösungsmittel sowie Aceton und 2-Propanol durch Vakuum-Destillation (Rotationsverdampfer Rotavapour R-114 und Vakuumpumpe Vac V-513, Büchi Labortechnik) bei 30 mbar und 40°C entfernt. Die verbliebenen Komponenten wurden über eine Kieselgel 60-Säule (118 g Kieselgel in 250 mL-Säule, Füllhöhe 35 cm) mit Ethylacetat als Laufmittel getrennt.

Literaturverzeichnis

- Amidjojo M, Weuster-Botz D** (2005) Asymmetric synthesis of the chiral synthon ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate using *Lactobacillus kefir*. *Tetrahedron Asymmetry* **16**(4):899–901
- Bernofsky C, Swan M** (1973) Improved Cycling Assay for Nicotinamide Adenine Dinucleotide. *Analytical biochemistry* **53**(2):452–458
- Bertau M, Burli M** (2000) Enantioselective microbial reduction with baker's yeast on an industrial scale. *Chimia* **54**(9):503–507
- Bisswanger H** (2000) *Enzymkinetik. Theorie und Methoden*, Wiley-VCH, 3. Aufl.
- Bommarius AS, Schwarm M, Stingl K, Kottenhahn M, Huthmacher K, Drauz K** (1995) Synthesis and the Use of Enantiomerically Pure *tert*-Leucine. *Tetrahedron Asymmetry* **6**:2851–2888
- Breuer M, Ditrich K, Habicher T, Hauer B, Kessler M, Stürmer R, Zelin-ski T** (2004) Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angewandte Chemie International Edition* **43**(7):788–824
- Buchholz S, Gröger H** (2006) *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries*, Kap. Enantioselective Biocatalytic Reduction of Ketones for the Synthesis of Optically Active Alcohols, S. 757–790, Taylor and Francis, New York
- Buque-Taboada EM, Straathof AJJ, Heijnen JJ, van der Wielen LAM** (2006) In situ product recovery (ISPR) by crystallization: basic principles, design, and potential applications in whole-cell biocatalysis. *Applied Microbiology and Biotechnology* **71**(1):1–12
- 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 and Microbial Technology* **31**(5):665–672

- Chmiel H** (2005) Bioprozesstechnik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 2. Aufl.
- Corey EJ** (1987) A stable and easily prepared catalyst for the enantioselective reduction of ketones - applications to multistep syntheses. *Journal of the American Chemical Society* **109**(25):7925–7926
- Csuk R** (1991) Baker's yeast mediated transformations in organic chemistry. *Chemical Reviews* **91**:49–97
- van Dam JC, Eman MR, Frank J, Lange HC, van Dedem GWK, Heijnen SJ** (2002) Analysis of glycolytic intermediates in *Saccharomyces cerevisiae* using anion exchange chromatography and electrospray ionization with tandem mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta* **460**(2):209–218
- Daußmann T, Rosen TC, Dünkemann P** (2006) Oxidoreductases and hydroxynitrilase lyases: Complementary enzymatic technologies for chiral alcohols. *Engineering in Life Sciences* **6**(2):125–129
- Dellweg H, Schmid RD, Trommer WE** (1992) Roempp Lexikon Biotechnologie, Thieme Verlag, Stuttgart
- Eckstein M, Villela M, Liese A, Kragl U** (2004) Use of an ionic liquid in a two-phase system to improve an alcohol dehydrogenase catalysed reduction. *Chemical Communications* (9):1084–1085
- Ernst M, Kaup B, Müller M, Bringer-Meyer S, Sahn H** (2005) Enantioselective reduction of carbonyl compounds by whole-cell biotransformation, combining a formate dehydrogenase and a (*R*)-specific alcohol dehydrogenase. *Applied Microbiology and Biotechnology* **66**(6):629–634
- Faber K** (2004) Biotransformations in Organic Chemistry, Springer, Berlin, 5. Aufl.
- Findrik Z, Vasic-Racki D, Lütz S, Daußmann T, Wandrey C** (2005) Kinetic modeling of acetophenone reduction catalyzed by alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobacter sp.* *Biotechnology Letters* **27**(15):1087–1095
- Frost, Sullivan** (2003) Developments in Global Chiral Technology Markets **B105-39**
- Galkin A, Kulakova L, Tishkov V, Esaki N, Soda K** (1995) Cloning of formate dehydrogenase gene from a methanol-utilizing bacterium *Mycobacterium vaccae* N10. *Applied Microbiology and Biotechnology* **44**(3-4):479–483

- Gelpke AES, Kooijman H, Spek AL, Hiemstra H** (1999) Synthesis of the Dibenzofuran-Based Diphosphine Ligand BIFAP and its Water-Soluble Derivative BIFAPS and Their Use in Ruthenium-Catalyzed Asymmetric Hydrogenation. *Chemical European Journal* **5**:2472–2482
- Goldberg K, Edegger K, Kroutil W, Liese A** (2006) Overcoming the thermodynamic limitation in asymmetric hydrogen transfer reactions catalyzed by whole cells. *Biotechnology and Bioengineering* **95**(1):192–198
- Goldberg K, Schroer K, Lütz S, Liese A** (2007a) Biocatalytic ketone reduction - a powerful tool for the production of chiral alcohols, part I: processes with isolated enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**(2):237–248
- Goldberg K, Schroer K, Lütz S, Liese A** (2007b) Biocatalytic ketone reduction - a powerful tool for the production of chiral alcohols, part II: whole cell reductions. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**(2):249–255
- Gröger H, Chamouleau F, Orogas 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. *Angewandte Chemie International Edition* **45**(34):5677–5681
- Haberland J** (2003) Verfahrensentwicklung zur Darstellung von (2*R*,5*R*)-Hexandiol mit *Lactobacillus kefir* DSM20587, Doktorarbeit Universität Bonn
- Haberland J, Hummel W, Daußmann T, Liese A** (2002) New continuous production process for enantiopure (2*R*,5*R*)-hexanediol. *Organic Process Research Development* **6**(4):458–462
- Hanahan D** (1983) Studies on Transformation of *Escherichia-Coli* with Plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**(4):557–580
- Hennemann J** (2007) persönliche Mitteilung
- Heuser F, Schroer K, Lütz S, Bringer-Meyer S, Sahm H** (2007) Enhancement of the NAD(P)(H) Pool in *Escherichia coli* for Biotransformation. *Engineering in Life Sciences* **7**(4):1–12
- Hirau A** (1981) Asymmetric Reduction of Aromatic Ketones with Chiral Alkoxy-Amine-Borane Complexes. *Journal of the Chemical Society Chemical Communications* (7):315–317

- Hogan MC, Woodley JM** (2000) Modelling of two enzyme reactions in a linked cofactor recycle system for chiral lactone synthesis. *Chemical Engineering Science* **55**:2001–2008
- Honda K, Ishige T, Kataoka M, Shimizu S** (2006) *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries*, Kap. Microbial and Enzymatic Processes for the Production of Chiral Compounds, S. 529–546, Taylor and Francis, New York
- Hummel W** (1997) New Alcohol Dehydrogenases for the Synthesis of Chiral Compounds. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology* **58**:145–184
- Hummel W, Kula MR** (1989) Dehydrogenases for the Synthesis of Chiral Compounds. *European Journal of Biochemistry* **184**(1):1–13
- Johnson SL, Tuazon PT** (1977) Acid-Catalyzed Hydration of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide and its Analogues. *Analytical Biochemistry* **53**:1175–1183
- Kataoka M, Yamamoto K, Kawabata H, Wada M, Kita K, Yanase H, Shimizu S** (1999) Stereoselective reduction of ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate by *Escherichia coli* transformant cells coexpressing the aldehyde reductase and glucose dehydrogenase genes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**(4):486–490
- Kizaki N, Yasohara Y, Hasegawa J, Wada M, Kataoka M, Shimizu S** (2001) Synthesis of optically pure ethyl (*S*)-4-chloro-3-hydroxybutanoate by *Escherichia coli* transformant cells coexpressing the carbonyl reductase and glucose dehydrogenase genes. *Applied microbiology and biotechnology* **55**(5):590–595
- Kruse W, Hummel W, Kragl U** (1996) Alcohol-dehydrogenase-catalyzed production of chiral hydrophobic alcohols. A new approach leading to a nearly waste-free process. *Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays Bas Journal of the Royal Netherlands Chemical Society* **115**(4):239–243
- Laercio R, Fernandes JCB, de Oliveira Neto G, Kubota LT, Katekawa E, Serrano SHP** (1998) Study of NADH Stability Using Ultraviolet-Visible Spectrophotometric Analysis and Factorial Design. *Analytical Biochemistry* **260**:50–55
- Liese A, Seelbach K, Wandrey C** (2005) *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim, 2. Aufl.
- Liese A, Zelinski T, Kula MR, Kierkels H, Karutz M, Kragl U, Wandrey C** (1998) A novel reactor concept for the enzymatic reduction of poorly soluble ketones. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic* **4**(1-2):91–99

- Lilius EM, Multanen VM, Toivonen V** (1979) Quantitative Extraction and Estimation of Intracellular Nicotinamide Nucleotides of *Escherichia coli*. Analytical Biochemistry **99**(1):22–27
- Lütz S** (2006) The Handbook of Homogeneous Hydrogenation, Bd. 3, Kap. Transition Metal Catalyzed Regeneration of Nicotineamide Cofactors, S. 1471–1482, Wiley-VCH, Weinheim
- Lütz S** (2007) persönliche Mitteilung
- Lütz S, Rao N, Wandrey C** (2005) Membranen in der Biotechnologie. Chemie Ingenieur Technik **77**(11):1669–1682
- Luo B, Groenke K, Takors R, Wandrey C, Oldiges M** (2007) Simultaneous determination of multiple intracellular metabolites in glycolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle by liquid chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A **1147**(2):153–164
- Lye GJ, Woodley JM** (1999) Application of in situ product-removal techniques to biocatalytic processes. Trends in Biotechnology **17**(10):395–402
- Mailinger W, Baumeister A, Reuss M, Rizzi M** (1998) Rapid and highly automated determination of adenine and pyridine nucleotides in extracts of *Saccharomyces cerevisiae* using a micro robotic sample preparation HPLC system. Journal of Biotechnology **63**(2):155–166
- Mertens R, Greiner L, van den Ban ECD, Haaker HBCM, Liese A** (2003) Practical applications of hydrogenase I from *Pyrococcus furiosus* for NADPH generation and regeneration. Journal of molecular catalysis B Enzymatic **24-5**:39–52
- Meyer HP, Kiener A, Imwinkelried R, Shaw N** (1997) Biotransformations for Fine Chemical Production. Chimia **51**:287–289
- Miller JH** (1972) Cold Spring Harbor Laboratory, Kap. Experiments in Molecular Genetics, S. 352–355, Cold Spring Harbor, New York
- Muttzall K** (1993) Einführung in die Fermentationstechnik, Behrs Verlag, Hamburg
- Nakamura K, Matsuda T** (2002) Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, Bd. 3, Kap. Reduction of Ketones, S. 991–1047, Wiley-VCH, Weinheim

- 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 Microbiology Technology* **28**:632–636
- Neuberg C, Hirsch J** (1921) Über ein Kohlenstoffketten knüpfendes Ferment. *Biochemische Zeitung* **115**:282–310
- Oldiges M, Lütz S, Pflug S, Schroer K, Stein N, Wiendahl C** (2007) Metabolomics: Current State and Evolving Methodologies and Tools. *Applied Microbiology Biotechnology* S. Doi: 10.1007/s00253-007-1029-2
- Park JB, Bühler B, Habicher T, Hauer B, Panke S, Witholt B, Schmid A** (2006) The Efficiency of Recombinant *Escherichia coli* as Biocatalyst for Stereospecific Epoxidation. *Biotechnology and Bioengineering* **95**(3):501–512
- Park JB, Bühler B, Panke S, Witholt B, Schmid A** (2007) Carbon Metabolism and Product Inhibition Determine the Epoxidation Efficiency of Solvent Tolerant *Pseudomonas* sp. Strain VLB120ΔC. *Biotechnology and Bioengineering* S. DOI 10.1002/bit.21496
- Patel RN, McNamee CG, Banerjee A, Howell JM, Robinson RS, Szarka LJ** (1992) Stereoselective Reduction of β -Keto Esters by *Geotrichum candidum*. *Enzyme Microbiology Technology* **14**:731–738
- Peters J, Minuth T, Kula MR** (1993) A Novel NADH-Dependent Carbonyl Reductase with an Extremely Broad Substrate Range from *Candida parapsilosis* - Purification and Characterization. *Enzyme and Microbial Technology* **15**(11):950–958
- Peterson DH, Murray HC, Epstein SH, Reineke LM, Weintraub A, Meister PD, Leight HM** (1952) Microbial Oxygenation of Steroids. I. Introduction of Oxygen at Carbon-11 of Progesteron). *Journal of the American Chemical Society* **74**:5933–5936
- Pfruender H, Amidjojo M, Kragl U, Weuster-Botz D** (2004) Efficient whole-cell biotransformation in a biphasic ionic liquid/water system. *Angewandte Chemie International Edition* **43**(34):4529–4531
- Reichstein T, Grüssner H** (1934) Eine ergiebige Synthese der L-Ascorbinsäure (C-Vitamin). *Helvetica Chimia Acta* **17**:311–328
- Rissom S** (1999) Membranverfahren für Redoxenzyme: Gasversorgung - Reaktion - Produktextraktion, Doktorarbeit Universität Bonn

- Rodriguez S, Kayser M, Stewart JD** (1999) Improving the stereoselectivity of bakers' yeast reductions by genetic engineering. *Organic Letters* **1**(8):1153–1155
- Rodriguez S, Kayser MM, Stewart JD** (2001) Highly stereoselective reagents for beta-keto ester reductions by genetic engineering of baker's yeast. *Journal of the American Chemical Society* **123**(8):1547–1555
- Rosen TC, Daußmann T, Stohrer J** (2004) Bioreduction forms optically active 3-hydroxyesters. *Specialty Chemicals Magazine* S. 39–40
- Schöfer SH, Kaftzik N, Kragl U, Wasserscheid P** (2001) Enzyme Catalysis in Ionic Liquids: Lipase Catalysed Kinetic Resolution of 1-Phenylethanol with Improved Enantioselectivity. *Chemical Communications* S. 425–426
- Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B** (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **409**(6817):258–268
- Schmidt E, Ghisalba O, Gygax D, Sedelmeier G** (1992) Optimization of a Process for the Production of (*R*)-2-Hydroxy-4-Phenylbutyric Acid - an Intermediate for Inhibitors of Angiotensin Converting Enzyme. *Journal of Biotechnology* **24**(3):315–327
- Schroer K, Mackfeld U, Tan AWI, Wandrey C, Heuser F, Bringer-Meyer S, Weckbecker A, Hummel W, Daußmann T, Pfaller R, Liese A, Lütz S** (2007) Continuous Asymmetric Ketone Reduction Processes with Recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* S. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2007.08.003
- Schumacher J, Eckstein M, Kragl U** (2006) Influence of water-miscible organic solvents on kinetics and enantioselectivity of the (*R*)-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*. *Biotechnology Journal* **1**:1–8
- Seelbach K, Riebel B, Hummel W, Kula MR, Tishkov VI, Egorov AM, Wandrey C, Kragl U** (1996) A novel, efficient regenerating method of NADPH using a new formate dehydrogenase. *Tetrahedron Letters* **37**(9):1377–1380
- Shaked Z, Whitesides GM** (1980) Enzyme-Catalyzed Organic Synthesis: NADH Regeneration by Using Formate Dehydrogenase. *Journal of the American Chemical Society* **102**:7104–7105
- Stark D, von Stockar U** (2003) In Situ Product Removal (ISPR) in Whole Cell Biotechnology During the Last Twenty Years. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology* **80**:150–175

- Stillger T, Bönitz M, Villela M, Liese A** (2002) Overcoming thermodynamic limitations in substrate-coupled cofactor regeneration processes. *Chemie Ingenieur Technik* **74**(7):1035–1039
- von Stockar U, Maskow T, Liu JS, Marison IW, Patino R** (2006) Thermodynamics of microbial growth and metabolism: An analysis of the current situation. *Journal of Biotechnology* **121**(4):517–533
- Tacha E** (2007) Biologische Beurteilung rekombinanter *Escherichia coli* bei Ganzzellbiotransformations-Prozessen mit *in situ*-Acetonabtrennung durch Pervaporation, Diplomarbeit Fachhochschule Wiener Neustadt für Wirtschaft und Technik, Österreich
- Takors R** (2004) Whole cell ISPR process development: Chances and pitfalls. *Chemie Ingenieur Technik* **76**(12):1807–1814
- Tan AWI** (2006) Applications of Whole Cell Biotransformations for the Production of Chiral Alcohols, Doktorarbeit Universität Bonn
- Tan AWI, Fischbach M, Huebner H, Buchholz R, Hummel W, Daußmann T, Wandrey C, Liese A** (2006) Synthesis of Enantiopure (5*R*)-Hydroxyhexane-2-one with Immobilized Whole Cells of *Lactobacillus kefir*. *Applied Microbiology Biotechnology* **71**:289–293
- Tao JH, McGee K** (2002) Development of a continuous enzymatic process for the preparation of (*R*)-3-(4-fluorophenyl)-2-hydroxy propionic acid. *Organic Process Research Development* **6**(4):520–524
- Tishkov VI, Galkin AG, Fedorchuk VV, Savitsky PA, Rojkova AM, Gieren H, Kula MR** (1999) Pilot scale production and isolation of recombinant NAD(+)- and NADP(+)-specific formate dehydrogenases. *Biotechnology and Bioengineering* **64**(2):187–193
- Vasic-Racki D, Kragl U, Liese A** (2003) Benefits of enzyme kinetics modelling. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* **17**(1):7–18
- Villela M, Stillger T, Müller M, Liese A, Wandrey C** (2003) Is log P a convenient criterion to guide the choice of solvents for biphasic enzymatic reactions? *Angewandte Chemie International Edition* **42**(26):2993–2996
- Walton AZ, Stewart JD** (2004) Understanding and improving NADPH-dependent reactions by nongrowing *Escherichia coli* cells. *Biotechnology Progress* **20**(2):403–411

- Wandrey C** (2004) Biochemical reaction engineering for redox reactions. *Chemical Record* **4**(4):254–265
- Weckbecker A, Hummel W** (2004) Glucose Dehydrogenase for the regeneration of NADH and NADPH. In Barredo JL ed *Microbial Enzymes and Biotransformations Methods in Biotechnology* **17**:241–253
- Weisser P, Kramer R, Sahm H, Sprenger GA** (1995) Functional Expression of the Glucose-Transporter of *Zymomonas mobilis* Leads to Restoration of Glucose and Fructose Uptake in *Escherichia coli* Mutants and Provides Evidence for Its Facilitator Action. *Journal of Bacteriology* **177**(11):3351–3354
- Wichmann R, Vasic-Racki D** (2005) Cofactor regeneration at the lab scale. *Technology Transfer in Biotechnology From Lab to Industry to Production* **92**:225–260
- Wolfson A, Geresh S, Landau MV, Herskowitz M** (2001) Enantioselective Hydrogenation of Methyl Acetoacetate Catalyzed by Nickel Supported on Activated Carbon or Graphit. *Applied Catalysis A General* **208**:91–98
- Wu JT, Wu LH, Knight JA** (1986) Stability of Nadph - Effect of Various Factors on the Kinetics of Degradation. *Clinical Chemistry* **32**(2):314–319
- Wubbolts MG, Terpstra P, Vanbeilen JB, Kingma J, Meesters HAR, Witholt B** (1990) Variation of Cofactor Levels in *Escherichia coli* - Sequence-Analysis and Expression of the Pncb Gene Encoding Nicotinic-Acid Phosphoribosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* **265**(29):17665–17672
- Zelinski T, Liese A, Wandrey C, Kula MR** (1999) Asymmetric reductions in aqueous media: enzymatic synthesis in cyclodextrin containing buffers. *Tetrahedron Asymmetry* **10**(9):1681–1687

Anhang A

Bestimmung der kinetischen Parameter für isolierte *Lb*ADH

A.1 NAD-System



$$v_{1,1} = v_{max1,1} \cdot \frac{c_{MAA} \cdot c_{NADH}}{\left(k_m^{MAA} \cdot \left(1 + \frac{c_{MHB}}{k_{pi}^{MHB}}\right) + c_{MAA}\right) \cdot (k_{m1}^{NADH} + c_{NADH})} \quad (\text{A.1})$$

$$v_{max1,1} = 6,5234 \pm 0,3556 \text{ U/mg}$$

$$k_m^{MAA} = 48,999 \pm 11,611 \text{ mmol/L}$$

$$k_{m1}^{NADH} = 2,224 \pm 0,3015 \text{ mmol/L}$$

$$k_{pi}^{MHB} = 184,35 \pm 5,02 \text{ mmol/L}$$



$$v_{2,1} = v_{max2,1} \cdot \frac{c_{MHB} \cdot c_{NAD}}{\left(k_m^{MHB} \cdot \left(1 + \frac{c_{MAA}}{k_{pi}^{MAA}}\right) + c_{MHB}\right) \cdot (k_{m1}^{NAD} + c_{NAD})} \quad (\text{A.2})$$

$$v_{max2,1} = 0,0131 \pm 0,0004 \text{ U/mg}$$

$$k_m^{MHB} = 125,42 \pm 21,99 \text{ mmol/L}$$

$$k_{m1}^{NAD} = 0,3822 \pm 0,1095 \text{ mmol/L}$$

$$k_{pi}^{MAA} = 2,9086 \pm 0,6135 \text{ mmol/L}$$



$$v_{3,1} = v_{max3,1} \cdot \frac{C_{Ace} \cdot C_{NADH}}{\left(k_m^{Ace} \cdot \left(1 + \frac{C_{Prop}}{k_{pi}^{Prop}} \right) + C_{Ace} \right) \cdot (k_{m2}^{NADH} + C_{NADH})} \quad (\text{A.3})$$

$$v_{max3,1} = 1,7336 \pm 0,0290 \text{ U/mg}$$

$$k_m^{Ace} = 13,951 \pm 3,084 \text{ mmol/L}$$

$$k_{m2}^{NADH} = 1,1803 \pm 0,1080 \text{ mmol/L}$$

$$k_{pi}^{Prop} = 4,2560 \pm 0,8912 \text{ mmol/L}$$



$$v_{4,1} = v_{max4,1} \cdot \frac{C_{Prop} \cdot C_{NAD}}{\left(k_m^{Prop} \cdot \left(1 + \frac{C_{Ace}}{k_{pi}^{Ace}} \right) + C_{Prop} \cdot \left(1 + \frac{C_{Prop}}{k_{si}^{Prop}} \right) \right) \cdot \left(k_{m2}^{NAD} \cdot \left(1 + \frac{C_{NADH}}{k_{pi}^{NADH}} \right) + C_{NAD} \right)} \quad (\text{A.4})$$

$$v_{max4,1} = 0,5849 \pm 0,0988 \text{ U/mg}$$

$$k_m^{Prop} = 206,78 \pm 65,29 \text{ mmol/L}$$

$$k_{m2}^{NAD} = 0,3502 \pm 0,0136 \text{ mmol/L}$$

$$k_{pi}^{Ace} = 4,2463 \pm 0,4811 \text{ mmol/L}$$

$$k_{pi}^{NADH} = 0,1683 \pm 0,0339 \text{ mmol/L}$$

$$k_{si}^{Prop} = 2777,9 \pm 563,0 \text{ mmol/L}$$

A.2 NADP-System



$$v_{1,2} = v_{max1,2} \cdot \frac{C_{MAA} \cdot C_{NADPH}}{\left(k_m^{MAA} + C_{MAA} \cdot \left(1 + \frac{C_{MAA}}{k_{si}^{MAA}} \right) \right) \cdot \left(k_{m1}^{NADPH} \cdot \left(1 + \frac{C_{NADP}}{k_{pi1}^{NADP}} \right) + C_{NADPH} \right)} \quad (\text{A.5})$$

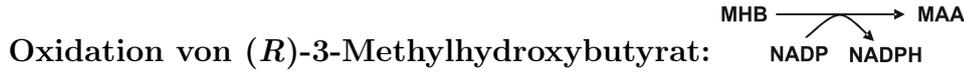
$$v_{max1,2} = 0,9092 \pm 0,0673 \text{ U/mg}$$

$$k_m^{MAA} = 0,2633 \pm 0,0259 \text{ mmol/L}$$

$$k_{m1}^{NADPH} = 1,1511 \cdot 10^{-3} \pm 0,1954 \cdot 10^{-3} \text{ mmol/L}$$

$$k_{si}^{MAA} = 74,299 \pm 6,726 \text{ mmol/L}$$

$$k_{pi1}^{NADP} = 0,0280 \pm 0,0087 \text{ mmol/L}$$



$$v_{2,2} = v_{max2,2} \cdot \frac{c_{MHB} \cdot c_{NADP}}{\left(k_m^{MHB} \cdot \left(1 + \frac{c_{MAA}}{k_{pi}^{MAA}} \right) + c_{MHB} \cdot \left(1 + \frac{c_{MHB}}{k_{si}^{MHB}} \right) \right) \cdot \left(k_{m1}^{NADP} \cdot \left(1 + \frac{c_{NADPH}}{k_{pi}^{NADPH}} \right) + c_{NADP} \right)} \quad (\text{A.6})$$

$$v_{max2,2} = 0,2271 \pm 0,0612 \text{ U/mg}$$

$$k_m^{MHB} = 48,758 \pm 3,936 \text{ mmol/L}$$

$$k_{m1}^{NADP} = 0,0320 \pm 0,0042 \text{ mmol/L}$$

$$k_{pi}^{MAA} = 2,251 \cdot 10^{-3} \pm 0,631 \cdot 10^{-3} \text{ mmol/L}$$

$$k_{pi}^{NADPH} = 7,977 \cdot 10^{-5} \pm 5,595 \cdot 10^{-5} \text{ mmol/L}$$

$$k_{si}^{MHB} = 25,486 \pm 1,529 \text{ mmol/L}$$



$$v_{3,2} = v_{max3,2} \cdot \frac{c_{Ace} \cdot c_{NADPH}}{\left(k_m^{Ace} \cdot \left(1 + \frac{c_{Prop}}{k_{pi}^{Prop}} \right) + c_{Ace} \cdot \left(1 + \frac{c_{Ace}}{k_{si}^{Ace}} \right) \right) \cdot \left(k_{m2}^{NADPH} \cdot \left(1 + \frac{c_{NADP}}{k_{pi2}^{NADP}} \right) + c_{NADPH} \right)} \quad (\text{A.7})$$

$$v_{max3,2} = 1,2898 \pm 0,1466 \text{ U/mg}$$

$$k_m^{Ace} = 0,1349 \pm 0,0097 \text{ mmol/L}$$

$$k_{m2}^{NADPH} = 2,954 \cdot 10^{-3} \pm 0,961 \cdot 10^{-3} \text{ mmol/L}$$

$$k_{pi}^{Prop} = 0,0964 \pm 0,0132 \text{ mmol/L}$$

$$k_{pi2}^{NADP} = 4,2560 \pm 0,8912 \text{ mmol/L}$$

$$k_{si}^{Ace} = 921,92 \pm 67,11 \text{ mmol/L}$$



$$v_{4,2} = v_{max4,2} \cdot \frac{c_{2-Prop} \cdot c_{NADP}}{\left(k_m^{Prop} \cdot \left(1 + \frac{c_{Ace}}{k_{pi}^{Ace}} \right) + c_{Prop} \cdot \left(1 + \frac{c_{Prop}}{k_{si}^{Prop}} \right) \right) \cdot \left(k_{m2}^{NADP} \cdot \left(1 + \frac{c_{NADPH}}{k_{pi2}^{NADPH}} \right) + c_{NADP} \right)} \quad (\text{A.8})$$

$$v_{max4,2} = 0,2214 \pm 0,0834 \text{ U/mg}$$

$$k_m^{Prop} = 1,354 \pm 0,099 \text{ mmol/L}$$

$$k_{m2}^{NADP} = 1,610 \cdot 10^{-3} \pm 0,154 \cdot 10^{-3} \text{ mmol/L}$$

$$k_{pi}^{Ace} = 4,610 \cdot 10^{-3} \pm 0,458 \cdot 10^{-3} \text{ mmol/L}$$

$$k_{pi2}^{NADPH} = 2,398 \cdot 10^{-3} \pm 0,860 \cdot 10^{-3} \text{ mmol/L}$$

$$k_{si}^{Prop} = 3879,7 \pm 455,9 \text{ mmol/L}$$

Anhang B

Modellierung

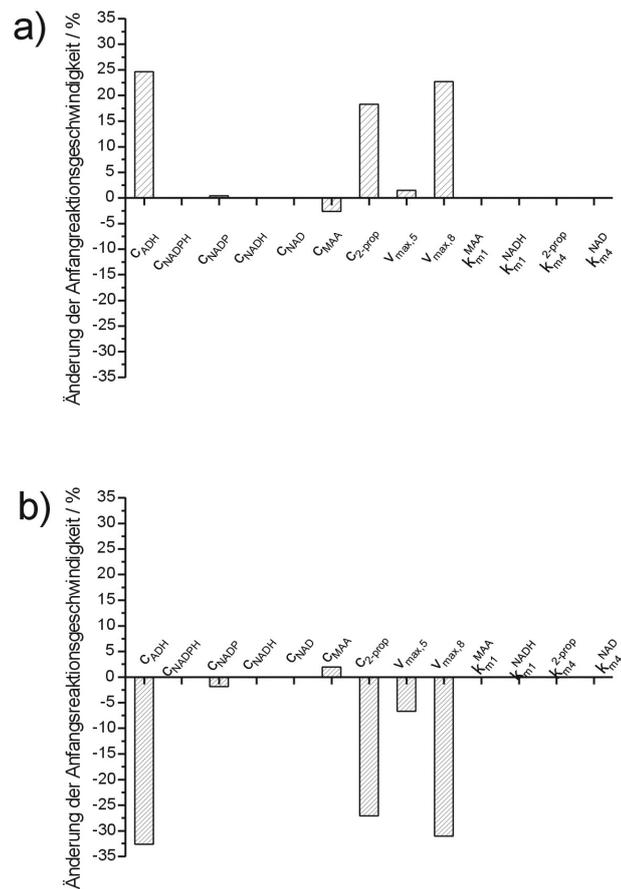


Abbildung B.1: Sensitivitätsanalyse des Modells für die Reduktion von MAA mit rek. *E. coli* (LbADH) im Satzreaktor. Oben: Erhöhung der untersuchten Parameter um 50%. Unten: Verringerung der untersuchten Parameter um 50%.

B.1. REAKTIONEN MIT ISOLIERTER ALKOHOL-DEHYDROGENASE AUS LACTOBACILLUS BREVIS IM SATZREAKTOR

B.1 Reaktionen mit isolierter Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* im Satzreaktor

```
// intracellular cofactor pool
// Batch reduction of MAA, with cofactor NADH and NADPH, and cofactor regeneration by isopropanol

// Variables and parameters

IndVars: t
DepVars: cMAA, cMHB, cAce, cIso, cNADH, cNAD, cNADPH, cNADP, v12, v22, v32, v42, v1, v2, v3, v4
Params: vmax12, km112, km122, kp112, vmax22, km212, kp212, km222, vmax32, km312, kp312, km322, vmax42, km412,
kp412, ks412, km422, kp422, vmax1, km11, ks11, km12, kp12, vmax2, km21, kp21, ks21, km22, kp22, vmax3, km31, kp31,
ks31, km32, kp32, vmax4, km41, kp41, ks41, km42, kp42

//Kinetic equations
v12=km12/km122*vmax12*cMAA*cNADH*cADH/((km112*(1+cMHB/kp112)+cMAA)*(km122+cNADH))
v22=km12/km122*vmax22*cMHB*cNAD*cADH/((km212*(1+cMAA/kp212)+cMHB)*(km222+cNAD))
v32=km12/km122*vmax32*cAce*cNADH*cADH/((km312*(1+cIso/kp312)+cAce)*(km322+cNADH))
v42=km12/km122*vmax42*cIso*cNAD*cADH/((km412*(1+cAce/kp412)+cIso*(1+cIso/ks412))*(km422*(1+cNADH/kp422)+cNAD))
v1=(1-km12/km122)*vmax1*cMAA*cNADPH*cADH/((km11+cMAA*(1+cMAA/ks11))*(km12*(1+cNADP/kp12)+cNADPH))
v2=(1-
km12/km122)*vmax2*cMHB*cNADP*cADH/((km21*(1+cMAA/kp21)+cMHB*(1+cMHB/ks21))*(km22*(1+cNADPH/kp22)+cNAD
P))
v3=(1-
km12/km122)*vmax3*cAce*cNADPH*cADH/((km31*(1+cIso/kp31)+cAce*(1+cAce/ks31))*(km32*(1+cNADP/kp32)+cNADPH))
v4=(1-
km12/km122)*vmax4*cIso*cNADP*cADH/((km41*(1+cAce/kp41)+cIso*(1+cIso/ks41))*(km42*(1+cNADPH/kp42)+cNADP))

//Mass balance equations
cMAA'=-v12+v22-v1+v2
cMHB'=v12-v22+v1-v2
cAce'=-v32+v42-v3+v4
cIso'=v32-v42+v3-v4
cNADH'=-v12+v22-v32+v42
cNAD'=v12-v22+v32-v42
cNADPH'=-v1+v2-v3+v4
cNADP'=v1-v2+v3-v4

//Initial conditions
t=0
cMAA=100
cMHB=0
cIso=200
cAce=0
cNADH=0.00314
cNAD=0.566
cNADPH=0.00059
cNADP=0.0478
cADH=5000

//Parameters
VMAX12=6.5234
KM112=48.999
KM122=2.2024
KP112=184.35
VMAX22=0.01307
KM212=125.42
KP212=2.9086
KM222=0.3822
VMAX32=1.7336
VMAX32=1.7336
KM312=13.951
KP312=4.256
KM322=1.1803
VMAX42=0.5849
KM412=206.78
KP412=4.2463
KS412=2777.9
KM422=0.3502
KP422=0.1683
VMAX1=2.2073
KM11=0.2633
KS11=74.299
KM12=0.001511
KP12=0.028
VMAX2=0.000001274
KM21=48.758
KP21=0.032
KS21=25.476
KM22=0.002251
KP22=0.00007977
VMAX3=0.3438
KM31=0.1349
KP31=0.0964
KS31=921.92
KM32=0.002594
Kp32=4.256
VMAX4=0.5351
KM41=1.354
KP41=0.00461
KS41=3879.7
KM42=0.00161
KP42=0.002398
***
```

B.2 Kontinuierliche Ganzzell-Biotransformationsprozesse

```
// intracellular cofactor pool
// Batch reduction of MAA, with cofactor NADH and NADPH, and cofactor regeneration by isopropanol

// Variables and parameters

IndVars: t
DepVars: cMAA, cMHB, cAce, cIso, cNADH, cNAD, cNADPH, cNADP, v12, v22, v32, v42, v1, v2, v3, v4
Params: vmax12, km112, km122, kp112, vmax22, km212, kp212, km222, vmax32, km312, kp312, km322, vmax42, km412,
kp412, ks412, km422, kp422, vmax1, km11, ks11, km12, kp12, vmax2, km21, kp21, ks21, km22, kp22, vmax3, km31, kp31,
ks31, km32, kp32, vmax4, km41, kp41, ks41, km42, kp42

//Kinetic equations
v12=km12/km122*vmax12*cMAA*cNADH*cADH/((km112*(1+cMHB/kp112)+cMAA)*(km122+cNADH))
v22=km12/km122*vmax22*cMHB*cNAD*cADH/((km212*(1+cMAA/kp212)+cMHB)*(km222+cNAD))
v32=km12/km122*vmax32*cAce*cNADH*cADH/((km312*(1+cIso/kp312)+cAce)*(km322+cNADH))
v42=km12/km122*vmax42*cIso*cNAD*cADH/((km412*(1+cAce/kp412)+cIso*(1+cIso/ks412))*(km422*(1+cNADH/kp422)+c
NAD))
v1=(1-km12/km122)*vmax1*cMAA*cNADPH*cADH/((km11+cMAA*(1+cMAA/ks11))*(km12*(1+cNADP/kp12)+cNADPH))
v2=(1-
km12/km122)*vmax2*cMHB*cNADP*cADH/((km21*(1+cMAA/kp21)+cMHB*(1+cMHB/ks21))*(km22*(1+cNADPH/kp22)+cNAD
P))
v3=(1-
km12/km122)*vmax3*cAce*cNADPH*cADH/((km31*(1+cIso/kp31)+cAce*(1+cAce/ks31))*(km32*(1+cNADP/kp32)+cNADPH))
v4=(1-
km12/km122)*vmax4*cIso*cNADP*cADH/((km41*(1+cAce/kp41)+cIso*(1+cIso/ks41))*(km42*(1+cNADPH/kp42)+cNADP))

//Mass balance equations
cMAA'=(100-cMAA)/tau-v12+v22-v1+v2
cMHB'=(0-cMHB)/tau+v12-v22+v1-v2
cAce'=(0-cAce)/tau-v32+v42-v3+v4
cIso'=(200-cIso)/tau+v32-v42+v3-v4
cNADH'=-v12+v22-v32+v42
cNAD'=-v12-v22+v32-v42
cNADPH'=-v1+v2-v3+v4
cNADP'=-v1-v2+v3-v4

//Initial conditions
t=0
cMAA=100
cMHB=0
cIso=200
cAce=0
cNADH=0.00314
cNAD=0.566
cNADPH=0.00059
cNADP=0.0478
cADH=5000

//residence time
tau=1

//Parameters
VMAX12=6.5234
KM112=48.999
KM122=2.2024
KP112=184.35
VMAX22=0.01307
KM212=125.42
KP212=2.9086
KM222=0.3822
VMAX32=1.7336
VMAX32=1.7336
KM312=13.951
KP312=4.256
KM322=1.1803
VMAX42=0.5849
KM412=206.78
KP412=4.2463
KS412=2777.9
KM422=0.3502
KP422=0.1683
VMAX1=2.2073
KM11=0.2633
KS11=74.299
KM12=0.001511
KP12=0.028
VMAX2=0.00001274
KM21=48.758
KP21=0.032
KS21=25.476
KM22=0.002251
KP22=0.00007977
VMAX3=0.3438
KM31=0.1349
KP31=0.0964
KS31=921.92
KM32=0.002594
Kp32=4.256
VMAX4=0.5351
KM41=1.354
KP41=0.00461
KS41=3879.7
KM42=0.00161
KP42=0.002398
***
```


Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Kirsten Schroer
Anschrift: Wolkensteingasse 66, A-8020 Graz
Geburtstag: 30. März 1979
Geburtsort: Moers
Familienstand: ledig

Ausbildung und Berufstätigkeit:

Schule: 1985 bis 1989 Städt. Gemeindegrundschule Rheim I, Moers
1989 bis 1998 Gymnasium Rheinkamp, Moers
Abschluss: Abitur

Studium: 1998 bis 2004 Studium der Biologie an der RWTH Aachen
Juni 2004 Abschluss als Diplom-Biologin
Thema der Diplomarbeit: „Hochzelldichtekultur mit rekombinanten Hefen unter erhöhten Fermentationsdrücken“

Promotion: August 2004 bis Oktober 2007 Doktorandin am Institut für Biotechnologie 2 in der Forschungszentrum Jülich GmbH

Berufstätigkeit: Seit April 2008 Post-Doc-Tätigkeit in der Angewandte Biokatalyse-Kompetenzzentrum GmbH