

Kontinuierliche Reaktionsführung mit löslichen Enzymen

Herrn Professor Dr. Dr. h.c. Karl Schügerl
zum 65. Geburtstag

Udo Kragl, Durda Vasic-Racki und
Christian Wandrey*

Die Arbeit beschreibt im Überblick die Verwendung von Enzym-Membran-Reaktoren mit erzwungener Konvektion, bei denen lösliche Enzyme in einem kontinuierlich durchflossenen Reaktionsgefäß mit Hilfe einer Ultrafiltrationsmembran zurückgehalten werden. Die Technik ist am Beispiel der L-Aminosäure-Herstellung nach dem Acylase-Verfahren im 200-t/a-Maßstab kommerzialisiert worden. Sie eignet sich besonders für Multienzymsysteme mit Cofaktorregenerierung. Dies ist am Beispiel der L-tert-Leucin-Herstellung aus der korrespondierenden α -Ketosäure im Kilogramm-Maßstab gelungen. An wasserlösliche Polymere gebundene Coenzyme können zusammen mit den Enzymen im Membranreaktor zurückgehalten werden. Durch geeignete experimentelle Bedingungen kann der Verlust durch Elution über die Membran bzw. Desaktivierung für die Enzyme/Coenzyme in vielen Fällen so gering gehalten werden, daß er wirtschaftlich nicht mehr limitierend ist. So gelang es, Coenzyme bis zu 600 000mal bei kontinuierlicher Reaktionsführung im Membranreaktor zu regenerieren. Am Beispiel der enzymatischen Peptid-Synthese wurden Raum-Zeit-Ausbeuten von mehr als 25 kg/(l d) erreicht. Zur Unterdrückung unerwünschter Parallelreaktionen kann mit extrem hohen Katalysatorkonzentrationen gearbeitet werden, so daß Verweilzeiten bis unter 4 min möglich sind.

Continuous processes with soluble enzymes. This paper surveys the use of continuously operating enzyme-membrane reactors with enforced flow where the retention of soluble enzymes in the reaction vessel is achieved by means of an ultrafiltration membrane. This technique has been commercialized in the acylase process for the synthesis of L-amino acids on a 200 ton/year level. It is especially useful for the application of multi-enzyme systems with cofactor regeneration. The synthesis of L-tert-leucine from the corresponding α -keto acid has been achieved on a kilogram scale. Coenzymes coupled to water soluble polymers are retained in the membrane-reactor together with the enzymes. Use of suitable conditions prevents loss of enzyme and coenzyme by passage through the membrane or by deactivation. Therefore the costs of enzymes and coenzymes are no longer limitations for economic processes. In the continuously operating enzyme-membrane reactor regeneration of the coenzyme up to 600 000 times was achieved. In continuous peptide synthesis space-time yields of 25 kg/(l d) were obtained. To suppress side reactions very high catalyst concentrations are possible, yielding residence times below 4 min.

1 Biotransformationen mit isolierten Enzymen oder ganzen Zellen?

Der Einsatz von Biokatalysatoren für präparative Zwecke ist weltweit Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten. Inzwischen sind zahlreiche industrielle Verfahren etabliert, wobei die Biokatalysatoren in Form ganzer Mikroorganismen oder gereinigter Enzyme eingesetzt werden. Derartige Verfahren sind immer dann vorteilhaft, wenn optisch aktive Substanzen hergestellt oder umgesetzt werden sollen oder aber sehr milde Reaktionsbedingungen erforderlich sind. Als Beispiele für den ersten Fall sollen hier nur die fermentative Gewinnung von natürlichen Aminosäuren und die Racematspaltung von Aminosäure-Derivaten zur Gewinnung von nicht-natürlichen Aminosäuren genannt werden [1]. Ein Beispiel für die Ausnutzung der milden Reaktionsbedingungen ist die Hydrolyse von Acrylnitril und Acrylamid unter Verwendung ganzer Zellen von *Rhodococcus rhodochrous*. Nach diesem Verfahren werden inzwischen 30 000 t Acrylamid pro Jahr hergestellt [2]. Neben dem Einsatz von ganzen Zellen bietet sich der Einsatz von aufgereinigten Enzymen an. Tab. 1 stellt Vor-

und Nachteile des Einsatzes von Enzymen und ganzen Zellen gegenüber. Gerade bei der Umsetzung nicht-natürlicher Substrate ist der Einsatz von gereinigten Enzymen vorteilhaft. Im Vergleich zu chemischen Katalysatoren bewirken Enzyme eine deutlich höhere Reaktionsgeschwindigkeit und zeichnen sich zusätzlich durch bessere Regio- und Stereoselektivität aus. Enzyme sind somit interessante Katalysatoren für die Synthese von Feinchemikalien und chiralen Verbindungen [3–9]. In der vorliegenden Arbeit sollen die wichtigsten Aspekte der Verfahrensentwicklung zum Einsatz von Enzymen an Hand eines Beispiels aufgezeigt werden.

2 Heterogene oder homogene Katalyse mit Enzymen in kontinuierlichen Verfahren?

Kontinuierliche Prozesse zeichnen sich gegenüber dem Satz- oder Chargen-Betrieb durch höhere Raum-Zeit-Ausbeuten und besser kontrollierbare Reaktionsbedingungen aus. Letzteres kann insbesondere zur Unterdrückung unerwünschter Nebenreaktionen ausgenutzt werden. Ebenso reduzieren sich die produktmengenspezifischen Enzymkosten. Für einen effektiven Einsatz als Katalysator ist es erforderlich, Enzyme durch geeignete Methoden im Reaktionsraum zurückzuhalten [10]. Die Immobilisierung kann beispielsweise durch adsorptive oder kovalente

* Dr. U. Kragl, Prof. Dr. C. Wandrey, Forschungszentrum Jülich GmbH, Institut für Biotechnologie, 5170 Jülich, und Prof. Dr. D. Vasic-Racki, Faculty of Technology, University of Zagreb, Zagreb/Croatia.

Tabelle 1. Vor- und Nachteile von isolierten Enzymen und ganzen Zellen als Biokatalysatoren.

pro		pro	
isolierte Enzyme		ganze Zellen	
pro	contra	pro	contra
– hohe Katalysatorkonzentration	begrenzte Stabilität	– unbegrenzte Stabilität wegen Zellwachstum	– Nebenreaktionen
– kein Erhaltungsstoffwechsel	– Cofaktor-Regenerierung nur für NAD(P)H und ATP	– Cofaktor-Regenerierung kein Problem	– komplexe Aufreinigung
– keine unerwünschte Biomasse		– vielstufige Prozesse möglich	– Biomasseentsorgung
– keine Nebenreaktionen			– niedrige Raum-Zeit-Ausbeute
– einfache Reinigung			
– nicht-natürliche Kombination von Enzymen aus verschiedenen Organismen			
– nicht-natürliche Substrate und Reaktionsbedingungen (org. Lösungsmittel)			

Kopplung des Enzyms an einem unlöslichen Träger erfolgen. Man erhält somit ein heterogenes System; als Reaktoren bieten sich Festbett- oder Wirbelbett-Reaktoren an. Um Nachteile der heterogenen Katalyse wie z.B. Stofftransport-Limitierungen, sterische Effekte oder Wechselwirkungen zwischen Träger und Reaktanden zu vermeiden, kann auch das lösliche Enzym durch geeignete Maßnahmen im Reaktionsraum zurückgehalten werden. Im Enzym-Membran-Reaktor werden die in Lösung befindlichen Enzyme in einem kontinuierlich durchflossenen Reaktionsgefäß mit Hilfe von Ultrafiltrationsmembranen zurückgehalten. Man macht sich dabei zunutze, daß Enzyme als Biopolymere sehr viel größer sind als die Substrat- und Produktmoleküle [11–13]. Auf diese Art ist eine kontinuierliche homogene Katalyse mit sehr guter Ausnutzung des Katalysators und Entkopplung der Verweilzeiten von Reaktanden und Katalysator möglich.

3 Aufbau von Membranreaktoren

Bei der Verwirklichung von Membranreaktoren sind im Prinzip vier verschiedene Typen zu unterscheiden, die in

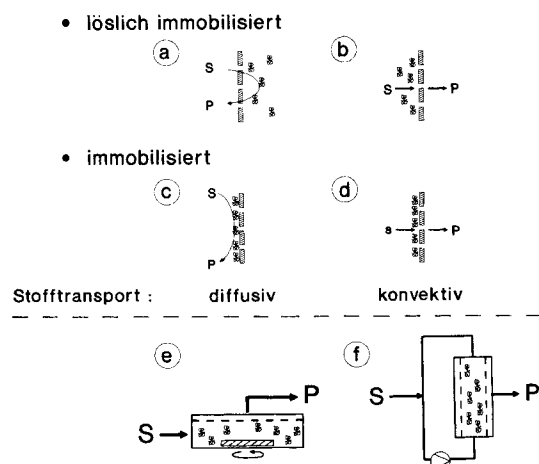


Abb. 1. Mögliche Bauformen von Enzym-Membran-Reaktoren; a–d: Unterscheidung zwischen Art der Enzymrückhaltung und der Art des Stofftransportes; e–f: Enzym-Membran-Reaktoren mit löslich immobilisierten Enzymen und konvektivem Stofftransport.

Abb. 1 dargestellt sind.¹⁾ Das lösliche Enzym wird durch die Filtrationswirkung einer Ultrafiltrationsmembran in einem begrenzten Raum zurückgehalten. Im einfachsten Fall gelingt das durch Einschluß des Enzyms in einen Dialyseschlauch, der ähnlich wie ein Teebeutel in die Reaktionslösung gehängt werden kann [14]. Der Stofftransport über die Membran zum Enzym erfolgt hierbei durch Diffusion (1a). Zur Vermeidung von Stofftransport-Limitierungen ist der Enzym-Membran-Reaktor mit erzwungener Konvektion günstiger (Abb. 1b). Häufig dient die Membran nur als Träger mit großer Oberfläche zur Fixierung des Enzyms [15]. Auch hierbei ist wieder zwischen diffusivem und konvektivem Stofftransport zu unterscheiden (Abb. 1c und d). Zu dieser Art gehören auch Reaktoren zum Einsatz von Esterasen oder Lipasen, bei denen die Membran gleichzeitig zur Stabilisierung von Phasengrenzflächen dient [16].

Die vorliegende Arbeit beschränkt sich auf die Beschreibung von Systemen in konvektiv betriebenen Membranreaktoren, bei denen lösliche Enzyme verwendet wurden. Ein wesentlicher Vorteil dieses Systems ist der mögliche Betrieb des Reaktors unter Sterilbedingungen. Durch ein vorgeschaltetes Mikrofilter werden Keime vor dem Reaktor zurückgehalten. Durch Sterilisation der gesamten Anordnung vor dem Einbringen der Enzyme und Substrate werden vorhandene Mikroorganismen abgetötet. Zur Sterilisation können je nach Membranmaterial Dampf oder chemische Mittel verwendet werden. Auf antibakterielle Mittel kann während des Prozesses verzichtet werden. Die erhaltene Produktlösung ist ultrafiltriert und pyrogenfrei. Mögliche Bauformen des Enzym-Membran-Reaktors sind in Abb. 1e und f dargestellt. Beim Flachmembranreaktor wird die Konzentrationspolarisation durch intensives Rühren vermieden. Diese Reaktoren mit Volumina zwischen 2 und 50 ml werden im wesentlichen zur Verfahrensentwicklung genutzt.²⁾ Für Produktionszwecke werden Enzym-Membran-Reaktoren verwendet, bei denen die Ultrafiltrationsmembranen in Form von Hohlfasermodule oder als Flachmembranstapel eingebaut werden [11]. Diese Reaktoren sind als Schlaufenreaktoren ausgelegt, wobei

1) Eine Zusammenstellung der Formelzeichen befindet sich am Schluß des Beitrags.

2) Von der Firma Bioengineering, Wald/Schweiz, wird ein Enzym-Membran-Reaktor mit 10 ml Arbeitsvolumen vertrieben.

durch eine Kreislaufpumpe hohe Strömungsgeschwindigkeiten über der Oberfläche der Membran erzielt werden, durch die die Konzentrationspolarisation vermieden wird. Wenn die Umpumpgeschwindigkeit groß ist im Vergleich zur Geschwindigkeit der Substratdosierung, verhält sich ein derartiger Reaktor wie ein kontinuierlich betriebener Rührkesselreaktor. Eine dritte Bauform, bei der eine rotierende Filterkerze in der Lösung eingesetzt wird, sei hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt. Die Membrankosten sind für einen wirtschaftlichen Einsatz von Enzym-Membran-Reaktoren nicht mehr limitierend.

Der Enzym-Membran-Reaktor mit löslichen Enzymen ist vor allem bei Multienzysystemen vorteilhaft, da Stofftransportlimitierungen aufgrund der guten Durchmischung des Systems nicht auftreten können.

4 Bioreaktionstechnik – Prozeßoptimierung Schritt für Schritt

Mit Hilfe der Prozeßoptimierung sollen die günstigsten Bedingungen gefunden werden, um hohe Raum-Zeit-Ausbeuten bei hohem Umsatz, hoher Selektivität und niedrigem Enzymverbrauch zu erzielen. Unter einem Prozeß ist dabei im weitesten Sinne jede chemische Reaktion zu verstehen, die entweder kontinuierlich oder diskontinuierlich durchgeführt wird. Durch die Thermodynamik wird die Gleichgewichtslage der Reaktion beschrieben, während die Kinetik die Geschwindigkeit, mit der zum Beispiel der Gleichgewichtsumsatz erreicht werden kann, beschreibt. Thermodynamik, Kinetik und der Biokatalysator werden durch die gewählten Bedingungen (z.B. pH-Wert, Temperatur, Konzentration aller anwesenden Substanzen) beeinflusst. Durch die Ermittlung geeigneter Reaktionsbedingungen werden die Eigenschaften des Biokatalysators möglichst gut ausgenutzt.

Durch die Verfahrenstechnik wird der für die betreffende Reaktion am besten geeignete Reaktor ausgewählt. Aber auch weitere Faktoren, wie zum Beispiel die Produktisolierung, spielen eine wichtige Rolle. Erst die gleichzeitige Betrachtung und gegenseitige Abstimmung aller prozeßrelevanten Parameter führt zu optimalen Prozeßbedingungen. Während die Verhältnisse bei einer einfachen Reaktion mit nur einem Enzym noch überschaubar sind, kommt es bei zwei oder drei Enzymen, bei Parallel- oder Folgereaktionen, die über gemeinsame Reaktanden gekoppelt sind, schnell zu Abhängigkeiten, die anschaulich nicht mehr erfaßt werden können. Hier sind Modellrechnungen hilfreich, die eine quantitative Überschaubarkeit selbst komplexer Abhängigkeiten liefern. Sie helfen auch, unnötigen experimentellen Aufwand zu vermeiden, indem Bedingungen, die nicht zum angestrebten Ziel führen, erkannt und vermieden werden können.

4.1 Fall-Beispiel

4.1.1 Das Reaktionssystem: Enzymatische Synthese von L-tert-Leucin durch reduktive Aminierung

Im folgenden soll das Verfahren der Prozeßentwicklung an einem konkreten Beispiel erläutert werden. In Abb. 2 ist das Reaktionssystem dargestellt (a). L-tert-Leucin kann durch reduktive Aminierung mit Leucindehydrogenase aus Trimethylpyruvat erhalten werden [17]. Der erforderliche Cofaktor NAD(H) wird mit Hilfe eines zweiten Enzyms, der Formiatdehydrogenase, regeneriert. Durch Kopplung

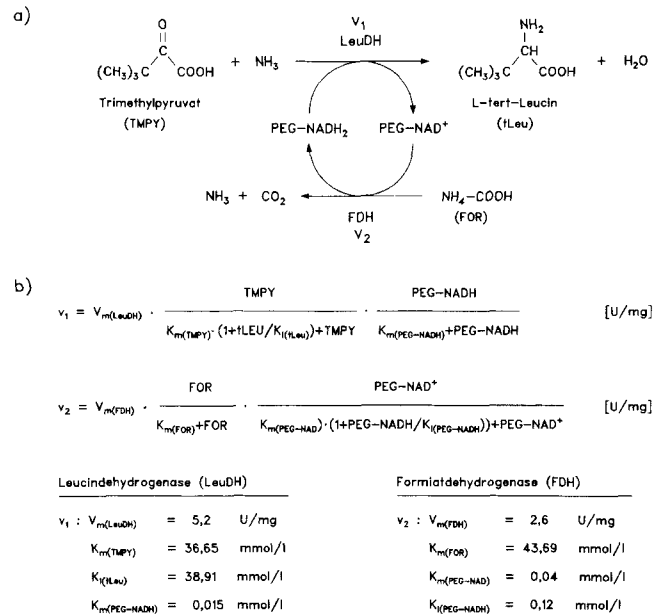


Abb. 2. a) Synthese von L-tert-Leucin durch reduktive Aminierung von Trimethylpyruvat mit Cofaktor-Regenerierung; es wurde polymervergrößertes und natives NAD(H) eingesetzt; b) kinetische Gleichungen und Parameter zur Beschreibung der verwendeten Enzyme; LeuDH Leucindehydrogenase, FDH Formiatdehydrogenase, PEG Polyethylenglycol.

an wasserlösliches Polyethylenglycol mit einer Molmasse von 20000 g/mol wird der Cofaktor zusammen mit den Enzymen im Reaktionsraum zurückgehalten [18–20]. Die Synthese von L-tert-Leucin ist ein Beispiel für den Einsatz der Cofaktor-Regenerierung in einem industriell genutzten kontinuierlichen Prozeß. Daß sowohl mit dem „polymervergrößerten“ als auch mit dem „nativen“ Cofaktor hohe Zyklenzahlen erreicht werden können, soll mit der später vorgestellten Modellierung gezeigt werden. Die Zyklenzahl gibt an, wieviel mol Produkt pro mol verbrauchtem Cofaktor gebildet werden („Total turnover number“).

4.1.2 Thermodynamische Eigenschaften des Reaktionssystems

Im Fall der kontinuierlichen Produktion von L-tert-Leucin wird durch die thermodynamisch begünstigte Bildung von Kohlendioxid das Gleichgewicht der Gesamtreaktion auf die Produktseite (L-tert-Leucin) verschoben. Prinzipiell wird durch die Thermodynamik der maximal erreichbare Gleichgewichtsumsatz bestimmt. Höhere Produktausbeuten lassen sich auch erzielen, wenn das Reaktionsprodukt selektiv aus dem Reaktionsmedium abgetrennt werden kann und das Substrat rezykliert wird. Dies wurde beispielsweise bei der Herstellung von L-Methionin aus der entsprechenden racemischen α -Hydroxysäure mit Hilfe eines Multi-Enzym-Systems verwirklicht. Die Produktabtrennung erfolgte durch integrierte Elektrodialyse [21].

4.1.3 Katalysator-Eigenschaften

Die Eigenschaften des Biokatalysators bestimmen maßgeblich, ob eine Prozeßentwicklung erfolgreich durchgeführt werden kann. Insbesondere die Aktivität und Stabilität des Enzyms und eventuell benötigter Cofaktoren sind wichtige Parameter. Zur Vermeidung der Enzymdesaktivierung müssen zu große Scherkräfte und Gas/Flüssigkeits-

Grenzflächen vermieden werden [22]. Ebenso ist darauf zu achten, daß durch die verwendeten Reaktormaterialien keine irreversible Schädigung des Biokatalysators verursacht wird. Die Enzymstabilität kann unter Umständen durch Stabilisatoren, chemische Modifizierung oder kovalente Kopplung an Träger verbessert werden [23, 24]. Bei der Feststellung der Reaktionsbedingungen (pH-Wert, Temperatur) ist daher auf eine gute Langzeitstabilität des Enzyms unter Betriebsbedingungen zu achten, die sich deutlich von der Lagerstabilität ohne Anwesenheit der Reaktanden unterscheiden kann. Für den vorliegenden Fall erwiesen sich 37 °C und ein pH-Wert von 8,0 als vorteilhaft. Für diese Bedingungen wurden folgende Desaktivierungskonstanten gefunden: LeuDH 0,0239 d⁻¹; FDH 0,0618 d⁻¹; PEG-NAD(H) 0,109 d⁻¹. Die Desaktivierung folgt dabei einem Zeitgesetz erster Ordnung.

4.1.4 Kinetische Untersuchungen

Mit Hilfe kinetischer Untersuchungen muß ein mathematisches Modell entwickelt werden, um Betriebszustände des Reaktors vorzuberechnen. Im Idealfall stehen detaillierte Informationen über den Reaktionsmechanismus des Enzyms zur Verfügung, mit denen nach bestimmten Regeln eine Gleichung für die Reaktionsgeschwindigkeit abgeleitet werden kann. Sind diese Informationen nicht verfügbar, so kann in einem rein formalkinetischen Ansatz das einfachste Modell verwendet werden, das die Kinetik mit ausreichender Genauigkeit beschreibt. In der Regel werden die kinetischen Parameter, wie die maximale Reaktionsgeschwindigkeit $V_{\max}$ und die Michaelis-Menten-Konstante K_m , aus Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit bestimmt. Diese Messungen werden häufig in verdünnten Lösungen durchgeführt, während bei technischen Anwendungen oft möglichst hohe Substratkonzentrationen und bei hohen Umsätzen hohe Produktkonzentrationen gefordert werden. Daher ist es notwendig, den Einfluß auch hoher Konzentrationen auf die Enzymaktivität zu untersuchen. Kinetische Parameter aus Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit sollten durch Satzreaktorversuche überprüft werden, indem berechnete und experimentelle Konzentration/Zeit-Kurven miteinander verglichen werden. Dabei sind auch die erreichten Gleichgewichtskonzentrationen miteinander zu vergleichen.

Die verwendeten kinetischen Modelle sowie die aus Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit erhaltenen kinetischen Parameter sind in Abb. 2b angegeben. Das nicht natürliche Substrat Trimethylpyruvat wird von der Leucindehydrogenase mit guter Aktivität umgesetzt. Der Einfluß der Ammonium-Konzentration auf die Aktivität der LeuDH wird nicht berücksichtigt, da sowohl die kinetischen Untersuchungen als auch die kontinuierlichen Prozesse bei hohen Ammonium-Konzentrationen entsprechend einem großen Überschuß durchgeführt wurden. Die Konzentration bleibt damit nahezu konstant und wird in $V_{\max}$ einbezogen.

Der Einfluß des Substrats und des Cofaktors kann mit einer „Michaelis-Menten-Doppelsubstratkinetik“ unter Berücksichtigung einer kompetitiven Produktinhibition beschrieben werden.

4.1.5 Vergleich von Modellrechnungen und experimentellen Daten

Der verwendete Enzym-Membran-Reaktor verhält sich wie ein kontinuierlich betriebener Rührkesselreaktor

(CSTR). Der ideale CSTR ist durch vollständige Rückvermischung gekennzeichnet, was eine homogene Verteilung von Biokatalysator, Cofaktor und Reaktanden bedeutet. Die Stoffbilanzen enthalten nur den Konvektions- und den Reaktionsterm. Für das polymervergrößerte NAD(H) wird angenommen, daß es vollständig von der Membran zurückgehalten wird, so daß der Konvektionsterm entfällt. Für den nativen Cofaktor wird der Konvektionsterm benötigt, da er ständig mit der Substratlösung zudosiert werden muß. Das Gleichungssystem besteht aus vier Differentialgleichungen; es wurde durch numerische Integration nach dem Runge-Kutta-Verfahren [25] mit Hilfe eines PC gelöst.

In Abb. 3 ist der Umsatz an Trimethylpyruvat als Funktion der Zeit für die kontinuierliche Produktion von L-tert-Leucin im Enzym-Membran-Reaktor dargestellt. Die zugehörigen Daten sind in der Abbildung und der zugehörigen Legende angegeben. Die mit Hilfe dieser Daten berechnete Zyklenzahl beträgt 112 000 mol/mol und stimmt sehr gut mit dem experimentell bestimmten Wert von 125 000 mol/mol überein. Das Ergebnis der Berechnungen wird sehr stark von der Desaktivierungskonstante für den Cofaktor beeinflusst. Auch die übrigen Daten des Prozesses lassen sich mit guter Genauigkeit berechnen. Bei einer Verweilzeit von 2 h wurde bei einem mittleren Umsatz von 85% (berechnet 81%) eine Raum-Zeit-Ausbeute von 638 g/(l d) (berechnet 641 g/(l d)) erreicht. Die Schwankungen im experimentell beobachteten Umsatz wurden durch die Enzymdesaktivierung und entsprechende Nachdosierung verursacht. Gemäß den Desaktivierungskonstanten (vgl. Abschnitt 4.1.3) mußte FDH etwa dreimal so oft wie LeuDH nachdosiert werden.

Das hier verwendete Modell ist somit geeignet, Betriebszustände für den kontinuierlichen Prozeß zu berechnen.

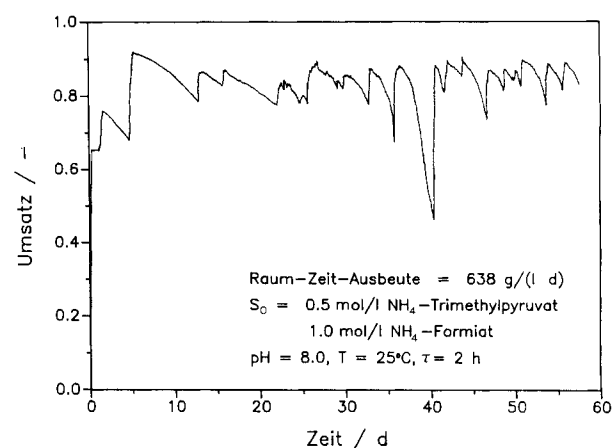


Abb. 3. Umsatz als Funktion der Zeit bei der kontinuierlichen Produktion von L-tert-Leucin im 10-ml-Enzym-Membran-Reaktor; Startkonzentrationen: LeuDH 30 U/ml, FDH 30 U/ml, PEG-NAD(H) 0,4 mmol/l.

4.1.6 Einfluß der Cofaktorkonzentration und Substratkonzentration auf die erzielbare Zyklenzahl

Durch die im folgenden vorgestellten Berechnungen soll zunächst gezeigt werden, wie die Zyklenzahl von der Cofaktor- und Substratkonzentration abhängt. In den Abb. 4 und 5 sind die Raum-Zeit-Ausbeute, der produktmengenspezifische Enzymverbrauch und die Zyklenzahl als Funktion der Cofaktorkonzentration und der Substratkonzentration sowohl für den polymervergrößerten als

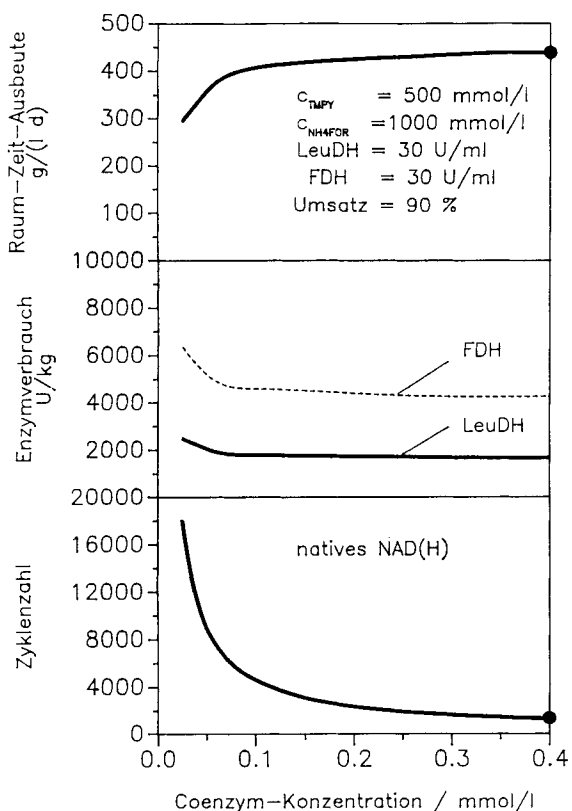
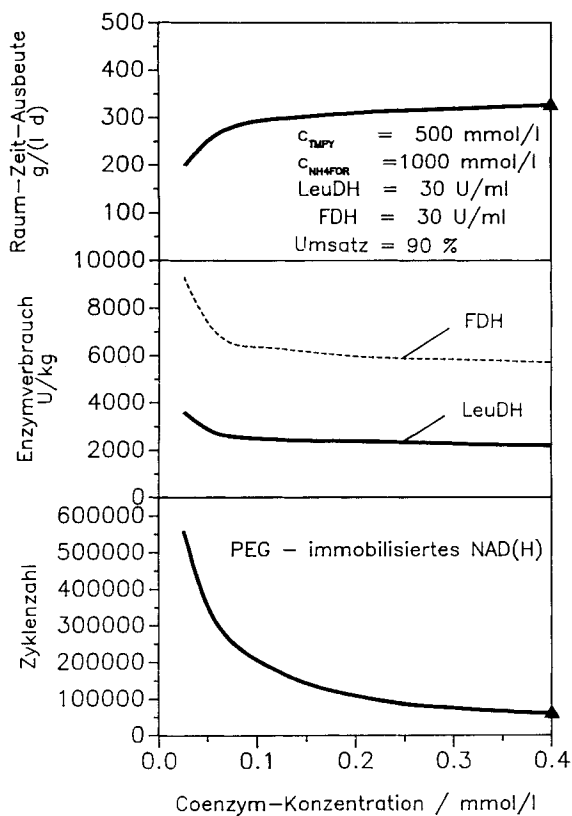


Abb. 4. Einfluß der Cofaktorkonzentration bei Verwendung des nativen und des polymervergrößerten Cofaktors auf die Zyklenzahl, den produktmengenspezifischen Enzymverbrauch und die Raum-Zeit-Ausbeute. Durch Variation der Verweilzeit wurde ein konstanter Umsatz von 90% eingestellt. Die Symbole (▲, ●) kennzeichnen korrespondierende Produkte in den Abb. 4 und 5.

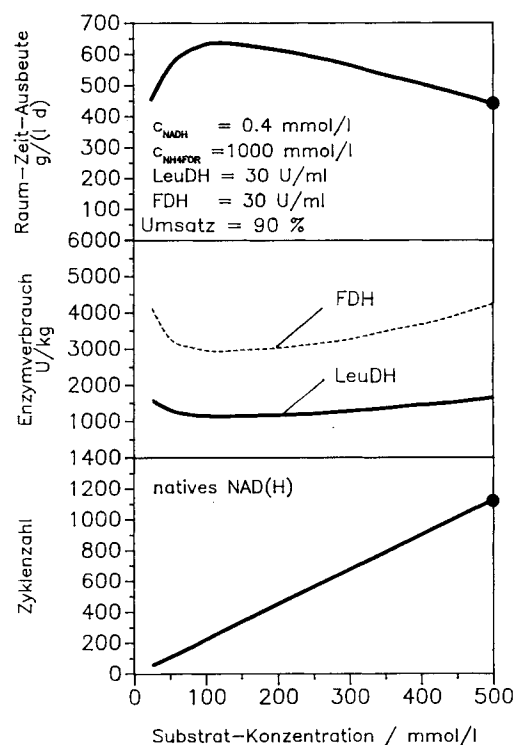
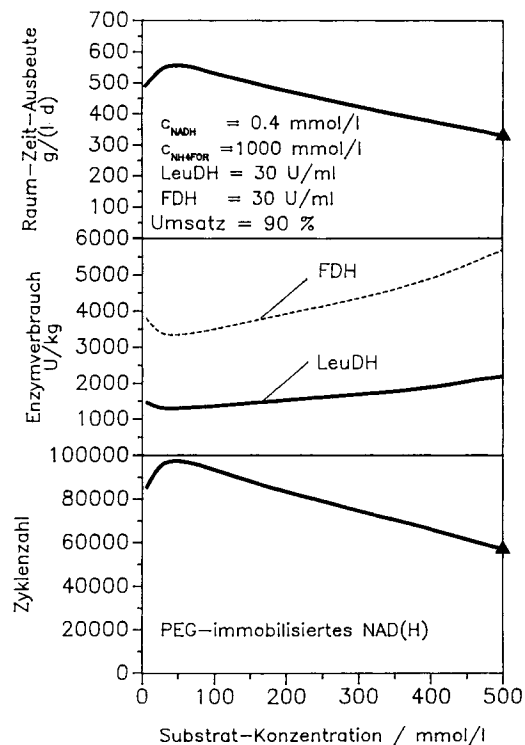


Abb. 5. Einfluß der Substratkonzentration bei Verwendung des nativen und des polymervergrößerten Cofaktors auf die Zyklenzahl, den produktmengenspezifischen Enzymverbrauch und die Raum-Zeit-Ausbeute. Durch Variation der Verweilzeit wurde ein konstanter Umsatz von 90% eingestellt. Die Symbole (▲, ●) kennzeichnen korrespondierende Punkte in den Abb. 4 und 5.

auch für den nativen Cofaktor dargestellt. Die gezeigten Abhängigkeiten gelten für einen Umsatz von 90%, der durch entsprechende Variation der Verweilzeit eingestellt

wurde. Während mit steigender Cofaktorkonzentration die Raum-Zeit-Ausbeute ansteigt, nimmt gleichzeitig die erzielbare Zyklenzahl ab. Dieses Verhalten wird sowohl beim polymervergrößerten wie auch beim nativen Cofaktor gefunden. Erwartungsgemäß sind die erreichbaren Zykluszahlen für den nativen Cofaktor deutlich kleiner als für den polymervergrößerten Cofaktor, der im Reaktor zurückgehalten wird. Die Raum-Zeit-Ausbeute ist für den nativen Cofaktor etwas höher, da aufgrund etwas günstigerer kinetischer Parameter eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird.

In beiden Fällen steigt die Zyklenzahl mit abnehmender Cofaktorkonzentration stark an – allerdings auf Kosten der Raum-Zeit-Ausbeute, da allmählich die Cofaktorkonzentration für das Gesamtreaktionssystem limitiert wird. Gibt man für den polymervergrößerten Cofaktor eine Konzentration von 0,05 mmol/l und unter sonst gleichen Bedingungen einen Umsatz von nur 10% vor, so erhält man eine Zyklenzahl von 3 300 000 bei einer Raum-Zeit-Ausbeute von etwa 2400 g/(l d). Dieses Beispiel zeigt, wie wichtig die Angabe des Umsatzes für den Vergleich von Prozeßdaten ist.

Während die Kurvenverläufe bei den Abhängigkeiten von der Cofaktorkonzentration beim nativen und polymervergrößerten Cofaktor ähnlich sind, gibt es bei der Abhängigkeit der Zyklenzahl von der Substratkonzentration (Abb. 5) einen deutlichen Unterschied. Während beim polymervergrößerten Cofaktor mit steigender Substratkonzentration ein Maximum der Zyklenzahl durchlaufen wird, steigt sie beim nativen Cofaktor mit steigender Substratkonzentration monoton an. Beim polymervergrößerten Cofaktor bedingt zu niedrige Substratkonzentration Substratlimitierung und zu hohe Substratkonzentration (bei einem gegebenen Umsatz von 90%) Produktinhibition. Dies gilt prinzipiell auch bei Verwendung des nativen Cofaktors (wie auch an dem ähnlichen Verlauf der Raum-Zeit-Ausbeute als Funktion der Substratkonzentration zu erkennen ist). Bei hoher Substratkonzentration wird hier aber eine entsprechend längere Verweilzeit benötigt, um den vorgegebenen Umsatz von 90% einzustellen. Damit hat hier der Cofaktor gleichsam „mehr Zeit“, öfter regeneriert zu werden, was den Anstieg der Zyklenzahl erklärt.

4.1.7 Welcher Cofaktor in welcher Konzentration?

Vom ökonomischen Standpunkt her muß ein Kompromiß gefunden werden zwischen der Raum-Zeit-Ausbeute und der Zyklenzahl, die direkt die Kosten für den Cofaktor bestimmt. Anzustreben sind möglichst niedrige Cofaktorkonzentrationen, um bei möglichst hohen Zyklenzahlen überschüssigen Cofaktor zu vermeiden. Andererseits sollte die Cofaktorkonzentration so hoch sein, daß nicht schon bei geringfügiger Desaktivierung die Raum-Zeit-Ausbeute abfällt.

In kontinuierlichen Prozessen, bei denen die Verweilzeit des Cofaktors von der Substratverweilzeit entkoppelt werden kann, sind Zyklenzahlen bis zu 600 000 erreicht worden. Die Rückhaltung kann durch Polymervergrößerung (wie hier beschrieben), durch geladene Ultrafiltrationsmembranen [26, 27] oder durch starke Wechselwirkungen zwischen Enzym und dem Cofaktor [28] erreicht werden.

Aufgrund des inzwischen niedrigen Preises kann auch natives NAD(H) bei kleineren erreichbaren Zyklenzahlen kostengünstig in kontinuierlichen Prozessen eingesetzt werden. Damit wird zumindest im Fall des NAD(H) das

Argument entkräftet, daß cofaktorabhängige Reaktionen zu teuer sind und effektive Methoden zur Cofaktorregenerierung nach wie vor fehlen [29]. Allerdings zeigt sich, daß ein reaktionstechnisches Verständnis derartiger Systeme zur Ermittlung optimaler Reaktionsbedingungen hilfreich ist. Im folgenden sollen daher entsprechende Beziehungen für das hier dargestellte Reaktionssystem unter Verwendung des polymervergrößerten Cofaktors diskutiert werden.

In Abb. 6 ist die Gesamtreaktionsgeschwindigkeit der Bildung von L-tert-Leucin als Funktion der Konzentration an Trimethylpyruvat und der Cofaktorkonzentration für 90% Substratumsatz dargestellt. Die Reaktionsgeschwindigkeit steigt mit zunehmender Cofaktorkonzentration, während sie mit steigender Substratkonzentration abfällt. Der Abfall ist bei gegebenem Umsatz (90%) auf die steigende Produktinhibition zurückzuführen.

Neben den Substrat- und Produktkonzentrationen beeinflusst auch das Aktivitätsverhältnis der beiden eingesetzten Enzyme die erzielbare Raum-Zeit-Ausbeute. In Abb. 7 ist die Raum-Zeit-Ausbeute als Funktion des Enzymmolenbruches und des Umsatzes dargestellt. Der Enzymmolenbruch ist durch Gl. (1) definiert:

Enzymmolenbruch =

$$\frac{\text{FDH } V_m(\text{FDH})}{\text{LeuDH } V_m(\text{LeuDH}) + \text{FDH } V_m(\text{FDH})} \quad (1)$$

Unterschiedliche Umsätze bei konstantem Enzymverhältnis werden durch Variation der Verweilzeit erzielt. Bei der Berechnung des Enzymmolenbruches werden die unter Anfangsreaktionsgeschwindigkeitsbedingungen ermittelten Enzymaktivitäten verwendet. Daher ist bei niedrigen Umsätzen die maximale Raum-Zeit-Ausbeute bei einem Molenbruch von 0,5 zu finden. Mit zunehmendem Umsatz verschiebt sich das Maximum der erzielbaren Raum-Zeit-Ausbeute zu kleineren Enzymmolenbrüchen, da das Produktionsenzym und das Regenerierungsenzym unterschiedlich von den mit zunehmendem Umsatz veränderten Konzentrationen der Reaktanden beeinflusst werden. Um auch unter den im Reaktor vorliegenden Konzentrations-

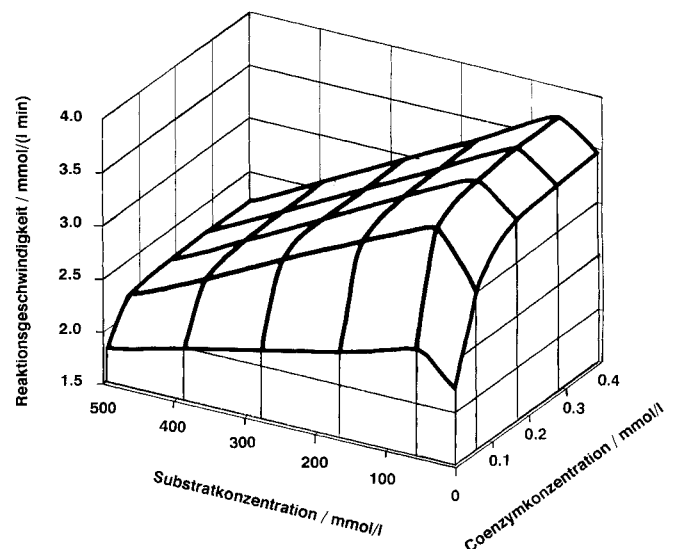


Abb. 6. Berechnete Reaktionsgeschwindigkeit der LeuDH als Funktion der Substrat- und Cofaktorkonzentration (PEG-NAD(H)) im kontinuierlichen Prozeß. Bedingungen: LeuDH 30 U/ml, FDH 30 U/ml; Umsatz 90%, eingestellt durch Variation der Verweilzeit; Ammoniumformiat 1 mol/l.

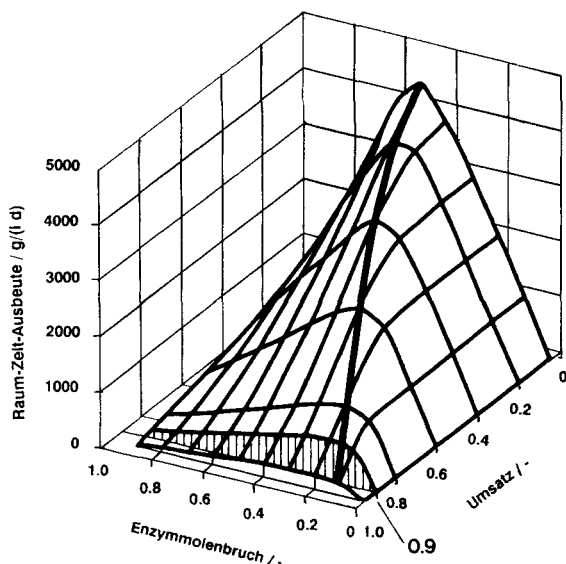


Abb. 7. Berechnete Raum-Zeit-Ausbeute als Funktion des Enzymmolenbruchs und des Umsatzes im kontinuierlichen Prozeß. Der Umsatz wird durch Variation der Verweilzeit eingestellt; 90% Umsatz sind durch die schraffierte Fläche hervorgehoben. Bedingungen: Trimethylpyruvat 500 mmol/l; Ammoniumformiat 1 mol/l; Summe FDH + LeudH = 60 U/ml = konstant; PEG-NAD(H) 0,4 mmol/l.

verhältnissen gleiche Reaktionsgeschwindigkeiten für die beiden Enzyme zu erzielen, muß das Produktionsenzym in größeren Mengen eingesetzt werden (sehr starke Produktinhibition).

4.2 Ausgewählte Beispiele, bei denen Bioreaktionstechnik zur Prozeßoptimierung nützlich ist

In den Tab. 2 bis 4 findet sich eine Auflistung über erfolgreich im Enzym-Membran-Reaktor eingesetzte eige-

ne Systeme, wobei zwischen Ein-Enzym-Systemen, Zwei-Enzym-Systemen und Drei-Enzym-Systemen unterschieden wird [17, 30–63]. Im folgenden soll an Hand von vier Beispielen die Leistungsfähigkeit derartiger kontinuierlicher Systeme im Enzym-Membran-Reaktor verdeutlicht werden. Auf die Ermittlung optimaler Reaktionsbedingungen mit Hilfe der Bioverfahrenstechnik kann dabei nicht im Detail eingegangen werden. Das Verfahren entspricht jedoch in seinem Ablauf der in dieser Arbeit geschilderten Vorgehensweise.

Im einzelnen sind dies:

- Produktion optisch aktiver Aminosäuren im industriellen Maßstab,
- kontinuierliche Cofaktorregenerierung mit Zyklenzahlen bis zu 600 000,
- kontinuierliche enzymatische Peptid-Synthese mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 25 kg/(l d),
- kontinuierlicher Einsatz der (R)-Oxynitrilase bei Verweilzeiten von unter 4 min.

4.2.1 Produktion optisch aktiver Aminosäuren

L-Aminosäuren können durch stereospezifische Hydrolyse von N-Acetyl-D,L-aminosäuren erhalten werden. Das Verfahren wird seit 1981 industriell mit löslicher Acylase im Enzym-Membran-Reaktor eingesetzt. Der Reaktor wird dabei als Schlaufenreaktor mit mehreren parallel betriebenen Hohlfasermembranen betrieben. Zur Zeit werden nach diesem Verfahren mehr als 200 t L-Methionin pro Jahr produziert. Bei Versuchen im Pilot-Maßstab wurde bei einer Verweilzeit von 1 h und einer Substratkonzentration von 0,6 mol/l eine Raum-Zeit-Ausbeute von 913 g/(l d) mit einem Enzymverbrauch von 300 U/kg erzielt [30, 31].

4.2.2 Kontinuierliche Cofaktorregenerierung

Ein weiteres Beispiel für die reduktive Aminierung ist die Umsetzung von Phenylpyruvat zu L-Phenylalanin. Durch

Tabelle 2. Übersicht über Anwendungen im Enzym-Membran-Reaktor für Ein-Enzym-Systeme.

Enzym	Biokatalytische Reaktion	pH	T [°C]	Substratkonzentration [M]	Reaktorvolumen [l]	Verweilzeit [h]	Umsatz [%]	Raum-Zeit-Ausbeute [g/(l d)]	Enzymverbrauch [U/kg]	Zyklenzahl	Anwendungen	kommerzielle Bedeutung	Lit.
Aminoacylase	Hydrolyse	7,0	37	0,8 N-Acetyl-D,L-methionin	1	1,8	85	1 200	1 000		Enantiomeren-Trennung von Aminosäuren	+++	[30, 31]
PEN-G-Acylase	Hydrolyse	7,8	25	0,002 Phenacetyl-L-tyrosyl-L-alanin	0,01	0,25	98	29	7 200		Deacylierung von Dipeptid		[39]
Fumarase	Dehydratisierung	7,0	37	1,0 Fumarsäure	1,2	1,5	42	1 000			Produktion von L-Äpfelsäure	+++	[40]
(R)-Oxynitrilase	Bildung einer C-C-Bindung	3,75	20	0,059 Benzaldehyd, 0,2 HCN	0,01	0,06	80–90	2 400	17 000		Produktion von Mandelsäure über (R) Mandelsäurenitril	+	[35]
Aldolase	Bildung einer C-C-Bindung	6,0	25	0,03 (R,S)-3-Azido-2-hydroxypropanol 0,019 Dihydroxyacetophosphat	0,005	2–3	72	40	512 000		Produktion von nicht-natürlichen Zuckeranaloga		[41, 42]
Aspartase	Aminierung	8,5	20	0,4 Fumarsäure, 0,44 NH ₃	0,2	5,0	80	400	5 000		Produktion von L-Asparaginsäure	+++	[43]
β-Decarboxylase	Decarboxylierung	5,7	30	0,2 L-Asparaginsäure 0,005 Pyruvat	0,18	4,5	74	53	144 000		Produktion von L-Alanin	+++	[43]
Aspartat-Phenylpyruvat-Transaminase	Transaminierung			0,090 L-Asparaginsäure 0,061 Phenylpyruvat	0,01	0,5	75				Produktion von L-Phenylalanin		[44]
FDH	Reduktion	8,0	25	0,2 Ameisensäure 0,0194 NAD	0,010	2,0	90				Produktion von NADH ₂		[45]
α-Chymotrypsin	Bildung einer C-N-Bindung	9,5	25	0,01 ForTyr-OProp 0,02 Arg-OProp	0,2	0,5	> 98	91	750 mg/kg		Produktion von Kytorphin	++	[46]
α-Chymotrypsin	Bildung einer C-N-Bindung	9,5	25	0,48 MalTyr-OEt 0,8 Arg-NH ₂	0,0021	0,083	80	25 600	175 mg/kg		Produktion von Kytorphin		[33, 47]
Papain	Bildung einer C-N-Bindung	9,0	25	0,005 MalTyrArg-OEt 0,05 Ala-OEt	0,01	0,25	62	154,4	2,1 g/kg		Produktion von Tripeptid		[48]
Carboxypeptidase Y	Bildung einer C-N-Bindung	8,4	25	0,002 PhenacTyr-OMe 1,0 L-Alanin	0,01	0,25	> 98	33,7	1 060		Produktion von Dipeptid		[49]

Abkürzungen: FDH Formiatdehydrogenase, NAD(H) β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid.

Tabelle 3. Übersicht über Anwendungen im Enzym-Membran-Reaktor für Zwei-Enzym-Systeme.

Enzym	Biokatalytische Reaktion	pH	T [°C]	Substratkonzentration [M]	Reaktor-volumen [l]	Verweil-zeit [h]	Umsatz [%]	Raum-Zeit-Ausbeute [g/(l d)]	Enzym-verbrauch [U/kg]	Zyklus-zahl	Anwendungen	kommerzielle Bedeutung	Lit.
LeuDH/FDH	reduktive Aminie-rung	8,0	25	0,1 α-Ketoisocaproat 0,4 NH ₄ -Formiat	0,01	1,2	80	250	260 LeuDH 300 FDH	75 000	Produktion von L-Leucin		[50]
LeuDH/FDH	reduktive Aminie-rung	8,0	25	0,1 α-Ketoisocaproat 1,0 NH ₄ -Formiat	0,01	1,0	87	239	653 LeuDH 412 FDH	50 000	Produktion von L-Leucin		[51]
LeuDH/FDH	reduktive Aminie-rung	8,0	25	0,5 Trimethylpyruvat 1,0 NH ₄ -Formiat	0,01	2,0	85	640	930 LeuDH 2280 FDH	125 000	Produktion von L-Leucin	+++	[17]
PheDH/FDH	reduktive Aminie-rung	8,5	25	0,12 Phenylpyruvat 1,0 NH ₄ -Formiat	0,01	1,0	95	456	1500 PheDH 150 FDH	600 000	Produktion von L-Phenylalanin		[52]
L-HicDH/FDH	Reduktion	7,0	25	0,1 2-Ketoisocaproat 0,4 Na-Formiat	0,01	0,7	90	411	730 L-HicDH 2280 FDH	69 400	Produktion von Hydroxysäure		[52]
MaDH/FDH	Reduktion	8,0	25	0,5 Phenylglyoxylsäure 1,0 NH ₄ -Formiat	0,01	2–3	95	698	1070 MaDH 660 FDH	24 000	Produktion von (R)-Mandelsäure		[53]
D-HicDH/FDH	Reduktion	7,5	28	0,08 3,4-Dihydroxy-phenylpyruvat 0,2 NH ₄ -Formiat	0,01	1,7	80	205	5125 HicDH	5 000	(R)-DHPL (Bestandteil der Rosmarinsäure-Produktion)		[54]
HK/AK	Phosphorylierung	7,6	25	0,1 Glucose 0,06 Acetylphosphat	0,01	1,33	87	10,2	14 HK 6 AK	20 000	Produktion von Glucose-6-phosphat		[55]
D-RK/PK	Phosphorylierung	8,3	25	0,025 D-Ribulose 0,03 Phosphoenol-pyruvat	0,01	1,0	93	117	7300 D-RK 25 800 PK		Produktion von D-(-)-Ribulose-5-phosphat		[56]
EPI/ALD	Bildung einer C-C-Bindung	7,5	25	0,2 N-Acetylglucos-amin 0,1 Pyruvat	0,014	2,85		109			Produktion von N-Ace-tylneuraminsäure		[57]
D-AO/CAT	oxidative Deaminierung	7,5	25	0,0005 D-Methionin 0,1 Pyruvat	0,01		100	99			Produktion von L-Me-thionin		[58]

Abkürzungen: AlaDH Alanindehydrogenase, ALD Aldolase, AK Acetatkinase, D-AO Aminosäureoxidase, CAT Catalase, EPI Epimerase, FDH Formiatdehydrogenase, HicDH Hydroxyisocaproatdehydrogenase, HK Hexokinase, LeuDH Leucindehydrogenase, MaDH Mandelatdehydrogenase, PheDH Phenylalanindehydrogenase, PK Pyruvatkinase, D-RK D-Ribulokinase.

Tabelle 4. Übersicht über Anwendungen im Enzym-Membran-Reaktor für Drei-Enzym-Systeme.

Enzym	Biokatalytische Reaktion	pH	T [°C]	Substratkonzentration [M]	Reaktor-volumen [l]	Verweil-zeit [h]	Umsatz [%]	Raum-Zeit-Ausbeute [g/(l d)]	Enzym-verbrauch [U/kg]	Zyklus-zahl	Anwendungen	Lit.
D-HicDH/ L-HicDH/LeuDH	reduktive Aminierung	8,5	25	0,1 D,L-Hydroxy- und 0,0005 Ketoisocaproat 0,25 (NH ₄) ₂ SO ₄	0,01	1–3	70	72	350 D-HicDH 730 L-HicDH 655 LeuDH	10 000	Produktion von L-Leucin	[59]
D-HicDH/ L-HicDH/AlaDH	reduktive Aminierung	9,0	25	0,4 D,L-Lactat 0,0001 Pyruvat 1,0 NH ₄ -Formiat	0,01	3,0	46	134	2600 D-HicDH 4700 L-HicDH	19 200	Produktion von L-Alanin	[60]
D-HicDH/ L-HicDH/PheDH	reduktive Aminierung	8,5	25	0,05 D,L-Phenyllactat 0,00015 Phenylpyruvat 1,0 NH ₄ -Formiat	0,01	3,0	43	28	6790 D-HicDH 3020 730 L-HicDH 60860 PheDH	3 500	Produktion von L-Phenylalanin	[61]
Acylase/ PheDH/FDH	reduktive Aminierung Deacylierung	8,5	25	0,04–0,08 Acetamidozimtsäure 1,0 NH ₄ -Formiat	0,01	1,0	88	277	1170 Acylase 1775 L-PheDH 400 FDH	200 000	Produktion von L-Phenylalanin	[62]
NADK/AK/GlcDH	Phosphorylie-rung	6,0	25	0,09 Acetylphosphat 0,006 Glucose-6-phosphat, 0,004 NAD	0,01	3,3	46	32,9	30800 AK 71000 NADK 14600 GlcDH	1 800	Produktion von NADP(H)	[63]

Abkürzungen: AlaDH Alanindehydrogenase, AK Acetatkinase, FDH Formiatdehydrogenase, GlcDH Glucose-6-phosphatdehydrogenase, HicDH Hydroxyisocaproatdehydrogenase, LeuDH Leucindehydrogenase, NADK NAD-Kinase, NADP(H) β-Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, NAD β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid, PheDH Phenylalanindehydrogenase.

eine Optimierung der Cofaktorkonzentration wurden experimentell Zyklenzahlen von 600 000 erreicht [32].

4.2.3 Kontinuierliche enzymatische Peptid-Synthese

Am Beispiel der Synthese von Mal-Tyr-Arg-NH₂ wurde ein kontinuierliches Verfahren zur enzymatischen Peptid-Synthese entwickelt. Durch neue N-terminale Schutzgruppen konnte aufgrund der verbesserten Löslichkeit (bis zu 4 mol/l) der Substrate und der hohen Enzymaktivität eine Raum-Zeit-Ausbeute von 25,6 kg/(l d) erzielt werden [33].

4.2.4 Kontinuierliche Synthese von (R)-Cyanhydrinen

Enantiomerenreine Cyanhydrine sind vielseitig verwendbare Bausteine in der organischen Synthese. Als Modellreaktion wurde die durch das Enzym (R)-Oxynitrilase katalysierte enantioselektive Addition von Blausäure an Benzaldehyd untersucht. Um optisch reines Mandelsäurenitril

zu erhalten, muß die konkurrierende unspezifische Reaktion vollständig unterdrückt werden. Dies läßt sich durch Verwendung organischer Lösungsmittel erreichen, wobei das Enzym zur Verbesserung der Stabilität auf einem Träger immobilisiert werden muß [34]. Besonders effektiv gelingt die Unterdrückung, wenn man die Reaktion im Enzym-Membran-Reaktor unter Verwendung hoher Katalysator-Konzentrationen bei sehr kurzen Verweilzeiten durchführt. Bei einer Verweilzeit von nur 3,8 min konnte nach diesem Verfahren mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 2380 g/(l d) enantiomerenreines (R)-Mandelsäurenitril hergestellt werden [35, 36].

4.3 Ausblick

Die hier nur kurz vorgestellten Reaktionssysteme stehen stellvertretend für zahlreiche weitere, die in den Tab. 2 bis 4 aufgelistet sind bzw. zur Zeit von uns bearbeitet werden. Im Laufe der Jahre verlagerte sich dabei der Schwerpunkt von zunächst abbauenden (Acylase) über umbauende (Oxido-

reduktase) zu aufbauenden (C-N-Verknüpfung, C-C-Verknüpfung) Reaktionen. Weitere aktuelle Arbeiten beschäftigen sich mit dem Einsatz von Enzymen in organischen Lösungsmitteln zur Umsetzung von in Wasser schlecht löslichen Substraten sowie der Polymervergrößerung chiraler Auxiliare, die in der klassischen asymmetrischen Synthese der organischen Chemie verwendet werden. Dadurch soll das Konzept des Membranreaktors und seiner Vorteile in bezug auf die kontinuierliche Reaktionsführung auch für diese Reaktionen nutzbar gemacht werden. Für den Einsatz von Enzymen in organischen Lösungsmitteln ist als neue Variante die Immobilisierung in lyotropen Flüssigkristallen möglich, die zu einer deutlichen Verbesserung der Enzymstabilität führt [37, 38].

Bei all diesen Problemen sind die hier vorgestellten Methoden der Bioreaktionstechnik hilfreich. Sie schützen jedoch nicht vor unvorhergesehenen Problemen, wenn z.B. die verwendete Ultrafiltrationsmembran durch das hydrolytische Enzym, das eigentlich zurückgehalten werden soll, aufgelöst wird. Ebenso wurde bei den ersten Arbeiten mit Enzym-Membran-Reaktoren die mit der Zeit zunehmende Enzym- und Cofaktordesaktivierung aufgrund einer mikrobiellen Kontamination auch als „autokatalytischer Effekt bei der Zersetzung“ interpretiert. Hier ist sicherlich eine gewisse Erfahrung hilfreich, doch gilt gerade bei unerwarteten Problemen nach wie vor das von *Albert Einstein* stammende Zitat: „L'imagination est plus importante que le savoir.“

5 Membranreaktoren – weltweit

Ohne Anspruch auf Vollständigkeit soll die aufgeführte Literatur [64–107] die mögliche Anwendungsbreite und das Potential dieser Technik zum effektiven und kostengünstigen Einsatz von Enzymen als Katalysatoren in kontinuierlichen Prozessen dokumentieren. Eine Zusammenstellung der Systeme in Listenform kann bei den Autoren erhalten werden.

Die Autoren danken Frau Prof. Dr. M.-R. Kula, Institut für Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, für die Bereitstellung der Enzyme und des polymervergrößerten Cofaktors sowie dem Bundesministerium für Forschung und Technologie für die finanzielle Unterstützung.

Eingegangen am 24. Januar 1992 [B 5701]

Formelzeichen und Abkürzungen

FDH		Formiatdehydrogenase
For		Formiat
k_d	[d ⁻¹]	Desaktivierungskonstante
K_{eq}		Gleichgewichtskonstante (Einheit unterschiedlich)
K_i	[mol/l]	Inhibierungskonstante
K_m	[mol/l]	Michaelis-Menten-Konstante
LeuDH		Leucindehydrogenase
M_r	[g/mol]	Molmasse
Mal		Maleyl
NAD		Nicotin-adenin-dinucleotid
P		Produkt
PEG		Polyethylenglycol
PheDH		Phenylalanindehydrogenase
τ	[h]	Verweilzeit

S		Substrat
tLeu		L-tert-Leucin
TMPY		Trimethylpyruvat
v_1	[U/mg]	massenspezifische Aktivität der Synthese von L-tert-Leucin
v_2	[U/mg]	massenspezifische Aktivität der Regenerierung von NAD(H)
V_m	[U/mg]	maximale massenspezifische Aktivität
X_A	[-]	Umsatz der Komponente

Literatur

- [1] Elfderink, V. H. M.; Breitgoff, D.; Kloosterman, M.; Kamphuis, J.; van den Tweel, W. J. J.; Meijer, E. M.: *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* 110 (1991) S. 63/74.
- [2] Yamada, H.: persönliche Mitteilung 1991.
- [3] Yamada, H.; Shimizu, S.: *Angew. Chem.* 100 (1988) S. 640/661.
- [4] Davies, H. G.; Green, R. H.; Kelly, D. R.; Roberts, S. M.: *Biotransformations in Preparative Organic Chemistry: The Use of Isolated Enzymes and Whole Cell Systems in Synthesis*, Academic Press, London 1989.
- [5] Crout, D. H. G.; Christen, M.: *Mod. Synth. Methods* 5 (1989) S. 1/114.
- [6] Seebach, D.: *Angew. Chem.* 102 (1990) S. 1363/1409.
- [7] Gais, H.-J.; Hemmerle, H.: *Chem. Unserer Zeit* 24 (1990) S. 239/248.
- [8] Leuenberger, H. G. W.: *Pure Appl. Chem.* 62 (1990) S. 753/768.
- [9] Gerhartz, W.: *Enzymes in Industry: Production and Applications*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1990.
- [10] Chibata, I.: *Immobilized enzymes*, A Halsted Press Book, Kodansha Ltd., Tokyo, J. Wiley, New York 1978.
- [11] Wandrey, C.: *Continuous Homogeneous Catalysis in Enzyme Engineering*, in: *Biochemical Engineering 1* (Ed. Vieth, Venkatasubramanian, Constantinides), Vol. 326, S. 87/96, Ann. N.Y. Acad. Sci. 1979.
- [12] Flaschel, E.; Wandrey, C.; Kula, M.-R.: *Ultrafiltration for the Separation of Biocatalysts*, in: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol. 26, S. 73/142, Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg – New York 1983.
- [13] Wandrey, C.: *The Growing Importance of Biochemical Engineering*, in: *Biochemical Engineering* (Ed. Chmiel, Hammes, Bailey), S. 43/68, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1987.
- [14] Bednarski, M. D.; Chenault, H. K.; Simon, E. S.; Whitesides, G. M.: *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) S. 1283/1285.
- [15] Schmidt-Kastner, G., in: *Bioreaktoren*, 2. BMFT-Statusseminar Bioverfahrenstechnik, Jülich, S. 63, Bundesministerium für Forschung und Technologie, Bonn 1987.
- [16] Yamane, T.; Hoq, M. M.; Shimizu, S.: *Continuous Hydrolysis of Olive Oil by Lipase in Microporous Hydrophobic Membrane Bioreactor*, in: *Enzyme Engineering 8* (Ed. Laskin, Mosbach, Thomas, Wingard), Vol. 501, S. 224/228, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987.
- [17] Wandrey, C.; Bossow, B.: *Biotechnol. Bioind.* 3 (1986) S. 8/13.
- [18] Bückmann, A. F.; Kula, M.-R.; Wichmann, R.; Wandrey, C.: *J. Appl. Biochem.* 3 (1981) S. 301/315.
- [19] Wandrey, C.; Wichmann, R.: *Coenzyme Regeneration in Membrane Reactors*, in: *Enzymes and Immobilized Cells in Biotechnology* (Ed. Laskin), S. 177/208, Benjamin/Cummings Publ. Co. Inc., Menlo Park 1985.
- [20] Kula, M.-R.; Wandrey, C.: *Continuous Enzymatic Transformation in an Enzyme Membrane Reactor with Simultaneous NADH Regeneration*, in: *Methods in Enzymology* Vol. 136, S. 9/21, Academic Press Inc., New York 1987.
- [21] Tichy, S.; Vasic-Racki, D.; Wandrey, C.: *Chem. Biochem. Eng. Q.* 4 (1990) S. 127/135.
- [22] Flaschel, E.; Raetz, E.; Renken, A.: *International Conference of Bioreactor and Fluid Dynamic*, Cranfield/Bedford 1986, S. 173/180.

- [23] Schmid, R. D.: Stabilized Soluble Enzymes, in: *Advances in Biochemical Engineering* (Ed. Ghose, Fiechter, Blakebrough), Vol. 19, S. 41/118, Springer-Verlag, Berlin 1979.
- [24] Hartmeier, W.: *Immobilisierte Biokatalysatoren*, Springer-Verlag, Berlin 1986.
- [25] Zurmühl, R.: *Praktische Mathematik für Ingenieure und Physiker*, Springer-Verlag, Berlin 1986.
- [26] Ikemi, M.; Ishimatsu, Y.; Kise, S.: *Biotechnol. Bioeng.* 36 (1990) S. 155/165.
- [27] Howaldt, M.; Gottlob, A.; Kulbe, K. D.; Chmiel, H.: Simultaneous Conversion of Glucose/Fructose Mixtures in a Membrane Reactor, in: *Enzyme Engineering* 9, Vol. 542, S. 400/405, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1988.
- [28] Nakamura, K.; Aizawa, M.; Miyawaki, O.: *Electro-Enzymology Coenzyme Regeneration*, S. 136/153, Springer-Verlag, Berlin 1988.
- [29] Ryabov, A. D.: *Angew. Chem.* 103 (1991) S. 945/955.
- [30] Wandrey, C.; Flaschel, E.; Schügerl, K.: *Biotechnol. Bioeng.* 21 (1979) S. 1649/1670.
- [31] Wandrey, C.: Macrokinetics and Reactor Design for the Industrial Application of Enzymes in L-Amino Acid Production, in: *Enzyme Engineering* Vol. 3, (Ed. Pye, Weetall), S. 509/517, Plenum Publ. Corp., New York 1978.
- [32] Hummel, W.; Schütte, H.; Schmidt, E.; Wandrey, C.; Kula, M.-R.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26 (1987) S. 409/416.
- [33] Fischer, A.; Schwarz, A.; Wandrey, C.; Bommarius, A. S.; Knaup, G.; Drauz, K.: *Biomed. Biochim. Acta* 50 (1991) S. 169/174.
- [34] Effenberger, F.; Ziegler, T.; Förster, S.: *Angew. Chem.* 99 (1987) S. 491/493.
- [35] Kragl, U.; Niedermeyer, U.; Kula, M.-R.; Wandrey, C.: Engineering Aspects of Enzyme Engineering – Continuous Asymmetric C-C-Bond Formation in an Enzyme Membrane Reactor, in: *Enzyme Engineering* 10 (Ed. Okada, Tanaka, Blanch), Vol. 613, S. 167/175, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1990.
- [36] Niedermeyer, U.; Kula, M.-R.: *Angew. Chem.* 102 (1990) S. 423/425.
- [37] Miethe, P.; Gruber, R.; Voss, H.: *Biotechnol. Letters* 11 (1989) S. 449/454.
- [38] Miethe, P.; Jansen, I.; Kula, M.-R.; Wandrey, C.; Mohr, K.-H.; Niedermeyer, U.; Kragl, U.: *Biocatalysis* (1992), in press.
- [39] Schütz, H. J.: Dissertation, Univ. Bonn 1988.
- [40] Bastin, K.: Diplomarbeit, TU Clausthal-Zellerfeld 1979.
- [41] Bossow, B.: Dissertation, Univ. Bonn 1989.
- [42] Bossow-Berke, B.; Berke, W.; Wandrey, C.: *Bioengineering* (1992) Nr. 1, S. 12/19.
- [43] Jandel, A.-S.; Hustedt, H.; Wandrey, C.: *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 15 (1982) S. 59/63.
- [44] Ziehr, H.; Kula, M.-R.; Schmidt, E.; Wandrey, C.; Klein, J.: *Biotechnol. Bioeng.* 29 (1987) S. 482/487.
- [45] Wandrey, C.: unveröffentlichte Ergebnisse.
- [46] Flörsheimer, A.; Kula, M.-R.; Schütz, H.-J.; Wandrey, C.: *Biotechnol. Bioeng.* 33 (1989) S. 1400/1405.
- [47] Herrmann, G.; Schwarz, A.; Wandrey, C.; Kula, M.-R.; Knaup, G.; Drauz, K. H.; Berndt, H.: *Appl. Biochem.* 13 (1991) S. 346/353.
- [48] Schwarz, A.: Dissertation, Univ. Bonn 1991.
- [49] Schütz, H. J.: Dissertation, Univ. Bonn 1988.
- [50] Wichmann, R.; Wandrey, C.; Bückmann, A. F.; Kula, M.-R.: *Biotechnol. Bioeng.* 23 (1981) S. 2789/2802.
- [51] Oshima, T.; Wandrey, C.; Kula, M.-R.; Soda, K.: *Biotechnol. Bioeng.* 27 (1985) S. 1616/1618.
- [52] Wichmann, R.; Wandrey, C.; Hummel, W.; Schütte, H.; Bückmann, A. F.; Kula, M.-R.: Enzymatic Production of Optically Active 2-Hydroxy Acids, in: *Enzyme Engineering* 7 (Ed. Laskin, Tsao, Wingard), Vol. 434, S. 87/90, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1984.
- [53] Vasic-Racki, D.; Jonas, M.; Wandrey, C.; Hummel, W.; Kula, M.-R.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31 (1989) S. 215/222.
- [54] Pabsch, K.; Petersen, M.; Rao, N. N.; Alfermann, A. W.; Wandrey, C.: *Rec. Trav. Chim. Pay-Bas* 110 (1991) S. 199/205.
- [55] Berke, W.; Schütz, H. J.; Wandrey, C.; Morr, M.; Denda, G.; Kula, M.-R.: *Biotechnol. Bioeng.* 32 (1988) S. 130/139.
- [56] Gyax, D.; Nachtegaal, H.; Ghisalpa, O.; Lattmann, R.; Schär, H.-P.; Wandrey, C.; Streiff, M. B.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32 (1990) S. 621/626.
- [57] Kragl, U.; Gyax, D.; Ghisalpa, O.; Wandrey, C.: *Angew. Chem.* 103 (1991) S. 854/855.
- [58] Nakajima, N.; Conrad, D.; Sumi, H.; Suzuki, K.; Esaki, N.; Wandrey, C.; Soda, K.: *J. Ferment. Bioeng.* 70 (1990) S. 322/325.
- [59] Bossow, B.; Wandrey, C.: Continuous Enzymatically Catalyzed Production of L-Leucine from the Corresponding Racemic Hydroxy Acid, in: *Biochemical Engineering* 5, Vol. 506, S. 325/336, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987.
- [60] Wandrey, C.; Fiolitis, E.; Wichmann, U.; Kula, M.-R.: L-Amino Acids from a Racemic Mixture of α -Hydroxy-Acids, in: *Enzyme Engineering* 7, Vol. 434, S. 91/94, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1984.
- [61] Schmidt, E.; Vasic-Racki, D.; Wandrey, C.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26 (1987) S. 42/48.
- [62] Schmidt, E.; Hummel, W.; Wandrey, C.: Continuous Production of L-Phenylalanine from Acetamido Cinnamic Acid Using the Three Enzyme System Acylase/L-PheDH/FDH, *Proceedings of 4th European Congress of Biotechnology*, Vol. 2, (1987) S. 189/191.
- [63] Schütz, H. J.; Kula, M.-R.; Wandrey, C.; Siefert, E.; Schütte, A.: *Biotech-Forum* 3 (1986) S. 98/102.
- [64] Butterworth, T. A.; Wang, D. I.; Sinskey, A. J.: *Biotechnol. Bioeng.* 12 (1970) S. 615/631.
- [65] Darnoko, D.; Cheryan, M.; Artz, W. E.: *Enzyme Microbiol. Technol.* 11 (1989) S. 154/159.
- [66] Ryu, D. R.; Bruno, C. F.; Lee, B. K.; Venkatasubramanian, K.: Microbial Penicillin Amidohydrolase and the Performance of a Continuous Enzyme Reactor System, in: *Fermentation Technology Today*, S. 307/314, *Proceedings of the International Fermentation Symposium*, Kyoto 1972.
- [67] Boudrant, J.; Cheftel, C.: *Biochimie* 55 (1973) S. 413/420.
- [68] Greco, A.; Alfani, F.; Iorio, G.; Cantarella, M.; Formisano, A.; Gianfreda, L.; Palescandolo, R.; Scardi, V.: *Biotechnol. Bioeng.* 21 (1979) S. 1421/1438.
- [69] Bowski, L.; Shah, P. M.; Ryu, D. R.; Vieth, W. R.: *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 3 (1972) S. 229/239.
- [70] Deeslie, W. D.; Cheryan, M.: *Biotechnol. Bioeng.* 23 (1981) S. 2257/2271.
- [71] Cheryan, M.; Deeslie, W. D.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60 (1983) S. 1112/1115.
- [72] Ohlson, I.; Traegardh, G.; Hahn-Hagerdal, B.: *Biotechnol. Bioeng.* 26 (1984) S. 647/653.
- [73] Frennsson, I.; Traegardh, G.; Hahn-Hagerdal, B.: *Biotechnol. Bioeng.* 27 (1985) S. 1328/1334.
- [74] Kinoshita, S.; Chua, J. W.; Kato, N.; Yoshida, T.; Taguchi, H.: *Microbiol. Technol.* 8 (1986) S. 691/695.
- [75] Henley, R. G.; Yang, R. Y. K.; Greenfield, P. F.: *Enzyme Microbiol. Technol.* 2 (1980) S. 206/208.
- [76] Bressolier, P.; Petit, J. M.; Julien, R.: *Biotechnol. Bioeng.* 31 (1988) S. 650/658.
- [77] Hong, J.; Tsao, G. T.; Wankot, P. C.: *Biotechnol. Bioeng.* 23 (1981) S. 1501/1516.
- [78] Azhar, A.; Hamdy, M. K.: *Biotechnol. Bioeng.* 23 (1981) S. 1297/1307.
- [79] Roger, L.; Manbois, J. L.; Thapon, J. L.; Brule, G.: *Ann. Nutr. Alim.* 32 (1978) S. 657/669.
- [80] Blatt, W. F.; Hudson, B. G.; Robinson, S. M.; Zipilivan, E. M.: *Anal. Biochem.* 22 (1968) S. 161/165.
- [81] Flaschel, E.; Raetz, E.; Renken, A.: Development of a Tubular Recycle Membrane Reactor for Continuous Operation with Soluble Enzymes, in: *Enzyme Technology*, 3rd Rothenburg Fermentation Symposium 1982, S. 285/295 (1983).
- [82] Roger, L.; Thapon, J. L.; Maubois, J. L.; Brule, G.: *Lait* 56 (1976) S. 551/557.
- [83] Schmidt-Kastner, G.: Bioreactor-Production of Bioproducts and Biotransformation by Enzymes and Immobilized Enzymes, in: *Biochemical Engineering* (Ed. Chmiel, Hammes, Bailey), S. 111/131, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1987.
- [84] Boudrant, J.; Cheftel, C.: *Biotechnol. Bioeng.* 18 (1976) S. 1735/1749.

- [85] *Scheper, T.; Halwachs, W.; Schügerl, K.*: Chem.-Ing.-Tech. 54 (1982) S. 696/697.
- [86] *Scheper, T.; Halwachs, W.; Schügerl, K.*: Chem. Eng. J. 29 (1984) S. B31/B37.
- [87] *Yamazaki, Y.; Maeda, H.; Suzuki, H.*: Biotechnol. Bioeng. 18 (1976) S. 1761/1775.
- [88] *Miyawaki, O.; Nakamura, K.; Yano, T.*: J. Chem. Eng. Jpn. 15 (1982) S. 142/147.
- [89] *Miyawaki, O.; Nakamura, K.; Yano, T.*: J. Chem. Eng. Jpn. 15 (1982) S. 224/288.
- [90] *Katayama, N.; Urabe, I.; Okada, H.*: Eur. J. Biochem. 132 (1983) S. 403/409.
- [91] *Hayakawa, K.; Urabe, I.; Okada, H.*: J. Ferment. Technol. 63 (1985) S. 245/250.
- [92] *Nakamura, A.; Minami, H.; Urabe, I.; Okada, H.*: J. Ferment. Technol. 66 (1988) S. 267/272.
- [93] *Howaldt, M.; Kulbe, K. D.; Chmiel, H.*: Minimizing Enzyme Requirement by Choice of Appropriate Reactor Type, in: Biochemical Engineering 5, Vol. 506, S. 669/675, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987.
- [94] *Howaldt, M.; Kulbe, K. D.; Chmiel, H.*: Optimization of Performance of an Enzyme Membrane Reactor. Computer Simulation and Experimental Results, in: Biochemical Engineering (Ed. Chmiel, Hammes, Bailey), S. 402/406, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1987.
- [95] *Kulbe, K. D.; Schwab, U.; Howaldt, M.*: Conjugated NAD(H)-Dependent Dehydrogenases for the Continuous Production of Mannitol and Gluconic Acid from Glucose-Fructose Mixtures in a Membrane Reactor, in: Enzyme Engineering 8, Vol. 501, S. 216/223, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987.
- [96] *Kulbe, K. D.; Heinzler, A.; Schmidt, K.; Chmiel, H.*: Charged Membrane Enzyme Reactors for Continuous Regeneration of Native Coenzymes. I. Processing Technique for NAD(P), Regeneration and Retention in Aqueous Systems, in: DECHEMA, Biotechnol. Conf., Vol. 3, Part B, S. 719/722, Frankfurt/M. 1989.
- [97] *Fink, D. J.; Rodwell, V. W.*: Biotechnol. Bioeng. 17 (1975) S. 1029/1050.
- [98] *Röthig, T. R.; Schmidt, K.; Chmiel, H.; Hasenfratz, H.; Kulbe, K. D.*: Charged Membrane Enzyme Reactors for Continuous Regeneration of Native Coenzymes. II. Synthesis of Hydrophobic Compounds with NADP(H)-Dependent Dehydrogenases, in: DECHEMA Biotechnol. Conf., Vol. 3, S. 643/647, Frankfurt/M. 1989.
- [99] *Howaldt, M. W.; Kulbe, K. D.; Chmiel, H.*: A Continuous Enzyme Membrane Reactor Retaining the Native Nicotinamide Cofactor NAD(H), in: Biochemical Engineering 6, Vol. 589, S. 253/260, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1990.
- [100] *Kulbe, K. D.; Howaldt, M. W.; Schmidt, K.; Röthig, T. R.; Chmiel, H.*: Rejection and Continuous Regeneration of the Native Coenzyme NADP(H) in a Charged Ultrafiltration Membrane Enzyme Reactor, in: Enzyme Engineering 10, Vol. 613, S. 820/827, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1990.
- [101] *Makryaleas, K.; Scheper, T.; Schügerl, K.; Kula, M.-R.*: Chem.-Ing.-Tech. 57 (1985) S. 362/363.
- [102] *Ikemi, M.; Koizumi, N.; Ishimatsu, Y.*: Biotechnol. Bioeng. 36 (1990) S. 149/154.
- [103] *Ikemi, M.; Ishimatsu, Y.*: J. Biotechnol. 14 (1990) S. 211/220.
- [104] *Kise, S.; Hayashida, M.*: J. Biotechnol. 14 (1990) S. 221/228.
- [105] *Peters, J.; Kula, M.-R.*: Biotechnol. Appl. Biochem. 13 (1991) S. 363/370.
- [106] *Schmidt, E.; Ghisalba, O.; Gyax, D.; Sedelmeier, G.*: J. Biotech. (1992), in press.
- [107] *Lee, C. K.; Hong, J.*: Biotechnol. Bioeng. 32 (1988) S. 647/654.

Neuerscheinungen

Die im folgenden angezeigten Bücher sind der Redaktion zugesandt worden. Nur für einen Teil dieser Werke können Rezensionen erscheinen, da die Seitenzahl, die für den Abdruck von Buchbesprechungen zur Verfügung steht, begrenzt ist.

Structure-Activity and Selectivity Relationships in Heterogeneous Catalysis. Studies in Surface and Catalysis 67. Herausgeg. von R. K. Grasselli und A. W. Sleight. Elsevier Science Publishers, Amsterdam – New York 1991. X, 364 S., zahlr. Abb. u. Tab., geb., US-\$ 180.-. – ISBN 0-444-88942-6.

Advances in Measurement and Control of Colloidal Processes. Von R. A. Williams und N. C. de Jaeger. Butterworth-Heinemann, Oxford 1991. X, 442 S., zahlr. Abb. u. Tab., geb., £ 40.-. – ISBN 0-7506-1177-4.

TA Abfall, Rehm-Textausgabe, 1. Teil. Von R. Henselder-Ludwig. Verlag Franz Rehm, München 1991. XX, 131 S., kart., DM 22,80. – ISBN 3-8073-0846-0.

Luftreinhaltung – Leitfaden zur kontinuierlichen Emissionsüberwachung – Berichte 11/90. Herausgeg. vom Umweltbundesamt. Erich Schmidt Verlag, Berlin – Bielefeld – München 1990.

4. Aufl., VI, 194 S., DIN A4, kart., DM 56.-. – ISBN 3-503-03198-7.

Computeranwendungen in der Chemischen Reaktionstechnik. Von E. Müller-Erlwein (Reihe Datenverarbeitung in den Naturwissenschaften. Herausgeg. von C. Bliefert und J. Kwiatkowski). VCH, Weinheim – New York – Basel – Cambridge 1991. XII, 440 S., zahlr. Abb., geb., DM 148,-. – ISBN 3-527-28267-X.

Corrosion Handbook, Vol. 8: Sulfuric Acid. Herausgeg. im Auftrag der DECHEMA von D. Behrens. VCH, Weinheim – New York – Basel – Cambridge 1991. IX, 283 S., 264 Abb., 166 Tab., geb., Subskriptionspreis DM 645,-; endgült. Preis DM 775,-. – ISBN 3-527-26659-3.

Berechnung des Betriebsverhaltens von Rohrleitungsflanschverbindungen. Von H. Schwind und W. Kämpkes. Vulkan Verlag, Essen 1990. VII, 91 S., zahlr. Abb. u. Tab., geb., DM 78,-. – ISBN 3-8027-2665-0.

Lagerung gefährlicher Güter in der Europäischen Gemeinschaft. Von P. Schmitt. Verlag TÜV Rheinland, Köln 1991. 96 S., geb., DM 78,-. – ISBN 3-8249-0017-3.

Size Enlargement by Agglomeration. Von W. Pietsch. Wiley & Sons, Chichester – New York 1991. XI, 532 S., zahlr. Abb. u. Tab., geb., £ 85,-. – ISBN 0-4719-2991-3.