



Institut für Biotechnologie

Verfahrensentwicklung zur Darstellung von (2*R*,5*R*)-Hexandiol mit *Lactobacillus* *kefir* DSM20587

Jürgen Haberland

Verfahrensentwicklung zur Darstellung von (2*R*,5*R*)-Hexandiol mit *Lactobacillus* *kefir* DSM20587

Jürgen Haberland

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 4059

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie Jül-4059

D 5 (Diss., Bonn, Univ., 2003)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461/61-5220 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Zusammenfassung der Dissertation von Jürgen Haberland

Verfahrensentwicklung zur Darstellung von (2*R*,5*R*)-Hexandiol mit *Lactobacillus kefir* DSM20587

Die Reduktion von (2,5)-Hexandion zu (2*R*,5*R*)-Hexandiol mit ruhenden, ganzen Zellen von *Lactobacillus kefir* DSM20587 wurde als Modellreaktion mit industriellem Hintergrund untersucht. Das enantiomerenreine Diol wird für die Synthese von DuPhos, einem chiralen Liganden, welcher bei homogen Hydrierungen eingesetzt wird, verwendet. Zunächst wurden sowohl die Kinetik, als auch die Stöchiometrie der Reaktion untersucht. Im Zuge der Untersuchungen zur Stöchiometrie der Reaktion konnten alle auftretenden extrazellulären Metabolite identifiziert und quantifiziert werden.

In Fed-Batch Experimenten konnte (2*R*,5*R*)-Hexandiol enantiomerenrein mit einer chemischen Selektivität von 93% dargestellt werden. Um ein Verfahren zur Synthese von kg-Mengen zur Verfügung zu stellen, wurde ein kontinuierlich betriebener Rührkessel (CSTR) mit Zellrückhaltung etabliert und charakterisiert.

Dieser wurde im 2-L Maßstab betrieben, so daß im Hinblick auf eine Kommerzialisierung bereits kg-Mengen von (2*R*,5*R*)-Hexandiol im Rahmen dieser Arbeit produziert werden konnten. Dabei konnte eine Raum-Zeit-Ausbeute von $64 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ erzielt werden. Ergänzt wurde der CSTR durch eine angekoppelte Flüssig-Flüssig-Gegenstromextraktion. Diese Gegenstromextraktion wurde mit Ethylacetat als Extraktionsmittel betrieben und lieferte eine Extraktionsleistung von über 90%. Das Produkt sammelte sich im Sumpf der Destillation, so daß hier chargenweise nur noch das Ethylacetat abgetrennt werden mußte, um das Produkt zu kristallisieren. Neben der Flüssig-Flüssig-Extraktion wurden auch andere Aufarbeitungsverfahren auf ihre Einsatzfähigkeit untersucht.

Die Ergebnisse aus der Synthese von (2*R*,5*R*)-Hexandiol wurden auf ein anderes Substrat bzw. einen anderen Biokatalysator übertragen. So konnte in einem weiteren kontinuierlichen Experiment 2-Oktanon stereospezifisch zu (2*R*)-Oktanol reduziert werden. Hierbei wurde eine Raum-Zeit-Ausbeute von $42,4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ erreicht werden. Durch Einsatz von Bäckerhefe konnte mit der gleichen Technik unter aeroben Bedingungen 3-Oxobuttersäureethylester zu (3*S*)-Hydroxybuttersäureethylester reduziert werden. Bei dieser Reduktion konnte ein Enantiomerenüberschuß von >95% und eine Raum-Zeit-Ausbeute von $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ erreicht werden.

Zusammenfassung der Dissertation von Jürgen Haberland

Process Development for the synthesis of (2*R*,5*R*)-hexanediol With *Lactobacillus kefir* DSM20587

The reduction of (2,5)-hexanedion to (2*R*,5*R*)-hexanediol with resting whole cells of *Lactobacillus kefir* DSM20587 was investigated as model reaction with a industrial background. The enantiopure diol is used for the synthesis of the chiral ligand DuPhos, which is used in homogeneous hydrogenation reactions. At first the kinetics and the stoichiometry of the reaction was investigated. Within the investigations of the stoichiometry of the reaction all extracellular metabolites were identified and quantified.

In fed-batch experiments (2*R*,5*R*)-hexanediol was produced enantiopure with a purity of 93%. To obtain a synthesis to produce kg quantities a continuous stirred tank reactor (CSTR) with cell retention was established and characterized.

The CSTR was run in 2-L scale and to look forward to a commercially used process kg quantities of (2*R*,5*R*)-hexanediol were produced during the practical work of this thesis. A space-time yield of $64 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ was achieved. The CSTR was completed by a coupled online liquid-liquid-extraction. As solvent for the extraction ethyl acetate was used. The extraction efficiency was >90%. The product was collected at the bottom of the distillation column. The ethyl acetate was removed batchwise to crystallize the product. Besides the liquid-liquid-extraction other methods for downstream processing were tested.

The results of the synthesis of (2*R*,5*R*)-hexanediol were transferred to another product and another biocatalyst. In an additional continuous experiment 2-octanone was stereospecifically reduced to (2*R*)-octanol. A space-time-yield of $42,4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ was achieved for this reaction. With the use of baker's yeast and the same continuous setup 3-oxobutyric acid ethylester was reduced to (3*S*)-hydroxybutyric acid ethylester under aerobic conditions. For this reduction an enantiomeric excess of >95% and a space-time-yield of $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ was achieved.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Chiralität	1
1.2	Chirale Diole	2
1.2.1	Allgemein	2
1.2.2	Modellreaktion	3
1.2.3	(2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-Hexandiol	4
1.2.4	Technische Verfahren	6
1.3	Ganzzellbiotransformation	8
1.3.1	GVOs	11
1.3.2	Fermentation	11
1.3.3	Mikrobielle Transformation	12
1.3.4	“Kombinationsverfahren“	13
1.4	Milchsäurebakterien	14
1.4.1	<i>Lactobacillus kefir</i>	15
1.4.2	Alkoholdehydrogenase aus <i>L. kefir</i>	18
1.5	Kofaktorregenerierung	19
2	Aufgabenstellung	21
3	Systemuntersuchungen	23
3.1	Einführung	23
3.2	Bereitstellung des Biokatalysators	23
3.3	Metabolite	26
3.4	Allgemeine Definitionen	27
3.5	Kinetische und Thermodynamische Untersuchungen	29
3.5.1	Allgemeine Parameter	29
3.5.2	Verhältnis von Kosubstrat und Substrat	30
3.5.3	Einfluß des pH-Wertes	30
3.5.4	Einfluß der Temperatur	32
3.5.5	Zwischenbilanz	33
3.5.6	Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten	33
3.5.7	Inhibierungen durch Substrat oder Produkte	37
3.5.8	Zwischenbilanz	43

3.6	Inhibierungen im Stoffwechsel	43
3.7	Stöchiometrie	47
3.7.1	Mathematische Grundlagen	47
3.7.2	Ergebnisse	51
3.7.3	Redoxäquivalente	55
3.7.4	Zwischenbilanz	56
3.8	Enantiomerenüberschuß von Lactat	56
3.9	Kapitelzusammenfassung	56
4	Produktion	59
4.1	Einführung	59
4.2	Fed-Batch Produktion	60
4.2.1	Versuchsaufbau	60
4.2.2	Ergebnisse	61
4.2.3	Zwischenbilanz	65
4.3	Kontinuierliche Produktion	67
4.3.1	Reaktoraufbau	67
4.3.2	Verweilzeitverteilung	69
4.3.3	Kontinuierliche Experimente	73
4.3.4	Proteine	85
4.3.5	Zellen nach neuem Fermentationsprotokoll	88
4.3.6	Zwischenbilanz	90
4.4	Übertragbarkeit	92
4.4.1	2-Oktanon	92
4.4.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	94
5	Aufarbeitung	99
5.1	Sprühtrocknung	99
5.2	Fest-Flüssig-Extraktion	100
5.2.1	Prinzip	100
5.2.2	Phasen und Eluenten	101
5.2.3	Anwendung	102
5.2.4	Ergebnis	104
5.3	Flüssig-Flüssig-Extraktion	105
5.3.1	Prinzip	105
5.3.2	Verteilungskoeffizienten	106
5.3.3	Kontinuierliche Extraktion	108
5.3.4	Destillation	114
5.3.5	Evaporation und Kristallisation	116
5.3.6	Kopplung	117
5.4	Zwischenbilanz	117

6	Diskussion und Ausblick	121
6.1	Reaktion	121
6.1.1	Potential	121
6.1.2	Biokatalysator	122
6.1.3	Systemparameter	123
6.2	Kontinuierliche Produktion	123
6.2.1	mit <i>L. kefir</i>	123
6.2.2	mit <i>S. cerevisiae</i>	124
6.2.3	Produktivität	125
6.3	Aufarbeitung	125
6.4	Kostenvergleich des Verfahrens	126
7	Zusammenfassung	131
8	Material und Methoden	135
8.1	Material	135
8.1.1	Geräte	135
8.1.2	Chemikalien	137
8.2	Methoden	139
8.2.1	Fermentationsprotokoll zur Biomassegewinnung	139
8.2.2	Assay zur Aktivitätsbestimmung	139
8.2.3	Protokoll zur Bestimmung der Stöchiometrie	141
8.2.4	Protokoll für FedBatchversuche	141
8.2.5	Protokoll zum Betrieb eines CSTR mit <i>L. kefir</i>	142
8.2.6	Protokoll zum Betrieb eines CSTR mit <i>S. cerevisiae</i>	143
8.3	Analytische Methoden	143
8.3.1	Bestimmung der optischen Dichte	143
8.3.2	Bestimmung der Biotrockenmasse	144
8.3.3	Proteinbestimmung nach Bradford	144
8.3.4	Gaschromatographie	145
8.3.5	HPLC	147

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

1.1	Exemplarische Verwendungsmöglichkeiten von Diolen	3
1.2	Übersicht der literaturbeschriebenen Methoden zur Herstellung von (2 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)- oder (2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-Hexandiol	7
1.3	Eigenschaften mikrobieller Transformationen und Fermentationen	9
1.4	Beispiele für die verschiedenen Typen von Ganzzellbiotransformationen	10
1.5	Taxonomische Einordnung von <i>L. kefir</i>	16
1.6	Anzahl der Literaturzitate für verschiedene <i>Lactobacillus</i> species .	17
1.7	Kosten der Kofaktoren	19
3.1	Zusammensetzung und Kosten der Ingredienzen des verwendeten MRS-Mediums	24
3.2	Identifizierte extrazelluläre Metabolite.	27
3.3	Kinetische Parameter für die erste Teilreaktion	38
3.4	Kinetische Parameter für die zweite Teilreaktion	41
3.5	Produktionsraten während eines Pulsversuchs	46
3.6	“Degree of Reduction“ für die ermittelten Metabolite.	50
3.7	Produktions- und Verbrauchsdaten während einer Batch/Fed-Batch Biotransformation	54
4.1	Parameter der Fed-Batch-Experimente.	61
4.2	Momente der Verweilzeitverteilung.	71
4.3	Parameter der Verweilzeitverteilung.	73
4.4	Daten der verschiedenen Betriebspunkte	77
4.5	Extrazelluläre Proteinmenge während einer Biotransformation . .	85
5.1	Beladungskapazitäten ausgewählter XAD-Harze	102
5.2	Extraktionsgrad für verschiedene Lösungsmittel	106
5.3	Kolonnenparameter	108
5.4	Parameter der verschiedenen Säulenpackungen.	113
6.1	Kostenvergleich der beiden Verfahren	128

Tabellenverzeichnis

8.3	Medienzusammensetzung (MRS-Medium) für die Fermentation von <i>L.kefir</i>	139
8.4	GC-Methode zur Umsatzbestimmung	145
8.5	Retentionszeiten der Umsatzbestimmung	146
8.6	GC-Methode zur Enantioselektivitätsbestimmung	148
8.7	Retentionszeiten der Selektivitätsbestimmung	148
8.8	HPLC-Methode zur organische Säuren/Zucker-Analytik	149
8.9	Retentionszeiten der HPLC-Bestimmung	150

Abbildungsverzeichnis

1.1	1 Chiralitätszentrum	1
1.2	2 Chiralitätszentren	2
1.3	Synthese von (2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-Hexandiol mit ruhenden Zellen von <i>Lactobacillus kefir</i> DSM 20587	3
1.4	Unterschiedliche Folgechemie der Produkte	4
1.5	Exemplarische Ligandensynthese von Me-DuPhos und Me-BPE	4
1.6	Synthese von α -Aminosäuren mit DuPhos	5
1.7	Chirale Auxiliare basierend auf (2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-Hexandiol	5
1.8	Zugang zu beiden Enantiomeren von (2,5)-Hexandiol ausgehend von (2,5)-Hexandion durch Ganzzellbiotransformation	5
1.9	Überholtes Produktionsverfahren	6
1.10	Aktuelles Produktionsverfahren	8
1.11	Fermentation versus Ganzzellbiotransformation	9
1.12	Produktivitätsverbesserung durch gentechnische Optimierung	11
1.13	Beispiel einer kontinuierlichen mikrobiellen Transformation	13
1.14	Beispiel für ein "Kombinations"-Verfahren.	14
1.15	Postulierter Stoffwechsel für <i>L. kefir</i>	18
1.16	Standardreaktion für die ADH aus <i>L. kefir</i>	18
1.17	Prinzipien der Regenerierung von NADPH.	20
2.1	Ganzzellbiotransformation von (2,5)-Hexandion mit <i>Lactobacillus kefir</i> DSM 20587	21
3.1	Fermentationsstrategie zur Produktion von <i>L. kefir</i>	24
3.2	Fermentation von <i>Lactobacillus kefir</i> DSM20587	25
3.3	Fermentation von <i>Lactobacillus kefir</i> DSM20587	26
3.4	Mögliche Metabolite	26
3.5	Untersuchtes Gesamtreaktionssystem.	27
3.6	OD _{660nm} , BTM und Zellzahl	29
3.7	Einfluß von verschiedenen Verhältnissen von Kosubstrat zu Substrat.	31
3.8	Einfluß von verschiedenen Verhältnissen von Kosubstrat zu Substrat bei Einsatz von Bäckerhefe.	31
3.9	Abhängigkeit der Aktivität von der Temperatur.	32
3.10	Folgereaktion	33

3.11	Formalkinetische Betrachtung	34
3.12	Bereich der Reaktion 1. Ordnung in der Michaelis-Menten Kurve	35
3.13	Ermittlung von k_1 durch lineare Regression.	36
3.14	Modellierung des Batches aus Abbildung 3.11.	36
3.15	Abhängigkeit der Aktivität von der Konzentration an (2,5)- Hexandion.	37
3.16	Batchverlauf mit Rückreaktion.	39
3.17	Abhängigkeit der Aktivität von der Konzentration an (2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)- Hexandiol.	39
3.18	Abhängigkeit der Aktivität von der Konzentration an (5 <i>R</i>)- Hydroxyhexan-2-on.	40
3.19	Batchverlauf mit Rückreaktion.	42
3.20	Beobachtete Reaktionen unter Anfangsreaktionsgeschwindigkeits- bedingungen	42
3.21	Angenommene Inhibierung durch NADPH	43
3.22	Pulsexperiment - Reduktion	44
3.23	Pulsexperiment - Metabolite	45
3.24	Postulierter Stoffwechsel für <i>L. kefir</i>	46
3.25	Apparativer Aufbau zur Bestimmung der Stöchiometrie	47
3.26	Gesamtreaktionssystem	48
3.27	Verlauf der Reduktionsreaktion.	51
3.28	Verlauf der Reduktionsreaktion.	52
3.29	Bildung der aus Glucose gebildeten Metabolite.	53
3.30	Elektronen- und Kohlenstoffbilanz als Funktion der Zeit	54
4.1	Zielprodukt des technischen Prozesses.	59
4.2	Versuchsaufbau für Fed-Batch Experimente.	61
4.3	Einfluß verschiedener Dosierraten.	62
4.4	Spezifische Aktivitäten $q_{\Sigma^t_{<OH>}}$ für die Fed-Batche A-C.	63
4.5	Selektivität als Funktion der <i>fsbc</i>	64
4.6	Ausbeute und Selektivität als Funktion des Umsatzes.	64
4.7	Umsatz und Ausbeute als Funktion der <i>fsbc</i>	65
4.8	Kontinuierlicher Reaktor	68
4.9	Messung der Verweilzeitverteilung	70
4.10	Kontinuierliche Reduktion in NaCl.	74
4.11	Kontinuierliche Reduktion in NaCl.	75
4.12	Konzentrations/Zeit-Verlauf für verschiedene Betriebspunkte.	76
4.13	Totalkonzentration und Selektivität.	77
4.14	Metabolitkonzentrationen als Funktion der Zeit.	78
4.15	Konzentrations/Zeit-Verlauf	80
4.16	Selektivität als Funktion der <i>tof_{max}'</i>	81
4.17	Beobachtete bzw. erwartete Desaktivierungskurve.	82
4.18	Metabolitkonzentrationen als Funktion der Zeit.	83

4.19	Kohlenstoff- und Elektronenbilanz als Funktion der Zeit.	83
4.20	Verlauf der Biotrockenmasse über die Zeit für verschiedene kontinuierliche Experimente.	84
4.21	Typisches Proteingel	86
4.22	Exemplarischer Batchverlauf unter Zusatz des unbekannten Proteins	87
4.23	Konzentrations-/Zeit-Verlauf mit "neuen" Zellen.	88
4.24	Selektivitäts-/Zeit-Verlauf.	89
4.25	Selektivität als Funktion des Umsatzes für verschiedene kontinuierliche Experimente.	90
4.26	Ganzzellbiotransformation mit <i>L. kefir</i> und 2-Oktanon als Substrat	92
4.27	Kontinuierliche Produktion von (2 <i>R</i>)-Oktanol	93
4.28	Versuchsaufbau für die aerobe Ganzzellbiotransformation mit Bäckerhefe.	94
4.29	Mit Bäckerhefe durchgeführte Ganzzellbiotransformation.	95
4.30	Reproduzierbarkeit der Biotransformation mit Bäckerhefe.	96
4.31	Kontinuierliche Produktion von (3 <i>S</i>)-Hydroxybuttersäureethylester.	97
4.32	Kontinuierliche Reduktion mit Substratwechsel.	98
5.1	Bisherige Aufarbeitungsstrategie	99
5.2	Prinzip der Festphasenextraktion	100
5.3	Adsorption von (2,5)-Hexandiol auf verschiedenen XAD-Harzen. .	101
5.4	Elution von XAD-Harzen.	103
5.5	Präparative Adsorptionssäule.	104
5.6	Präparative Adsorptionssäule.	105
5.7	Verteilungskoeffizient in Abhängigkeit der Temperatur	107
5.8	Kontinuierliche Extraktion	109
5.9	Fixierung der Phasengrenze am Säulenboden	110
5.10	Schematische Darstellung der Produktaufarbeitung/-isolierung . .	111
5.11	Kolonnenpackungen	112
5.12	Extraktionsgrad für verschiedene Packungsmaterialien	112
5.13	Charakterisierung der Sulzer SMV Mischer.	114
5.14	Charakterisierung der Raschig-Ringe.	115
5.15	Gillespie-Apparatur	116
5.16	Charakterisierung der Destillation mit der Gillespie-Apparatur . .	117
5.17	Fließbild des entwickelten Verfahrens	118
6.1	Durch Reduktion darstellbare Produkte	121
6.2	Symmetrische und asymmetrische Folgeprodukte	122
6.3	Produktivität und Wertschöpfung für die verschiedenen Reaktortypen.	125
6.4	100%-ige Nutzung des Substrates durch Isolierung aller Produkte	127
6.5	Vergleich der Verfahren	129
6.6	Prozentualer Kostenvergleich	130

6.7	sProzentualer Kostenvergleich	130
7.1	Fließbild des entwickelten Verfahrens	133
8.1	Abhängigkeit der Aktivität von der Biomasse	140
8.2	Kalibriergerade zur Proteinbestimmung.	144
8.3	Umsatzanalytik	145
8.4	Beispielchromatogramm GC	146
8.5	Kalibriergeraden für die Gaschromatographie	147
8.6	Diastereomeren- und Enantiomerenanalytik	147
8.7	Auftrennung der Diole	149
8.8	Organische Säuren und Zucker die mittels HPLC nachgewiesen werden.	149
8.9	Beispielchromatogramm HPLC	150
8.10	Kalibriergerade für die HPLC	151
8.11	Übersicht der verwendeten Verbindungen	152

Abkürzungsverzeichnis

2PG	2-Phosphoglycerat
3PG	3-Phosphoglycerat
13PG	1,3 Phosphoglycerat
6PGlu	6-Phosphogluconat
AcCoA	Acetyl Coenzym A
Acetald	Acetaldehyd
AcP	Acetylphosphat
ADP	Adenosin Diphosphat
ATP	Adenosin Triphosphat
ADH	Alkoholdehydrogenase
CAS	Chemical Abstract Service
CSTR	Continuous Stirred Tank Reactor
de	Diastereomerenüberschuß
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ee	Enantiomerenüberschuß
EHB	(3 <i>S</i>)-Hydroxybuttersäureethylester
EOB	3-Oxobuttersäureethylester
FDA	Food & Drug Administration, Amerikanische Gesundheitsbehörde
FDH	Formiatdehydrogenase
Ga3P	Galactose-3-phosphat
GC	Gas Chromatographie
Glu	Glucose
Glu6P	Glucose-6-phosphat
GVO	Gentechnisch veränderter Organismus
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
JFC	Juelich Fine Chemicals
k.A.	keine Angabe
MS	Massenspektrometrie
MWCO	(engl. Molecular Weight Cut Off)
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid, reduziert
NADP	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NADP	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat, reduziert
NMR	Kernresonanzspektroskopie
PEP	Phosphoenolpyruvat
Pyr	Pyruvat
Rib5P	Ribose-5-phosphat
RNA	Ribonukleinsäure
<i>tof</i>	turn over frequency

Abbildungsverzeichnis

UPM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
vvm	Gasvolumenstrom pro Flüssigkeitsvolumen
Xyl5P	Xylose-5-phosphat

Symbolverzeichnis

fsbc	feed specific biomass concentration	$[\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{h} \cdot \text{mmol}^{-1}]$
η	Ausbeute	$[\%]$
γ	Degree of Reduction	$[-]$
σ	Selektivität	$[\%]$
$\Sigma_{<O>}$	Stoffmenge Ketofunktion	$[\text{mol}]$
$\Sigma_{<OH>}$	Stoffmenge Hydroxyfunktion	$[\text{mol}]$
A	Fläche	$[\text{m}^2]$
BFM	Biofeuchtmasse	$[\text{g}]$
Bo	Bodensteinzahl	$[-]$
BTM	Biotrockenmasse	$[\text{g}]$
DA	Damköhlerzahl	$[-]$
E_a	Aktivierungsenergie	$[\text{kJmol}^{-1}]$
k_1, k_2	Geschwindigkeitskonstanten	$[\text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}]$
K_M	Michaelis Konstante	$[\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$
n	Stoffmenge	$[\text{mol}]$
N	Kesselzahl	$[-]$
OD	optische Dichte	$[-]$
$p\text{O}_2$	Sauerstoffpartialdruck	$[\%]$
R	Gaskonstante	$8,314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$
R_i	Reaktionsgeschwindigkeit	$[\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1}]$
U	Umsatz	$[\%]$
V	Volumen	$[\text{L}]$

1 Einleitung

1.1 Chiralität

Chirale Moleküle besitzen eine große Bedeutung in der Natur. Die verschiedenen Stereoisomere haben häufig unterschiedliche Funktionen in natürlichen physiologischen Vorgängen [1]. Die Stereoisomere können trotz gleicher Konstitution nicht zur Deckung gebracht werden. Sie verhalten sich zueinander wie Bild und Spiegelbild.

Die Chiralität kann unterschiedliche Ursachen haben; da sie eine Symmetrieeigenschaft ist, können verschiedene Symmetrieelemente dafür verantwortlich sein. Es können z.B. Chiralitätszentren, Chiralitätsachsen und Chiralitätsebenen vorhanden sein. Im Zusammenhang mit Chiralität muß man auch den häufig gebrauchten Ausdruck der optischen Aktivität erwähnen. Diese ist eine Eigenschaft der chiralen Moleküle, nämlich die Fähigkeit, die Schwingungsebene des polarisierten Lichtes zu drehen.

Moleküle mit nur einem Chiralitätszentrum, wie z.B. (*2R*)- und (*2S*)- Butanol (siehe Abbildung 1.1), verhalten sich wie z.B. die rechte und die linke Hand und können nicht zur Deckung gebracht werden. In diesem Fall spricht man von Enantiomeren.

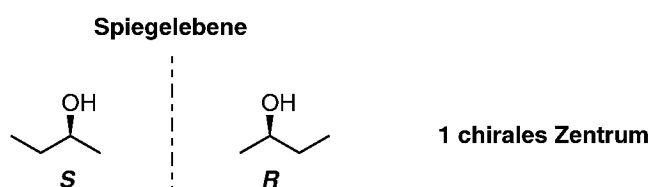


Abbildung 1.1: 1 Chiralitätszentrum

Betrachtet man nun ein Molekül mit zwei chiralen Zentren, wie z.B. (2,5)-Hexandiol, so gibt es mehrere Möglichkeiten der räumlichen Anordnung an diesen beiden Zentren und deshalb mehr als 2 mögliche Stereoisomere. Die möglichen Kombinationen sind in Abbildung 1.2 dargestellt.

Das (*R,R*)- und das (*S,S*)-Stereoisomer verhalten sich wie Bild und Spiegelbild, folglich stellen diese beiden Enantiomere dar. Das unten abgebildete (*R,S*)-

1 Einleitung

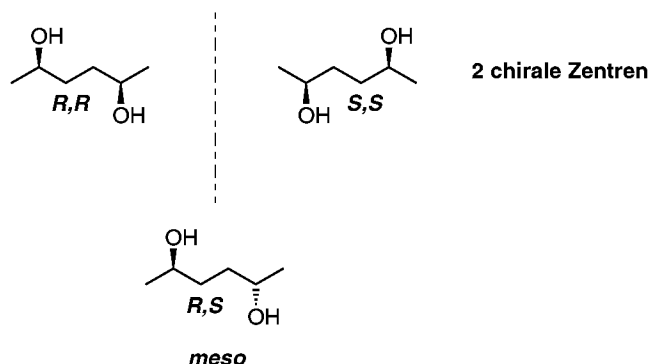


Abbildung 1.2: 2 Chiralitätszentren

Stereoisomer besitzt ebenfalls zwei chirale Zentren, es kann aber nicht in eines der obigen beiden Enantiomere überführt werden. In diesem Fall spricht man von einem Diastereomer.

Zusätzlich besitzt das Diastereomer in diesem Fall noch eine Spiegelebene. Auf Grund dieser Ebene können die beiden chiralen Zentren ineinander überführt werden. Das Molekül ist trotz zweier chiraler Zentren nicht mehr chiral und nicht mehr optisch aktiv. In diesem Fall spricht man von einer *meso*-Verbindung.

1.2 Chirale Diole

1.2.1 Allgemein

Die Synthese enantiomerenreiner Verbindungen gewinnt immer mehr an Bedeutung. Besonders im Bereich der Pharmazeutika können nach einer Entscheidung der amerikanischen Food & Drug Administration (FDA, Gesundheitsbehörde der USA) [2, 3], die einzelnen Enantiomere eines bereits patentierten racemischen Wirkstoffes, bei nachgewiesenen unterschiedlicher Wirkung, erneut angemeldet werden. Das Interesse an enantiomerenreinen Verbindungen ist damit stark gestiegen [4, 5]. Folglich steht hinter diesen Verbindungen nicht nur ein akademisches, sondern auch ein kommerzielles Interesse. Somit besteht natürlich auch ein Interesse an kostengünstigen und nachhaltigen Prozessen zur Synthese dieser chiralen Verbindungen. Aber nicht nur im Bereich der Pharmazeutika, sondern auch im Bereich der Agrochemikalien gewinnen Chiralika als Synthesebaustein an Bedeutung.

Chirale Diole, welche im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen, bieten mannigfaltige Einsatzmöglichkeiten [6, 7]. In Tabelle 1.1 sind einige Beispiele für die Verwendung von Diolen dargestellt.

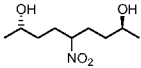
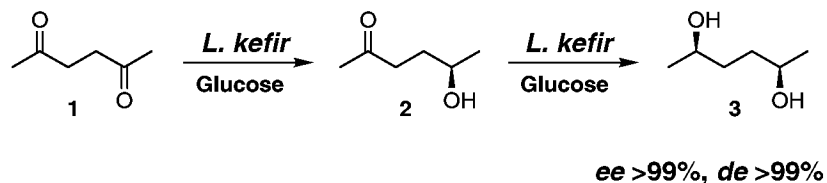
Verwendung	Diol	Literatur
Wirkstoff		[8]
Intermediat		[9, 10]
		[11]
Katalysatoren		[12, 13]

Tabelle 1.1: Exemplarische Verwendungsmöglichkeiten von Diolen

1.2.2 Modellreaktion

Als Modellreaktion mit industrieller Relevanz dient in dieser Arbeit die Reduktion von (2,5)-Hexandion zu (2*R*,5*R*)-Hexandiol. Diese in Abbildung 1.3 gezeigte Reduktion wird als Ganzzellbiotransformation (siehe Kapitel 1.2) unter Einsatz von *Lactobacillus kefir* DSM 20587 (siehe Kapitel 1.3) als Biokatalysator durchgeführt. Es wird sowohl ein Enantiomerenüberschuß (*ee*), als auch ein Diastereomerenüberschuß (*de*) >99% erreicht [14, 15].

Abbildung 1.3: Synthese von (2*R*,5*R*)-Hexandiol mit ruhenden Zellen von *Lactobacillus kefir* DSM 20587

Sowohl das Produkt (2*R*,5*R*)-Hexandiol **1**, als auch das Zwischenprodukt (5*R*)-Hydroxyhexan-2-on **2**, stellen interessante chirale Verbindungen dar. Im folgenden Kapitel werden die Verwendungsmöglichkeiten für das Diol **1** diskutiert. Das Intermediat **2** wird zwar in der racemischen Form in der Literatur erwähnt [16], bis heute allerdings nicht als Synthesebaustein. Die beiden Enantiomere finden sich nicht in der Literatur und besitzen beide keine CAS-Nummer. Dies mag daran liegen, daß es bis heute keinen Zugang zu größeren Mengen gibt. Die Verbindung hat aber auf Grund der bereits eingeführten chiralen Hydroxyfunktion und der für Folgechemie zur Verfügung stehenden Ketofunktion ein hohes Potential als Synthesebaustein.

1 Einleitung

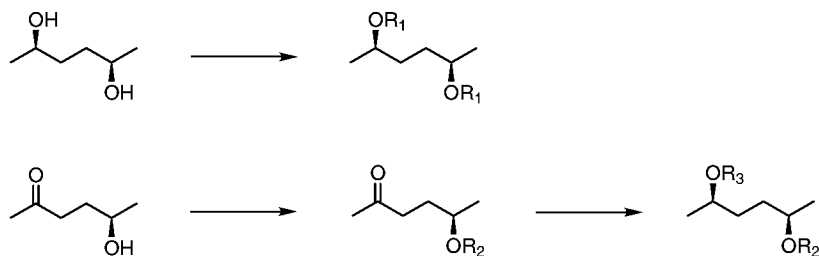


Abbildung 1.4: Unterschiedliche Folgechemie der Produkte **2** und **3**

Abbildung 1.4 illustriert die Möglichkeiten. Bei Einsatz des Diols gelangt man immer zu symmetrischen Produkten, während der Einsatz des Hydroxyketones auch asymmetrisch substituierte Produkte ermöglicht.

1.2.3 (2*R*,5*R*)-Hexandiol

Enantiomerenreines (2*R*,5*R*)-Hexandiol ist von erheblichen industriellem Interesse, da es Baustein für eine ganze Reihe chiraler Liganden von Übergangsmetallkatalysatoren ist. Am Beispiel von DuPhos¹, einem der prominentesten Vertretern dieser Klasse, und BPE² wird die Ligandensynthese in Abbildung 1.5 gezeigt [17]. In dieser mehrstufigen Synthese werden Ausbeuten von 70-90% erreicht. Der Weltmarkt für DuPhos liegt in der Größenordnung 500 kg·a⁻¹ [18].

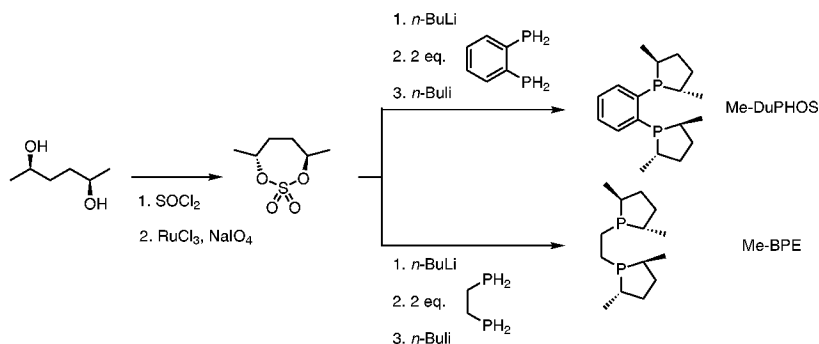


Abbildung 1.5: Exemplarische Ligandensynthese von Me-DuPhos und Me-BPE [17]

Beide Liganden werden in Übergangsmetallkatalysatoren beispielsweise zur Hydrierung von ungesättigten α - und β -Aminosäuren eingesetzt (Abbildung 1.6). Bei diesen Hydrierungen werden Enantiomerenüberschüsse von maximal >98% erreicht [19, 20].

¹1,2-Bis(phospholano)benzen

²1,2-Bis(phospholano)ethan

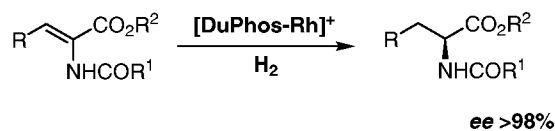


Abbildung 1.6: Synthese von α -Aminosäuren mit DuPhos [19, 20]

Weiterhin kann (2*R*,5*R*)-Hexandiol noch zur Synthese von (2*S*,5*S*)-Dimethylpyrrolidin **4** und (2*S*,5*S*)-Dimethylborolan **5** verwendet werden (Abbildung 1.7). Diese werden als chirale Auxiliare zur asymmetrischen Induktion bei einer Reihe von enantioselektiven Reaktionen genutzt [21, 22, 23, 24]. Beispiele hierfür sind die Alkylierung von Enaminen [25], Aldolkondensationen [26], Claisen-Umlagerungen [27], intramolekularen Cycloadditionen [28] sowie die Reduktion von Ketonen [29] und Aziden [30].

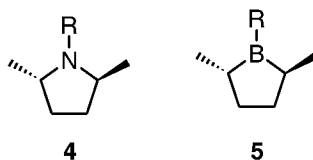


Abbildung 1.7: Chirale Auxiliare basierend auf (2*R*,5*R*)-Hexandiol

Der Zugang zu dem komplementären Enantiomer (2*S*,5*S*)-Hexandiol ist bereits über eine Ganzzellbiotransformation möglich. Hierbei werden allerdings ganze Zellen von Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) eingesetzt [31]. Das Verfahren hierzu wurde bereits von Bertau und Bürli [32] in der Literatur beschrieben, und wird von Juelich Fine Chemicals im 1,5 m³-Maßstab durchgeführt.

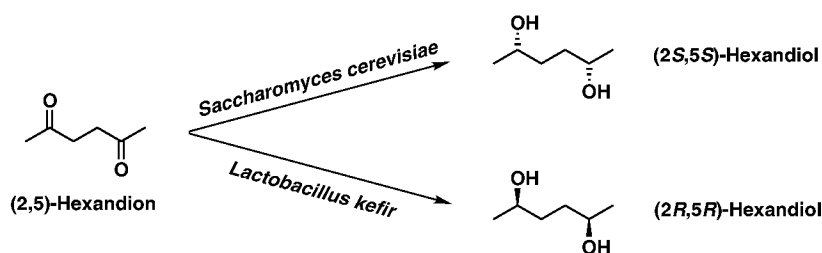


Abbildung 1.8: Zugang zu beiden Enantiomeren von (2,5)-Hexandiol ausgehend von (2,5)-Hexandion durch Ganzzellbiotransformation

Neben diesen beiden Verfahren gibt es noch eine ganze Reihe weiterer Synthesemethoden zur Synthese der beiden Enantiomere. In Tabelle 1.2 auf Seite 7

1 Einleitung

sind chemische und biochemische Synthesewege zu beiden Enantiomeren zusammengefasst³.

Von den chemischen Methoden ist kein Verfahren wirklich überzeugend. Bei fast allen werden zwar moderate bis gute Enantiomerenüberschüsse erreicht, allerdings lassen entweder die Ausbeuten oder die erreichten Diastereomerenüberschüsse zu wünschen übrig.

Auf Seiten der biologischen Methoden muß in jedem Fall das Verfahren von *Ohta et al.* erwähnt werden, da hierbei ebenfalls (2,5)-Hexandion in einer Ganzzellbiotransformation zu (2*R*,5*R*)-Hexandiol reduziert wird. Als Mikroorganismus kommt ein Wildtyp von *Pichia farinosa* zum Einsatz. Es wird ein Umsatz von 83% erreicht. Der Enantiomerenüberschuß liegt ebenfalls bei >99%, während im Vergleich zur Reduktion mit *L. kefir* nur ein Diastereomerenüberschuß von 95% erreicht wird [48].

1.2.4 Technische Verfahren

Bis heute gibt es zwei literaturbeschriebene technische Verfahren im multi-kg-Maßstab zur Darstellung beider Enantiomere von (2,5)-Hexandion.

Das in Abbildung 1.9 gezeigte chemische Verfahren wurde von der Firma DuPont zum Patent angemeldet und zur Produktion im kleinen Maßstab eingesetzt [36, 37, 38, 39]. Zur Synthese des (*S,S*)-Diols wird für den ersten Schritt auch Bäckerhefe statt Ru-BINAP eingesetzt. Der elektrochemische Schritt ist eine anodische Dimerisierung (Kolbe Kupplung). Dabei kommt es allerdings im größeren Maßstab zu unkontrollierter Polymerisation, so daß die Elektroden mit nichtleitenden Polymeren belegt werden, und die Reaktion zum Erliegen kommt.

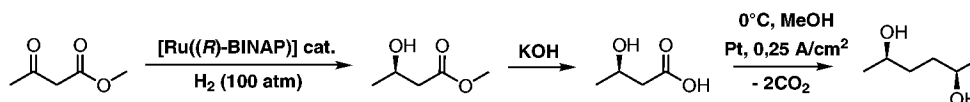


Abbildung 1.9: Ehemals von DuPont (Wilmington, USA) durchgeführte Synthese.

Das aktuelle Produktionsverfahren, welches von Chirotech (Cambridge, UK) durchgeführt wird, basiert auf dem Einsatz einer Lipase zur Racematspaltung. Hierbei geht man von der kommerziell erhältlichen Mischung von racemischen/*meso*-(2,5)-Hexandiol aus. Da die Lipase (*R*)-spezifisch ist, werden nur die (*R*)-Hydroxyfunktionen acyliert. Das *meso*-Diol, welches halb acetyliert vorliegt, kann durch Inversion in das (*R,R*)-Enantiomer überführt werden. Es werden maximal die in Abbildung 1.10 auf Seite 8 gezeigten theoretischen Ausbeuten erreicht [53].

³basierend auf einer Recherche in der *Chemical Abstract* Online-Datenbank im Zeitraum 1967-April 2002. Recherchiert wurde nach den folgenden CAS-Nummern: 34338-96-0 (2*S*,5*S*)-Hexandiol, 17299-07-9 (2*R*,5*R*), 2935-44-6 rac. (2,5)-Hexandiol

Chemische Methoden zur Synthese von (2,5)-Hexandiol-Enantiomeren

Katalysator	Substrat	ee	meso/(rr+ss)	Ausbeute	Literatur
Chiral Pool	D-Mannose	99% <i>R,R</i>	1/100	30%	[33]
DIBAL	Diketodisulfoxid	95% <i>R,R</i>	5/100	75%	[34]
DIBAL/ZnBr ₂	Diketodisulfoxid	95% <i>R,R</i>	5/100	75%	[34]
EtTRAP-Rh	(2,5)-Hexandion	97% <i>S,S</i>	25/75	97%	[35]
Kolbe-Kupplung	(3 <i>S</i>)-Hydroxybuttersäure	98% <i>S,S</i>	1/100	55-70%	[36, 37, 12, 13, 38, 39]
Kolbe-Kupplung	(3 <i>R</i>)-Hydroxybuttersäure	98% <i>R,R</i>	1/100	55-70%	[36, 37, 12, 13, 38, 39]
Oxazaborolidin	(2,5)-Hexandion	92% <i>S,S</i>	32/68	92%	[40, 41, 42]
Raney-Nickel/L-(+)-Tartarat	(2,5)-Hexandion	10% <i>R,R</i>	1/7	10 %	[43]
Sharpless Hydroxylierung	1,5-Hexadien	k.A. <i>R,R</i>	1/4	32%	[44]

Biochemische Methoden zur Synthese von (2,5)-Hexandiol-Enantiomeren

Katalysator	Substrat	ee	meso/(rr+ss)	Ausbeute	Literatur
Lipase	meso/rac diol	98% <i>R,R</i>	2/100	17%	[22, 45]
Lipase	meso/rac diol	94% <i>R,R</i>	3/100	47%	[46]
Lipase	meso/rac diol	98% <i>R,R</i>	1/100	26%	[47]
<i>Pichia farinosa</i>	(2,5)-Hexandion	99% <i>R,R</i>	5/100	83%	[48]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(2,5)-Hexandion	99% <i>S,S</i>	10/100	75%	[32, 49, 50]
<i>Yamadazyma farinosa</i>	(2,5)-Hexandion	k.A. <i>R,R</i>	k.A.	k.A.	[51, 52]

Tabelle 1.2: Übersicht der literaturbeschriebenen Methoden zur Herstellung von (2*S*,5*S*)- oder (2*R*,5*R*)-Hexandiol

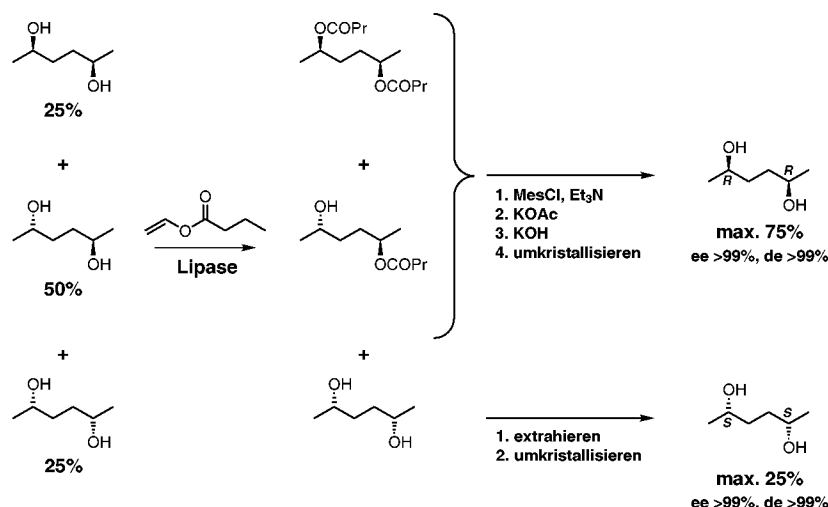


Abbildung 1.10: Aktuelles von ChiroTech (Cambridge, UK) durchgeführtes Produktionsverfahren [53] für (2*S*,5*S*)- und (2*R*,5*R*)-Hexandiol

1.3 Ganzzellbiotransformation

Umsetzungen mit Enzymen und ganzen Zellen haben mittlerweile den Status einer einfachen Laboranwendung verlassen und stehen auch für industrielle Verfahren zur Verfügung [54, 55]. Der Einsatz dieser Methoden bietet den Vorteil, nachhaltige Verfahren verwenden zu können. Mit hoch selektiven Katalysatoren kann bei milden Reaktionsbedingungen gearbeitet werden.

Beim Einsatz ganzer Zellen als Biokatalysator muss zwischen zwei grundlegend verschiedenen Vorgehensweisen (Abbildung 1.11) unterschieden werden [56]. Erstens gibt es Prozesse, welche fermentativ, also unter Zellwachstum, durchgeführt werden (siehe Kapitel 1.2.1). Hierbei werden die Zielprodukte ausgehend von billigen Kohlenstoffquellen wie Glucose hergestellt. Zweitens gibt es solche, bei denen die Zelle ruht (siehe Kapitel 1.2.2) und somit nicht wächst. Bei diesen Prozessen wird das Produkt direkt aus einer Vorstufe gebildet. In Tabelle 1.3 sind einige Eigenschaften beider Vorgehensweisen allgemein zusammengefasst. In den folgenden beiden Unterkapiteln sind einige Beispiele für beide Verfahren dargestellt. Tabelle 1.4 auf Seite 10 zeigt die unten diskutierten Verfahren in der Übersicht.

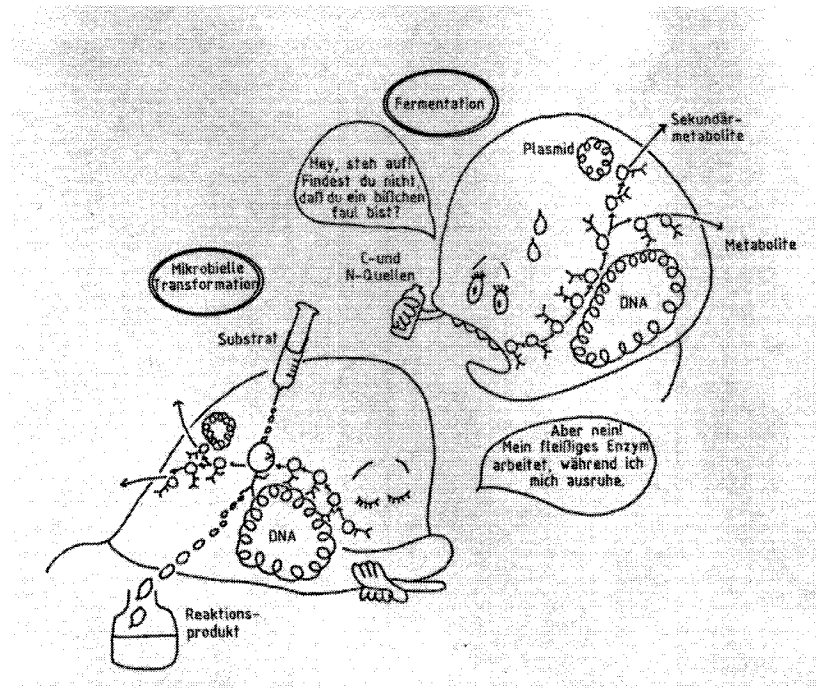


Abbildung 1.11: Fermentation versus Ganzzellbiotransformation [56]

	Mikrobielle Transformation	Fermentation
Mikroorganismen	ruhende Zellen	wachsende Zellen
Reaktion	einfache katalytische Reaktion (ein oder mehrere Schritte)	lebendes System komplexe Reaktionskette
Reaktionszeit	kurz	lang
Ausgangsmaterial	Vorstufe des Produktes	billige Kohlen- und Stickstoffquellen
Produkt	natürlich oder nicht-natürlich	natürlich

Tabelle 1.3: Eigenschaften mikrobieller Transformationen und Fermentationen nach [56]

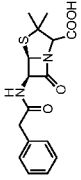
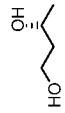
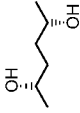
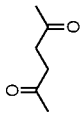
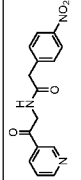
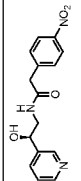
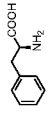
Fermentationen					
Produkt	Substrat	Organismus	Maßstab [m ³]	Hersteller	Literatur
	Glucose	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	100	Boehringer Ingelheim GmbH	[57, 58]
	Molasse	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	170	Danish Distilleries Ltd.	[59, 60]
	Glucose	<i>Penicillium chrysogenum</i>	300	?	[61]
Mikrobielle Transformationen					
Produkt	Substrat	Organismus	Maßstab	Hersteller	Literatur
		<i>Candida parapsilosis</i>	2	Daicel Ltd.	[9, 62]
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,5	Juelich Fine Chemicals	[32, 49, 50]
“Kombinationsverfahren“					
Produkt	Substrat	Organismus	Maßstab	Hersteller	Literatur
		<i>Candida sorbophila</i>	0,5	Merck	[63, 64, 65, 7]
	Glucose	<i>Escherichia coli</i>	0,5	FZJ, DSM	[66, 67, 68]

Tabelle 1.4: Beispiele für die verschiedenen Typen von Ganzzellbiotransformationen

1.3.1 GVOs

Der Einsatz gentechnisch veränderter Mikroorganismen (GVO) nimmt immer mehr zu. Gerade im industriellen Bereich versucht man den perfekten Biokatalysator zu schaffen [54, 69].

Durch verschiedenste Arten der Manipulation, sei es durch ungerichtete [70] oder gerichtete [71] Mutationen oder durch den Einsatz von “Metabolic Engineering” [72, 73, 74], bei dem der Stoffwechsel gezielt manipuliert wird, versucht man potente Überproduzenten (siehe Abbildung 1.12) zu erzeugen. Diese Methoden werden mittlerweile durch kombinatorische Methoden unterstützt, um in einem kürzeren Zeitraum mehr potentielle Kandidaten zu erzeugen [75].

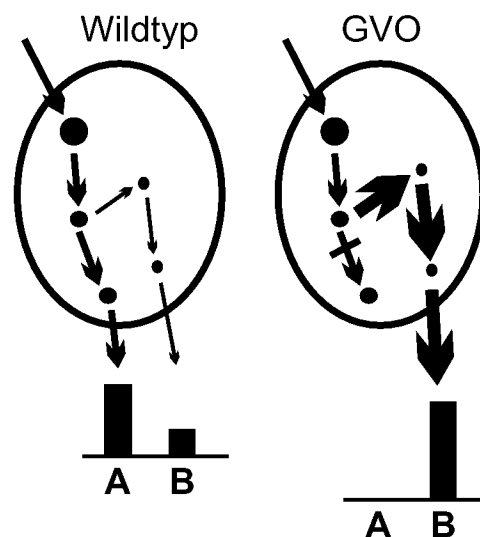


Abbildung 1.12: Produktivitätsverbesserung durch gentechnische Optimierung

Dem gegenüber steht der Einsatz von Wildtypen, welche, so wie sie in der freien Natur vorkommen, eingesetzt werden. Diese haben per Definition schon den Vorteil, daß sie, sofern nicht pathogen, keinem Anmeldeverfahren nach Gentechnikgesetz unterliegen und deshalb überall verwendet werden können. Gerade im Bereich kleinerer Betriebe kann dies ein Vorteil sein. Weiterhin besitzt solch ein natürlich vorkommender Organismus einen intakten und funktionierenden Stoffwechsel, was bei den GVOs nicht immer der Fall ist.

1.3.2 Fermentation

Fermentationstechniken zur Gewinnung verschiedenster Produkte werden bereits seit Jahrhunderten eingesetzt. Als eines der ältesten Beispiele sei hier die Herstellung von Bier genannt, die bereits mehrere tausend Jahre alt ist. Die fermentative

Herstellung von Ethanol ist auch heutzutage noch ein Verfahren, welches in sehr großem Maßstab durchgeführt wird [59, 60]. Hierbei werden häufig Abfallprodukte anderer Prozesse, wie zum Beispiel Melasse, als Substrat eingesetzt.

Eine weitere Klasse von Verbindungen, welche fermentativ hergestellt werden, sind organische Säuren. Milchsäure, Essigsäure, Citronensäure oder Pyruvat werden auf diesem Wege hergestellt [76]. Die Verfahrensschritte für deren Herstellung haben sich seit ihrer Etablierung kaum verändert. Ein Beispiel hierfür ist die Herstellung von Milchsäure bei Boehringer in Ingelheim. Das Verfahren wurde 1893 eingeführt und wird seitdem mit immer gleichen Prozeßschritten durchgeführt [57, 58].

Es lassen sich neben diesen primären Stoffwechselmetaboliten aber auch anspruchsvollere Strukturen herstellen. Die Herstellung von Penicillin G ist auch ein fermentatives Verfahren, bei dem ausgehend von Glucose die Zielverbindung synthetisiert wird [61].

Ein großer Nachteil dieser fermentativen Herstellung ist die Tatsache, daß die Synthese der Zielverbindung ein Stoffwechselendprodukt darstellt. Es können also nur im Stoffwechsel vorhandene Wege durchschritten werden.

Ein ganz anderes, und hier nur am Rande erwähntes Feld der Fermentation, ist natürlich die Herstellung von Biomasse zur Gewinnung von Proteinen [77], Polysacchariden [78, 79, 80] bzw. von Zellen für z.B. Lebensmittelanwendungen. Gerade im Kontext mit der Klasse der Milchsäurebakterien muß dies zumindest Erwähnung finden, da die Formulierung von Käse und Joghurt [81, 82, 83, 84] ein Markt von weltweit großer Bedeutung ist.

1.3.3 Mikrobielle Transformation

Bei den mikrobiellen Transformationen wird der eingesetzte ruhende Mikroorganismus nur als "Sack von Enzymen" genutzt. Dies hat im Gegensatz zur Fermentation auch Vorteile.

Ein großer Vorteil ist, daß bei einer mikrobiellen Transformation Zellwachstum und Biotransformation getrennt voneinander optimiert werden können. Ein Beispiel hierfür ist die Produktion von (*R*)-1,3-Butandiol mit *Candida parapsilosis* IFO1396 [9, 62]. Bei diesem Verfahren werden zunächst die Wachstumsbedingungen für den Stamm optimiert, und dann wird mit den geernteten Zellen die Biotransformation durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird auch ein weiterer Vorteil deutlich: Durch die Resuspendierung der Zellen lassen sich für die Transformation wesentlich höhere Zelldichten einstellen, als unter Wachstumsbedingungen erreicht werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß das Verfahren auch auf einen verbesserten rekombinanten Stamm von *Escherichia coli* übertragbar ist [72].

Ein weiterer Vorteil der mikrobiellen Transformation ist, daß auch nicht-natürliche Substrate eingesetzt werden können. Begrenzende Faktoren sind einerseits die Substratspezifität des relevanten Enzyms und andererseits die Mem-

brangängigkeit des eingesetzten Substrates bzw. Produktes. Dieser Einsatz nicht-natürlicher Substrate macht die mikrobielle Transformation zu einem sehr interessanten Werkzeug für die organische Synthese [85, 86, 87]. Wichtig zu erwähnen ist in diesem Zusammenhang noch die Tatsache, daß durch den Einsatz solch eines “Enzymsacks“ auch Probleme der Kofaktorregenerierung von beispielsweise NADPH einfach zu überwinden sind. Durch Zugabe eines entsprechenden kostengünstigen Kosubstrates, in den meisten Fällen Glucose, können die zellinternen Regenerationsmechanismen genutzt werden [56].

Einer der weitverbreitetsten Mikroorganismen für Reduktionen aller Art ist Bäckerhefe, welche sowohl für Forschungszwecke, als auch für industrielle Anwendungen eingesetzt [32, 88, 89] wird. Bäckerhefe ist billig, leicht zu lagern und fast überall zu bekommen.

Ein Beispiel für die Anwendung von Bäckerhefe für mikrobielle Transformationen ist die Synthese von (2*S*,5*S*)-Hexandiol aus (2,5)-Hexandion (siehe auch Tabelle 1.2 auf Seite 7 bzw. Abbildung 1.8 auf Seite 5). Bei dieser Transformation im 1,5 m³ Fed-Batch Verfahren wird die Reduktion mit Hefe durchgeführt. Hierbei wird ein Umsatz von etwa 75% erreicht [49].

Neben diesen vielen Vorteilen gibt es aber auch einen entscheidenden Nachteil: Da kein Wachstum stattfindet, gibt es keine Möglichkeit, den Katalysator zu vervielfältigen. Durch Desaktivierung nimmt die Aktivität der Zellen im Reaktor ab. Dies ist vor allem bei kontinuierlich durchgeführten mikrobiellen Transformationen zu berücksichtigen. Für diesen Fall findet man in der Literatur nur wenige Beispiele. Eines ist die in Abbildung 1.13 gezeigte Produktion von (2*S*)-Chloro- α -methylbenzylalkohol durch Reduktion von α -Chloracetophenon mit immobilisierten Zellen von *Pachysolen tannophilus* [90].

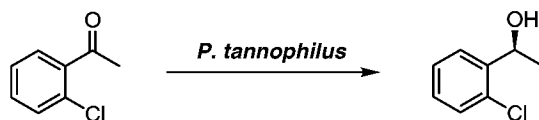


Abbildung 1.13: Beispiel einer kontinuierlichen mikrobiellen Transformation

Das in dieser Arbeit vorgestellte Verfahren zur Produktion von (2*R*,5*R*)-Hexandiol mit *Lactobacillus kefir* DSM20587 gehört auch in diese Klasse von Ganzzellbiotransformationen.

1.3.4 “Kombinationsverfahren“

Es gibt auch “Kombinationsverfahren“, welche aus den beiden oben dargestellten Vorgehensweisen bestehen. Dies bedeutet, daß zunächst unter Wachstumsbedingungen gearbeitet wird und dann ein Bereich folgt, in dem die Zellen nur noch produzieren und nicht mehr wachsen.

1 Einleitung

Ein Beispiel für ein “Kombinationsverfahren” mit eher fermentativem Charakter ist die Produktion von L-Phenylalanin mit rekombinanten *Escherichia coli*-Zellen [68, 66, 67]. In diesem Fed-Batch Prozess wird zunächst mit Tyrosin auxotrophen Stämmen fermentativ Biomasse (Glucose- und Tyrosinfeed) erzeugt. In einer zweiten reinen Produktionsphase, welche durch Abschaltung des Tyrosinfeeds eingeläutet wird, wird aus Glucose nur noch L-Phenylalanin produziert, während kein Wachstum der Biomasse mehr zu beobachten ist.

Ebenso gibt es “Kombinationsverfahren”, die eher den Charakter einer mikrobiellen Transformation haben. Ein Beispiel hierfür ist die Herstellung von (*R*)-*N*-(2-hydroxy-2-pyridin-3-yl-ethyl)-2-(4-nitro-phenyl)-acetamid mit *Candida sorbophila* (Abbildung 1.14), welches ein wichtiger Baustein für Pharmazeutika zur Diabetestherapie ist.

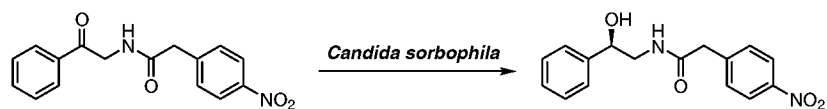


Abbildung 1.14: Beispiel für ein “Kombinations“-Verfahren.

Bei diesem Fed-Batch Prozess wird durch Zugabe von Glucose Biomasse produziert und gleichzeitig aber schon das Substrat zur Produktion zugegeben. Nach Erreichen einer bestimmten Zelldichte wird der Glucosefeed reduziert, so daß keine Biomasse mehr produziert wird, sondern die Glucose nur noch für die Kofaktorregenerierung ausreicht [63, 64, 65, 7].

1.4 Milchsäurebakterien

The commitment to life in rich environments demands a simple but effective way of outcompeting other microorganisms. Solution: Acid production!

Lars Axelsson, 1998

Zu dieser Gruppe von Mikroorganismen gehören die Arten *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* und *Weissella*. Diese sind alle gram-positive, nicht-sporende, stäbchen-formende Bakterien [91, 92, 93]. Die Milchsäurebakterien sind anaerob, mikroaerophil, säure-tolerant, und alle produzieren Lactat als Endprodukt der Zuckerfermentation. Generell wachsen sie bevorzugt in einer sehr nährstoffreichen Umgebungen wie z.B. Milch, Fleisch, Gemüse. Somit hat die Produktion von Milchsäure und das Absinken des pH

zwei wichtige Aspekte. Erstens gewinnen die Milchsäurebakterien aus der Produktion von Lactat ihre Energie in Form von ATP [94], und zweitens ist es ein Selektionsvorteil, um sich in solch einer nährstoffreichen Umgebung gegen alle anderen Mikroorganismen durchzusetzen [95].

Die Klasse der Lactobacillen ist die größte und divergenteste innerhalb der Milchsäurebakterien. Die Heterogenität läßt sich am anschaulichsten durch den hohen prozentualen Anteil an Guanosin und Cytosin in der DNA zeigen. Bei den Lactobacillen beträgt dieser Anteil 32-54%. Dies ist eine doppelt so hohe Spannweite wie sie gewöhnlich für die Anerkennung einer Spezie akzeptiert wird [96]. Aufgrund dieser hohen Divergenz können physiologische Informationen anderer Lactobacillen für den Vergleich mit *Lactobacillus kefir* nur unter bestimmten Bedingungen herangezogen werden. Lactobacillen lassen sich in drei physiologische Gruppen einteilen:

- **Obligatorisch homofermentativ** - aus einem Mol Glucose werden als Stoffwechselendprodukt zwei Mol Lactat gebildet.
- **Fakultativ heterofermentativ** - aus einem Mol Glucose können je nach Bedingung entweder ein oder zwei Mol Lactat als Stoffwechselendprodukt gebildet werden.
- **Obligatorisch heterofermentativ** - aus einem Mol Glucose wird als Stoffwechselendprodukt ein Mol Lactat gebildet.

Es läßt sich auch eine Gruppierung durch Homologien in der rRNA vornehmen [96]. Hierbei gibt es wiederum drei Hauptgruppen, welche sich aus homologen Stämmen zusammensetzen:

- *Lactobacillus delbrueckii* Gruppe
- *Lactobacillus casei*-*Pediococcus* Gruppe
- *Leuconostoc* Gruppe

Aus beiden Systemen kann die in Tabelle 1.5 auf Seite 16 dargestellte taxonomische Einordnung des betrachteten Stammes *Lactobacillus kefir* vorgenommen werden. Dieser ist obligatorisch heterofermentativ und gehört in die *L. casei*-*Pediococcus* Gruppe. Trotz dieser Einteilung der *Lactobacillus*-Species bleibt zu sagen, daß diese untereinander genetisch sehr diversifiziert sind [92].

1.4.1 *Lactobacillus kefir*

Kefir ist ein fermentiertes Getränk, welches bereits vor mehreren tausend Jahren in den Bergen des Kaukasus hergestellt wurde. Kefir wird mit sogenannten Kefirkörnern produziert, welche in Getreidekörnern vorkommen. Kefirkörner sind

16	obligatorisch homofermentativ	fakultativ heterofermentativ	obligatorisch heterofermentativ
<i>L. delbrueckii</i> Gruppe	<i>L. delbrueckii</i> , <i>L. johnsonii</i> <i>L. helveticus</i> , <i>L. gasserii</i> , etc. <i>L. acidophilus</i> , <i>L. kefiranofermentans</i> , etc.	<i>L. hamsteri</i> , <i>L. acetotolerans</i>	
<i>L. casei</i> , <i>Pediococcus</i> Gruppe	<i>Pediococcus damnosus</i> , <i>L. salivarius</i> <i>L. mali</i> , <i>Pediococcus parvulus</i> <i>L. sharpae</i> , etc.	<i>L. casei</i> , <i>L. pentosus</i> <i>L. plantarum</i> , <i>L. sakei</i> <i>Pediococcus acidilacti</i> , etc.	<i>L. brevis</i> , <i>L. buchneri</i> <i>L. fermentum</i> , <i>L. hilgardii</i> L. kefir , etc.
<i>Leuconostoc</i> Gruppe			<i>L. fructosus</i> , <i>L. confusus</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>L. kandleri</i> , etc.
andere Lactobacillen	<i>L. cateniformis</i> , <i>Carnobacterium piscicola</i> , <i>Lactococcus lactis</i>		

Tabelle 1.5: Taxonomische Einordnung von *L. kefir* (nach [93])

eine komplexe aber spezifische Mischung aus Bakterien und Hefen, welche von einer Polysaccharidmatrix zusammengehalten werden. Bei den Bakterien handelt es sich hauptsächlich um Milchsäurebakterien, außerdem kommen Essigsäurebakterien aber auch eine Reihe andere Organismen vor. Die Körner oder Mutterlaugen daraus werden schließlich zusammen mit Büffelmilch in Taschen aus Tierhaut fermentiert [97]. Heutzutage wird Kefir zwar hauptsächlich aus Kuhmilch, aber immer noch unter Einsatz von Kefirkörnern in Edelstahltanks hergestellt.

Aus diesen Körnern wurde dann 1983 von *Kandler* und *Kunath* erstmalig der hier verwendete Stamm *Lactobacillus kefir* DSM 20587 isoliert und beschrieben [98].

Bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) sind bis heute insgesamt 128 Stämme der Art *Lactobacillus* registriert. Vergleicht man die gefundenen Literaturstellen⁴ für die verschiedenen *Lactobacillus* species, so kommt man zu dem in Tabelle 1.6 gezeigten Ergebnis. *L. kefir* gehört zu den eher selten in der Literatur beschriebenen *Lactobacillus*-Species.

Stamm	Anzahl	%-Anteil
gesamt <i>Lactobacillus</i>	16455	100
<i>Lactobacillus casei</i>	3640	22,1
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	1275	7,7
<i>Lactobacillus helveticus</i>	871	5,3
<i>Lactobacillus brevis</i>	726	4,4
<i>Lactobacillus fermentum</i>	466	2,8
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	369	1,6
<i>Lactobacillus sakei</i>	141	0,8
<i>Lactobacillus pentosus</i>	138	0,8
<i>Lactobacillus kefir</i>	122	0,7
<i>Lactobacillus leichmanii</i>	111	0,7

Tabelle 1.6: Anzahl der Literaturzitate für verschiedene *Lactobacillus* species

Aus Analogieschlüssen läßt sich dann ein postuliertes Stoffwechselmodell aufstellen. Allerdings ist zu betonen, daß es sich hier nur um Annahmen handelt, da über den Stoffwechsel in *L. kefir* keinerlei detaillierte Informationen vorliegen. Um aber ein grobes Muster, welches für die weiteren Kapitel wichtig ist, vorzugeben, wurde aus verschiedenen Literaturangaben ein Stoffwechsel postuliert, der die später betrachteten Metabolite einschließt [94, 99, 100, 101, 102, 103, 104].

⁴basierend auf einer Online-Recherche in der *Chemical Abstract* Datenbank. Die Recherche umfasste den Zeitraum von 1907 bis April 2002.

1 Einleitung

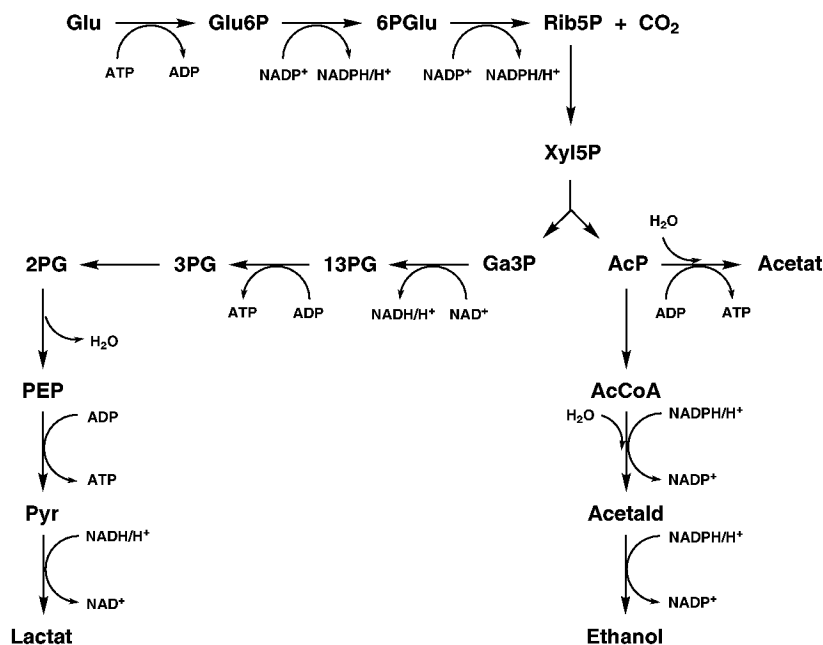


Abbildung 1.15: Postulierter Stoffwechsel für *L. kefir*

1.4.2 Alkoholdehydrogenase aus *L. kefir*

Bei einem Screening nach neuen Alkoholdehydrogenasen wurde von *Hummel et al.* 1990 [105] entdeckt, daß es in *Lactobacillus kefir* eine Alkoholdehydrogenase (ADH) gibt, welche die enantioselektive Reduktion von Acetophenon **6** zu (*R*)-Phenylethanol **7** katalysiert (siehe Abbildung 1.16 [106, 107, 108, 109]).

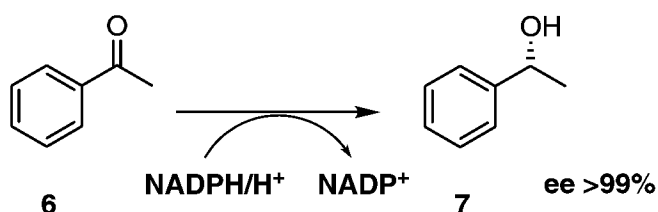


Abbildung 1.16: Standardreaktion für die ADH aus *L. kefir*

Diese ADH ist NADPH abhängig und zeigt eine (*R*)-Spezifität⁵. Allerdings zeigt die ADH in ihrer isolierten Form eine geringe Stabilität. Daher wird in der Regel dem Enzym aus *Lactobacillus brevis* der Vorzug gegeben, welches zu dem

⁵Biologen geben die jeweilige Stereospezifität nach dem Standardsubstrat an. Die Angabe der absoluten Konfiguration ist natürlich Substratabhängig. Bei entsprechenden Substituenten am Stereozentrum können dann auch Verbindungen mit (*S*)-Konfiguration entstehen.

hier betrachteten eine hohe Homologie aufzeigt, und deutlich stabiler ist [106]. Das Substratspektrum ist für beide Enzyme vergleichbar und sehr vielfältig [110]. Es reicht von einfachen aliphatischen Ketonen bis zu mehrfach substituierten aromatischen Ketonen. Das Enzym stellt daher eine interessante Alternative für die organische Synthese [111, 112, 113] dar, da die meisten ADHs (*S*)-spezifisch sind und ein nicht so breites Substratspektrum besitzen.

Im Laufe der Untersuchungen der Arbeitsgruppe *Hummel* zeigte sich dann, daß auch Diketoverbindungen mit der isolierten ADH zu Dihydroxyverbindungen mit sehr hohen optischen Ausbeuten (ee > 99%, de > 99%) reduziert werden können. Allerdings ist die Enzymaktivität mit diesen Verbindungen sehr gering, so daß eine große Menge ADH erforderlich ist. Ebenso konnte gezeigt werden, daß sich die ganze Zelle als Biokatalysator eignet [106, 15].

Hierzu wurden dann von *Hummel et al.* [114] erste Voruntersuchungen zu diesem System durchgeführt. Von *Kriegesmann* [49] wurden diese Arbeiten dann fortgesetzt.

1.5 Kofaktorregenerierung

Oxidoreductasen benötigen Kofaktoren, welche die benötigten Redoxequivalente beinhalten, um die Reduktion von Carbonylfunktionen katalysieren zu können. Bei diesen handelt es sich in der Regel um Nicotinamidadenindinucleotide (NADH und NADPH) [115]. Selten werden Flavine (FAD) oder Methoxatin (PQQ) als Kofaktoren genutzt. Da diese sehr teuer sind, wie Tabelle 1.7 zeigt, ist ihre Regenerierung von enormen wirtschaftlichen Interesse.

Kofaktor	Preis [Euro·mol ⁻¹]
NAD	1.300
NADH	5.200
NADP	5.400
NADPH	39.200
FAD	155.288
PQQ	2.735.376

Tabelle 1.7: Kosten der Kofaktoren. Katalogpreise JFC - Stand Januar 2002. Katalogpreise Fluka für FAD,PQQ - Stand September 2002

Für die Nicotinamid-Kofaktoren wurden eine Reihe von Regenerierungsmethoden in der Literatur publiziert [116, 117, 118]. Neben chemischen [119, 120, 121] und elektrochemischen [122] sind dies in der Praxis vor allem enzymatische Verfahren zur Regenerierung von NADPH.

Bei den enzymatischen Verfahren muß man zwischen zwei Prinzipien [123] unterscheiden:

1 Einleitung

- substratgekoppelte Regenerierung
- enzymgekoppelte Regenerierung

In Abbildung 1.17 sind die beiden Prinzipien an Beispielen dargestellt.

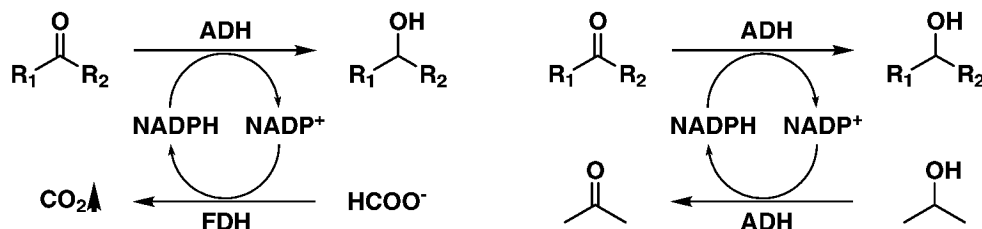


Abbildung 1.17: Prinzipien der Regenerierung von NADPH. links: enzymgekoppelte Regenerierung. rechts: substratgekoppelte Regenerierung.

Die substratgekoppelte Regenerierung nutzt nur ein Enzym sowohl zur Produktion als auch zur Kofaktorregenerierung. Im Falle der hier verwendeten ADH aus *L. kefir* wird häufig Isopropanol als Kosubstrat eingesetzt [124]. Problematisch ist hierbei allerdings die Tatsache, daß es eine thermodynamische Limitierung gibt, da das entstehende Aceton ebenfalls ein Substrat für die ADH ist. Durch verschiedene Methoden, wie z.B. die online Entfernung des Acetons aus der Reaktionslösung kann das Reaktionsgleichgewicht verschoben werden [125].

Bei der enzymgekoppelten Regenerierung wird ein zweites Enzym eingesetzt, welches unter Umsetzung eines entsprechenden Substrates NADP⁺ reduziert. Ein häufig eingesetztes Enzym ist die Formiatdehydrogenase aus *Pseudomonas* sp. [126, 127], welche Formiat zu CO₂ umsetzt. Ein Problem bei der Verwendung dieser FDH liegt in der Kompatibilität der Reaktionsbedingungen mit der verwendeten ADH. Abgesehen davon ist die Verfügbarkeit begrenzt. Ein weiteres Problem stellt die *in vitro* Stabilität von NADP⁺ und NADPH dar.

Um die Schwierigkeiten der Etablierung eines geeigneten Systems zur Kofaktorregenerierung auf einfache Weise überwinden zu können, bietet sich der Einsatz ganzer Zellen an. Diese bieten die Möglichkeit durch Verstoffwechselung einfacher Kosubstrate, wie z.B. Glucose, die Kofaktoren zu regenerieren.

Zwar ist nicht für viele Stämme bekannt, wie genau diese Regenerierung durchgeführt wird, aber man versucht aus den vielen Enzymaktivitäten in einer Zelle, diejenigen die NADPH bilden zu isolieren [128]. Um so zu verstehen, wie die Regenerierung in einer Zelle durchgeführt wird. Zwei Beispiele hierfür sind *Candida parapsilosis* und *Saccharomyces cerevisiae* [129].

Für den hier verwendeten Stamm *Lactobacillus kefir* wurden von Hummel eine Reihe von Kosubstraten untersucht. Neben Isopropanol, Lactose und Fructose erwies sich Glucose als das preisgünstigste und effektivste Kosubstrat für die zellinterne Kofaktorregenerierung [114].

2 Aufgabenstellung

Ziel der Arbeit ist es, einen Produktionsprozeß für enantiomerenreine Diole, am Beispiel der Reduktion von (2,5)-Hexandion **1** zu (2*R*,5*R*)-Hexandiol **3**, mit *Lactobacillus kefir* DSM20587 als Biokatalysator zu entwickeln.

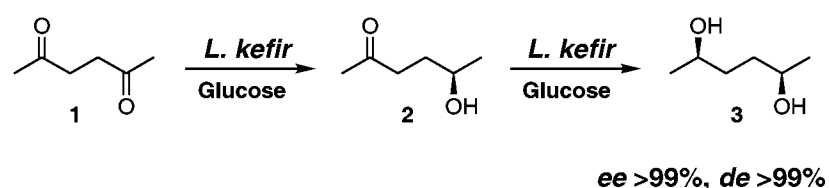


Abbildung 2.1: Ganzzellbiotransformation von (2,5)-Hexandion mit *Lactobacillus kefir* DSM 20587

Wie bereits in der Einleitung gezeigt, sind die Herstellungskosten für den Biokatalysator im Verhältnis zu beispielsweise Bäckerhefe um ein Vielfaches höher. Daher ist ein weiteres Ziel, den Biokatalysator möglichst effektiv zu nutzen. Es bedarf einer möglichst großen Produktivität¹:

$$(2.1) \quad \text{Produktivität} = \frac{g_{\text{Produkt}}}{g_{\text{BTM}}}$$

Es wurden bereits nach der Entdeckung von *Hummel et al.* in der Diplomarbeit von *Kriegesmann* [49] Vorarbeiten geleistet. Unter anderem konnte gezeigt werden, daß sich das Reduktionssystem im Satzreaktor gut anwenden läßt. Allerdings sind die erreichten Produktivitäten gering.

¹Der hier eingeführte Begriff der Produktivität bezieht sich immer auf das jeweilige Experiment und ist zeitunabhängig

2 Aufgabenstellung

Die Aufgabenstellungen dieser Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Kinetik/Stöchiometrie
 - Bestimmung der Kosubstratmenge die benötigt wird, um quantitative Umsätze in Batch Reaktionen zu erreichen.
 - Ermittlung der kinetischen Parameter.
 - Identifizierung der gebildeten Metabolite.
 - Bestimmung der Stöchiometrie der Reaktion.

- Produktion
 - Bestimmung der idealen Produktionsform - Fed-Batch oder ein kontinuierliches Reaktorkonzept.
 - Übertragung des etablierten Reaktorkonzept als Mehrzweckanlage für andere Produkte oder Stämme.
 - Kostenvergleich des etablierten Verfahrens mit dem aktuellen technischen Verfahren.

- Aufarbeitung
 - Etablierung einer Methode zur Aufarbeitung.
 - Kopplung der Aufarbeitung an die Produktion.

3 Systemuntersuchungen

3.1 Einführung

Das Kapitel Systemuntersuchungen soll alle Fragen klären, welche das Reaktionssystem betreffen. Hierzu gehören so grundlegende Dinge, wie die Bereitstellung des Biokatalysators genauso wie die Auswirkungen verschiedener Reaktionsbedingungen (pH, T). Der eigentliche Biokatalysator ist hier die Alkoholdehydrogenase in der Zelle. Da aber immer nur Summenparameter auftreten, welche den Transport der Reaktanden in die Zelle, bzw. aus der Zelle mit einschließen, spricht man letztlich doch von der ganzen Zelle als Biokatalysator.

Ein weiterer wichtiger Bereich ist die Kinetik. Es soll versucht werden eine kinetische Betrachtung des Katalysators vorzunehmen, auch wenn es sich nicht um ein isoliertes Enzym handelt. Und da es sich hier um einen Ganzzellbiokatalysator handelt, muß auch ein Blick auf mögliche Stoffwechselprodukte geworfen werden. Da dies in der Literatur nicht zu finden ist, müssen sowohl die Art der Metabolite als auch die hieraus resultierende Stöchiometrie der Reaktion aufgeklärt werden.

3.2 Bereitstellung des Biokatalysators

Zu Beginn der Arbeiten war es nicht möglich, größere Mengen Biomasse von *Lactobacillus kefir* käuflich zu erwerben. Daher mußte die Biomasse selbst fermentiert werden. Das ursprüngliche Fermentationsprotokoll für heterofermentative Lactobacillen wurde von *De Man et al.* [130] in den sechziger Jahren beschrieben. Das dort beschriebene MRS-Medium (Tabelle 3.1) ist auch heute ein gängiges Medium zur Fermentation von Milchsäurebakterien. Die Expression der ADH wurde für dieses Fermentationsprotokoll von *Riebel* [108] untersucht. Um vergleichbare Biomasse zu erhalten, wurde stets nach diesen Vorgaben fermentiert.

Die Kosten¹ für das Medium belaufen sich auf ca. 3,16 Euro·L⁻¹.

Um ausreichende Mengen Biomasse zu erhalten, wird im 200-L Maßstab fermentiert. Die Fermentation verläuft, wie in Abbildung 3.1 gezeigt, in drei Stufen.

¹Alle angegebenen Preise sind den aktuellen Katalogen 2002 von Merck, Fluka, Sigma und Aldrich entnommen

3 Systemuntersuchungen

	$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{Euro} \cdot \text{L}^{-1}$
Glucose Monohydrat	22	0,03
Casein Pepton	10	0,94
Fleischextrakt	10	1,26
Hefeextrakt	5	0,36
Natriumacetat	5	0,22
Dikaliumhydrogenphosphat	2	0,18
Tween 80	1	0,08
Diammoniumhydrogencitrat	2	0,07
Magnesiumsulfat Heptahydrat	0,2	0,01
Mangansulfat Monohydrat	0,01	0,01
Summe		3,16

Tabelle 3.1: Zusammensetzung und Kosten der Ingredienzen des verwendeten MRS-Mediums

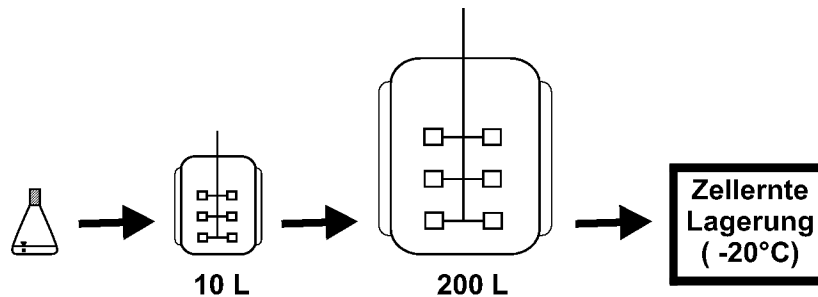


Abbildung 3.1: Fermentationsstrategie zur Produktion von *L. kefir*.

Innerhalb von 6 Tagen gelangt man vom Schüttelkolben über eine 10-L Kultur in den 200-L Maßstab. Im Anschluß wird die Biomasse mit einem kontinuierlich betriebenen Separator geerntet, und kann dann bei -20°C gelagert werden.

In den Abbildungen 3.2 und 3.3 sind die Ergebnisse einer exemplarischen Fermentation im 200-L Maßstab wiedergegeben. In Abbildung 3.3 ist die **Optische Dichte** (OD), gemessen bei 660 nm, als Funktion der Fermentationsdauer gezeigt. Nach 48 h wird eine $\text{OD}_{660\text{nm}}$ von 4,5 erreicht. Bei verschiedenen Fermentationen konnten Endwerte der $\text{OD}_{660\text{nm}}$ zwischen 4 und 4,7 erreicht werden.

In Abbildung 3.2 sind pH und der im Medium gelöste Sauerstoff (pO_2) als Funktion der Zeit aufgetragen. Bei der Fermentation werden typischerweise große Mengen Milchsäure gebildet. Daher fällt der pH von anfänglich 6,25 auf 4. Der pO_2 fällt ebenfalls von etwa 60% auf 0% ab. Auf welche Weise der Sauerstoff verstoffwechselt wird ist nicht klar.

Interessanterweise läßt sich nach Entgasen des Mediums im 300 L Fermenter mit Stickstoff, vor dem Überführen der 10-L Kultur, keine Biomasse gewinnen.

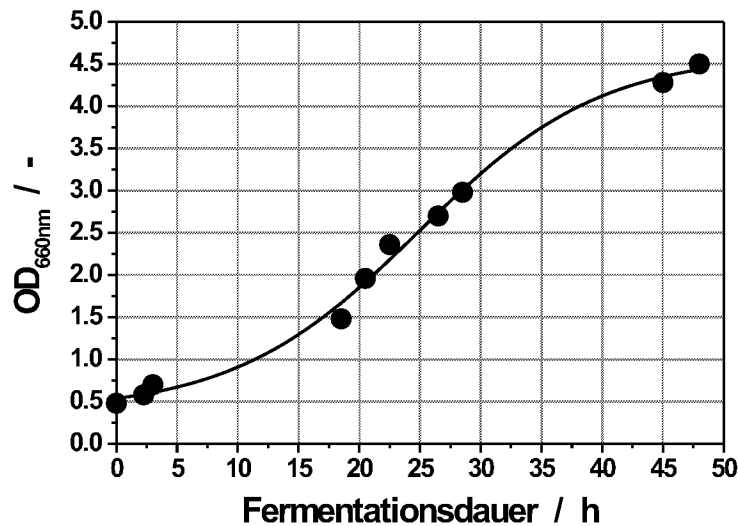


Abbildung 3.2: Optische Dichte in Abhängigkeit der Fermentationsdauer einer *L. kefir* Fermentation im 200-L Maßstab. Die eingezeichnete Linie dient nur als Visualisierungshilfe. Bedingungen: Medienzusammensetzung siehe Tabelle 3.1, 30°C, 300 UpM

In diesem Fall ist der pO_2 am Anfang der Fermentation Null. Daher ist es für eine erfolgreiche Fermentation zwingend erforderlich, daß am Beginn der Fermentation das Medium mit Sauerstoff gesättigt ist. Diese Tatsache wurde vom Kooperationspartner Jülich Fine Chemicals für eine später erfolgreich durchgeführte Optimierung des Fermentationsmediums und des Fermentationsprotokolls genutzt. Auf diesem Wege konnte dann etwas preiswertere Biomasse in größeren Mengen zur Verfügung gestellt werden.

Die Ausbeute an Biomasse in den hier durchgeführten Fermentationen lag in allen Fällen zwischen 0,9 und 1,2 kg Feuchtgewicht. Bei Verwendung von 200 L Fermentationsmedium belaufen sich die Materialkosten pro kg Feuchtgewicht *L. kefir* auf 632 Euro.

Bäckerhefe, welche heutzutage, wie bereits in der Einleitung beschrieben, häufig genutzt wird, ist im direkten Kostenvergleich ein wesentlich günstigerer Biokatalysator. 1 kg Bäckerhefe kostet etwa 70 Euro (Bäckerhefe Typ II, Sigma). Im Bäckereigroßhandel kostet das kg Trockenhefe etwa 1 Euro.

Um eine einfachere Lagerung der Biomasse zu realisieren, wurden die geernteten Zellen lyophilisiert. Nach zwei Stunden Resuspendierung des Lyophilisates in gepufferter Glucoselösung wurde nach Zugabe des Substrates jedoch nur noch eine Restaktivität von 4% gefunden. Das Verfahren der Lyophilisation eignet sich

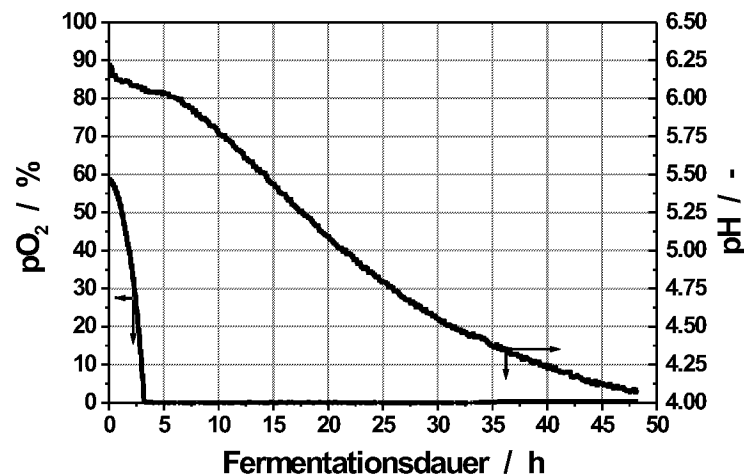


Abbildung 3.3: pO₂ (links) und pH (rechts) in Abhängigkeit der Fermentationsdauer einer *L. kefir* Fermentation im 200-L Maßstab. Bedingungen: siehe Abbildung 3.2

demnach nicht zur Lagerung der Lactobacillen.

Somit werden die Zellen nach der Ernte bei -20°C gelagert.

3.3 Metabolite

Für alle weiteren Untersuchungen muß zuerst geklärt werden, welche Metabolite ausgehend von Glucose gebildet werden. Für Milchsäurebakterien sind eine ganze Reihe möglicher Substanzen in der Literatur beschrieben [131].

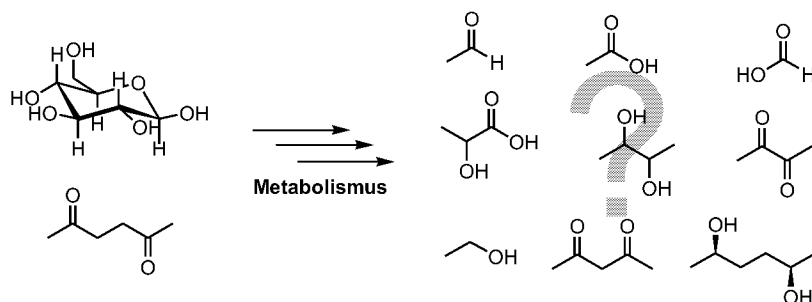


Abbildung 3.4: Mögliche Metabolite

Eine Reihe von Fermentationsüberständen wurde mittels GC, GC-MS, HPLC, LC-MS und NMR Techniken untersucht, um alle im Überstand befindlichen Sub-

stanzen zu identifizieren. Um zu ermitteln, ob *L. kefir* während der Biotransformation extrazelluläre Polysaccharide bildet, wurden Hydrolyseversuche von Zellüberständen mit HCl, H₂SO₄ und NaOH unternommen und die erhaltenen Reaktionslösungen in der HPLC untersucht. Die Ergebnisse der analytischen Untersuchungen sind in Tabelle 3.2 zusammengefaßt.

Metabolit		Metabolit	
Acetaldehyd	-	Diacetyl	-
Acetat	+	Ethanol	+
Acetoin	-	Formiat	-
2,3-Butandiol	-	Lactat	+
CO ₂	+	Polysaccharide	-

Tabelle 3.2: Identifizierte extrazelluläre Metabolite.

Als Ergebnis ist festzuhalten, daß Glucose zu Acetat, Ethanol, Lactat und CO₂ metabolisiert wird, welche im Zellüberstand meßbar sind. Alle anderen möglichen Metabolite konnten im Rahmen der Meßgenauigkeit extrazellulär nicht nachgewiesen werden.

3.4 Allgemeine Definitionen

Im folgenden Abschnitt werden einige grundlegende Definitionen eingeführt. Diese gelten nicht nur für dieses, sondern auch für alle weiteren Kapitel.

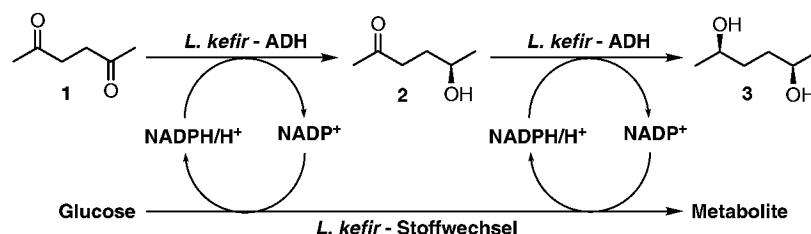


Abbildung 3.5: Untersuchtes Gesamtreaktionssystem.

In allen weiteren Arbeiten wird die bereits in der Einleitung dargestellte Reduktion von (2,5)-Hexandion **1** über (5*R*)-Hydroxyhexan-2-on **2** zu (2*R*,5*R*)-Hexandiol **3** untersucht. Als Kosubstrat wird bei allen Experimenten Glucose verwendet. Glucose dient hier als Elektronendonator, da durch die Metabolisierung die notwendigen Redoxäquivalente in Form von NADPH zur Verfügung gestellt werden.

3 Systemuntersuchungen

Für das in Abbildung 3.5 dargestellte Reaktionssystem kann der Umsatz U wie folgt bestimmt werden.

$$(3.1) \quad U_{(2,5)\text{-Hexandion}} = \frac{c_{(2,5)\text{-Hexandion}}^0 - c_{(2,5)\text{-Hexandion}}^t}{c_{(2,5)\text{-Hexandion}}^0}$$

Da die Verbindung **3** das eigentliche Zielprodukt ist, wird, sofern nicht anders im Text erwähnt, die Ausbeute η immer auf das Diol **3** bezogen. Es gilt:

$$(3.2) \quad \eta = \frac{c_{(2R,5R)\text{-Hexandiol}}}{c_{(2,5)\text{-Hexandion}}^0}$$

Auch für die chemische Selektivität σ gilt, sofern nicht anders im Text erwähnt, daß der Wert sich auf das Diol **3** bezieht.

$$(3.3) \quad \sigma = \frac{c_{(2R,5R)\text{-Hexandiol}}}{c_{(2R,5R)\text{-Hexandiol}} + c_{(5R)\text{-Hydroxyhexan-2-on}}$$

Zur Bestimmung der Stereoselektivität von (2*R*,5*R*)-Hexandiol müssen zwei Größen definiert werden. Der Enantiomerenüberschuß (*ee*) und der Diastereomerenüberschuß (*de*). Der *ee* ist definiert als:

$$(3.4) \quad ee_{R,R} = \frac{R, R - S, S}{R, R + S, S}$$

Der Diastereomerenüberschuß (*de*) ist wie folgt definiert:

$$(3.5) \quad de_{R,R} = \frac{(R, R + S, S) - meso}{R, R + S, S + meso}$$

3.5 Kinetische und Thermodynamische Untersuchungen

3.5.1 Allgemeine Parameter

Als Erstes wurde die Korrelation einiger allgemeiner Parameter bestimmt. Diese sind Zellzahl, Biotrockenmasse und optische Dichte (OD_{660nm}) (siehe Abbildung 3.6 auf Seite 29). Vor allem die Korrelation zwischen optischer Dichte (OD) und Biotrockenmasse (BTM) ist interessant, da die Bestimmung der OD wesentlich schneller ist als die BTM Bestimmung (siehe Material und Methoden). Problematisch bei der OD Bestimmung, aber auch bei der Bestimmung der Zellzahl, ist die hohe Zellkonzentration. Durch die für die Messung notwendige Verdünnung kommt es zu relativ starken Messwertschwankungen von bis zu 10%. Diese resultieren daraus, daß bei diesen hohen Zelldichten keine gleichmäßige Suspension vorliegt.

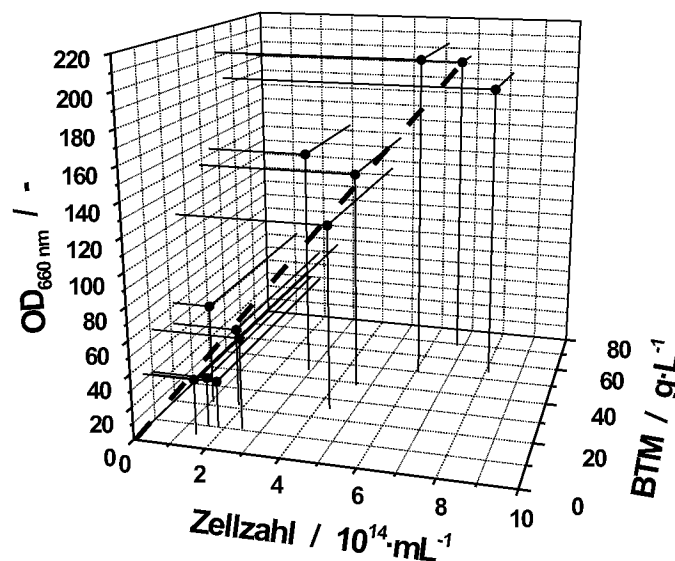


Abbildung 3.6: Korrelation von Optischer Dichte (OD_{660nm}), Biotrockenmasse (BTM) und Zellzahl pro mL.

Bildet man Schnitte auf jeweils 2 Ebenen ab, dann ergeben sich die folgenden Gleichungen für die daraus resultierenden Geraden:

$$(3.6) \quad BTM = 0,291 g \cdot L^{-1} \cdot OD_{660nm} \quad [g \cdot L^{-1}]$$

$$(3.7) \quad \text{BTM} = 8,16 \cdot 10^{11} g \cdot \text{Zellzahl} \quad [g \cdot L^{-1}]$$

$$(3.8) \quad \text{OD}_{660nm} = 28,03 mL \cdot \text{Zellzahl} \quad [-]$$

3.5.2 Verhältnis von Kosubstrat und Substrat

Der Einsatz ganzer Zellen von *Lactobacillus kefir* bringt im Gegensatz zur Nutzung der isolierten ADH den Vorteil, daß die zellinternen Regenerierungssysteme für den Kofaktor NADPH genutzt werden können. Um die entsprechende Menge an Redoxäquivalenten zu produzieren, muß ein Elektronendonator zur Verfügung gestellt werden. In Arbeiten von *Hummel et al.* wurde Glucose als der beste und kostengünstigste Elektronendonator ermittelt [114]. Um möglichst kostengünstig arbeiten zu können und möglichst wenig Nebenprodukte zu produzieren, welche bei der Aufarbeitung stören könnten, wird das minimale Verhältnis von Kosubstrat (Glucose) und Substrat (**1**) bestimmt. Hierfür werden Batchversuche mit verschiedenen Verhältnissen von Glucose und (2,5)-Hexandion **1** durchgeführt. In Abbildung 3.7 sind die am Ende eines jeden Batch erreichten Werte für Umsatz und Ausbeute an (2*R*,5*R*)-Hexandiol **3** über das eingesetzte Stoffmengenverhältnis von Elektronendonator zu Substrat aufgetragen.

Es zeigt sich, daß das minimale Verhältnis offensichtlich im Bereich von 1 bis 1,3 liegt, womit wohl ein kleiner Überschuß an Glucose nötig ist, um in jedem Fall quantitativen Umsatz zu erreichen.

Es werden, wie in Abbildung 3.7 auf Seite 31 gezeigt, quantitative Ausbeuten und Umsätze erreicht. Außerdem sind sowohl *ee*, als auch *de* von *U* und η völlig unabhängig. Bei allen Messungen werden Werte von >99% *ee* bzw. *de* erreicht. Bei der Hefe ist dies nicht möglich. Wie schon *Kriegesmann* [49] zeigen konnte (vgl. Abbildung 3.8), erreicht man bei einem 12-fachen Glucoseüberschuß nur etwa 72% Ausbeute und bei Einsatz von einem noch größeren Überschuß an Glucose einen maximal erreichbaren *de* von 95%.

3.5.3 Einfluß des pH-Wertes

Sowohl pH Wert als auch Temperatur beeinflussen die Stoffwechselaktivität der Zellen bzw. die Enzymaktivitäten in der Zelle. Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit wurden bereits von *Kriegesmann* [49] und *Riebel* [108] durchgeführt.

3.5 Kinetische und Thermodynamische Untersuchungen

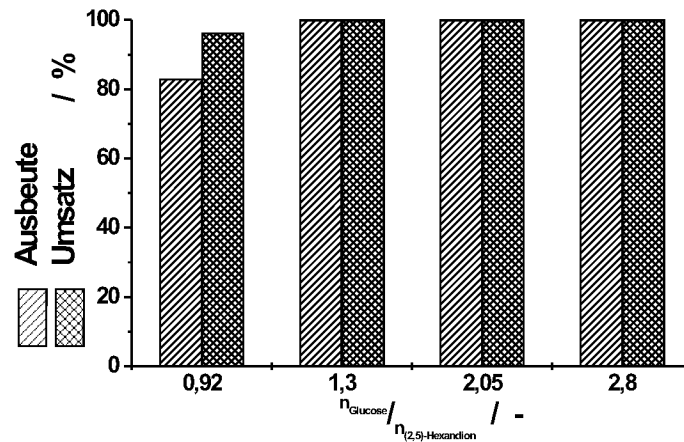


Abbildung 3.7: Einfluß von verschiedenen Verhältnissen von Kosubstrat zu Substrat. Bedingungen : $V = 0,06$ L, 30°C , pH 6, 6 g *L. kefir*. 0.92 100 mM Glucose, 109 mM (2,5)-Hexandion, 1.3 141 mM Glucose, 110 mM (2,5)-Hexandion, 2.05 219 mM Glucose, 107 mM (2,5)-Hexandion, 2.8 290 mM Glucose, 103 mM (2,5)-Hexandion.

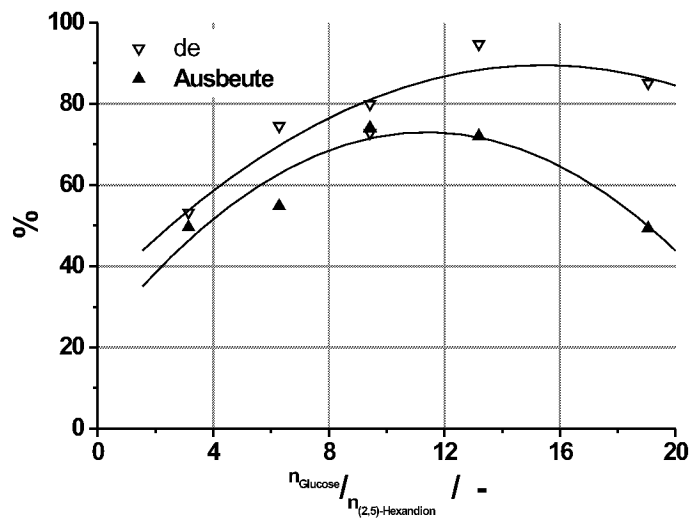


Abbildung 3.8: Einfluß von verschiedenen Verhältnissen von Kosubstrat zu Substrat bei Einsatz von Bäckerhefe auf *de* und Ausbeute (Originalabbildung vgl. [49] S.41).

3 Systemuntersuchungen

Ein pH-Wert von 6 ist zur Produktion des Diols **3** am besten geeignet. Bei pH 5 und 7 beobachtet man eine deutlich stärkere Bildung des intermediären Hydroxyketones.

3.5.4 Einfluß der Temperatur

Die Temperaturabhängigkeit wird zunächst nur für (2,5)-Hexandion als Substrat² untersucht. Aus der Arrhenius-Gleichung [132]

$$(3.9) \quad k = A \cdot e^{\frac{E_a}{RT}}$$

läßt sich die Aktivierungsenergie errechnen. Durch Auftragung von Aktivität gegen Temperatur (siehe Abbildung 3.9) kann die Aktivierungsenergie E_a zu 64,5 kJ·mol⁻¹ bestimmt werden.

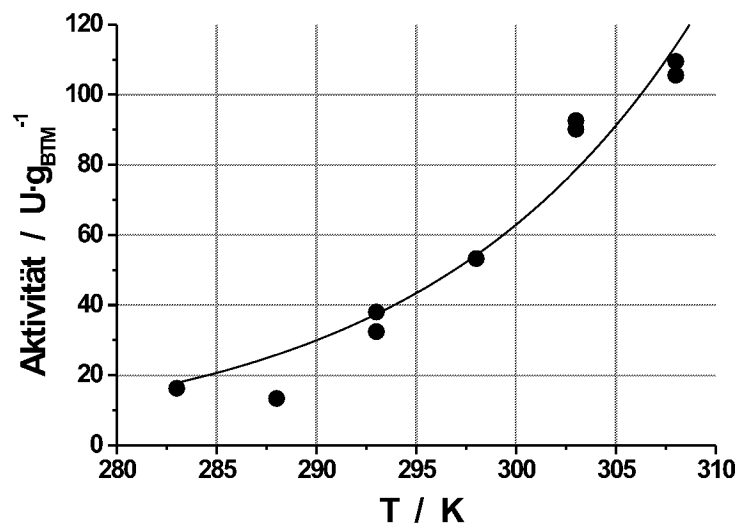


Abbildung 3.9: Abhängigkeit der Aktivität von der Temperatur.

Bedingungen : V = 0,1 L, 30°C, pH 6,2 g_{BFM} L. kefir. 50 mM (2,5)-Hexandion, 400 mM Glucose, 50 mM Phosphatpuffer.

Mit 64,5 kJ·mol⁻¹ liegt der Wert sehr hoch. Für Dehydrogenasen betragen die durchschnittlichen Aktivierungsenergien in der Regel 30-40 kJ·mol⁻¹.

²siehe Kapitel **Bestimmung der kinetischen Parameter**.

3.5.5 Zwischenbilanz

Die vorhergehenden Abschnitte lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Es konnte in ausreichenden Menge Biomasse hergestellt werden.
- Es wurden Ausbeuten von 0,9 - 1,2 kg Biofeuchtmasse je Fermentation erreicht.
- Es konnten während der Biotransformation extrazellulär Lactat, Acetat, Ethanol und CO₂ als Metabolite von Glucose nachgewiesen werden.
- Für einfache Batch-Experimente konnte ein minimales Verhältnis von Substrat und Kosubstrat von 1,3 ermittelt werden. Damit lassen sich quantitative Umsätze und Ausbeuten erzielen.
- Zur Produktion von (2*R*,5*R*)-Hexandiol ist ein pH-Wert von 6 ideal.
- Die Aktivierungsenergie der ersten Reduktion konnte zu 64,5 kJ·mol⁻¹ bestimmt werden.

3.5.6 Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten kann ein formalkinetischer Ansatz angewendet werden. Das System stellt eine einfache Folgereaktion ohne Nebenreaktionen dar (Abbildung 3.10)

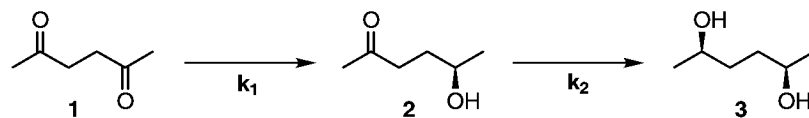


Abbildung 3.10: Folgereaktion

Als Grundlage zur Bestimmung der beiden kinetischen Konstanten k_1 und k_2 soll der in Abbildung 3.11 auf Seite 34 gezeigte Batchverlauf dienen.

Die Reaktionsgeschwindigkeiten R für die Komponenten **1**, **2** und **3** lassen sich wie folgt ausdrücken:

$$(3.10) \quad -R_1 = -\frac{dc_1}{dt} = k_1 \cdot c_1^m$$

$$(3.11) \quad R_2 = \frac{dc_2}{dt} = k_1 \cdot c_1^m - k_2 \cdot c_2^n$$

3 Systemuntersuchungen

$$(3.12) \quad R_3 = \frac{dc_3}{dt} = k_2 \cdot c_3^n$$

Wobei c_i die Konzentration der Verbindung i und m, n die jeweilige Reaktionsordnung darstellen.

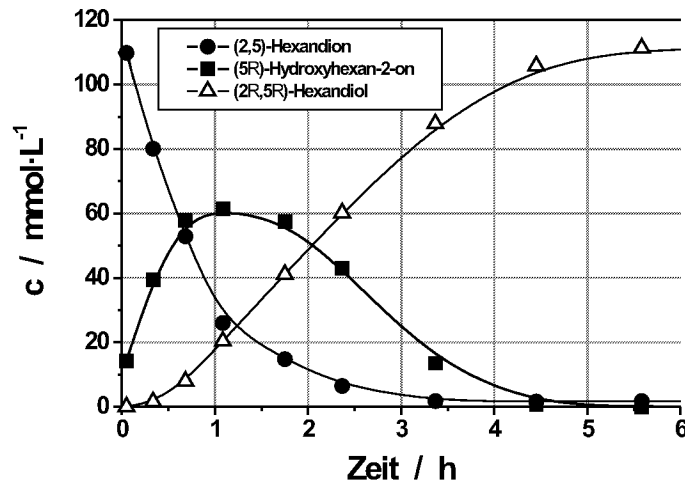


Abbildung 3.11: Exemplarischer Batchverlauf zur Ermittlung von k_1 und k_2 . Bedingungen : $V = 0,03$ L, 30°C , pH 6, Glucose 130 mM, (2,5)-Hexandion 110 mM, *L. kefir* $22 \text{ g}_{BTM} \cdot \text{L}^{-1}$

Aus zweierlei Gründen kann man in diesem Fall für beide Teilreaktionen eine irreversible Reaktion 1. Ordnung ($m = n = 1$) annehmen. In Abbildung 3.12 auf Seite 35 ist die Abhängigkeit der Aktivität von der Substratkonzentration gezeigt. Da die intrazellulären Konzentrationen an Substrat sehr gering sind, befindet man sich im Bereich erster Ordnung. Auf der anderen Seite kann man annehmen, daß die Zelle durch die unabhängige und konstant laufende intrazelluläre Kofaktorregenerierung eine große Menge an reduziertem Kofaktor zur Verfügung stellt.

Durch Integration von Gleichung 3.10 erhält man Gleichung 3.13. Durch Umformen dieser Gleichung ergibt sich dann Gleichung 3.14 sowie der in Abbildung 3.13 gezeigte Graph. Die Steigung der angepassten Geraden muß noch mit der eingesetzten Biomassekonzentration korrigiert werden und stellt dann die Konstante k_1' dar. Diese ergibt sich zu $k_1' = 0,055 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}_{BTM}^{-1}$.

$$(3.13) \quad c_1 = c_{10} \cdot e^{-k_1 t}$$

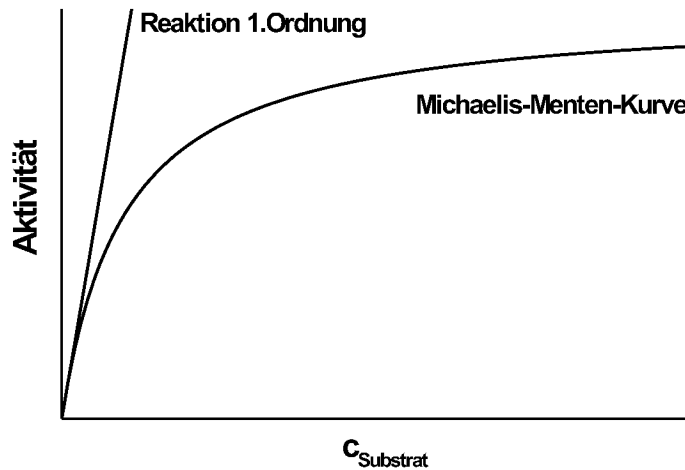


Abbildung 3.12: Bereich der Reaktion 1. Ordnung in der Michaelis-Menten Kurve

$$(3.14) \quad \ln \frac{c_{10}}{c_1} = -k_1 \cdot t$$

Durch Parameteranpassung von k_2 , ausgehend von den Gleichungen 3.10, 3.11 und 3.12, läßt sich die Konstante k_2 bestimmen. In Abbildung 3.14 ist diese Anpassung (Linien) für den oben gezeigten Batchverlauf durchgeführt. Hieraus ergibt sich k_2 zu $0,63 \text{ h}^{-1}$. Durch erneute Korrektur durch die eingesetzte Biomassemenge ergibt sich k_2' zu $0,029 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}_{BTM}^{-1}$.

Da gilt:

$$(3.15) \quad k_1' > k_2'$$

kommt es zu einer Akkumulation des intermediären Produktes **2**. Die in Abbildung 3.14 gezeigte Modellierung gibt den Verlauf des Batches gut wieder. Die Annahme eines Modelles erster Ordnung für die beiden Reaktionsschritte ist offensichtlich berechtigt.

3 Systemuntersuchungen

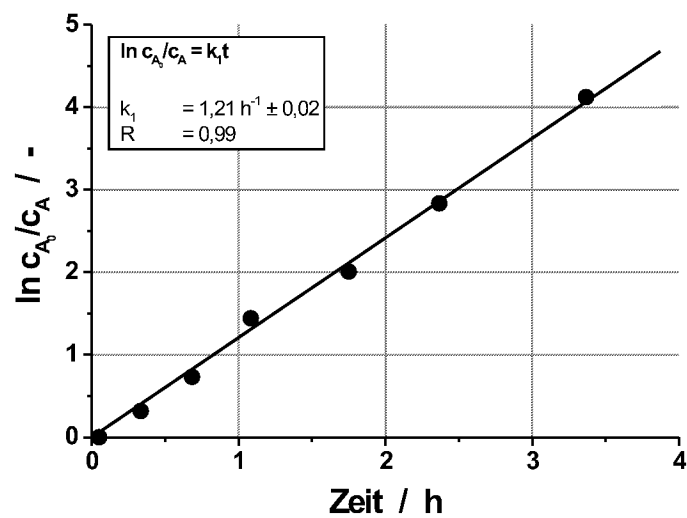


Abbildung 3.13: Ermittlung von k_1 durch lineare Regression. Bedingungen: siehe Abbildung 3.11

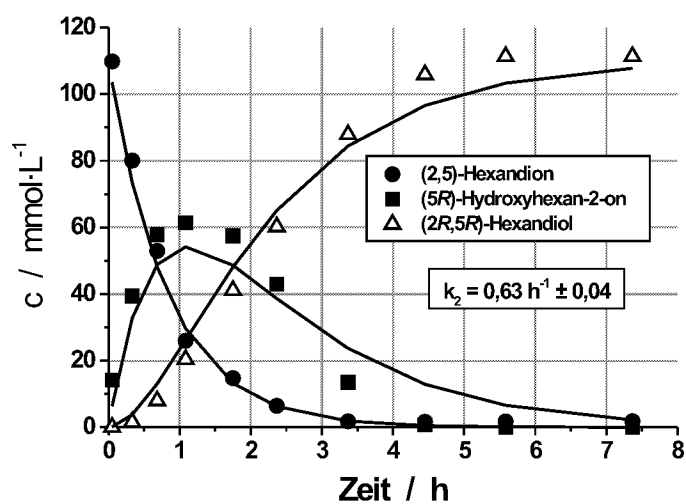


Abbildung 3.14: Modellierung des Batches aus Abbildung 3.11.

3.5.7 Inhibierungen durch Substrat oder Produkte

Um festzustellen, ob im System Inhibierungen durch das Substrat oder durch die beiden Produkte vorhanden sind, werden die beiden Teilreaktionen getrennt untersucht. Für beide Reaktionen wird sowohl die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration, als auch der Einfluß der Produkte untersucht. Um die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit messen zu können, wird hier für alle Experimente eine 2%-ige Zellsuspension eingesetzt (ca. $4 \text{ g}_{BTM} \text{L}^{-1}$). Bei den nun folgenden Untersuchungen handelt es sich um makroskopische Effekte. Die Einflüsse von Transportvorgängen (in die Zelle, aus der Zelle) sind immer vorhanden.

Für den Einsatz von (2,5)-Hexandion als Substrat (erste Reaktion) erhält man die in Abbildung 3.15 gezeigte Abhängigkeit der Aktivität von der Konzentration an (2,5)-Hexandion. Man erkennt eine deutliche Substratüberschußinhibierung. Das Aktivitätsmaximum liegt bei $36 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

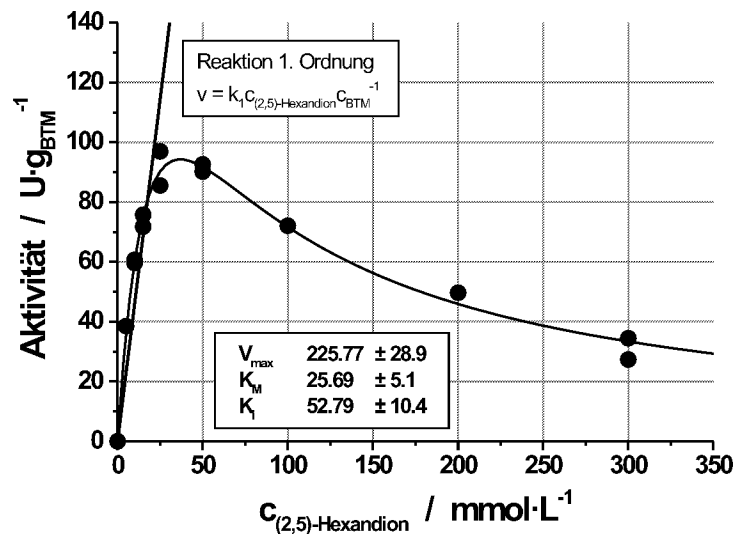


Abbildung 3.15: Abhängigkeit der Aktivität von der Konzentration an (2,5)-Hexandion. Bedingungen : $V = 0,1 \text{ L}$, 30°C , $\text{pH } 6$, $22 \text{ g}_{BFM} \cdot \text{L}^{-1}$ *L. kefir*, 400 mM Glucose, 50 mM Phosphatpuffer

Die eingezeichnete Gerade gibt den Verlauf einer Reaktion erster Ordnung wieder. Die hierbei verwendete Konstante k_1 entspricht der oben Ermittelten. Bis zum Aktivitätsmaximum gibt dieser den gemessenen Aktivitätsverlauf wieder. Es muß in der Zelle also Limitierungen geben, welche für diesen Verlauf verantwortlich sind. Es könnte sich hierbei beispielsweise um Transportphänomene handeln. Natürlich kann diese Limitierung auch im Stoffwechsel vorhanden

3 Systemuntersuchungen

sein. Dies würde bedeuten, daß die Pools der Kofaktoren eine limitierende Größe darstellen.

Um die beobachtete Inhibierung zu quantifizieren, werden die kinetischen Parameter nach Michaelis-Menten mit einem Modell für eine Substratüberschußinhibierung (Gleichung 3.16) angepaßt.

$$(3.16) \quad R^0 = \frac{V_{max} \cdot c_{(2,5)\text{-Hexandion}}}{K_M + c_{(2,5)\text{-Hexandion}} + \frac{c_{(2,5)\text{-Hexandion}}^2}{K_i}} \quad [U \cdot g_{BTM}^{-1}]$$

Für die kinetischen Parameter ergeben sich die in Tabelle 3.3 gezeigten Werte.

Parameter	Wert		
$V_{max}^{(2,5)\text{-Hexandion}}$	0,226	$\pm 0,029$	$\text{kU} \cdot \text{g}_{BTM}^{-1}$
$K_M^{(2,5)\text{-Hexandion}}$	25,7	$\pm 5,1$	$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
$K_i^{(2,5)\text{-Hexandion}}$	52,8	$\pm 5,1$	$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

Tabelle 3.3: Kinetische Parameter für die erste Teilreaktion

Als nächstes wurde untersucht, ob auch das Produkt (2*R*,5*R*)-Hexandiol **3** einen Einfluß auf die Aktivität hat. Um dieses zu untersuchen, wurden zu Standardassays verschiedene Konzentrationen an **3** gegeben.

Unter den gegebenen Bedingungen konnte die Rückreaktion des Diols **3** zum intermediär auftretenden Hydroxyketon **2** beobachtet werden (Abbildung 3.16). Die Abnahme von **3** und die überproportionale Zunahme von **2** sind im Batchverlauf zu erkennen. Durch Variation der (2*R*,5*R*)-Hexandiol Konzentration konnte gezeigt werden, daß dieser Effekt konzentrationsabhängig ist (Abbildung 3.17). Es zeigt sich eine Abhängigkeit erster Ordnung von der eingesetzten Konzentration des Diols **3**. Die Geschwindigkeit der Diolabnahme (Kreise) ist unabhängig von diesem Verhalten. Dieses Ergebnis überrascht, da bis zu diesem Zeitpunkt angenommen wurde, daß die beiden durchgeführten Reduktionsschritte irreversibler Natur sind. Hier konnte erstmalig eine Rückreaktion bei Einsatz der ganzen Zelle als Biokatalysator beobachtet werden.

Trotz dieses scheinbaren Gleichgewichtsverhaltens erreicht der Batchverlauf in Abbildung 3.16 auf Seite 39 am Ende quantitativen Umsatz und quantitative Ausbeute. Eine Erklärung hierfür könnte darin liegen, daß es in der Zelle eine nicht vernachlässigbare Konzentration an NADP^+ gibt. Dann wäre die oxidative Reaktion bis zu einem Zeitpunkt möglich, an dem die intrazelluläre Kofaktorregenerierung im Stoffwechsel den Pool an NADP^+ verbraucht hat, und die Reaktion irreversibel zu quantitativer Ausbeute an **3** führt. Um diese Theorie zu belegen, wäre es nötig die intrazellulären Konzentrationen an NADP^+ und NADPH gleichzeitig (!!) zu bestimmen. Dies ist allerdings bis heute nicht möglich [133, 134].

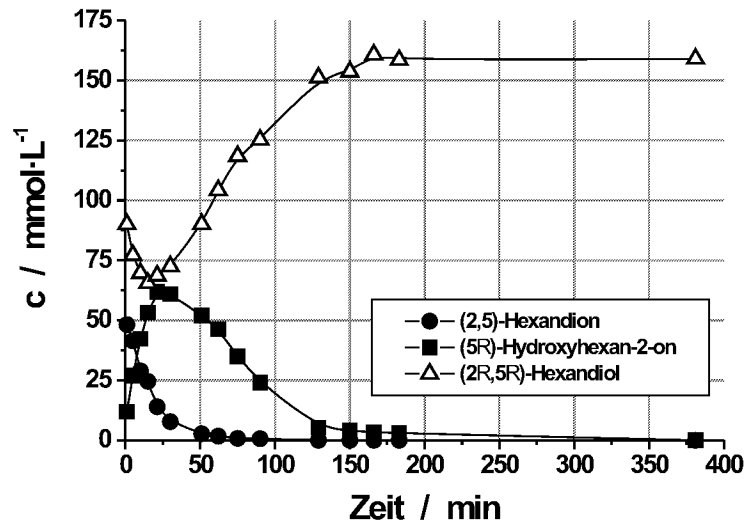


Abbildung 3.16: Batchverlauf mit Rückreaktion. Bedingungen: $V = 0,1 \text{ L}$, 30°C , pH 6, $22 \text{ g}_{BFM} \cdot \text{L}^{-1}$ *L. kefir*, 50 mM (2,5)-Hexandion, 100 mM (2*R*,5*R*)-Hexandiol, 400 mM Glucose, 50 mM Phosphatpuffer.

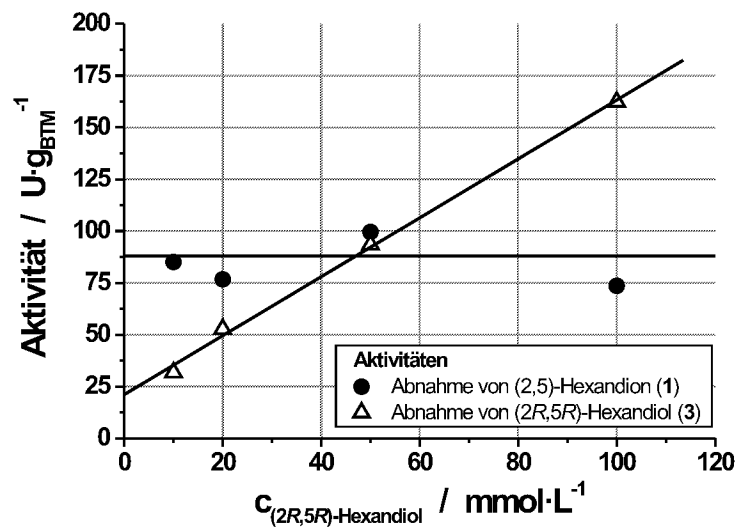


Abbildung 3.17: Abhängigkeit der Aktivität von der Konzentration an (2*R*,5*R*)-Hexandiol. Bedingungen: $V = 0,1 \text{ L}$, 30°C , pH 6, $22 \text{ g}_{BFM} \cdot \text{L}^{-1}$ *L. kefir*, 50 mM (2,5)-Hexandion, 400 mM Glucose, 50 mM Phosphatpuffer.

3 Systemuntersuchungen

Führt man kinetische Untersuchungen für die zweite Reaktion, also die Reduktion des Hydroxyketones, durch, dann ist es ungleich schwieriger kinetische Konstanten zu ermitteln als für die erste Reaktion. Da das eingesetzte Substrat **2** neben der Carbonylfunktion auch über eine Hydroxyfunktion verfügt, kann diese natürlich ebenso oxidiert werden. In Abbildung 3.18 auf Seite 40 ist die Abhängigkeit der Aktivität von der Konzentration an (5*R*)-Hydroxyhexan-2-on dargestellt.

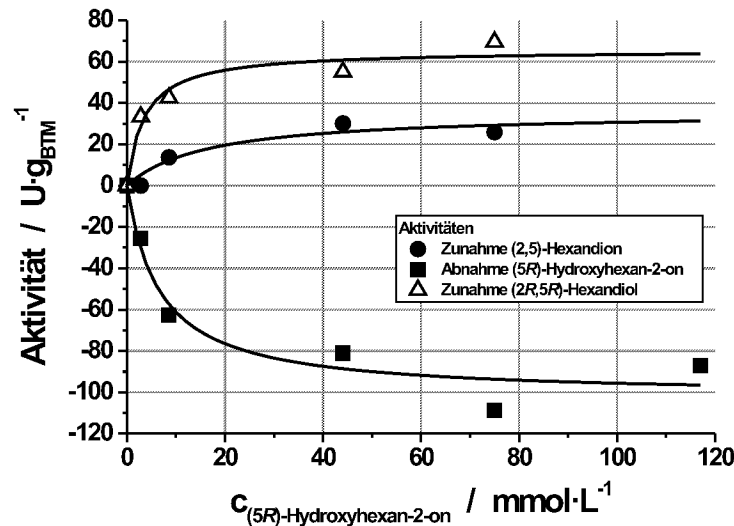


Abbildung 3.18: Abhängigkeit der Aktivität von der Konzentration an (*R*)-Hydroxyhexan-2-on. Bedingungen: $V = 0,1 \text{ L}$, 30°C , $\text{pH } 6$, $22 \text{ g}_{BFM} \cdot \text{L}^{-1}$ *L. kefir*, 400 mM Glucose, 50 mM Phosphatpuffer.

Hierbei kann man erstens eine Aktivität für die Zunahme an **1** definieren, zweitens eine Aktivität für die Zunahme von **3** sowie eine Aktivität für die Abnahme von **2** (hier nach unten aufgetragen).

Die kinetischen Konstanten für diese Abhängigkeiten lassen sich mit einer einfachen Michaelis-Menten Gleichung anpassen. Um aber eine Basis für eine mögliche zukünftige Modellierung zu schaffen, ist dies ein erster Ansatz zum Verständnis des Systems bzw. zur Ermittlung von kinetischen Konstanten.

$$(3.17) \quad R^0 = \frac{V_{max}^i \cdot c_{(5R)\text{-Hydroxyhexan-2-on}}}{K_M^i + c_{(5R)\text{-Hydroxyhexan-2-on}}}$$

Für die in Abbildung 3.18 gezeigten drei Anpassungen lassen sich die kinetischen Konstanten wie folgt bestimmen:

3.5 Kinetische und Thermodynamische Untersuchungen

Parameter	Wert		
V_{max}^1	0,036	$\pm 0,009$	$\text{kU} \cdot \text{g}_{BTM}^{-1}$
K_M^1	16,5	$\pm 14,4$	$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
V_{max}^2	0,102	$\pm 0,008$	$\text{kU} \cdot \text{g}_{BTM}^{-1}$
K_M^2	6,7	$\pm 2,6$	$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
V_{max}^3	0,066	$\pm 0,005$	$\text{kU} \cdot \text{g}_{BTM}^{-1}$
K_M^3	3,5	$\pm 1,4$	$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

Tabelle 3.4: Kinetische Parameter für die zweite Teilreaktion

Da mit Zugabe des Substrates **2** neben der Reduktion zum Diol **3** auch die Rückreaktion zum Diketon **1** zu beobachten ist, müssen die erhaltenen apparenten Konstanten mit Vorsicht betrachtet werden.

Trotz dieser Rückreaktion gelangt man hierbei in Batchversuchen auch zu quantitativem Umsatz von **1** und quantitativer Ausbeute von **3**, wie in Abbildung 3.19 auf Seite 42 gezeigt ist. V_{max} und K_M sind in diesem Fall auf die Abreaktion von **2** bezogen. Da dieses aber unter Anfangsreaktionsgeschwindigkeitsbedingungen sowohl in die oxidative als auch in die reduktive Richtung abreagiert, stellen beide kinetischen Parameter Summenparameter dar.

Als Ergebnis läßt sich festhalten, daß unter Anfangsreaktionsgeschwindigkeitsbedingungen das in Abbildung 3.20 gezeigte Komplexe Reaktionsschema gilt. Allerdings lassen sich die Konstanten für die beiden Rückreaktionen nicht bestimmen.

3 Systemuntersuchungen

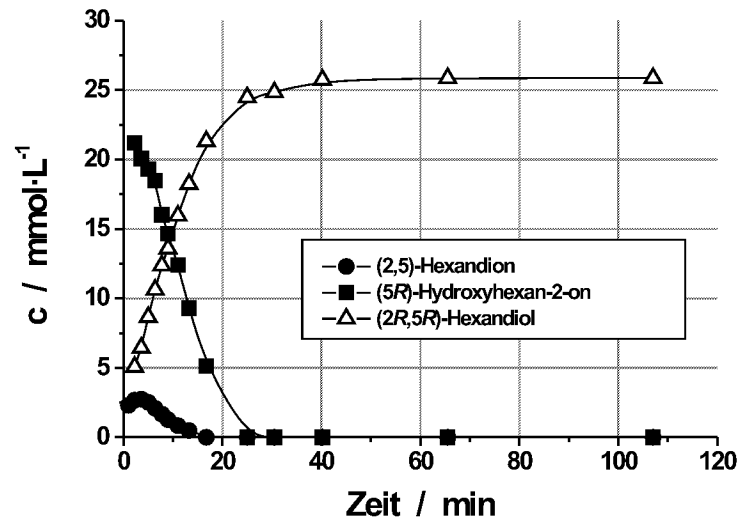


Abbildung 3.19: Batchverlauf mit Rückreaktion. Bedingungen: $V = 0,1 \text{ L}$, 30°C , $\text{pH } 6$, $22 \text{ g}_{BFM} \cdot \text{L}^{-1} \text{ L. kefir}$, 26 mM (5*R*)-Hydroxyhexan-2-on, 400 mM Glucose, 50 mM Phosphatpuffer.

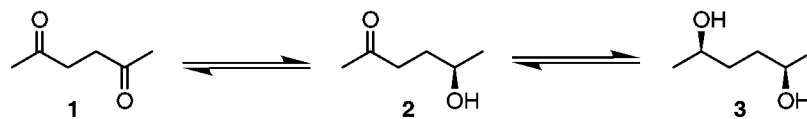


Abbildung 3.20: Beobachtete Reaktionen unter Anfangsreaktionsgeschwindigkeitsbedingungen

3.5.8 Zwischenbilanz

Die Ergebnisse des vorherigen Kapitels lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Durch den formalkinetischen Ansatz einer irreversiblen Reaktion erster Ordnung konnten die Geschwindigkeitskonstanten $k_1' = 0,055 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}_{BTM}^{-1}$ und $k_2' = 0,029 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}_{BTM}^{-1}$ bestimmt werden.
- Es wurde eine Substratüberschußinhibierung für (2,5)-Hexandion festgestellt. Die kinetischen Parameter konnten durch die Anpassung eines Modelles nach Michaelis-Menten bestimmt werden (siehe Tabelle 3.3 auf Seite 38).
- Es konnte, entgegen der bisherigen Annahmen, erstmals gezeigt werden, daß auch die Rückreaktion durch die Zelle katalysiert wird. Hierfür konnten auch kinetische Konstanten bestimmt werden (siehe Tabelle 3.4 auf Seite 41).
- Die Pools an NADP^+ und NADPH konnten als entscheidende Parameter für zukünftige Arbeiten identifiziert werden.

3.6 Inhibierungen im Stoffwechsel

Bei der Aufstellung von Stoffwechselmodellen für *E. coli* gibt es Überlegungen, eine Inhibierung durch NADPH im Schritt von Glu6P zu 6PGlu anzunehmen [135].

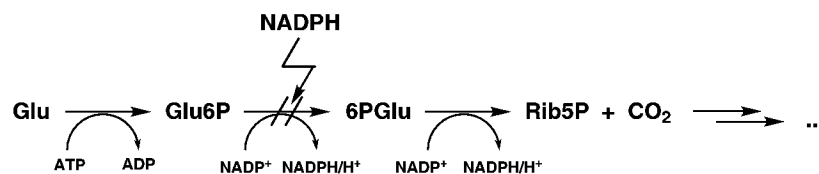


Abbildung 3.21: Angenommene Inhibierung durch NADPH

Damit wäre die Glykolyse blockiert, und es könnten keine Metabolite gebildet werden. In dem Fall der hier betrachteten Reaktion verläuft die Reduktion von (2,5)-Hexandion unter NADPH -Verbrauch. Es sollte also möglich sein, sofern es diese Inhibierung gibt, diese durch einen gezielten schnellen Verbrauch von NADPH zu neutralisieren. Glucose würde dann metabolisiert.

Hierzu wurde ein Fed-Batch Experiment mit Glucosezudosierung ($1,19 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{BTM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) durchgeführt und zu einem Zeitpunkt $t = 3 \text{ h } 60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (2,5)-Hexandion in den Reaktor gegeben. Der pH-Wert wird durch Titration mit 4N

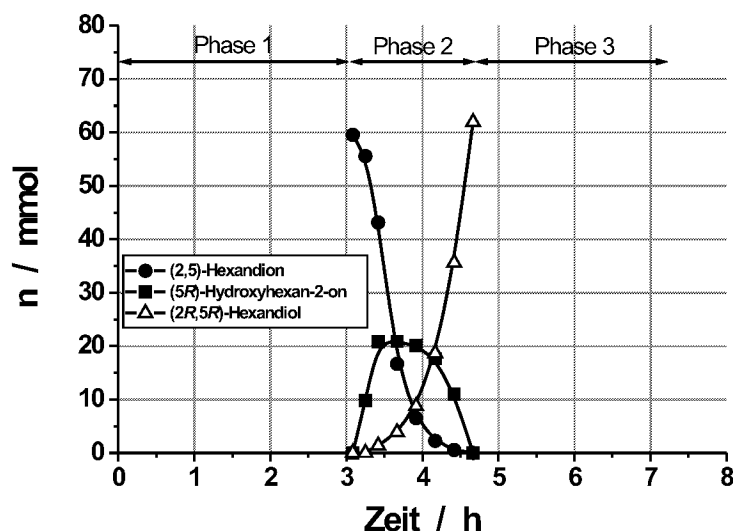


Abbildung 3.22: Pulsexperiment mit *L. kefir*. (2,5)-Hexandion als Puls in einem Glucose Fed-Batch. Bedingungen : $V_0 = 1$ L, 30°C , pH 6, 4 vvm N_2 , $12,6 \text{ g}_{\text{BFM}} \cdot \text{L}^{-1}$ *L. kefir*, 50 mM Phosphatpuffer, $1,19 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ Glucose, 60 mM (2,5)-Hexandion (Puls)

NaOH konstant bei 6 gehalten. In Abbildung 3.22 ist der Reaktionsverlauf gezeigt, während in Abbildung 3.23 der zeitliche Verlauf der Metabolite über das gesamte Experiment gezeigt ist.

Das gesamte Experiment läßt sich in drei Phasen einteilen. Die Produktionsraten innerhalb dieser drei Phasen sind in Tabelle 3.5 gezeigt. Daraus lassen sich Rückschlüsse auf den in Abbildung 3.24 postulierten Stoffwechsel (vgl. Kapitel Einleitung) ziehen.

Der (2,5)-Hexandionpuls zeigt einen normalen Batchverlauf. Daß vor Zugabe des Pulses Glucose nicht von der Zelle metabolisiert wird, ist vermutlich auf die eben beschriebene Inhibierung zurückzuführen. Scheinbar wird die Glucose z.T. aufgenommen, da weniger Glucose im Medium gefunden wird als zugefüttert wird, aber nicht verbraucht, da keine Metabolite gebildet werden.

Unmittelbar nach Zugabe des Dions **1** und Beginn der Reduktion unter Verbrauch von NADPH wird die Glucose metabolisiert, und es sind extrazellulär verschiedene Metabolite meßbar (Phase 2). Dieses Ergebnis ist ein Hinweis auf eine Inhibierung, da durch die Reduktion gezielt NADPH sprunghaft verbraucht wird. Dies wird auch durch die Tatsache unterstützt, daß die Zelle nach der durchgeführten Biotransformation (Abbildung 3.23) nicht wieder in den Anfangszustand zurückfällt (Phase 3).

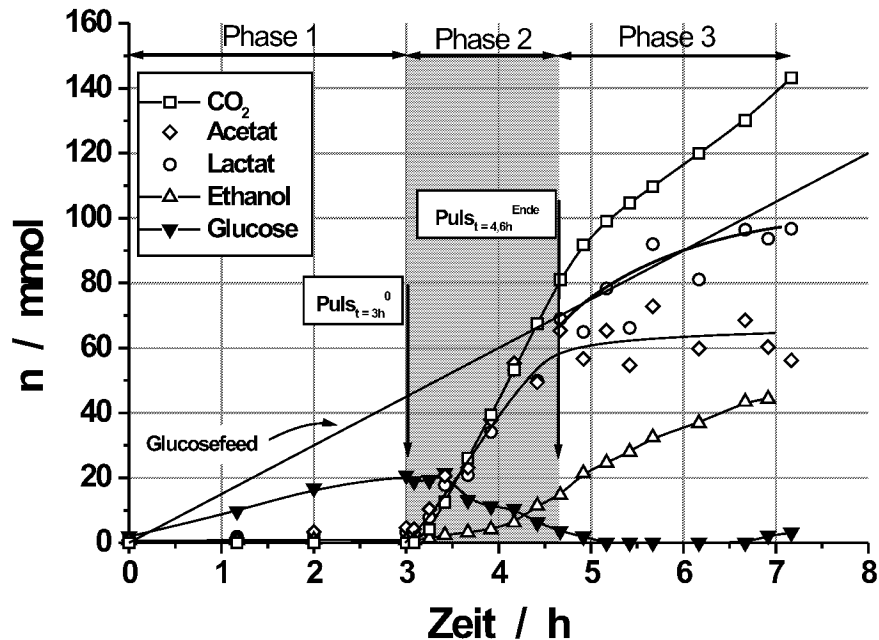


Abbildung 3.23: Pulsexperiment mit *L. kefir*. (2,5)-Hexandion als Puls in einem Glucose Fed-Batch. Bedingungen : siehe Abbildung 3.22

Zu beobachten ist aber auch, daß nach der Biotransformation der Stoffwechsel langsamer wird. Betrachtet man die gemessenen und in Tabelle 3.5 dargestellten Produktionsraten, so wird dies deutlich.

Ganz offensichtlich wird nach Beendigung der Reduktionsreaktion (siehe Abbildung 3.22) der Stoffwechsel langsamer. Auffallend ist, daß die Produktionsrate für Ethanol nicht sinkt, sondern auf $1,23 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{BTM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ steigt. Ein Grund für dieses Verhalten liegt vermutlich in der Regeneration des Kofaktors NADP^+ . Auf dem Weg zum Ethanol wird NADPH verbraucht. Da aber während der Biotransformation NADPH für die Reduktion von (2,5)-Hexandion verwendet wird, kann nur noch wenig Ethanol gebildet werden und der Hauptfluß in diese Richtung geht zum Acetat. Nach Beendigung der Biotransformation steht genug NADPH zur Verfügung, und es wird statt Acetat (die Produktionsrate fällt auf $0,2 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{BTM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) wieder mehr Ethanol gebildet.

3 Systemuntersuchungen

	Produktionsrate $\text{mmol} \cdot \text{g}_{BTM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$		
	Phase 1	Phase 2	Phase 3
Lactat	0,1	3,25	1,07
Acetat	0,12	3,03	0,2
Ethanol	0,03	0,66	1,23
CO ₂	0,00	4,19	1,75
OH ⁻	0,00	6,68	1,33

Tabelle 3.5: Produktionsraten während eines Pulsversuchs

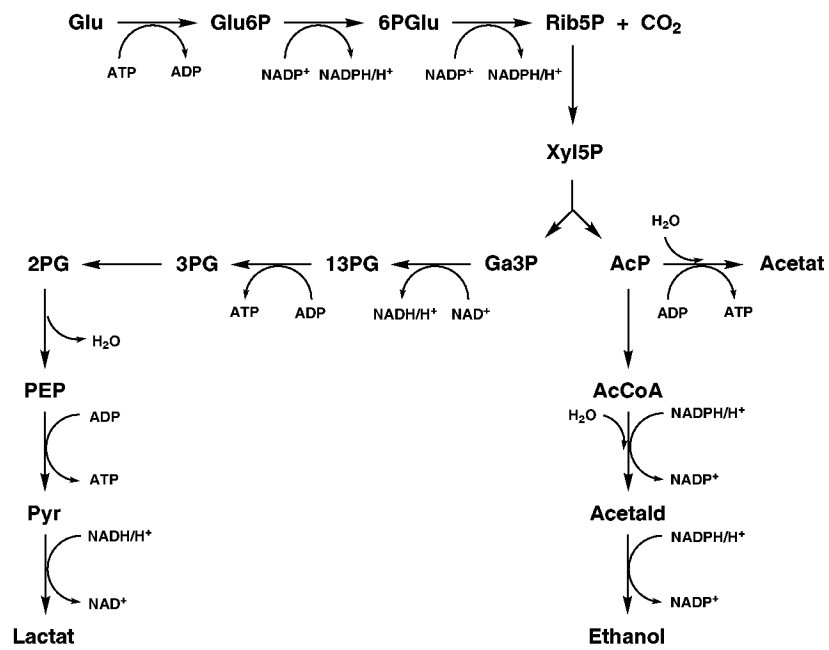


Abbildung 3.24: Postulierter Stoffwechsel für *L. kefir*

3.7 Stöchiometrie

Die Experimente zur Ermittlung der Stöchiometrie werden als Kombination von Batch und Fed-Batch Experiment durchgeführt. Während Glucose kontinuierlich mit $1,86 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{BTM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ zudosiert wird (Fed-Batch), wird das Substrat, (2,5)-Hexandion ($60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) im Fermenter vorgelegt (Batch). Die Biotransformation wird bei pH 6 und 30°C durchgeführt. Um CO_2 im Abgas messen zu können, wird der Fermenter mit 4 vvm Stickstoff begast. Um zu vermeiden, daß die Reaktion zu schnell abläuft, werden $11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Biotrockenmasse von *L. kefir* eingesetzt. Der experimentelle Aufbau ist in Abbildung 3.25 dargestellt.

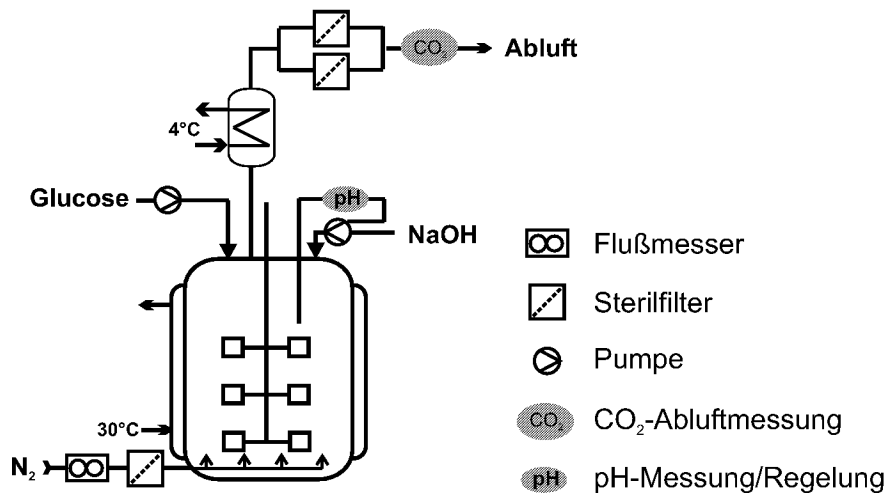


Abbildung 3.25: Apparativer Aufbau zur Bestimmung der Stöchiometrie

Um sicherzustellen, dass der Elektronendonator Glucose für möglichst keine Nebenreaktionen genutzt werden kann, und so ausschließlich für die Kofaktorgenerierung der Reduktionsreaktion genutzt wird, wird das gesamte Experiment unter Glucoselimitierung durchgeführt.

3.7.1 Mathematische Grundlagen

In die Bestimmung der Stöchiometrie fließen mehrere Bilanzen ein [136], welche im weiteren Verlauf alle kurz dargestellt und erläutert werden. Aus den Ergebnissen aller Bilanzen läßt sich dann die Stöchiometrie der Reaktion bestimmen.

Als erstes kann man allgemein die stöchiometrische Gleichung 3.18 für das Gesamtsystem Abbildung 3.26 aufstellen. Die stöchiometrischen Koeffizienten a' - i' sind zu ermitteln.

$$(3.18) \quad -a' \cdot 8 - b' \cdot 1 + c' \cdot 9 + d' \cdot 10 + e' \cdot 11 + f' \cdot 12 + g' \cdot 2 + h' \cdot 3 + i' \cdot H_2O = 0$$

3 Systemuntersuchungen

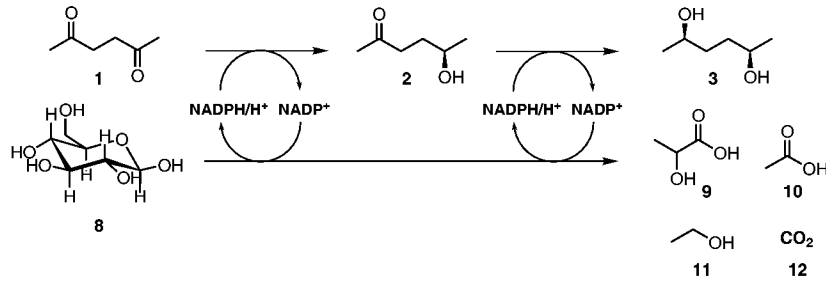


Abbildung 3.26: Gesamtreaktionssystem

Da bei der durchgeführten Reduktion das Intermediat **2** (siehe oben) zuerst akkumuliert und dann zum Endprodukt umgesetzt wird, wird, um eine einfache Bestimmung der Stöchiometrie zu ermöglichen, im Folgenden eine Vereinfachung eingeführt. Die Anzahl der zu reduzierenden Ketofunktionen ($\Sigma_{<O>}^t$) und die Anzahl der reduzierten Hydroxyfunktionen ($\Sigma_{<OH>}^t$) werden zusammengefaßt zu:

$$(3.19) \quad \Sigma_{<O>}^t = 2n_t \cdot \mathbf{1} + n_t \cdot \mathbf{2}$$

$$(3.20) \quad \Sigma_{<OH>}^t = n_t \cdot \mathbf{2} + 2n_t \cdot \mathbf{3}$$

Hierbei stellt n_t die Stoffmenge an einem diskreten Zeitpunkt t dar.

Fügt man die Gleichungen 3.19 und 3.20 in die stöchiometrische Gleichung für das Gesamtsystem (Gl. 3.18) ein, so ergibt sich die folgende stöchiometrische Gleichung.

$$(3.21) \quad -a \cdot \mathbf{8} - b \cdot \Sigma_{<O>} + c \cdot \mathbf{9} + d \cdot \mathbf{10} + e \cdot \mathbf{11} + f \cdot \mathbf{12} + g \cdot \Sigma_{<OH>} + i \cdot H_2O = 0$$

Die Normierung der Gesamtgleichung auf 1 Mol $\Sigma_{<OH>}^t$ schafft einen Bezugspunkt für alle anderen stöchiometrischen Koeffizienten.

$$(3.22) \quad -a \cdot \mathbf{8} - b \cdot \Sigma_{<O>} + c \cdot \mathbf{9} + d \cdot \mathbf{10} + e \cdot \mathbf{11} + f \cdot \mathbf{12} + 1 \cdot \Sigma_{<OH>} + i \cdot H_2O = 0$$

Um diese Gleichung lösen zu können, müssen eine Reihe weiterer Bilanzen berücksichtigt bzw. gelöst werden. Als erstes muß sichergestellt sein, daß keine der

Verbindungen (**1-3**) von der Zelle anderweitig verstoffwechselt wird. Hierzu muß die Massenbilanz der Reduktion von **1** formuliert werden:

$$(3.23) \quad -b + g = 0$$

mit der Normierung auf das Produkt ($g = 1$) ergibt sich:

$$(3.24) \quad -b + 1 = 0$$

Die Massenbilanz muß geschlossen sein, um auszuschließen, daß eine Verstoffwechselung durchgeführt wird. Die Wiederfindung für die Massenbilanz läßt sich wie folgt formulieren:

$$(3.25) \quad \% \text{Wiederfindung} = \left| \frac{1}{b'} \right| \cdot 100$$

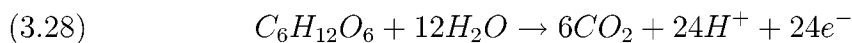
Wenn die Massenbilanz geschlossen ist kann als nächstes die C-Bilanz aufgestellt werden. Diese bezieht sich nur auf den zugeführten Elektronendonator Glucose und die daraus entstandenen Stoffwechselprodukte. Sie läßt sich wie folgt formulieren:

$$(3.26) \quad -6 \cdot a + 3 \cdot c + 2 \cdot d + 2 \cdot e + f = 0$$

Auch hier muß die Wiederfindung ebenfalls nahezu quantitativ sein, um sicher zu sein, daß alle entstandenen Metabolite identifiziert wurden.

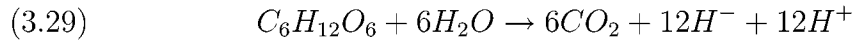
$$(3.27) \quad \% \text{Wiederfindung} = \left| \frac{3 \cdot c + 2 \cdot d + 2 \cdot e + f}{6 \cdot a} \right| \cdot 100$$

Weiterhin muß die Bilanz des sogenannten "Degree of Reduction" (γ) [137, 138, 136] bzw. die Elektronenbilanz gelöst werden. Hierbei handelt es sich um eine Größe, welche sowohl die C-Bilanz als auch die Anzahl der übertragenden Elektronen bzw. Hydridionen berücksichtigt. Um γ für eine Verbindung, z.B. Glucose, zu bestimmen, wird die Verbindung formal zu CO_2 oxidiert. Man erhält so die maximale Anzahl an übertragbaren Elektronen bzw. Hydridionen. Im Falle von Glucose (Gl. 3.28 und 3.29) sind dies 24 Elektronen bzw. 12 Hydridionen.



3 Systemuntersuchungen

bzw.



γ berechnet sich aus dem Verhältnis der maximal übertragbaren Elektronen zu der Anzahl der vorhandenen Kohlenstoffatome. Für das Beispiel Glucose also:

$$(3.30) \quad \gamma_{\text{Glucose}} = \frac{24}{6} = 4$$

Auf diese Weise läßt sich für jede Verbindung ein γ bestimmen. Zur Reduktion von 1 mol Ketofunktion ($<O>$) werden 2 mol Elektronen benötigt. Weil kein Beitrag der Reduktionsreaktion zur C-Bilanz vorhanden ist, lassen sich die folgenden Annahmen machen: Die Ketofunktionen werden lediglich verbraucht und geben keinen Beitrag zu dieser Bilanz, daher kann $\gamma_{<O>}$ gleich 0 gesetzt werden, während sich für die Hydroxyfunktionen, welche zwei Elektronen aufnehmen, $\gamma_{<OH>}$ gleich 2 ergibt.

	C-mol	e-mol	γ
Acetat	2	8	4
Ethanol	2	12	6
Glucose	6	24	4
Lactat	3	12	4
CO ₂	1	0	0

Tabelle 3.6: “Degree of Reduction“ für die ermittelten Metabolite.

Mit diesen Faktoren für den “Degree of Reduction“ kann man nun eine Bilanz aufstellen. Auch hier läßt sich wieder eine Wiederfindung definieren.

$$(3.31) \quad -4 \cdot a + 4 \cdot c + 4 \cdot d + 6 \cdot e + 2 = 0$$

$$(3.32) \quad \% \text{Wiederfindung} = \left| \frac{4 \cdot c + 4 \cdot d + 6 \cdot e + 2}{4 \cdot a} \right| \cdot 100$$

Die Elektronenbilanz läßt sich wie folgt aufstellen:

$$(3.33) \quad -24 \cdot a + 12 \cdot c + 8 \cdot d + 12 \cdot e + 2 = 0$$

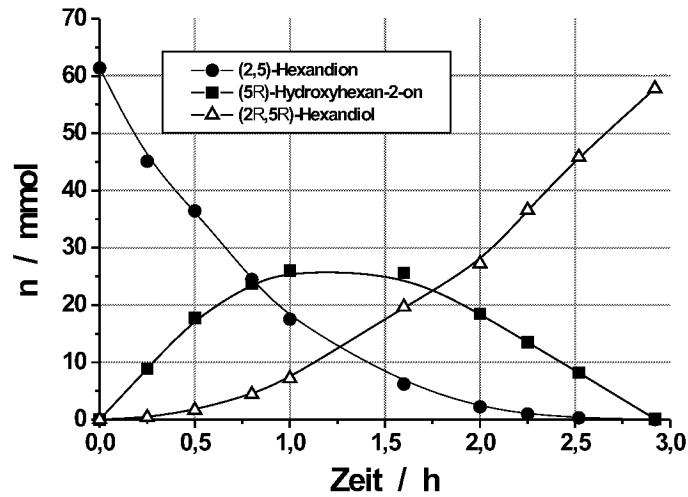


Abbildung 3.27: Verlauf der Reduktionsreaktion. Stoffmengen-Verlauf als Funktion der Zeit. Bedingungen : $V_0 = 1$ L, pH 6, 30°C , 4 vvm N_2 , $12,13 \text{ g}_{\text{BTM}} \cdot \text{L}^{-1}$ *L. kefir*, 60 mM (2,5)-Hexandion, Glucosefeed $1,856 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

$$(3.34) \quad \% \text{Wiederfindung} = \left| \frac{12 \cdot c + 8 \cdot d + 12 \cdot e + 2}{24 \cdot a} \right| \cdot 100$$

3.7.2 Ergebnisse

Aus den Ergebnissen der Reduktionsreaktion von (2,5)-Hexandion zu (2R,5R)-Hexandiol, welche in den Abbildungen 3.27 und 3.28 dargestellt sind, kann man die Massenbilanz (Gleichung 3.24 und 3.25) für die Reduktionsreaktion zu 95% schließen.

Aus Abbildung 3.27 kann man unter Berücksichtigung von Gleichung 3.19 und 3.20 die Stoffmenge an $\langle \text{O} \rangle$ und $\langle \text{OH} \rangle$ berechnen³. Wie in Abbildung 3.28 gezeigt, kann man sowohl eine Verbrauchs- als auch eine Produktionsrate formulieren. Die Werte für die Verbrauchs- bzw. Produktionsrate sind in Tabelle 3.7 aufgeführt.

³Da es sich um einen Fed-Batch handelt, ändert sich das Volumen im Fermenter. Die Reduktionsreaktion wird allerdings als Batch durchgeführt. Um die Geschlossenheit der Massenbilanz besser darzustellen, wurde die Stoffmenge als Parameter gewählt.

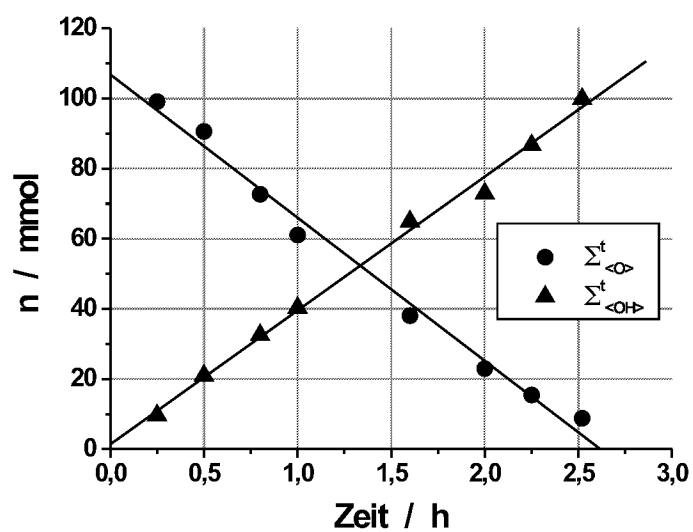


Abbildung 3.28: Verlauf der Reduktionsreaktion. Stoffmengen an verbrauchter Ketofunktion $\langle O \rangle$ und gebildeter Hydroxyfunktion $\langle OH \rangle$ als Funktion der Zeit. Die Steigungen der beiden Linien entsprechen der Verbrauchs- bzw. Produktionsrate (siehe Tabelle 3.7). Bedingungen: siehe Abbildung 3.27.

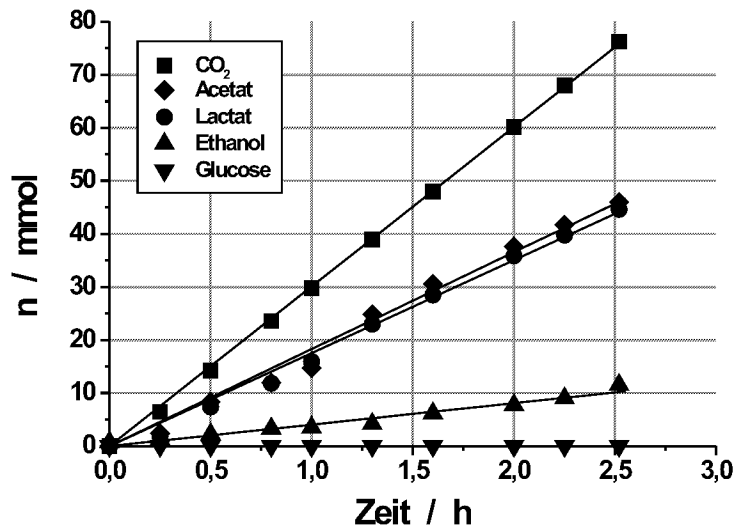


Abbildung 3.29: Bildung der aus Glucose gebildeten Metabolite. Die Steigungen der Geraden entsprechen den Produktionsraten (siehe Tabelle 3.7).
Bedingungen : siehe Abbildung 3.27 auf Seite 51

Da Glucose limitiert (Dosierate $1,856 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{BTM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) in den Fermenter dosiert wurde, erhält man die in Abbildung 3.29 gezeigten linearen Stoffmengen/Zeit-Verläufe für die verschiedenen Metabolite.

Durch lineare Regression der Meßwerte lassen sich auch aus dieser Abbildung Produktionsraten ermitteln. Diese sind ebenfalls in Tabelle 3.7 enthalten. Hierfür lassen sich auch die Elektronen- (in e^- -mol) sowie die Kohlenstoffbilanz (in C-mol) aufstellen. In Abbildung 3.30 sind die Bilanzgeraden für Verbrauch und Produktion zu sehen. Die C-Bilanz läßt sich zu 97% schließen. Es kann also davon ausgegangen werden, daß alle Metabolite identifiziert wurden. Die Elektronenbilanz kann zu 93% geschlossen werden. Die Abweichungen zu 100% ergeben sich aus dem Gesamtmeßfehler von 5-6%.

Durch Verwendung des Programmes MACROBAL [139] lassen sich aus den erhaltenen Raten die stöchiometrischen Faktoren ermitteln. Hieraus ergibt sich die folgende Gleichung für die Stöchiometrie der Gesamtreaktion:

$$(3.35) \quad \begin{aligned} & -1,14 \cdot \mathbf{8} - 1,01 \cdot \mathbf{1} - 0,99 \cdot H_2O + 0,93 \cdot \mathbf{9} \\ & + 0,95 \cdot \mathbf{10} + 0,38 \cdot \mathbf{11} + 1,39 \cdot \mathbf{12} + 1 \cdot \mathbf{3} = 0 \end{aligned}$$

Die ermittelte Stöchiometrie deckt sich zunächst einmal nicht mit dem in Abbildung 3.24 auf Seite 46 dargestellten Stoffwechsel. Aus diesem ergeben sich die

3 Systemuntersuchungen

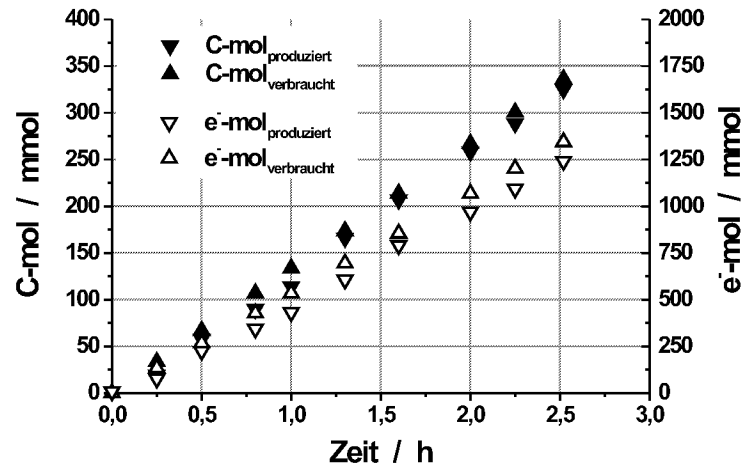


Abbildung 3.30: Elektronen- und Kohlenstoffbilanz als Funktion der Zeit

folgenden Randbedingungen:

$$(3.36) \quad \text{Glucose} = \text{CO}_2 + \text{Lactat} + \text{Acetat} + \text{Ethanol}$$

und für Lactat muß gelten:

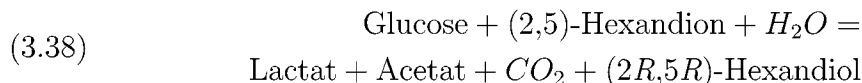
$$(3.37) \quad \text{Lactat} = \text{Acetat} + \text{Ethanol}$$

Erlaubt man nun neben dem gezeigten Primär-Stoffwechsel noch alkoholische

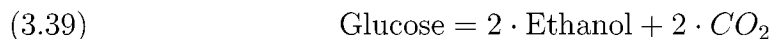
	Produktionsrate $\text{mmol} \cdot \text{g}_{BTM} \cdot \text{h}^{-1}$	Verbrauchsrate $\text{mmol} \cdot \text{g}_{BTM} \cdot \text{h}^{-1}$	Rate pro $\Sigma_{<OH>}$ -	Rate pro Glucose -
Lactat	1.44 ± 0.1	-/-	0.46	0.78
Acetat	1.51 ± 0.1	-/-	0.47	0.81
Ethanol	0.33 ± 0.15	-/-	0.10	0.18
CO ₂	2.48 ± 0.25	-/-	0.78	1.34
$\Sigma_{<OH>}$	3.13 ± 0.06	-/-	1	1.72
$\Sigma_{<O>}$	-/-	3.03 ± 0.12	0.97	1.64
Glucose	-/-	1.85 ± 0.02	0.58	1
OH ⁻	-/-	3.79 ± 0.25	1.21	2.05

Tabelle 3.7: Produktions- und Verbrauchsdaten während einer Batch/Fed-Batch Biotransformation

Gärung als weitere Stoffwechselreaktion, die während der Biotransformation abläuft, dann ergeben sich die folgenden beiden Gleichungen für die Stöchiometrie:



und



Teilt man die in Gleichung 3.35 gezeigten stöchiometrischen Faktoren entsprechend den obigen beiden Gleichungen 3.38 und 3.39 auf und kalkuliert erneut mit MACROBAL, dann würde die alkoholische Gärung etwa 10% des Gesamtstoffwechsels ausmachen. Diese Reaktion führt dazu, daß die Verhältnisse im Vergleich zum angenommenen Stoffwechsel wieder stimmen. Allerdings ergeben sich auch zwei gravierende Fehler. Erstens wird angenommen, daß $NADP^+$ auf dem Weg zum Ethanol im postulierten Stoffwechsel regeneriert wird. Zweitens müßte diese zweite Reaktion immer ablaufen, was aber nach den Ergebnissen des Kapitels Inhibierungen im Stoffwechsel nicht der Fall ist. Somit bleibt es hier bei Spekulation. Auch aus der Literatur lassen sich keinerlei Hinweise auf das wirkliche Verhalten ableiten.

Die Gesamtgleichung für die Stöchiometrie (Gleichung 3.35) zeigt, wie schlecht die Ausbeute der eingesetzten Redoxäquivalente ist. Es werden 14,6% der durch Glucose angebotenen Redoxäquivalente für die Reduktion genutzt.

3.7.3 Redoxäquivalente

Wie gezeigt werden konnte, werden nur etwa 15% der angebotenen Redoxäquivalente für die Reduktion des Diketons genutzt. Um erstens durch eine bessere Ausbeute dieser Äquivalente höhere Produkttiter zu ermöglichen und zweitens weniger Nebenprodukte zu erzeugen, soll im Folgenden eine kurze Betrachtung der Möglichkeiten zur Erhöhung der Ausbeute an Redoxäquivalenten durchgeführt werden.

Betrachtet man den in Abbildung 3.24 auf Seite 46 dargestellten Stoffwechselweg, dann wird deutlich, daß auf dem Weg zum Laktat keine Möglichkeit besteht zusätzliche Redoxäquivalente für die Biotransformation freizusetzen. Zum Einen ist dieser Weg nur NAD abhängig und zweitens wird das freigesetzte NADPH sofort wieder konsumiert. Stünde eine Transhydrogenase zur Verfügung könnte man darüber nachdenken die Laktatdehydrogenase im letzten Schritt auszuschalten und die frei werdenen Redoxäquivalente auf NADP zu übertragen. Da dies aber nicht der Fall ist, ist diese Möglichkeit theoretischer Natur.

3 Systemuntersuchungen

Eine auch in der Praxis denkbare Lösung, wäre die Möglichkeit das auf dem Weg zum Ethanol verbrauchte NADPH für die Biotransformation zu nutzen. Durch Unterbrechung des Weges zwischen AcP und AcCoA würde es keinen NADPH-Verbraucher neben der für die Biotransformation genutzte ADH mehr geben. Theoretisch wären dann alle durch die Glucose eingebrachten Redoxäquivalente für die Reduktion des Diones nutzbar.

3.7.4 Zwischenbilanz

Die Ergebnisse der vorherigen Kapitel lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Durch Pulsexperimente konnten Hinweise darauf erbracht werden, daß es möglicherweise eine Inhibierung durch NADPH im Stoffwechsel gibt.
- Zur Bestimmung der Stöchiometrie konnten alle Massenbilanzen geschlossen werden.
- Die Stöchiometrie der Reaktion wurde ermittelt.

3.8 Enantiomerenüberschuß von Lactat

Da während der Biotransformation große Mengen an Lactat anfallen, könnte man sich D- oder L-Milchsäure als ein zusätzliches Produkt vorstellen. In verschiedenen Fermentationsüberständen wurde der Enantiomerenüberschuß der Milchsäure enzymatisch bestimmt.

Es wurde ein Enantiomerenüberschuß von 33% D-Lactat ermittelt. Somit macht es keinen Sinn über Aufarbeitungsstrategien für Lactat nachzudenken. Allerdings läßt das Ergebnis den Schluß zu, daß es in der Zelle zumindest zwei Lactatdehydrogenasen gibt, eine L- und eine D-spezifische.

3.9 Kapitelzusammenfassung

Im vorangegangenen Kapitel Systemuntersuchungen konnten die im folgenden aufgelisteten Ergebnisse erzielt werden :

- Katalysatorherstellung
 - In mehreren Fermentationen konnte die zur Biotransformation nötige Biomasse hergestellt werden.
 - Es wurden insgesamt 5,5 kg Biofeuchtmasse produziert. Weitere Biomasse wurde durch JFC hergestellt.

- Kinetische Untersuchungen
 - Die Aktivierungsenergie der ersten Reduktion wurde zu $64,5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ bestimmt. Die der zweiten Reduktion läßt sich nicht bestimmen.
 - Es konnten die Geschwindigkeitskonstanten $k_1' = 0,055 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}_{BTM}^{-1}$ und $k_2' = 0,029 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}_{BTM}^{-1}$ bestimmt werden.
 - Es wurde eine Substratüberschußinhibierung festgestellt, und die kinetischen Parameter durch Anpassung eines Modelles nach Michaelis-Menten bestimmt werden.
 - Es konnte gezeigt werden, daß je nach Reaktionsbedingung auch die Oxidation von Hexandiol als Rückreaktion stattfindet.
 - Es konnten erste Hinweise für eine Inhibierung des Stoffwechsels durch NADPH geliefert werden.

- Stöchiometrie
 - Für einfache präparative Batchversuche konnte gezeigt werden, daß im Gegensatz zu Bäckerhefe nur ein Überschuß von 1,14 mol Glucose pro mol (2,5)-Hexandion nötig ist, um quantitative Ausbeute zu erreichen.
 - Als Metabolite von Glucose wurden im Überstand Lactat, Acetat, Ethanol und CO_2 gefunden.
 - Alle Massenbilanzen konnten bis auf 5% geschlossen werden.
 - Die Stöchiometrie der Reaktion konnte basierend auf diesen Metaboliten postuliert werden (siehe Gleichung 3.35 auf Seite 53).

3 *Systemuntersuchungen*

4 Produktion

It is no good offering an elegant, difficult and expensive process to an industrial chemist, whose ideal is something to be carried out in a disused bathtub by an one-armed man who cannot read, the product being collected continuously through the drain-hole in 100 per cent purity and yield.

J. Cornforth (Nobelpreis für Chemie 1975)

4.1 Einführung

Ziel dieses Kapitels ist es zu zeigen, daß sich (2*R*,5*R*)-Hexandiol in einem technischen Verfahren mit *Lactobacillus kefir* produzieren läßt.

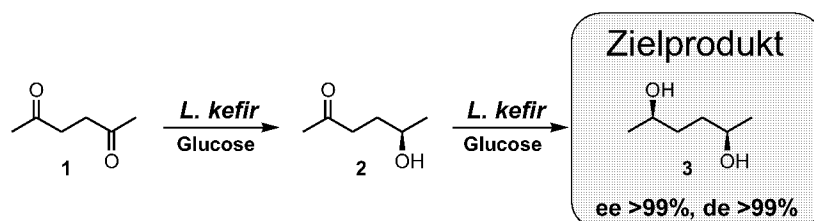


Abbildung 4.1: (2*R*,5*R*)-Hexandiol als Zielprodukt für die Realisierung eines technischen Prozesses.

Generell unterscheidet man verschiedene Reaktortypen, die zur Produktion eingesetzt werden: Dies sind im einzelnen Batch-Verfahren, repetitive Batch-Verfahren, Fed-Batch-Verfahren oder kontinuierliche Verfahren. In diesem Kapitel soll beleuchtet werden, welches Verfahren sich eignet und welches nicht. Als Parameter für die Beurteilung dieser Verfahren soll die Produktivität dienen.

$$(4.1) \quad \text{Produktivität} = \frac{g_{\text{Produkt}}}{g_{\text{BTM}}}$$

Dieser Parameter stellt im Prinzip eine maximale Zyklenzahl ttn^1 dar. Da aber die Biomasse nicht als molare Menge angegeben werden kann, kann keine dimensionslose Größe berechnet werden. Allenfalls kann eine ttn' definiert werden als:

$$(4.2) \quad ttn' = \frac{mol_{\text{Produkt}}}{g_{\text{BTM}}}$$

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel gezeigt wurde, ist die Herstellung des Biokatalysators teurer im Vergleich zu anderen Ganzzellbiokatalysatoren. Die spezifischen Katalysatorkosten eines Prozesses hängen von der Produktivität ab.

4.2 Fed-Batch Produktion

Der folgende Abschnitt soll Möglichkeiten zur Produktion kleinerer Mengen von (2*R*,5*R*)-Hexandiol im Fed-Batch-Verfahren² aufzeigen. Entscheidende Parameter hierfür sind die Produktivität und die Selektivität σ (vgl. Kapitel 3).

In Kapitel 3.2 wurde bereits gezeigt, daß es auf Grund der unterschiedlichen Geschwindigkeitskonstanten der beiden Teilreaktionen ($k_1 > k_2$) zu einer Akkumulation des intermediären (5*R*)-Hydroxyhexan-2-on kommt. Wie in Abbildung 3.11 auf Seite 34 zu erkennen ist, erreicht die erwünschte Selektivität in typischen Batchreaktionen erst gegen Ende hohe Werte. In dem in Abbildung 3.11 gezeigten Experiment konnte eine Produktivität von $0,5 \text{ g}_{\text{Produkt}} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$ erzielt werden.

In einem Fed-Batch Prozeß zur Produktion von (2*R*,5*R*)-Hexandiol soll über den gesamten Verlauf des Experimentes eine hohe Selektivität erzielt werden, um eine einfache Produktaufarbeitung zu erreichen. Außerdem soll die Produktivität maximiert werden.

4.2.1 Versuchsaufbau

Für die Durchführung der Fed-Batch Experimente wurde der in Abbildung 4.2 gezeigte Versuchsaufbau verwendet. Alle Versuchsreihen wurden in einer FedBatch-Pro Versuchsanlage der Firma DASGIP [140, 141] durchgeführt. Es wurden vierfach parallelisierte Ansätze in Schüttelkolben durchgeführt [142]. Das Startvolumen betrug jeweils 100 mL und es wurden $22 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Biotrockenmasse *L. kefir* eingesetzt. Glucose und (2,5)-Hexandion werden im Molverhältnis 1:1 in die Schüttelkolben dosiert. Der pH wurde durch Titration mit 4N NaOH konstant bei 6 gehalten.

¹ ttn = total turnover number

²Vielen Dank an Frau Dr. Evelyn Wolfram für die gute Zusammenarbeit

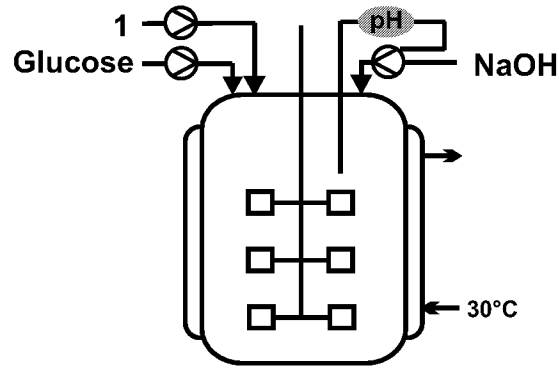


Abbildung 4.2: Versuchsaufbau für Fed-Batch Experimente. Alle Experimente wurden im FedBatch-Pro System der Firma DASGIP durchgeführt.

4.2.2 Ergebnisse

Es wurden Fed-Batch Experimente bei verschiedenen Dosierraten durchgeführt. Die Konzentration/Zeit-Verläufe der verschiedenen Experimente sind in Abbildung 4.3 auf Seite 62 dargestellt. Durch Reduktion der Dosierrate von $10,9 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \text{g}_{BTM}^{-1}$ (Experiment A) auf $1,1 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \text{g}_{BTM}^{-1}$ (Experiment C) konnte die Selektivität von 33% auf 93% gesteigert werden.

Die spezifischen Aktivitäten q der Fed-Batch Experimente lassen sich durch Zurückrechnen auf die Stoffmenge an gebildeter Hydroxyfunktion $\Sigma_{<OH>}^t$ (siehe auch Kapitel 3.3) ermitteln.

$$(4.3) \quad q = \frac{d\Sigma_{<OH>}^t}{dt}$$

Die spezifische Aktivität lässt sich durch lineare Regression der Auftragung von $\Sigma_{<OH>}^t$ gegen t bestimmen (siehe Abbildung 4.4). Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

	σ %	Dosierrate $\text{mmol} \cdot \text{h}^{-1} \text{g}_{BTM}^{-1}$	q $\text{mmol} \cdot \text{h}^{-1} \text{g}_{BTM}^{-1}$	Produktivität $\text{g} \cdot \text{g}_{BTM}^{-1}$
A	33	10,9	5,81	1,3
B	60	3,3	2,98	0,9
C	93	1,1	2,19	0,9

Tabelle 4.1: Parameter der Fed-Batch-Experimente.

Mit sinkender Dosierrate nimmt sowohl die Aktivität q als auch die Produktivität ab. Die Selektivität steigt. Diese kann durch zwei Parameter beeinflusst

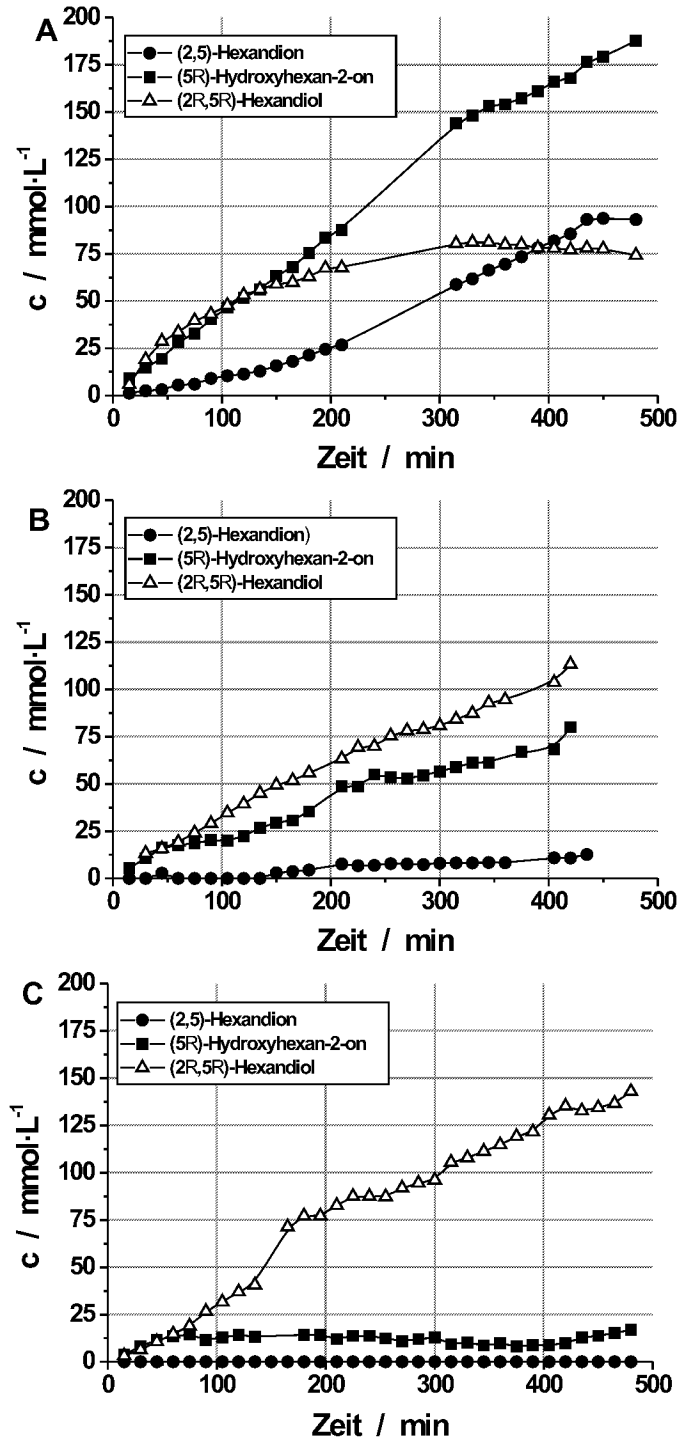


Abbildung 4.3: Einfluß verschiedener Dosieraten von Glucose und (2,5)-Hexandion auf den Verlauf der Biotransformation. Bedingungen: $V_0 = 0,1 \text{ L}$, 30°C , $\text{pH } 6$, $c_{\text{Glucose}} \text{ dosierrate } 2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $c_{(2,5)\text{-Hexandion}} \text{ dosierrate } 2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, Dosieraten: siehe Tabelle 4.1 auf Seite 61, $22 \text{ g}_{\text{BTM}}\text{L}^{-1} \text{ L. kefir}$

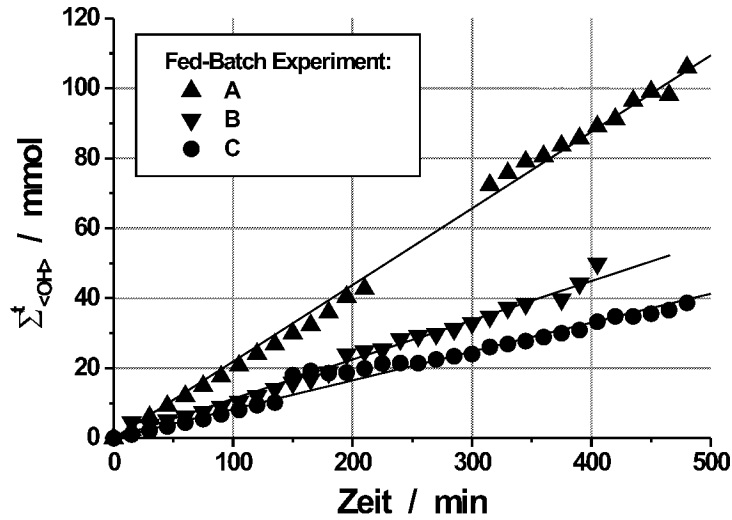


Abbildung 4.4: Spezifische Aktivitäten $q_{\Sigma_{<OH>}^t}$ für die Fed-Batche A-C. Bedingungen: siehe Abbildung 4.3 auf Seite 62.

werden. Erstens durch die Katalysatorkonzentration und zweitens durch die eingestellte Dosierrate.

Durch eine Erhöhung der Katalysatorkonzentration, bei konstanter Dosierrate, kann das intermediäre Hydroxyketon schneller verbraucht werden. Die Selektivität steigt. Den gleichen Effekt erzielt man mit einer Verringerung der Dosierrate.

Um diese beiden wählbaren Parameter mit der Selektivität zu korrelieren, wird die “feed specific biomass concentration“, kurz *fsbc*, eingeführt [14]. Diese ist wie folgt definiert:

$$(4.4) \quad fsbc = \frac{\text{Biomasse}}{\text{Dosierrate}} \quad \left[\frac{g_{\text{BTM}}}{\text{mmol} \cdot h^{-1}} \right]$$

Hieraus kann man die Selektivität über die *fsbc* auftragen. In Abbildung 4.5 ist dies gezeigt.

Mit steigender *fsbc* steigt die Selektivität. Das heißt je geringer die Dosierrate bei gleicher Biomasse desto besser ist die Selektivität.

Auch die Auftragung (Abbildung 4.6) von Selektivität und Ausbeute über den Umsatz zeigt, daß erst ab einem Umsatz von 95% die Ausbeute stark zu Gunsten des Diols **3** geht.

Mit der hier vorgestellten Methode läßt sich für jedes eingestellte Wertepaar von Dosierrate und Katalysatormenge eine Selektivität errechnen. Dieses kann

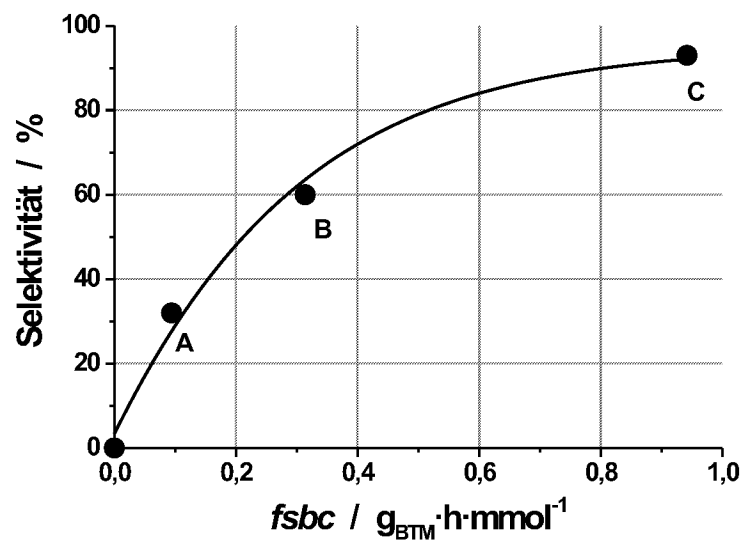


Abbildung 4.5: Selektivität als Funktion der $fsbc$. Die Linie ist eine optische Hilfslinie.

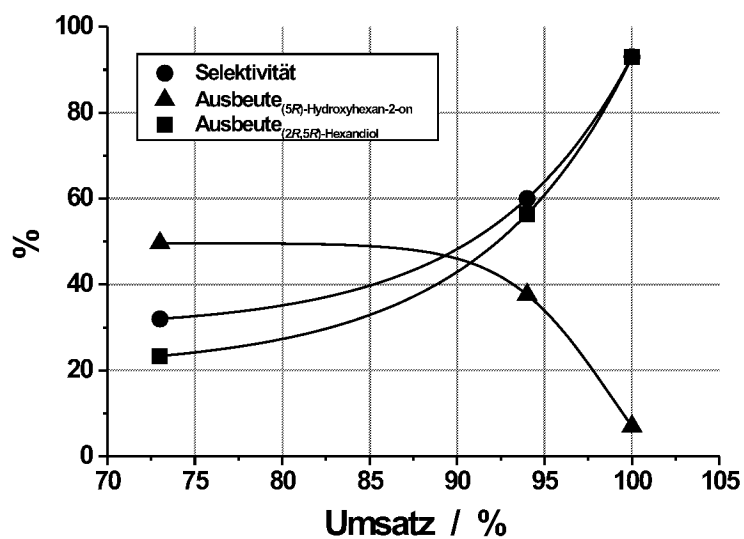


Abbildung 4.6: Ausbeute und Selektivität als Funktion des Umsatzes.

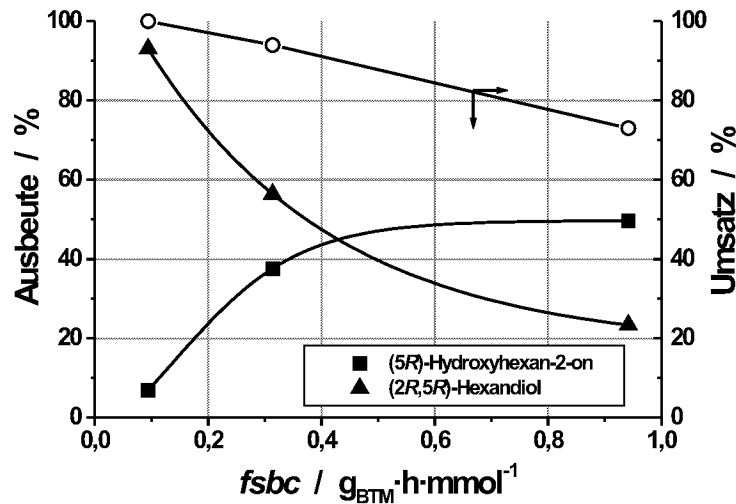


Abbildung 4.7: Umsatz und Ausbeute als Funktion der $fsbc$. Linien sind nur optische Hilfslinien.

genutzt werden, um die für das Erreichen einer spezifischen Selektivität erforderlichen Parameter zu ermitteln.

Allerdings kann diese Methode nicht zur Produktion von (5R)-Hydroxyhexan-2-on herangezogen werden. In Abbildung 4.7 wird deutlich, daß mit schlechterer Selektivität, bezogen auf das Diol, bzw. besserer Selektivität im Hinblick auf das Hydroxyketon, der Umsatz sinkt.

Um (5R)-Hydroxyhexan-2-on in größerer Menge produzieren zu können, muß zusätzlich zu der Einstellung der $fsbc$ auch eine Änderung der Reaktionsbedingungen, konkret eine Änderung des pH-Wertes vorgenommen werden.

Für Experiment C mit der höchsten Selektivität (93%, siehe Abbildung 4.3 auf Seite 62) konnte eine Produktivität von $0,9 \text{ g}_{\text{Produkt}} \cdot g_{BTM}^{-1}$ erreicht werden. Somit konnte durch Optimierung der Fed-Batch Strategie, im Vergleich zu dem in Abbildung 3.11 auf Seite 34 gezeigten Batch, eine Steigerung der Produktivität um ungefähr Faktor 2 erzielt werden.

4.2.3 Zwischenbilanz

Im Kapitel *Fed-Batch-Produktion* konnten die folgenden Ergebnisse erzielt werden:

- *Lactobacillus kefir* konnte erfolgreich zur Produktion von (2R,5R)-Hexandiol **1** im Fed-Batch-Verfahren eingesetzt werden.
- Es konnte hierbei eine Selektivität von 93% erzielt werden.

4 Produktion

- Das von E. Wolfram entwickelte Verfahren zur parallelen Durchführung von Fed-Batch-Fermentationen konnte erfolgreich auch die hier durchgeführte Ganzzellbiotransformation übertragen werden.
- Durch Aufklärung des Zusammenhanges zwischen *fsbc* und Selektivität können Parameter so gewählt werden, daß eine bestimmte Selektivität erreicht wird.
- Die Produktivität wurde im Vergleich zu Synthesen im Satzreaktor um Faktor 2 erhöht.

4.3 Kontinuierliche Produktion

Der folgende Abschnitt soll zeigen, ob ruhende Zellen von *L. kefir* auch im kontinuierlichen Prozeß eingesetzt werden können. Hierzu muß zunächst ein geeignetes Reaktorkonzept etabliert und charakterisiert werden. Der Aufwand ein solches Produktionsverfahren zu etablieren ist nur dann lohnenswert, wenn die Produktivität des Biokatalysators weiter gesteigert werden kann. Dies soll hier untersucht werden.

4.3.1 Reaktoraufbau

Für die kontinuierliche Synthese mit *Lactobacillus kefir* mußte zunächst ein Reaktorkonzept entwickelt werden. Die Verweilzeit von Katalysator und Substrat bzw. Produkt soll entkoppelt werden. Es muß also eine Möglichkeit gefunden werden, den Biokatalysator im Reaktor zu retentieren.

Generell bieten sich zwei Möglichkeiten zur Retention des Biokatalysators im Reaktor an:

- Immobilisierung der Zellen auf Trägern oder in einer Matrix;
- Retention durch Separation.

Da eine Immobilisierung der Zellen mit Aktivitätsausbeuten, welche eine technische Umsetzung erlauben bis jetzt nicht möglich war, fiel die Entscheidung auf einen kontinuierlich betriebenen Rührkessel (CSTR) mit Membranfiltration.

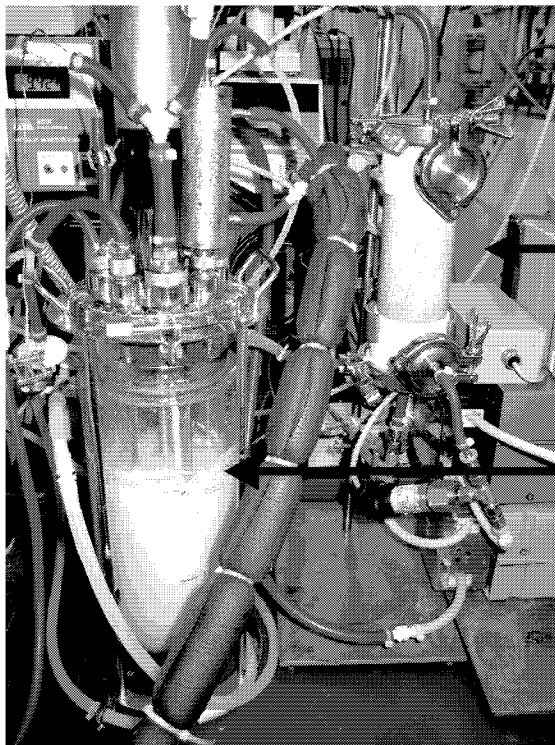
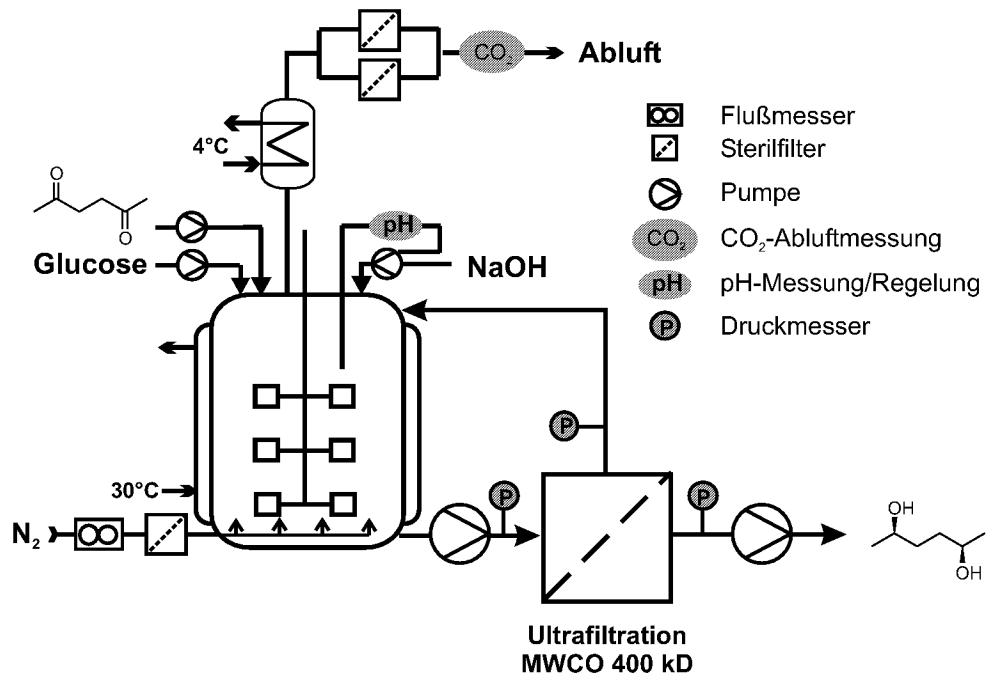
Um die Biomasse im Reaktor zu retentieren, wird ein Ultrafiltrationsmodul mit einer Ausschlußgrenze von 400 kD eingesetzt. Dieses bietet den Vorteil, daß es auf Grund der "geschlossenen" Oberfläche Zellen nicht möglich ist, sich darauf festzusetzen. Es tritt kein Membranfouling auf. Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch Filtrationsmodule im Mikrofiltrationsbereich (MWCO 0,05 μm) getestet. Diese besitzen eine makroporöse Oberfläche und erlauben es den Zellen, deren Größe in der gleichen Größenordnung liegt, sich dort festzusetzen. Durch das auftretende Membranfouling waren die Hohlfasern nach wenigen Stunden verstopft und das Filtrationsmodul wurde auf Grund des auftretenden hohen Drucks zerstört.

Das Fließbild des Reaktoraufbaus ist in Abbildung 4.8 auf Seite 68 dargestellt.

Als Reaktor wurde ein 3-L Fermenter mit 2 L Arbeitsvolumen eingesetzt. Das Reaktorvolumen wird durch einen Füllstandsmesser konstant gehalten.

Die Versuchsanlage wurde mit zwei unabhängigen Dosierstrecken für Glucose und (2,5)-Hexandion **1** angelegt. Auf diesem Weg können Glucosedosierrate und Substratdosierrate unabhängig voneinander variiert werden. Zusätzlich wird 4N NaOH in den Reaktor dosiert, um den pH-Wert auf 6 zu titrieren.

Der Reaktor wird standardmäßig bei 30°C und pH 6 betrieben. Um einen Verlust an Wasser bzw. Ethanol zu vermeiden, wird die Abluft auf 2°C gekühlt.



Filtration

Reaktor

Abbildung 4.8: Kontinuierlicher Reaktor. unten: Foto des Reaktoraufbaus. oben: Schematische Darstellung.

Die Begasung mit Stickstoff dient lediglich der Bilanzierung von CO_2 im Abgas und ist unter reinen Produktionsgesichtspunkten nicht unbedingt erforderlich.

Durch einen automatischen Fraktionssammler im Auslauf wird jede Stunde eine Fraktion des Auslaufes gesammelt. Proben aus diesen Fraktionen werden dann der Analytik zugeführt. Proben aus dem Reaktor zur Bestimmung der Biotrockenmasse werden je nach Bedarf manuell genommen.

4.3.2 Verweilzeitverteilung

4.3.2.1 Durchführung

Die Bestimmung der Verweilzeitverteilung eines Reaktors ist einer der grundlegenden reaktionstechnischen Ansätze zur Charakterisierung des Reaktors im Hinblick auf eine spätere Modellierung bzw. einer möglichen Maßstabsvergrößerung.

Es soll nun bestimmt werden, ob der im vorhergehenden Abschnitt beschriebene Reaktor sich wie ein idealer CSTR verhält. Zur Bestimmung der Verweilzeitverteilung ist es ausreichend, zu ermitteln, wie lange sich ein Volumenelement im Mittel im Reaktor aufhält. Die Messung dieser Verteilung kann durch Einsatz eines Spurstoffes erfolgen. Das aufgebene Spurstoffsignal wird durch den Reaktor verändert. Auf eine Eingabefunktion $x(t)$ erhält man also eine Antwortfunktion $y(t)$, welche durch die Gewichtsfunktion $g(t)$ des Reaktors gefaltet wird:

$$(4.5) \quad y(t) = g(t) * x(t)$$

Für eine Eingabefunktion im Sinne eines idealen Dirac-Impulses mit der Verteilungsbreite 0 ist die Antwortfunktion gleich der Gewichtsfunktion des Reaktors:

$$(4.6) \quad y(t) = g(t)$$

Allerdings ist dies sehr unwahrscheinlich, da es apparativ nicht möglich ist, einen idealen Puls mit der Verteilungsbreite 0 zu produzieren.

Der Reaktor wird mit Wasser durchströmt und zu einem Zeitpunkt t wird ein Natronlaugepuls (50 mL 50%-ige NaOH) in den Reaktor gegeben. Da Natronlauge eine hohe Leitfähigkeit besitzt, kann die Änderung der Leitfähigkeit im Auslauf gemessen und aufgezeichnet werden. In Abbildung 4.9 ist das Ergebnis dieser Messung dargestellt.

Aus dieser Abbildung kann das nullte Moment M^0 der Verteilung bestimmt

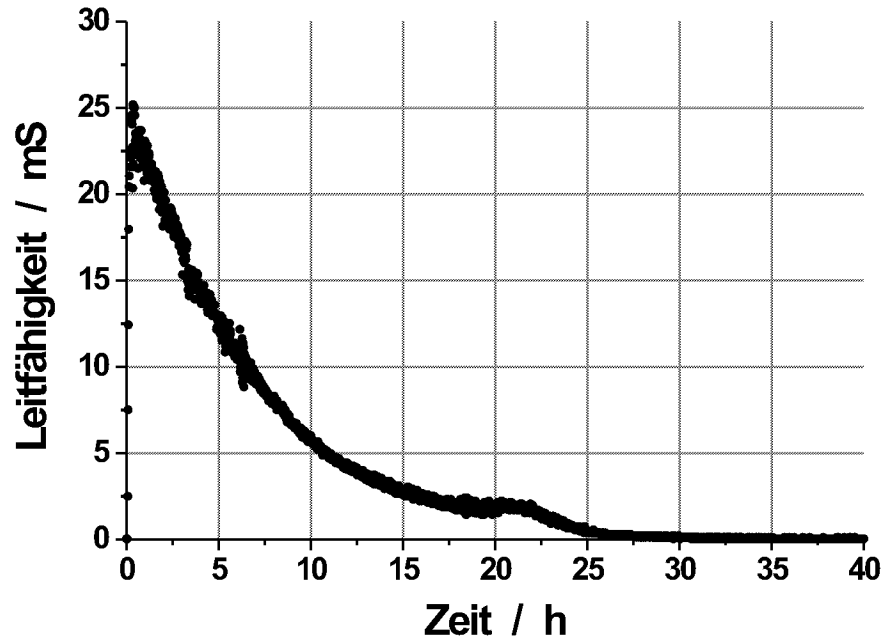


Abbildung 4.9: Änderung der Leitfähigkeit über die Zeit. NaOH-Puls bei $t=0$. Bedingungen: $V = 2 \text{ L}$, 30°C , $\tau = 4,3 \text{ h}$

werden.

$$(4.7) \quad M^0 = \int_0^{\infty} c(t) \cdot dt \approx \sum c(t) \cdot \Delta t$$

Dies entspricht der Fläche unter der Kurve. Das nullte Moment wird zur Normierung aller Momente verwendet. Das normierte nullte Moment ist demnach:

$$(4.8) \quad M^{0,0} = 1$$

Das erste Moment der Verteilung erhält man durch Integration des Produktes aus Konzentration und Zeit:

$$(4.9) \quad M^1 = \int_0^{\infty} t \cdot c(t) \cdot dt \approx \sum t \cdot c(t) \cdot \Delta t$$

Das normierte erste Moment ergibt die experimentell bestimmte mittlere Verweilzeit τ :

$$(4.10) \quad M^{1.0} = \tau_M = \frac{M^1}{M^0}$$

Das zweite Moment der Verteilung errechnet sich durch Integration des Produktes aus Konzentration und dem Quadrat der Abweichung der Zeit von der mittleren Verweilzeit.

$$(4.11) \quad M^2 = \int_0^{\infty} (t - \tau_M)^2 \cdot c(t) \cdot dt \approx \Sigma (t - t_M)^2 \cdot c(t) \cdot \Delta t$$

Das normierte zweite Moment stellt die Varianz der Verteilung dar:

$$(4.12) \quad M^{2.0} = \sigma^2 = \frac{M^2}{M^0}$$

Die dimensionslose Gesamtvarianz der Verteilung errechnet sich wie folgt :

$$(4.13) \quad \sigma_{\theta}^2 = \frac{\sigma^2}{\tau_M^2} = \frac{M^{2.0}}{(M^{1.0})^2}$$

Aus den in Abbildung 4.9 auf Seite 70 gezeigten Daten lassen sich die gerade eingeführten Parameter berechnen, diese sind in Tabelle 4.2 aufgelistet.

Moment	Wert	
M^0	172,5	mS·h
M^1	1158,4	mS·h ²
$M^{1.0}$	6,7	h
M^2	6578,1	mS·h ³
$M^{2.0}$	38,1	h ²

Tabelle 4.2: Momente der Verweilzeitverteilung.

4.3.2.2 Vermischungsmodelle

Das Verhalten des Reaktors kann durch zwei verschiedene Vermischungsmodelle beschrieben werden, durch:

- Das Diffusionsmodell, welches primär für den Bereich der Pfropfenströmung in Rohrreaktoren konzipiert ist und
- Das Kaskadenmodell, welches in erster Linie für Rührkesselreaktoren bzw. Rührkesselkaskaden gedacht ist.

Beim Diffusionsmodell gibt die dimensionslose Bodensteinzahl Bo den Grad der Rückvermischung und damit die Abweichung vom Ideal an. Die Bodensteinzahl leitet sich aus dem 1. Fickschen Gesetz her und ist das Verhältnis zweier Ströme:

$$(4.14) \quad Bo = \frac{\text{Konvektionsstrom}}{\text{axialer Diffusionsstrom}} = \frac{u \cdot L}{D_{ax}}$$

mit u = Strömungsgeschwindigkeit, L = charakteristische Länge und D_{ax} = axialer Dispersionskoeffizient. Die Bodensteinzahl läßt sich aus der Verweilzeitverteilung wie folgt herleiten:

$$(4.15) \quad Bo = \frac{1}{\sigma_\theta^2} + \sqrt{\left(\frac{1}{\sigma_\theta^2}\right)^2 + \frac{3}{\sigma_\theta^2}}$$

Für dieses Modell kann man eine Grenzbetrachtung durchführen:

1. $D_{ax} \rightarrow 0, Bo \rightarrow \infty$ ideales Strömungsrohr
2. $D_{ax} \rightarrow \infty, Bo \rightarrow 0$ idealer Rührkessel

In der Praxis gibt man die Grenze zwischen beiden Grenzformen mit $Bo = 7$ an [143].

Beim Kaskadenmodell nimmt man eine ideale Vermischung von N in Reihe geschalteter Rührkessel an. Der Parameter der für dieses Modell entscheidend ist, ist die Kesselzahl N :

$$(4.16) \quad N = \frac{1}{\sigma_\theta^2}$$

Beide Kennzahlen konnten ebenfalls bestimmt werden und sind in Tabelle 4.3 aufgeführt.

Parameter	Wert
σ_θ^2	0,846
Bo	3,41
N	1,2

Tabelle 4.3: Parameter der Verweilzeitverteilung.

4.3.2.3 Beurteilung

Alle Momente der Verweilzeitverteilung konnten berechnet werden. Allerdings weicht die ermittelte mittlere Verweilzeit mit 6,7 h deutlich von der Verweilzeit von 4,3 h ab. Dies könnte auf Fehler bei der Volumenbestimmung zurückzuführen sein, da die Leitfähigkeitsmessung hinter dem Filtrationsmodul durchgeführt wird. Um hier eine exakte Bestimmung der Verweilzeitverteilung durchführen zu können, müßten wahrscheinlich wesentlich mehr Meßpunkte, vor allem auch innerhalb des Reaktors, angebracht werden.

Die Bodensteinzahl wurde zu 3,41 bestimmt und die Kesselzahl zu 1,2. Es handelt sich also um einen idealen CSTR.

4.3.3 Kontinuierliche Experimente

4.3.3.1 Additive

Alle bisher vorgestellten Experimente wurden in Kaliumphosphatpuffer³ durchgeführt. Da aber bei den kontinuierlichen Experimenten große Mengen Kaliumphosphatpuffer benötigt würden, welche einen nicht zu vernachlässigenden Anteil an den Gesamtkosten ausmachten, wurde versucht auf kostengünstigere Zusätze, wie z.B. Kochsalz, auszuweichen, oder diese ganz wegzulassen.

In Batch Experimenten konnte von *JFC* gezeigt werden, daß es keinen Unterschied in der Aktivität gibt, ob Phosphatpuffer (in verschiedenen Konzentrationen), Kochsalz oder kein Zusatz verwendet wird.

Da nach zweimaligem Waschen der Zellen mit vollentsalztem Wasser keinerlei Aktivität mehr gefunden wurde, wurde dieser Ansatz für das kontinuierliche Experiment verworfen.

Die nächste Möglichkeit ist den Kaliumphosphatpuffer durch eine Kochsalzlösung (0,9%) zu ersetzen. Um einen Effekt durch Kochsalz über einen längeren Zeitraum messen zu können, wurde in einem kontinuierlichen Experiment der Glucoselösung Kochsalz zugesetzt. In Abbildung 4.10 ist der Konzentrations/Zeit-Verlauf der so durchgeführten Reduktionsreaktion gezeigt.

Die Konzentration an (2*R*,5*R*)-Hexandiol **3** steigt zu Anfang der Reduktion an und fällt vor Erreichen eines stationären Punktes bei 10 h schnell ab. (2,5)-

³in der Regel 50 mmol·L⁻¹.

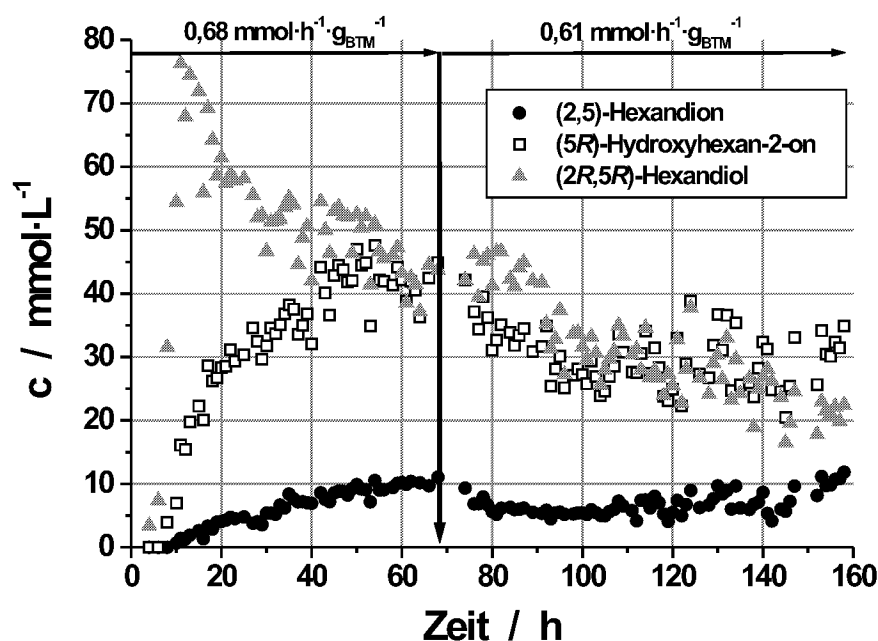


Abbildung 4.10: Kontinuierliche Reduktion in NaCl. Bedingungen: $V = 2 \text{ L}$, 30°C , $\text{pH } 6$, $\tau = 4 \text{ h}$, Glucosedosierrate $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$, (2,5)-Hexandiondosierrate : 0-63 h $0,68 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$, 64-160 h $0,61 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$, $25 \text{ g}_{\text{BTM}}\cdot\text{L}^{-1}$ *L. kefir*

Hexandion **1** und (5*R*)-Hydroxyhexan-2-on **2** zeigen einen normalen Verlauf in der Einspülphase. Trotz des Abfalls der Konzentration an **3** wird kurzzeitig ein stationärer Punkt erreicht. Die in Abbildung 4.11 gezeigte Selektivität (Kreise) fällt auf 50%.

Um die Selektivität an **3** zu erhöhen, wurde die (2,5)-Hexandiondosierrate auf $0,61 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$ heruntergeregelt. Die Selektivität steigt kurzzeitig auf etwa 60% und fällt dann wieder kontinuierlich auf 40%. Die Massenbilanz kann über den gesamten Verlauf geschlossen werden. Die Streuung der Datenpunkte ist vermutlich auf die nicht ganz eindeutige Verweilzeitverteilung im Reaktor zurückzuführen.

Augenscheinlich hat die Verwendung von Kochsalz einen eher negativen Effekt auf die Reaktion. Es kann davon ausgegangen werden, daß auch ruhende Zellen noch einen Phosphatstoffwechsel besitzen. Dies trifft wahrscheinlich vor allem Biosynthesewege zu, welche für die Synthese von NADPH und ATP verantwortlich sind. Da bei der kontinuierlichen Synthese Phosphat ausgetragen wird, bricht der Stoffwechsel zusammen. Durch eine Zuführung von Phosphat im Feed kann dies ausgeglichen werden.

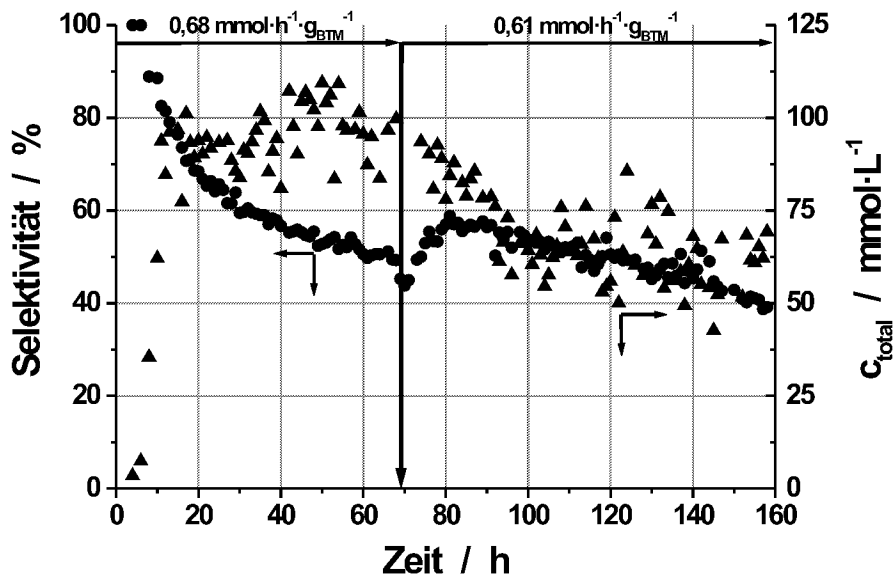


Abbildung 4.11: Kontinuierliche Reduktion in NaCl. Selektivität als Funktion der Zeit (Kreise). Gesamtkonzentration (Massenbilanz) als Funktion der Zeit (Dreiecke). Bedingungen: siehe Abbildung 4.10

Da die Produktivität primäres Ziel der empirischen Optimierung war, weil der Biokatalysator den Hauptkostenfaktor darstellt, wurde bei den folgenden Experimenten Kaliumphosphatpuffer verwendet.

4.3.3.2 Stabilität

Zur Untersuchung der Stabilität wurde das Verhalten des Systems bei verschiedenen Betriebspunkten (BP) beobachtet. Die verschiedenen Betriebspunkte wurden durch Erhöhung der Substratdosierrate erreicht. In Abbildung 4.12 ist der Konzentrations/Zeit-Verlauf der Reduktionsreaktion dargestellt. In Abbildung 4.13 auf Seite 77 sind Totalkonzentration und Selektivität als Funktion der Zeit gezeigt.

In Tabelle 4.4 sind die Einstellungen für die verschiedenen Betriebspunkte zusammengefasst. Ebenfalls mit aufgeführt ist die jeweils erreichte Selektivität. Die Glucosedosierrate betrug konstant $1,84 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$.

Der erste stationäre Betriebspunkt (1) wurde nach 20 h erreicht. Die (2,5)-Hexandiondosierrate betrug $0,85 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$. Die Selektivität war 93% und der Umsatz quantitativ. Nach 55 h wurde die eingestellte (2,5)-Hexandiondosierrate auf $1,46 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$ erhöht. Auch hier wird ein Betrieb-

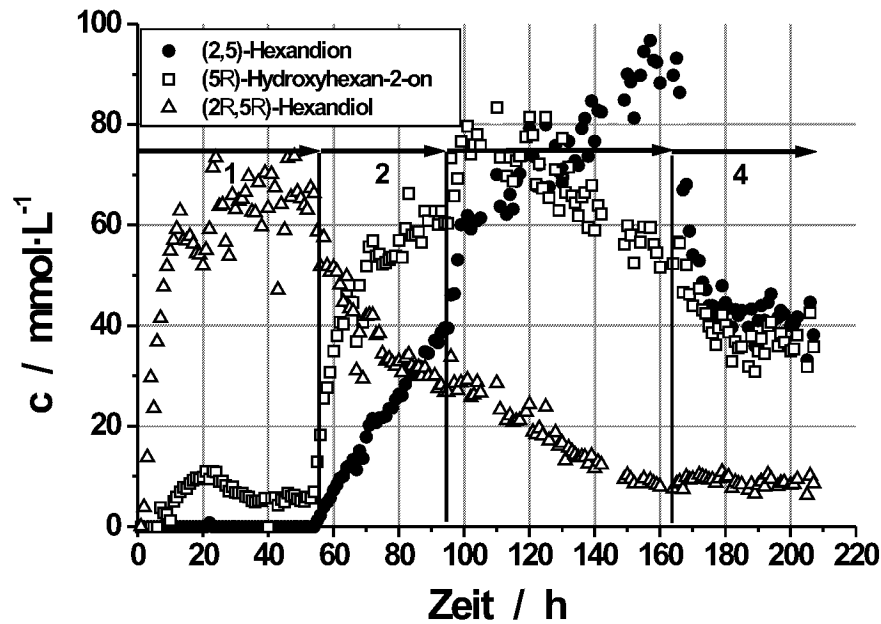


Abbildung 4.12: Konzentrations-/Zeit-Verlauf für verschiedene Betriebspunkte (1-4). Bedingungen: $V = 2 \text{ L}$, 30°C , $\text{pH } 6$, $\tau = 4 \text{ h}$, Glucosedosierrate $1,84 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\text{g}_{BTM}^{-1}$, (2,5)-Hexandiondosierrate: siehe Tabelle 4.4 auf Seite 77, $20,5 \text{ g}_{BTM}\cdot\text{L}^{-1} \text{ L. kefir}$

spunkt erreicht. Auf Grund der großen Streuung der Meßwerte ist er allerdings nicht besonders gut zu erkennen. Die Selektivität fällt bis zum Betriebspunkt (2) auf 30%, der Umsatz fällt ebenfalls. Die Reduktionskapazität der Zellen ist offensichtlich überschritten. Trotzdem wurde die (2,5)-Hexandiondosierrate noch einmal auf $1,95 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\text{g}_{BTM}^{-1}$ erhöht, um zu sehen wie das System reagiert. Ab etwa 120 h fallen sowohl Umsatz als auch Selektivität deutlich ab.

Erst mit starkem Absenken der eingestellten (2,5)-Hexandiondosierrate kann wieder ein stationärer Zustand erreicht werden. Der hier eingestellte Betriebspunkt (4) sollte eigentlich dem ersten Betriebspunkt (1) entsprechen. Allerdings sind sowohl Umsatz als auch Selektivität wesentlich niedriger.

Die Konzentrations-/Zeit-Verläufe der gebildeten Metabolite in diesem Experiment sind in Abbildung 4.14 auf Seite 78 gezeigt.

Lactat und Acetat werden in etwa gleichen Mengen produziert. Die Konzentrations-/Zeit-Verläufe dieser beiden Metabolite sind etwa parallel. Allerdings findet man nur drei stationäre Bereiche anstelle der 4 eingestellten. Der erste und der letzte stationäre Bereich entsprechen dem ersten und dem vierten eingestellten Betriebspunkt. Die mittleren beiden Betriebspunkte fallen bei der

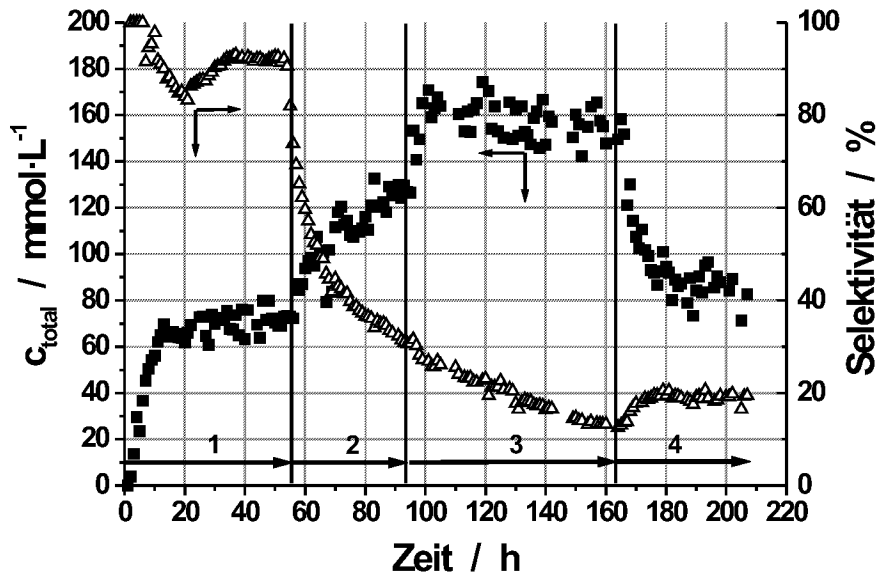


Abbildung 4.13: Totalkonzentration (Quadrate) und Selektivität (Dreiecke) der Reduktionsreaktion über die Zeit. Bedingungen: siehe Abbildung 4.12.

Metabolitbildung übereinander.

Für Ethanol und CO_2 findet man ebenfalls einen parallelen Verlauf. Überraschenderweise durchlaufen diese beiden Metabolite zu Anfang der Reaktion ein Maximum und fallen dann auf 0 bzw. 0,2% ab. Dieses Verhalten ist insofern erstaunlich, da in dem postulierten Stoffwechsel (vgl. Abbildung 1.15 auf Seite 18) ausgehend von 6PGLU zu Rib5P ein Mol CO_2 abgespalten wird, und dann über Xyl5P die beiden Wege zu den Stoffwechselendprodukten erreicht werden. Somit sollte die Bildung von CO_2 direkt mit der von Lactat und Acetat korreliert sein. Selbst wenn man das Modell einer zusätzlich auftretenden alkoholischen Gärung (wie im Kapitel Stöchiometrie beschrieben) annimmt, muß CO_2 den beiden an-

BP	Zeit [h]	Dosierrate _{(2,5)-Hexandion} [mmol·h ⁻¹ g _{BTM} ⁻¹]	σ [%]
1	0	0,85	93
2	55	1,46	30
3	93	1,95	14
4	162	0,85	20

Tabelle 4.4: Daten der verschiedenen Betriebspunkte

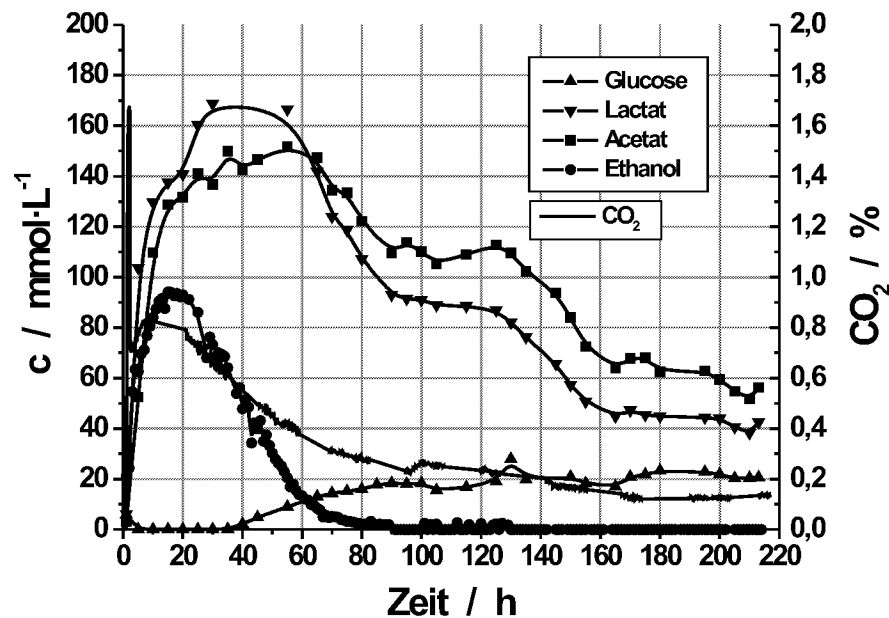


Abbildung 4.14: Metabolitkonzentrationen als Funktion der Zeit. Bedingungen: siehe Abbildung 4.12

deren Metaboliten folgen.

Festzuhalten bleibt, das prinzipiell verschiedene Betriebspunkte angefahren werden können. Allerdings ist die Langzeitstabilität der Zellen nicht gegeben.

4.3.3.3 Versuch der Stabilisierung

Ein Grund für den Aktivitätsabfall könnte eine Unterversorgung der Zellen sein. Möglicherweise werden durch die kontinuierliche Reaktionsführung essentielle Komponenten der Zelle ausgespült. Hierbei könnte es sich um Nährsalze oder Spurenelemente handeln.

Es wurde versucht, durch Zugabe von Komplexbestandteilen des Kulturmediums, diese Bestandteile wieder zur Verfügung zu stellen und so eine Stabilitäts-erhöhung zu erreichen. Daher wurde der Glucoselösung eine 5%-ige Kulturlösung zugesetzt.

Dies führte allerdings nicht zum Erfolg, eher zum Gegenteil. Das Problem der Insterilität des Prozesses kommt bei diesem Versuch zum Tragen. Reaktor, Filtrationsmodul, Vorratsflasche für Glucoselösung, etc. können sterilisiert werden. Da aber die Separation der Zellen nach der Fermentation nicht steril durchgeführt werden kann und der Reaktor zum Befüllen mit Biomasse geöffnet werden muß,

sind genügend Möglichkeiten vorhanden, Fremdkeime einzutragen. Im Falle des Einsatzes einer gepufferten Glucoselösung können sich keine Fremdkeime durchsetzen, da keine ausreichende Versorgung mit N- und P-Quellen vorhanden ist. Bietet man aber neben der Glucose auch kleine Mengen dieser Komplexbestandteile an, sind die Voraussetzungen ideal für jede Art von Kontamination. Bereits nach weniger als 15 h wurde starke Schaumbildung und eine Verdopplung der Zelldichte beobachtet. Somit muß entweder auf diese Vorgehensweise verzichtet werden, oder der Prozeß steril durchgeführt werden, was aber derzeit technisch nicht realisierbar ist.

4.3.3.4 Produktion

In einem weiteren kontinuierlichen Experiment war das Ziel (2*R*,5*R*)-Hexandiol über einen möglichst langen Zeitraum konstant zu produzieren. Das Ziel ist die Produktivität der teuren Biomasse von *L. kefir* zu maximieren. Der Konzentrations-/Zeit-Verlauf für dieses Experiment ist in Abbildung 4.15 gezeigt.

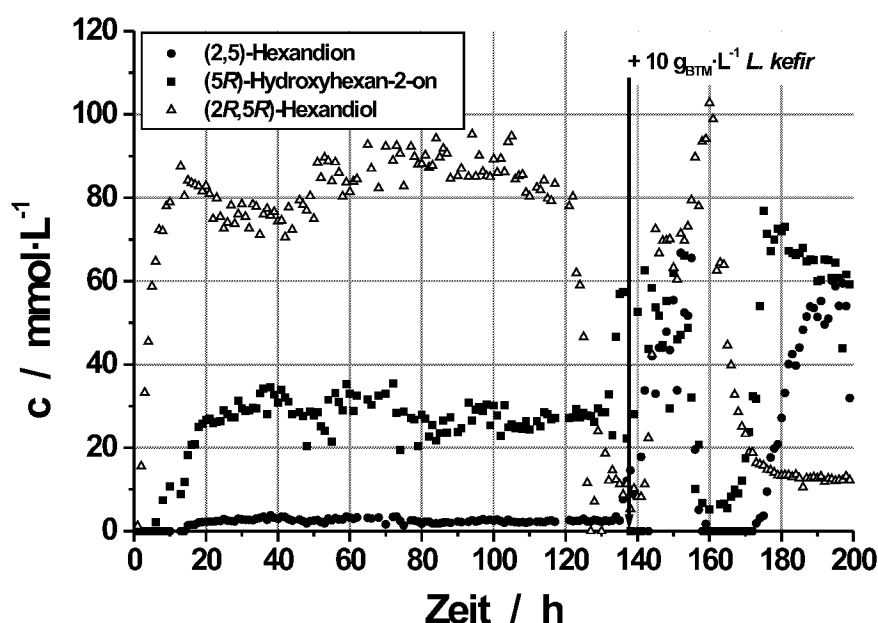


Abbildung 4.15: Konzentrations-/Zeit-Verlauf eines kontinuierlichen Experimentes zur Produktion. Bedingungen: $V = 2 \text{ L}$, 30°C , $\text{pH } 6$, $\tau = 4 \text{ h}$, Glucose $1,8 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$, (2,5)-Hexandion $1,37 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$, $21 \text{ g}_{\text{BTM}}\cdot\text{L}^{-1} \text{ L. kefir}$

Sowohl Glucoselösung als auch Substrat wurden konstant dosiert. Für die Glucoselösung wurde eine Dosierate von $1,8 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$ eingestellt, während das (2,5)-Hexandion mit $1,37 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$ zudosiert wurde.

Nach der Anfahrphase, etwa 20 h, konnte für einen Zeitraum von 100 h eine konstante Produktionsphase erreicht werden. In dieser Zeit betrug der Umsatz 98% und die Selektivität etwa 78%. Es konnte eine Raum-Zeit-Ausbeute von $63,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ erreicht werden. Es wurden ca. 630 g (2*R*,5*R*)-Hexandiol und ca. 180 g (5*R*)-Hydroxyhexan-2-on produziert. Sowohl der Diastereomerenüberschuß als auch der Enantiomerenüberschuß waren über den gesamten Reaktionsverlauf >99%. Die Produktivität konnte in diesem Experiment, im Vergleich zum Batch, um Faktor 30 auf $15 \text{ g}_{\text{Produkt}}\cdot\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$ gesteigert werden. Dennoch werden nur etwa 18% der angebotenen Redoxäquivalente für die Reduktion genutzt.

Auch für dieses Experiment gilt wieder die Abhängigkeit der Selektivität von der tof_{max} . In Abbildung 4.16 ist neben den bereits gezeigten Datenpunkten für die Fed-Batch-Experimente auch der Datenpunkt für dieses Experiment (Dreieck) eingezeichnet.

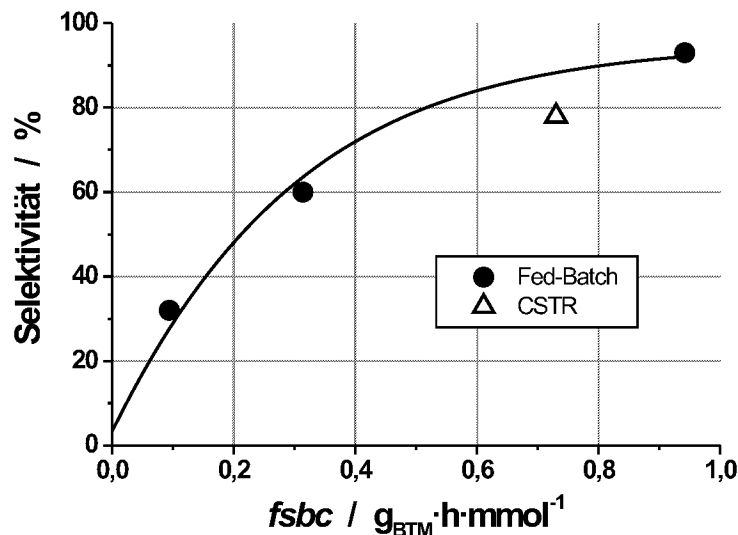


Abbildung 4.16: Selektivität als Funktion der tof_{max} .

Nach 120 h konnte, wie schon in Abbildung 4.12 auf Seite 76 gezeigt, ein drastischer Abfall der Aktivität der Zellen beobachtet werden. Unter den hier verwendeten Reaktionsbedingungen beträgt die Lebensdauer der Zellen reproduzierbar 120 h.

Dies hätte aber zur Konsequenz, daß es sich hier nicht um wirklich ruhende Zellen, eben einen "Enzymsack", handelt. Unter diesen stationären Bedingungen würde man einen Aktivitätsabfall entsprechend der Desaktivierung der Enzyme oder Koenzyme beobachten. Dies ist schematisch in Abbildung 4.17 dargestellt.

Erwarten würde man bei einem solchen von der Desaktivierung abhängigen Verhalten den Verlauf, der durch die gestrichelte Linie wiedergegeben ist. Tatsächlich beobachtet man aber einen Verlauf, der der durchgezogenen Linie entspricht - einen plötzlichen Abfall.

Eine Konsequenz hieraus wäre, daß sich die Prozeßdauer nicht großartig verlängern läßt, und man lediglich versuchen kann in diesem Zeitraum ein Maximum an Produktivität zu erreichen.

Verwunderlich war, daß trotz der Zugabe von $10 \text{ g}_{BTM} \cdot \text{L}^{-1}$ frischer Zellen Umsatz und Selektivität nur kurzzeitig ein Maximum erreichen, und innerhalb von 25 h wieder auf den vorher erreichten niedrigen Wert abfallen. Möglicherwei-

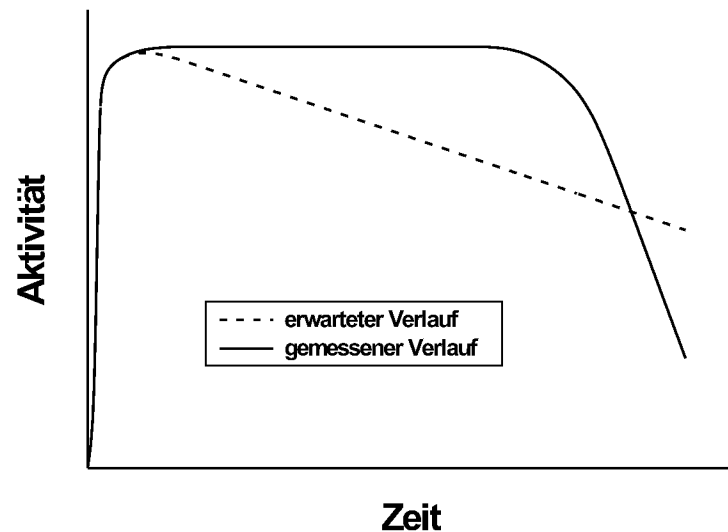


Abbildung 4.17: Beobachtete bzw. erwartete Desaktivierungskurve.

se wurden während des Abfalls der Aktivität Zellgifte gebildet, welche hier sofort eine weitere Biotransformation unterbinden, in dem die frischen Zellen inhibiert oder zerstört werden. Dies wäre ebenfalls eine Erklärung für den Aktivitätseinbruch. Die Konsequenz wäre, daß die Identifizierung und das eventuelle Abfangen dieser Toxine eine Verlängerung des Prozesses möglich machen würden. Es konnten allerdings keine solchen Substanzen nachgewiesen werden. In der Literatur sind ebenfalls keine solchen Verbindungen bekannt, so daß hier wenig Aussicht auf Erfolg besteht, eine Erklärung zu finden.

In Abbildung 4.18 sind die Metabolitkonzentrationen über die Zeit aufgetragen. Lactat und Acetat zeigen wieder einen parallelen Verlauf über 120 h. Ethanol und CO_2 haben auch einen gemeinsamen Verlauf. Beide erreichen zu Anfang wieder ein Maximum und fallen gegen 120 h immer mehr ab. Eine Interpretation dieses Verlaufes könnte darin bestehen, daß die Alkoholbildung vom Substrat übernommen wird und deshalb kein Ethanol mehr gebildet wird. Da aber genügend Glukose vorhanden ist, taucht ein Glukoseüberschuß auf. Betrachtet man den Verlauf von CO_2 und Ethanol, dann zeigen diese den in Abbildung 4.17 auf Seite 82 "erwarteten Verlauf". Während Lactat und Acetat, genauso wie die Verbindungen der Reduktionsreaktion dem "gemessenen Verlauf" in Abbildung 4.17 entsprechen. Möglicherweise ist Ethanol bzw. CO_2 der zu betrachtende Indikator für die Lebensfähigkeit der Zellen.

Abbildung 4.19 zeigt die Massenbilanz und Elektronenbilanz. Innerhalb des Betriebspunktes lassen sich beide Bilanzen schließen.

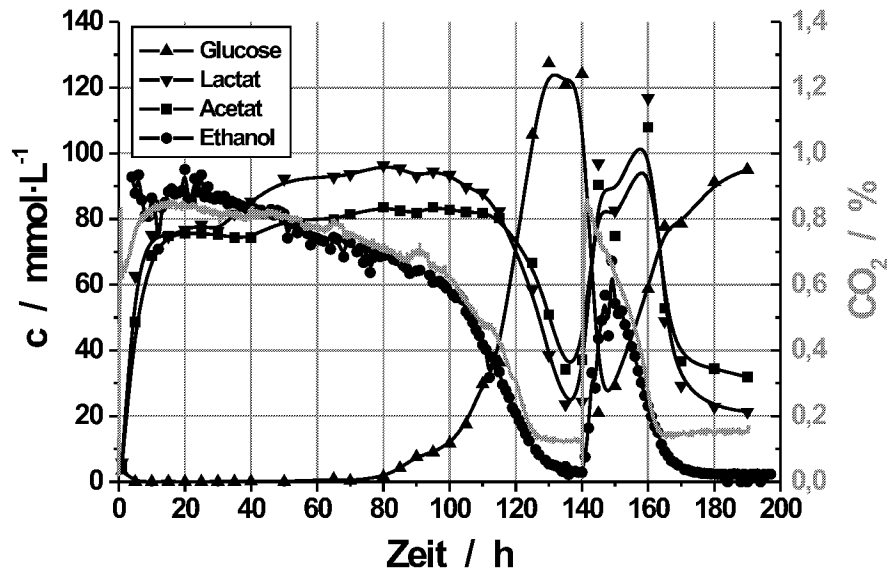


Abbildung 4.18: Metabolitkonzentrationen als Funktion der Zeit. Bedingungen: siehe Abbildung 4.15

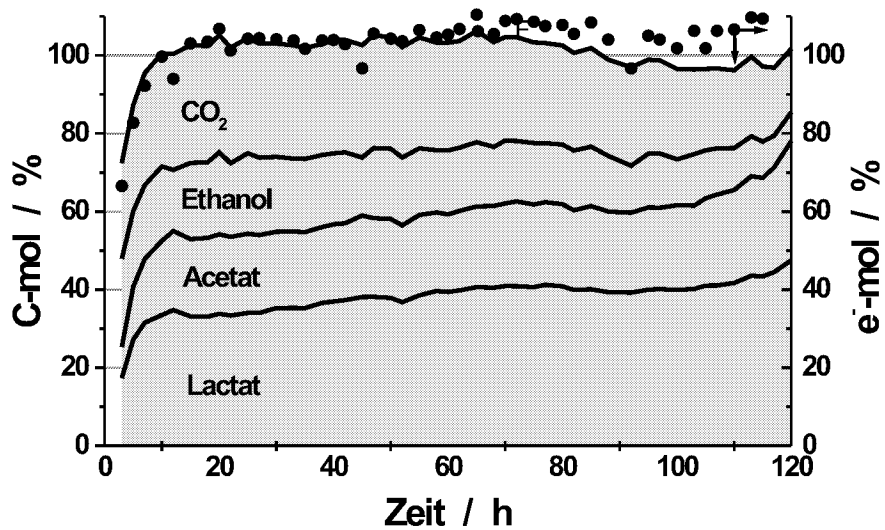


Abbildung 4.19: Kohlenstoff- und Elektronenbilanz als Funktion der Zeit. Bedingungen: siehe Abbildung 4.15

4.3.3.5 Biomasse

Für verschiedene kontinuierliche Experimente kann die Biotrockenmasse als Funktion der Zeit aufgetragen werden. Abbildung 4.20 zeigt die Auftragung.

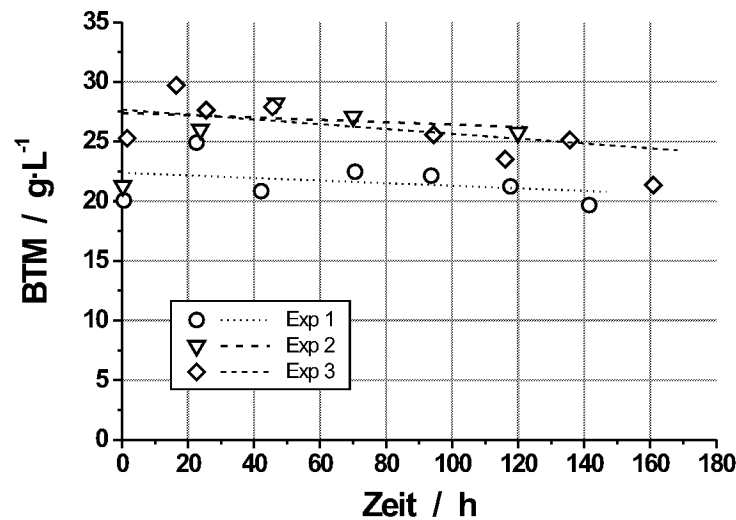


Abbildung 4.20: Verlauf der Biotrockenmasse über die Zeit für verschiedene kontinuierliche Experimente. Die eingezeichneten Linien sind optische Hilfslinien.

Wie der Abbildung zu entnehmen ist, nimmt die Menge an Biotrockenmasse über den zeitlichen Verlauf in allen Experimenten geringfügig ab. Es ist keine drastische Abnahme in einem der Experimente zu beobachten, die eine sofortige Erklärung für das Ende der Biotransformation wäre.

Die Streuung der Punkte resultiert aus dem großen Meßfehler von 10%. Hauptgrund hierfür ist die hohe Zelldichte im Reaktor.

Dies zeigt aber, daß die Lyse der Zellen nicht der verantwortliche Faktor für das Ende der kontinuierlichen Synthese ist. Wäre dem so, müßte die Biotrockenmasse deutlich stärker reduziert werden.

4.3.4 Proteine

4.3.4.1 Identifizierung

Auf der Suche nach Toxinen, welche das abrupte Ende der Biotransformation nach 120 h erklären könnten, wurde eine zunehmende Menge Protein im Reaktor identifiziert. Es wurden sowohl Proben aus dem Reaktor auf Proteingehalt, als auch Auslaufproben nach der Filtration, untersucht. Für das in Abbildung 4.15 auf Seite 80 gezeigte Experiment sind die gemessenen Proteingehalte in Tabelle 4.5 aufgelistet.

Zeit h	Probenart -	Proteinmenge $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
16,5	Retentat	223
25,5	Retentat	204
64,3	Retentat	276
64,0	Permeat	46

Tabelle 4.5: Extrazelluläre Proteinmenge während einer Biotransformation

Tests auf Protease und ADH Aktivität verliefen negativ. Es kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, daß hier eine bisher unbekannte Protease vorliegt, die mit dem eingesetzten Testkit keine Aktivität zeigt.

Um das unbekannte Protein weiter zu charakterisieren wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Hummel Proteingele (SDS-Page) angefertigt. In Abbildung 4.21 ist ein typisches Gel dargestellt.

Gut zu erkennen ist, daß es im Bereich von 66 kD eine sehr intensive Bande gibt. Wenn man dies auf den Inhalt von lysierten Zellen zurückführen würde, dann müßten wesentlich mehr intensive Banden zu sehen sein. Da dies nicht der Fall ist, kann man sagen, daß es sich um ein einzelnes Protein handelt.

Da eine weitere Aufreinigung ohne vorhandenen Aktivitätsassay extrem aufwendig wäre, und dies nicht Fokus dieser Arbeit ist, wurde versucht das vorhandene Protein ohne weitere Aufreinigung am N-Terminus zu sequenzieren. Die erhaltene Sequenz sieht wie folgt aus:

KSYAKVTSNKALTTDD(D)(N/T)(KVV)

Durch Datenbankvergleich ergab sich kein sinnvoller Treffer für die ermittelte Sequenz.

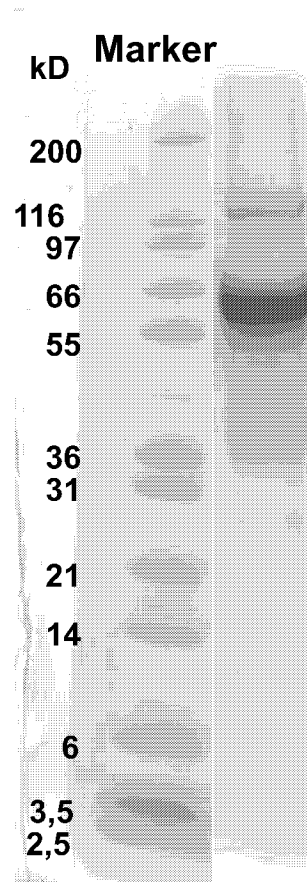


Abbildung 4.21: Typisches Proteingel des unbekannten Proteins für eine Standard-Biotransformation. Links auf dem Gel ist ein Marker aufgetragen, welcher die Massenbereiche anzeigt.

4.3.4.2 Einfluß des unbekannten Proteins

Um aber einen negativen Einfluß des Proteins auf das kontinuierliche Experiment auszuschließen, wurde der erhaltene Zellüberstand in einer Amiconzelle aufkonzentriert und das Konzentrat für einen Standard Batchversuch eingesetzt. Dabei wurden die Zellen vor Zugabe des Substrates 2 Stunden lang mit 50-Vol.% des aufkonzentrierten Proteins inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde durch Zugabe von (2,5)-Hexandion die Umsetzung gestartet. Der Konzentrations-/Zeit-Verlauf dieser Umsetzung ist in Abbildung 4.22 gezeigt.

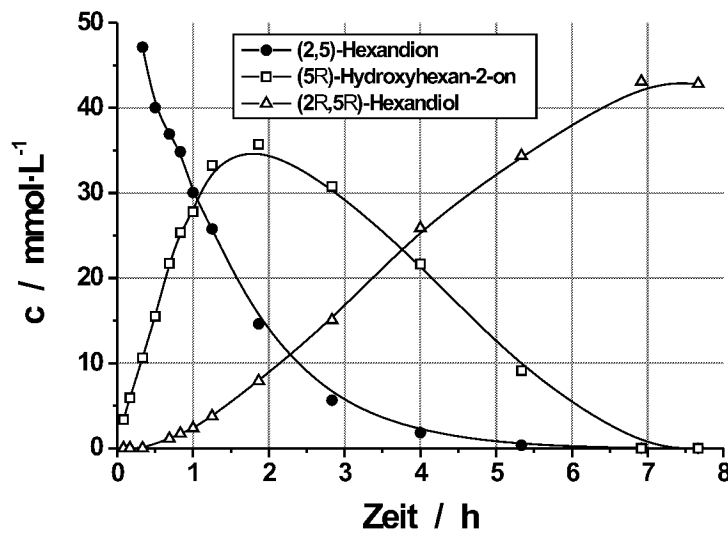


Abbildung 4.22: Exemplarischer Batchverlauf unter Zusatz des unbekannten Proteins. Bedingungen: $V = 0.1 \text{ L}$, 30°C , $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (2,5)-Hexandion, $22 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ *L. kefir*

Wie der Batchverlauf zeigt, ist keinerlei inhibierende Wirkung des gefundenen Proteins zu erkennen.

4.3.5 Zellen nach neuem Fermentationsprotokoll

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wurde im Rahmen des Projektes von der Firma Jülich Fine Chemicals eine Optimierung des Fermentationsprotokolls durchgeführt. Hierbei wurde erstens der Ablauf und zweitens das Medium optimiert. Das Medium wurde auf Basis von Hefeextrakt ausgelegt. Ziel dieser Optimierung war die Kostenersparnis durch Wegfall der teuren Medienkomponenten Fleischextrakt und Casein Pepton sowie das Erreichen von höheren Zelldichten. Eine Auftragsfermentation wurde durchgeführt und aus dieser Fermentation im 2 m³-Maßstab wurden 22 kg *L. kefir*-Feuchtmasse erhalten.

Diese Zellen wurden im kontinuierlichen Reaktor eingesetzt. Der Konzentrations-/Zeit-Verlauf für dieses Experiment ist in Abbildung 4.23 dargestellt.

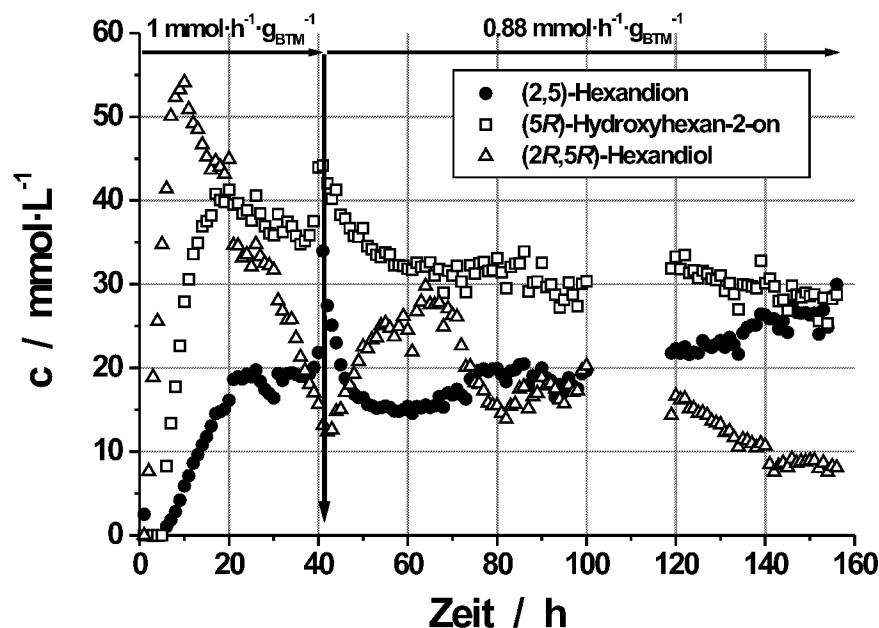


Abbildung 4.23: Konzentrations-/Zeit-Verlauf mit "neuen" Zellen. Bedingungen: $V = 2 \text{ L}$, 30°C , $\text{pH } 6$, $\tau = 4\text{h}$, Glucosedosierrate $3,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$, (2,5)-Hexandiondosierrate: $0\text{-}42\text{h } 1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$, $42\text{-}158\text{h } 0,88 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$, $20 \text{ g}_{\text{BTM}}\cdot\text{L}^{-1} \text{ L. kefir}$

(2,5)-Hexandion und (5R)-Hydroxyhexan-2-on erreichen nach ca. 20 h einen stationären Betriebspunkt. (2R,5R)-Hexandiol erreicht ein Maximum und fällt dann auf ca. 15 % des Maximalwertes ab. Der Konzentrations-/Zeit-Verlauf

des intermediären (5*R*)-Hydroxyhexan-2-ons fällt nur leicht ab und bleibt relativ konstant.

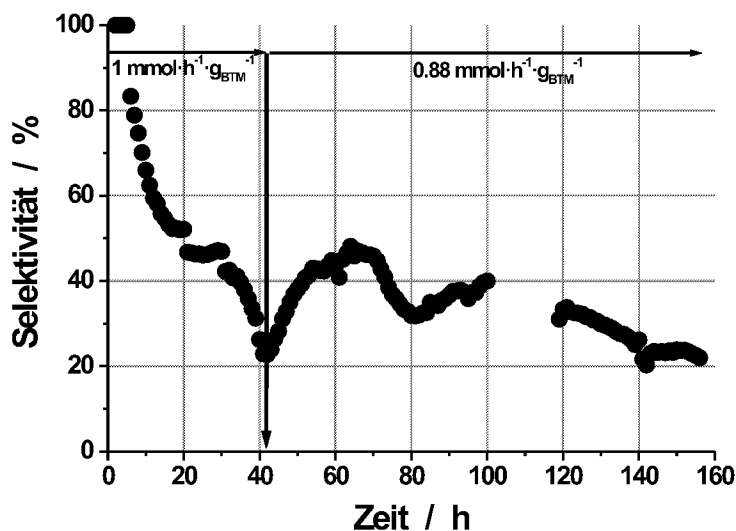


Abbildung 4.24: Selektivitäts-/Zeit-Verlauf für die nach dem neuen Fermentationsprotokoll fermentierten Zellen. Bedingungen: siehe Abbildung 4.23

Die Selektivität erreicht nach 40 h nur noch einen Wert von 20 %. Es wird kein stationärer Zustand erreicht. Trotz eines Absenken der (2,5)-Hexandiondosierrate von $1 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$ auf $0,88 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$ kann die Selektivität nur kurzzeitig auf über 40% erhöht werden. Dann erfolgt wieder ein Abfall auf 30%.

Dieses Experiment könnte ein Hinweis darauf sein, daß es in *L. kefir* doch zwei Enzyme geben könnte, die (2,5)-Hexandion reduzieren. Bisher konnte eine ADH aus *L. kefir* isoliert werden. Es ist aber noch nicht geklärt, ob es weitere Dehydrogenasen gibt, die die Reduktion katalysieren. In den nach dem neuen Protokoll fermentierten Zellen läge dann eine veränderte Enzymaktivität vor, welche den ersten Schritt katalysiert.

Festzuhalten bleibt, daß für die Produktion von (2*R*,5*R*)-Hexandiol diese Zellen nicht geeignet sind, da auf Grund der schlechten Selektivität die Aufarbeitung kostenintensiver werden würde. Möglicherweise bieten die nach dem neuen Protokoll fermentierten Zellen aber den Vorteil einer gezielten Produktion von (5*R*)-Hydroxyhexan-2-on mit hohen Ausbeuten. Dies würde einen präparativen Zugang zu dieser Verbindung eröffnen.

4.3.5.1 Reproduzierbarkeit der Experimente

Da (2*R*,5*R*)-Hexandiol erst ab einer Selektivität von 60% kristallisierbar ist, muß das Experiment so gestaltet werden, daß eine höhere Selektivität erreicht wird. Trägt man für verschiedene Batch, Fed-Batch, und kontinuierliche Experimente die Selektivität über den erreichten Umsatz auf, dann ergibt sich die in Abbildung 4.25 gezeigte Darstellung.

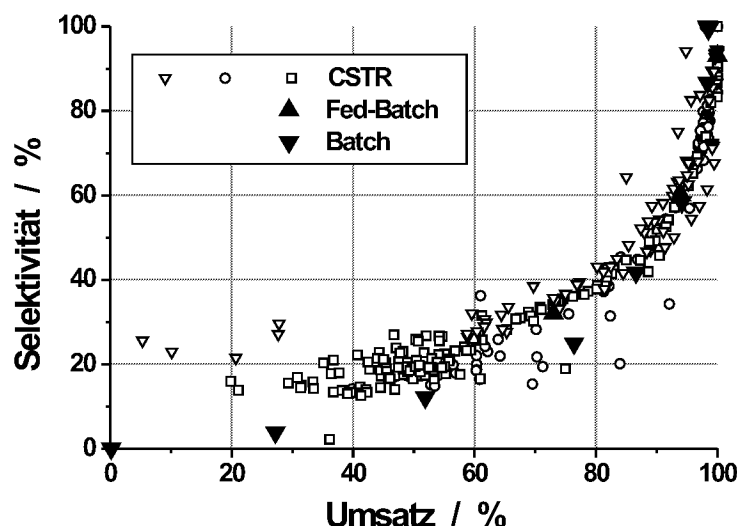


Abbildung 4.25: Selektivität als Funktion des Umsatzes für verschiedene kontinuierliche Experimente.

Überraschenderweise zeigt sich für alle Reaktortypen der gleiche Verlauf. Es muß also eine limitierende Größe geben, die unabhängig vom Reaktortyp ist. Eine denkbare Möglichkeit ist das Verhältnis der Kofaktoren NADP^+ und NADPH . Dieses sollte unabhängig vom Reaktortyp immer konstant sein und hat einen direkten Einfluß auf die Selektivität.

Außerdem zeigt diese Auftragung, daß alle Experimente, die zur Produktion durchgeführt werden sollen, einem Umsatz von mindestens 95% erreichen müssen, um eine einfache Aufarbeitungsstrategie zu ermöglichen (siehe Kapitel Aufarbeitung).

4.3.6 Zwischenbilanz

Die Ergebnisse des vorangegangenen Kapitels zur Produktion von (2*R*,5*R*)-Hexandiol mit *L. kefir* lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Es wurde ein kontinuierlich betriebener Rührkessel mit Zellrückhaltung etabliert.
- Die Verweilzeitverteilung des Reaktors wurde charakterisiert.
- (2*R*,5*R*)-Hexandiol konnte über einen Zeitraum von 120 h konstant produziert werden. Hierbei wurde ein Umsatz von 98% und eine Selektivität von 78% erreicht. Die Ausbeute dieses Experimentes betrug 630 g (2*R*,5*R*)-Hexandiol und 180 g (5*R*)-Hydroxyhexan-2-on.
- Eine maximale Raum-Zeit-Ausbeute von 63,8 g·L⁻¹·d⁻¹ wurde erreicht.
- Im Laufe dieser Arbeiten wurden insgesamt 2 kg (2*R*,5*R*)-Hexandiol hergestellt.
- Es konnte gezeigt werden, daß die nach neuem Fermentationsprotokoll hergestellten Zellen für die Produktion von (2*R*,5*R*)-Hexandiol nicht geeignet sind.

4.4 Übertragbarkeit

4.4.1 2-Oktanon

Um zu zeigen, daß die entwickelte Technologie nicht nur für die Synthese von (2*R*,5*R*)-Hexandiol geeignet ist, wurde eine weitere kontinuierliche Reduktion mit einem einfachen Keton durchgeführt. In Zusammenarbeit mit der Firma Juelich Fine Chemicals wurde 2-Oktanon mit *L. kefir* unter kontinuierlichen Bedingungen zu (2*R*)-Oktanol reduziert (siehe Abbildung 4.26). Auch bei dieser Reduktion wurden optische Ausbeuten > 99% erzielt.

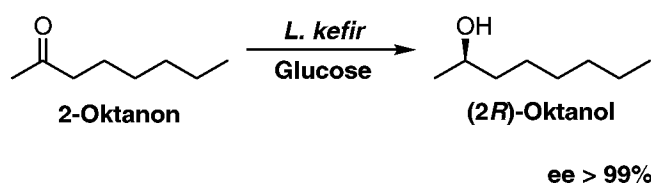


Abbildung 4.26: Ganzzellbiotransformation mit *L. kefir* und 2-Oktanon als Substrat

Die kontinuierliche Umsetzung von 2-Oktanon wurde ebenfalls in der in Abbildung 4.8 gezeigten Versuchsanlage durchgeführt. Da 2-Oktanon in Wasser sehr schlecht löslich ist (Löslichkeit 7 mmol·L⁻¹), wurden der 2-Oktanonlösung 5% Isopropanol als Lösungsvermittler zugegeben.⁴

Wird Glucose zur Kofaktorregenerierung verwendet, werden Lactat und Acetat als Stoffwechselendprodukte ins Medium abgegeben. Um den pH konstant bei 6 zu halten, muß mit NaOH titriert werden. In diesem Experiment wird bei gleichem Umsatz nur ein Bruchteil der üblichen Menge an NaOH verbraucht. Demnach verwendet die Zelle Isopropanol zur Regenerierung der Kofaktoren und nicht die Glucose durch Verstoffwechselung.

Der Umsatz/Zeit-Verlauf der kontinuierlichen Reduktion ist in Abbildung 4.27 wiedergegeben. Es wurde mit einer Dosierate von 2-Oktanon von 0,46 mmol·h⁻¹g_{BTM}⁻¹ begonnen. Dieser wurde nach 32h auf 1,14 mmol·h⁻¹g_{BTM}⁻¹ erhöht. Die Glucosedosierate blieb konstant bei 3,57 mmol·h⁻¹g_{BTM}⁻¹. Kurz nach Erhöhung der 2-Oktanondosierate wurde nochmals die gleiche Menge frische Biomasse wie zu Anfang des Experimentes zugegeben. Hierdurch erniedrigte sich die Glucosedosierate auf 1,78 mmol·h⁻¹g_{BTM}⁻¹ und die 2-Oktanondosierate auf 0,57 mmol·h⁻¹g_{BTM}⁻¹.

Der Umsatz fällt kontinuierlich über den Verlauf des Experimentes ab. Vermutlich werden die Zellen durch die Restkonzentration an 2-Oktanon permeabilisiert und somit destabilisiert.

⁴Allerdings ist hierzu zu bemerken, daß 2-Propanol auch ein Substrat für die in der Biotransformation genutzten ADH darstellt und bei Ansätzen mit isolierter ADH zur Kofaktorregenerierung verwendet wird.

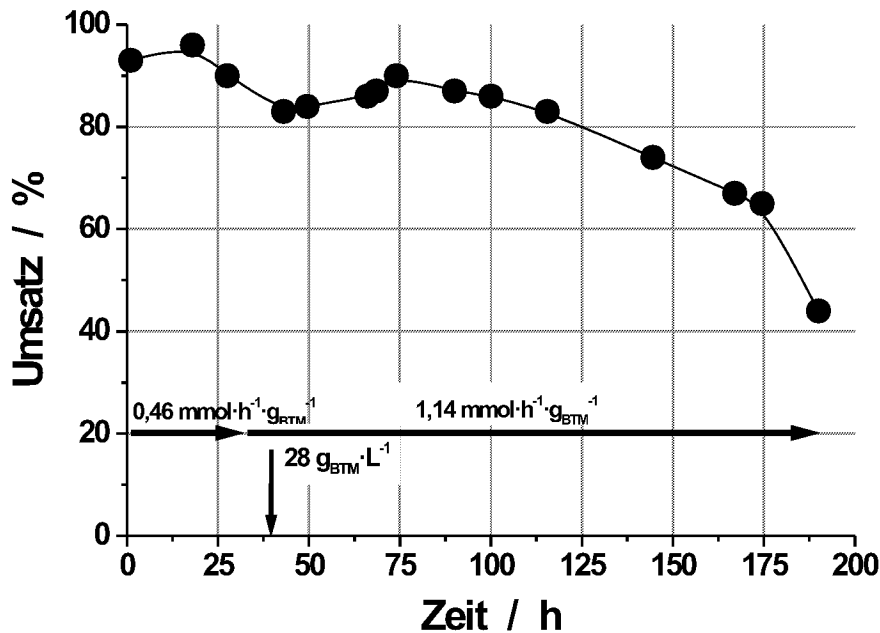


Abbildung 4.27: Kontinuierliche Produktion von (2*R*)-Oktanol. Bedingungen : $V = 2 \text{ L}$, 30°C , $\text{pH } 6$, $\tau = 4\text{h}$, 50 mM Phosphatpuffer, Glucosedosierrate_{0–32h} $3,57 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$, 2-Oktanondosierrate_{0–32h} $0,46 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$, 2-Oktanondosierrate_{32–168h} $1,14 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$, $t = 0 : 14 \text{ g}_{\text{BTM}}\text{L}^{-1} \text{ L. kefir}$, $t = 32\text{h} : 28 \text{ g}_{\text{BTM}}\text{L}^{-1} \text{ L. kefir}$

Auch das Filtrationsmodul ist nach 168 h durch das 2-Oktanon zerstört worden. Als Ergebnis ist somit festzuhalten, daß prinzipiell auch 2-Oktanon reduziert werden kann. Allerdings muß, wie dieses Experiment gezeigt hat, für eine Applikation erst das Problem der Stabilität des Filtrationsmoduls gelöst werden. Die Verklebung der Hohlfasern an den Enden des Moduls ist nicht inert gegenüber 2-Oktanon.

4.4.2 *Saccharomyces cerevisiae*

4.4.2.1 Einführung

Es soll gezeigt werden, daß das etablierte Reaktorsystem nicht nur für den Einsatz ruhender Zellen von *L. kefir* geeignet ist⁵. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Heijnen (TU Delft, Niederlande) wurden ruhende Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt. Da die Biotransformation mit Bäckerhefe unter aeroben Bedingungen durchgeführt wird, mußte der Reaktor geringfügig modifiziert werden (siehe Abbildung 4.28). Es mußte sowohl eine pO_2 -Messung als auch eine Sauerstoffmessung in der Abluft ergänzt werden.

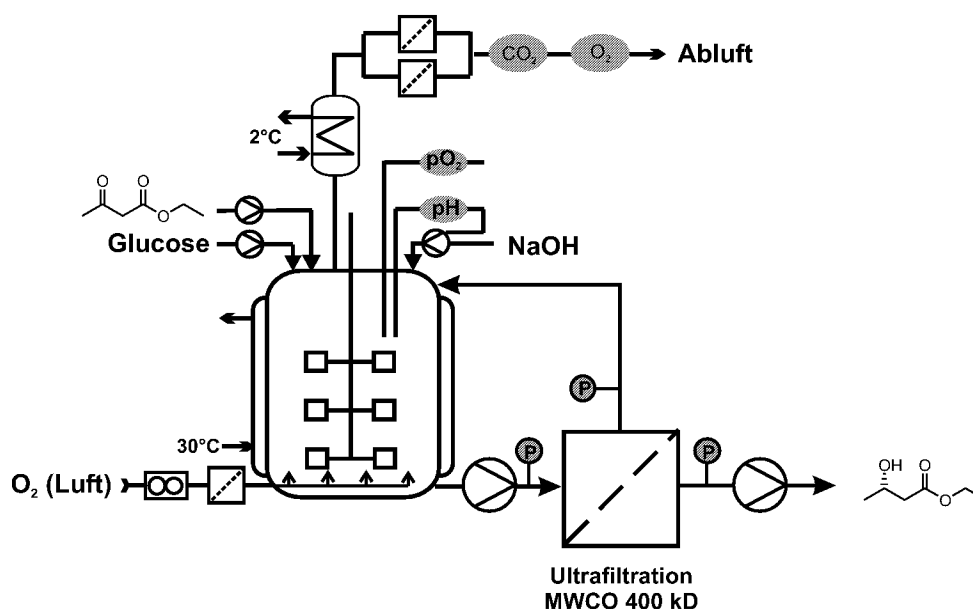


Abbildung 4.28: Versuchsaufbau für die aerobe Ganzzellbiotransformation mit Bäckerhefe.

Es wurde ein Reaktionssystem ausgewählt, welches bereits gut charakterisiert ist. Hierbei fiel die Wahl auf die Reduktion von 3-Oxobuttersäureethylester **EOB** zu (3*S*)-Hydroxybuttersäureethylester **EHB** (siehe Abbildung 4.29) [144], welche aus industrieller Sicht ebenfalls interessant ist [11, 145, 146]. (3*S*)-Hydroxybuttersäureethylester ist ein chiraler Baustein in der Synthese von Naturstoffen [147]. Beispiele sind hierfür die Synthese von Carbapenem Antibiotika [148], wie Thienamycin [149], oder die Synthese von Insektenpheromonen, wie Sulcatol [150, 151].

Für dieses Reaktionssystem wurden bereits die Reaktionsbedingungen, die Stöchiometrie sowie verschiedene Dosierstrategien in Fed-Batch Experimenten

⁵Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Ifoeng Chin-Joe (TU Delft, NL) durchgeführt.

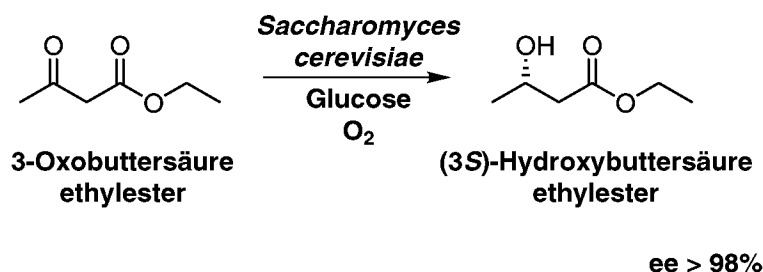


Abbildung 4.29: Mit Bäckerhefe durchgeführte Ganzzellbiotransformation.

von *Chin-Joe et al.* [152, 153] untersucht. Um die industrielle Anwendbarkeit zu demonstrieren, soll gezeigt werden, daß sich **EHB** auch unter kontinuierlichen Reaktionsbedingungen herstellen läßt.

4.4.2.2 Reproduzierbarkeit

Bäckerhefe zeigte sich in den kontinuierlichen Experimenten als sehr robustes System. Hierbei ist noch festzustellen, daß bei den Experimenten verschiedene Chargen von industrieller Frischhefe⁶ verwendet worden sind, und dies offensichtlich keinen Einfluß auf die Reproduzierbarkeit hat. In Abbildung 4.30 sind für drei kontinuierliche Reduktionen die Konzentrationen an **EHB** und **EOB** über die Zeit, bis zum Erreichen des stationären Betriebspunktes dargestellt. Man erkennt eine sehr gute Übereinstimmung.

4.4.2.3 Produktion

Ein Ziel dieser Arbeiten ist es zu zeigen, daß sich **EHB** auch über einen längeren Zeitpunkt konstant im CSTR mit Zellrückhaltung produzieren läßt. Für eines dieser Produktionsexperimente ist in Abbildung 4.31 der Konzentrations/Zeit-Verlauf dargestellt.

Es wird am stationären Betriebspunkt eine Konzentration von etwa 16 mmol·L⁻¹ **EHB** erreicht. Der Umsatz beträgt 95%. Die Restkonzentration an **EOB** beträgt 1,5 mmol·L⁻¹. Die Raum-Zeit-Ausbeute liegt bei 15,4 g·L⁻¹·d⁻¹.

Dieses Experiment offenbart allerdings auch einen großen Nachteil der Bäckerhefe zur Synthese von chiralen Alkoholen. Es gibt in *S. cerevisiae* zwar eine ganze Reihe von (*S*)-spezifischen Oxidoreduktasen, aber im Gegensatz zu *Lactobacillus kefir*, auch eine ganze Reihe von (*R*)-spezifischen Oxidoreduktasen [154, 155, 156, 157, 158]. Für das am häufigsten vorkommende (*R*)-spezifische sowie das (*S*)-spezifische Enzym konnten die K_M -Werte für **EOB** bestimmt werden zu: K_M^S 0,9 mmol·L⁻¹ und K_M^R 17 mmol·L⁻¹ [152]. Der damit zusammenhängende Effekt, daß bei einer steigenden Konzentration an Substrat der Enantiome-

⁶“Koningsgist“, DSM-Gist, Delft, Niederlande

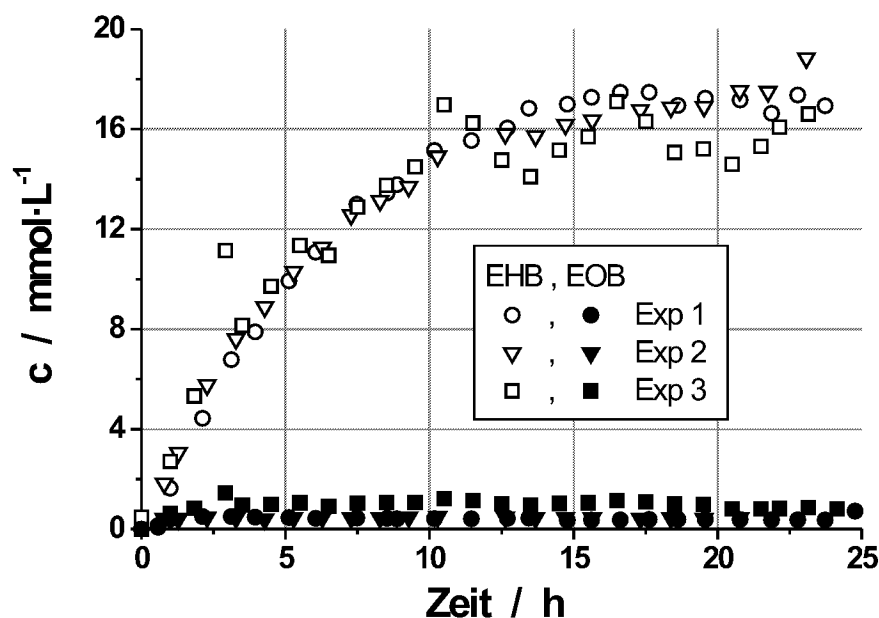


Abbildung 4.30: Konzentrations-/Zeit-Verläufe verschiedener Einlaufphasen kontinuierlicher Biotransformationen im Vergleich.

renüberschuß sinkt, wurde bereits für Batch und Fed-Batch-Versuche in der Literatur beschrieben [159, 153].

Auch in der kontinuierlichen Synthese kommt, wie in Abbildung 4.31 zu sehen, dieser Effekt zum Tragen. Der Enantiomerenüberschuß fällt von anfänglich >99% auf 90% nach 65 Stunden. So müßte man zur Umgehung dieses Effektes die Substratdosierate noch weiter drosseln, so daß der Restanteil an **EOB** gegen Null geht. Damit würde die Raum-Zeit-Ausbeute noch niedriger ausfallen als sie bereits schon ist.

4.4.2.4 Multipurposeproduktion

Auf Grund der guten Stabilität von Bäckerhefe soll gezeigt werden, daß gerade im Bereich kleiner Produktionsanlagen das Potential der Multipurposefähigkeit, durch Synthese verschiedener Produkte in einem Experiment, gegeben ist. In Abbildung 4.32 ist der Konzentrations-/Zeit-Verlauf eines solchen Experimentes dargestellt. Hierbei werden die bisher gezeigten Synthesen verknüpft. Es soll sowohl (3*S*)-Hydroxybuttersäureethylester als auch (2*S*,5*S*)-Hexandiol produziert werden.

Zunächst wurde für 180 h die in Abbildung 4.29 auf Seite 95 beschriebene

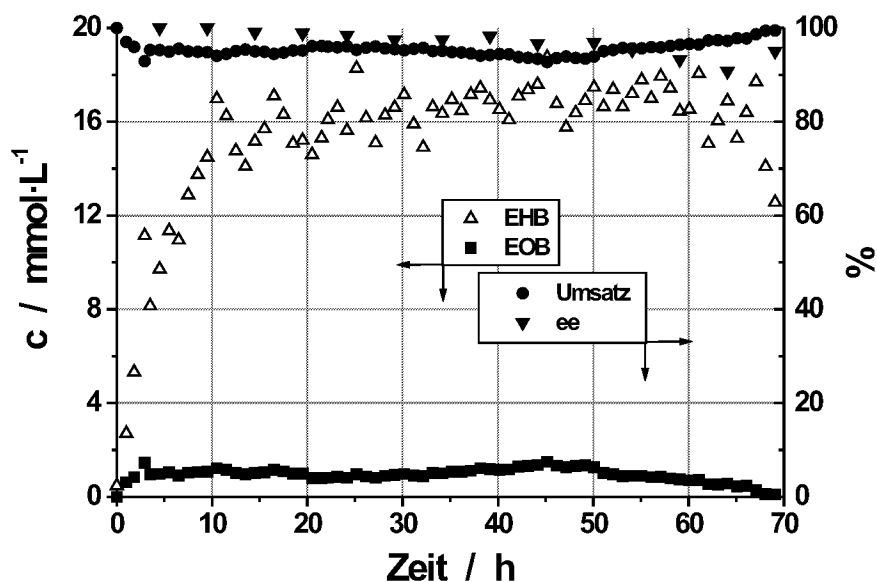


Abbildung 4.31: Kontinuierliche Produktion von (3*S*)-Hydroxybuttersäureethylester. Bedingungen: $V = 2$ L, 30°C , pH 5,5, $\tau=4$ h, 50 mM Kaliumphosphatpuffer, 5 mM MgSO_4 , Glucosedosierrate $0,11 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$, EOBdosierrate $0,17 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$, $29 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ *S. cerevisiae*

Reduktion durchgeführt. Durch leichte Modifikation der Substratdosierrate sank die Produktkonzentration während des Experimentes auf $15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Bei 180 h wurde bei laufender Glucosedosierrate die Substratdosierrate abgestellt. Die Reaktanden der **EHB**-Synthese wurden ausgepült. Nach 190 h wurde die (2,5)-Hexandiondosierrate gestartet. Innerhalb von 20 h wurde wieder ein stationärer Betriebspunkt erreicht. Der Umsatz war quantitativ, die Selektivität erreichte 32%. Aus technischen Gründen mußte das Experiment an dieser Stelle beendet werden. Es konnte aber gezeigt werden, daß die Umschaltung auf ein anderes Substrat im laufenden Betrieb möglich ist. Selbstverständlich müßten die Reaktionsbedingungen für die zweite Reaktion vorher optimiert werden.

4.4.2.5 Zwischenbilanz

Die Ergebnisse des Kapitels Übertragbarkeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Das etablierte Reaktorkonzept konnte auf die kontinuierliche Reduktion von 2-Oktanon zu (2*R*)-Oktanol übertragen werden.

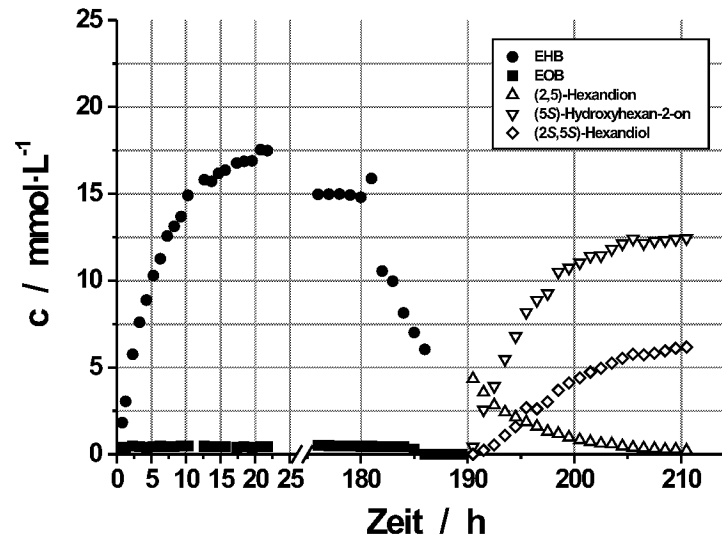


Abbildung 4.32: Kontinuierliche Reduktion mit Substratwechsel. Bedingungen: $V = 2 \text{ L}$, 30°C , $\text{pH } 5,5$, Glucosedosierrate, $0,09 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\text{g}_{BTM}^{-1}$, EOBdosierrate $0,15 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\text{g}_{BTM}^{-1}$, (2,5)-Hexandiondosierrate $0,33 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\text{g}_{BTM}^{-1}$, $27 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ *S. cerevisiae*

- (2*R*)-Oktanol konnte kontinuierlich mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von $42,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ produziert werden.
- Das etablierte Reaktorkonzept konnte mit leichten Modifikationen auf die kontinuierliche Reduktion von 3-Oxobuttersäureethylester zu (3*S*)-Hydroxybuttersäureethylester mit Bäckerhefe übertragen werden.
- Bei dieser Reduktion konnte eine Raum-Zeit-Ausbeute von $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ erreicht werden.
- Es konnte die Multipurposefähigkeit der Versuchsanlage durch Substratwechsel während eines laufenden Experimentes gezeigt werden.

5 Aufarbeitung

Aufarbeitung ist ein wichtiger Abschnitt im Bereich der Prozeßentwicklung. Wie in den vorhergehenden Kapiteln bereits gezeigt wurde, fallen erstens große Mengen an Nebenprodukten an, und zweitens liefert das etablierte Reaktorsystem auch große Mengen an Produktlösung, die zu verarbeiten sind. Bei einer standardmäßig eingestellten Verweilzeit von 4h sind dies $0,5 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$. Nimmt man das in Abbildung 4.15 auf Seite 80 gezeigte Experiment als Beispiel, dann fallen in den 120 h konstanter Produktionsphase 60 L Produktlösung an, die aufgearbeitet werden muß.

Das bisherige Aufbereitungsverfahren (Abbildung 5.1) besteht darin, die Biomasse durch Filtration oder Zentrifugation (abhängig vom Maßstab) abzutrennen und den erhaltenen Überstand durch Eindampfen aufzukonzentrieren. Der erhaltene Rückstand wird dann mit Ethylacetat manuell im Scheidetrichter extrahiert. Bei dieser Strategie kommt es zu Verlusten im Bereich von 30-40%.

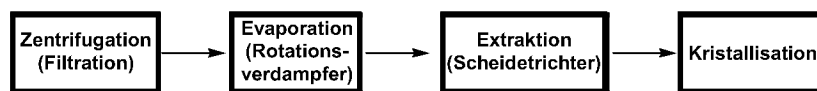


Abbildung 5.1: Bisherige Aufbereitungsstrategie

Im folgenden Kapitel sollen alternative Verfahren erarbeitet werden, welche sich auch in Kombination mit den im vorhergehenden Kapitel vorgestellten kontinuierlichen Verfahren integriert betreiben lassen.

5.1 Sprühtrocknung

Sprühtrocknung ist vor allem aus industrieller Sicht sehr interessant, da es ein sehr kostengünstiges Verfahren darstellt. Sprühtrocknung ist ein Verfahren, welches vor allem für den Tonnenmaßstab geeignet ist. Für Laboratorianswendungen gibt es wenige kommerziell erhältliche Sprühtrockner.

In Zusammenarbeit mit der Firma Büchi, die eines ihrer Laborgeräte (B-191) zur Verfügung gestellt hat, wurde mit verschiedenen Auslaufproben von kontinuierlichen Reduktionen das Verfahren der Sprühtrocknung getestet.

Da die Produktkonzentrationen relativ gering sind, eine große Menge an Nebenprodukten vorliegt und $(2R,5R)$ -Hexandiol nicht ohne weiteres kristallisiert bzw. rieselfähig ist, erwies sich die Sprühtrocknung als nicht geeignetes Aufbereitungsverfahren in Kombination mit dem vorliegenden Produktionsverfahren.

5.2 Fest-Flüssig-Extraktion

5.2.1 Prinzip

Bei der Fest-Flüssig-Extraktion tritt das Raffinat in reversible physikalische Wechselwirkung mit dem Festphasenmaterial (Sorbens) und wird von diesem adsorbiert. Die flüssige Phase sollte idealer Weise keine Wechselwirkung mit dem Sorbens aufweisen. Die Art der Wechselwirkung kann apolarer, polarer oder ionischer Natur sein. In jedem Fall muß sie aber reversibel sein, damit der adsorbierte Stoff mit einem geeigneten Eluenten wieder desorbiert werden kann.

Die gängige Applikation dieser Sorbentien ist die Verwendung einer mit dem jeweiligen Sorbens gepackten Säule. Das Prinzip zum Betrieb einer solchen Säule ist in Abbildung 5.2 dargestellt.

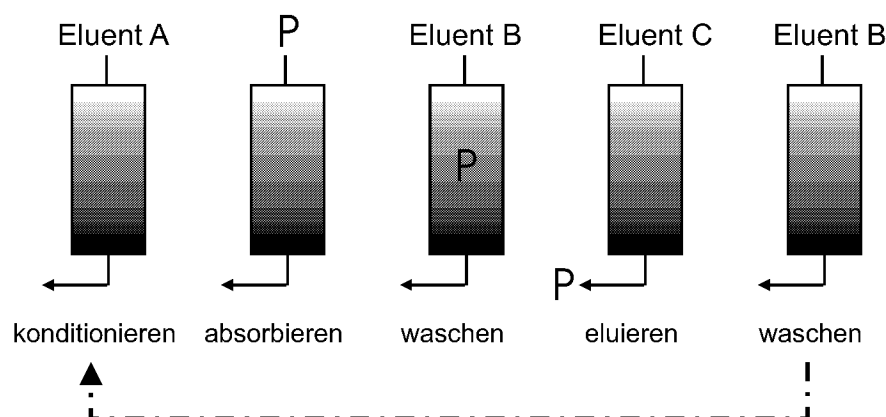


Abbildung 5.2: Prinzip der Festphasenextraktion

Je nach Material muß die Säule in einem ersten Schritt mit Lösungsmittel oder Puffer konditioniert werden. Dann kann in einem zweiten Schritt das Raffinat adsorbiert werden. Nach Adsorption wird, wiederum abhängig vom Material, entweder mit Lösungsmittel oder Puffer gewaschen oder aber die Säule trockenlaufen gelassen. Mit einem entsprechenden Eluenten wird das Raffinat von der Säule eluiert. Nach einem weiteren Spülschritt, beginnt der Zyklus von vorne. Um einen Produktverlust durch Überladen der Säule zu vermeiden bzw. das System kontinuierlich zu betreiben, wird in der Regel mit mehreren Säulen parallel gearbeitet.

5.2.2 Phasen und Eluenten

Zuerst wurden eine Reihe von C₁₈-funktionalisierten Kieselgel-Umkehrphasen (sog. RP18-Phasen) getestet. Da diese häufig Anwendung im Bereich der analytischen Probenvorbereitung finden [160], gibt es kommerziell erhältliche, fertig gepackte Kartuschen mit einer definierten Menge Material. Diese zeigten keine Adsorption für (5*R*)-Hydroxyhexan-2-on und (2*R*,5*R*)-Hexandiol.

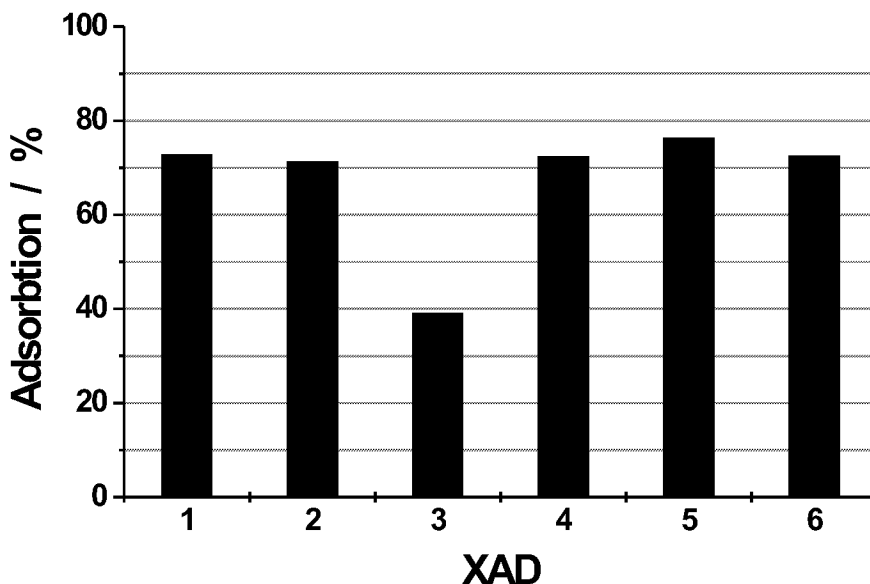


Abbildung 5.3: Adsorption von (2,5)-Hexandiol auf verschiedenen XAD-Harzen.

Eine andere Klasse von Festphasenadsorbentien sind Styroldivinylbenzolphasen. Diese sind auch bekannt unter dem Markennamen XAD[®]. XAD-Harze werden auch industriell eingesetzt. Sie sind ein häufig genutztes Material, um entweder Produkte sofort aus dem Reaktionsraum zu entfernen [161, 162], oder um Substrate in kleinen, kontrollierten Mengen in die Reaktionslösung abzugeben [163]. Alle bei Sigma-Aldrich kommerziell erhältlichen XAD-Harze wurden auf ihre Eignung zur Produktaufarbeitung getestet.

Um den Einsatz der XAD-Harze für das hier betrachtete System zu testen, müssen zweierlei Dinge geklärt werden. Erstens stellt sich die Frage, ob das jeweilige Harz (2*R*,5*R*)-Hexandiol überhaupt adsorbiert. Zweitens muß ein geeignetes Lösungsmittel als Eluent gefunden werden.

Um diese Fragestellungen beantworten zu können, wurden im kleinen Maßstab Tests durchgeführt. Es wurden 500 mg des jeweiligen Harzes mit Wasser für 5 min

konditioniert. Das Wasser wurde entfernt und 500 μL der (2*R*,5*R*)-Hexandiol-Stammlösung ($12 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) zugesetzt. Nach 2 min auf dem Vortex wurde aus der Wasserphase eine Probe zur GC-Analytik entnommen. Das restliche Wasser wurde möglichst quantitativ entfernt, und anschließend wurden 500 μL Eluent dazu gegeben. Aus dieser Phase wurde nach wiederum 2 min Schütteln eine Probe zur GC-Analytik entnommen.

Die Adsorption kann dann wie folgt berechnet werden:

$$(5.1) \quad \text{Adsorption} = \frac{c_0 - c_{\text{Überstand}}}{c_0}$$

XAD	Kapazität $\mu\text{mol}\cdot\text{g}_{\text{XAD}}^{-1}$
1	9
2	8
3	7
4	9
5	9
6	9

Tabelle 5.1: Beladungskapazitäten ausgewählter XAD-Harze

In Abbildung 5.3 ist die Menge des adsorbierten (2,5)-Hexandiol auf dem jeweiligen Harz aufgetragen. Hieraus lassen sich die in Tabelle 5.1 aufgelisteten Beladungskapazitäten der verschiedenen Harze für (2*R*,5*R*)-Hexandiol berechnen.

In Abbildung 5.4 sind die Wiederfindungen nach Elution mit dem jeweiligen Eluenten aufgetragen. Diese Wiederfindungen beziehen sich auf die eingesetzte Gesamtmenge von **3**. In der Abbildung ist zu sehen, daß überwiegend Alkohole (Methanol, Ethanol, 2-Propanol) zum Einsatz kommen. Andere Eluenten wurden ebenfalls getestet. Diese zeigten allerdings keinerlei Elution von **3**. Zu diesen hier nicht genannten Eluenten zählen chlorierte Kohlenwasserstoffe, wie Chloroform und Methylenchlorid, Ether, z.B. Diethylether, und Ester, wie z.B. Ethylacetat.

5.2.3 Anwendung

Die Kombination von XAD 2 als Harz und Ethanol als Eluent wurde gewählt, um eine präparative Adsorption auf einer gepackten Säule durchzuführen [164]. Die Säule wurde mit 10 g XAD 2 gepackt. Die Konzentration der Stammlösung (2*R*,5*R*)-Hexandiol betrug $26 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Es wurden in zwei Experimenten jeweils 4 mL ($105 \mu\text{mol}$) und 5 mL ($132 \mu\text{mol}$) von dieser Lösung aufgegeben und mit 50

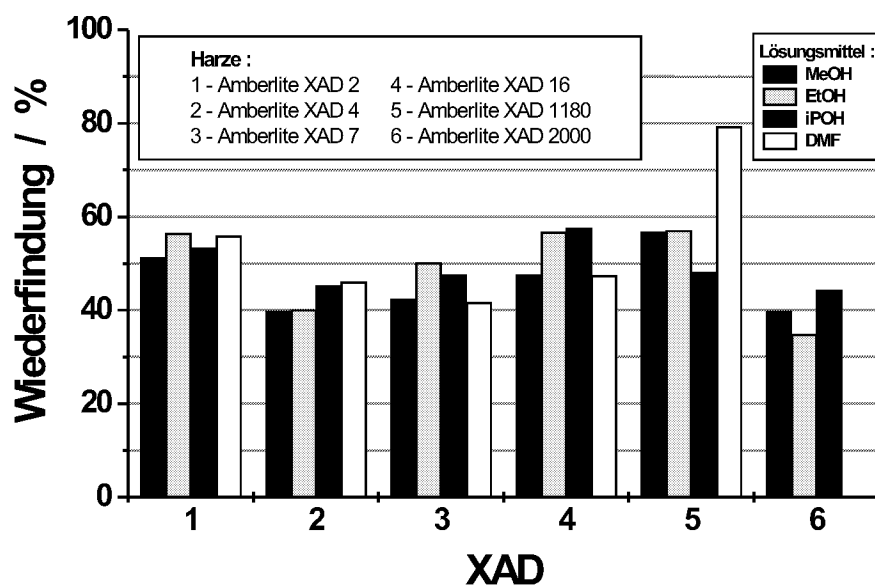


Abbildung 5.4: Elution von XAD-Harzen. Wiederfindung nach Elution bezogen auf die ursprünglich eingesetzte Menge **3** Bedingungen: siehe Abbildung 5.3

ml Wasser nachgespült. Der Fluß während der Auftragung betrug $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Gespült wurde mit $0,7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Schließlich wird zur Elution Ethanol mit einem Fluß von $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ in die Säule gespült. Es wurden Fraktionen von $2,5 \text{ mL}$ aufgefangen und analysiert. In den Abbildungen 5.5 und 5.6 sind die Elutionsprofile für die beiden Säulen dargestellt.

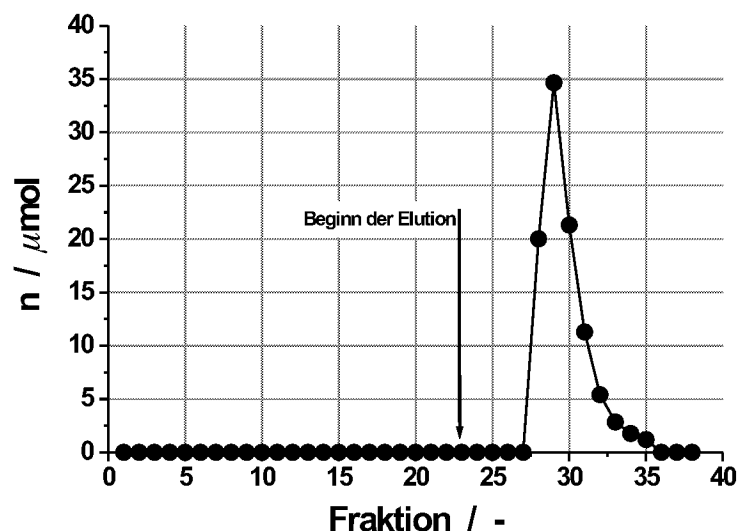


Abbildung 5.5: Präparative Adsorbtionssäule. Bedingungen: 10 g XAD-2, $105 \mu\text{mol}$ $(2R,5R)$ -Hexandiol.

Das Elutionsprofil in Abbildung 5.5 zeigt, daß $(2R,5R)$ -Hexandiol quantitativ auf der Säule adsorbiert wird und nach dem Einspülen von Ethanol auch wieder quantitativ desorbiert. Für diese Säule beträgt die Wiederfindung nach Elution 94%. Die Beladungskapazität beträgt demnach etwa $10 \mu\text{mol} \cdot \text{g}_{\text{XAD}}^{-1}$, was sich in etwa mit den in Tabelle 5.1 auf Seite 102 gezeigten Daten deckt. Das Elutionsprofil in Abbildung 5.6, bei dem $132 \mu\text{mol}$ aufgetragen wurden, zeigt einen deutlichen Durchbruch. Die Beladungskapazität ist überschritten. Die Wiederfindung beträgt 99,2 %.

5.2.4 Ergebnis

Es wird deutlich, daß die Festphasenextraktion für das betrachtete System im Prinzip möglich ist. Der große Nachteil ist aber, daß auf Grund der sehr geringen Adsorption eine große Menge fester Phase benötigt wird. Betrachtet man z.B. das in Abbildung 4.15 auf Seite 80 gezeigte kontinuierliche Experiment, bei dem in der Stunde 45 mmol Produkt anfallen, dann wären $4,5\text{--}5 \text{ kg}$ XAD Harz notwendig, um

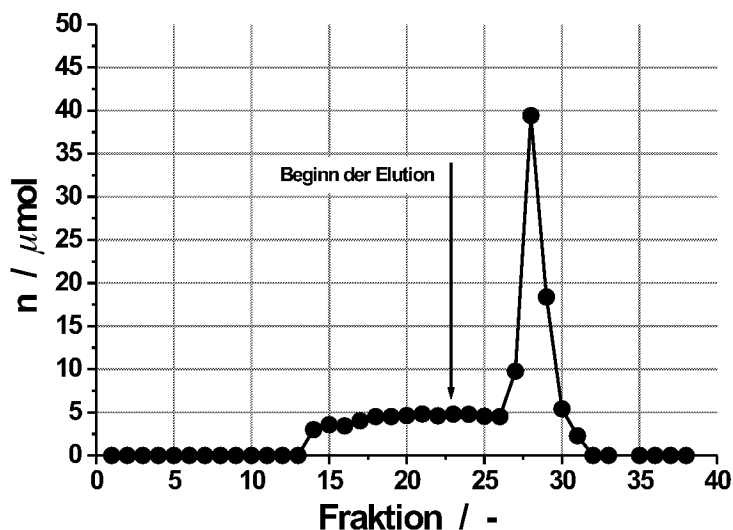


Abbildung 5.6: Präparative Adsorbtionssäule. Bedingungen: 10 g XAD-2, 132 μmol (2*R*,5*R*)-Hexandiol.

in einer Stunde das gesamte Produkt zu adsorbieren. Im kontinuierlichen Betrieb müßte man mit mehreren Säulen gleichzeitig operieren, um die verschiedenen Schritte parallel durchführen zu können (siehe Abbildung 5.2 auf Seite 100). Ein kg XAD-2 kostet derzeit 52 Euro¹. Somit würde eine einzige Säule circa 233 Euro kosten. Hinzu kommen noch Investitionskosten für Pumpen (jede Säule braucht mindestens eine), Glas- oder Edelstahlsäulen, etc.

Allerdings ist zu sagen, daß der Preis nicht das einzige Kriterium gegen dieses Verfahren ist. Erstens bleibt offen, wie lange solch ein Harz stabil bleibt, und zweitens läßt sich (2*R*,5*R*)-Hexandiol aus Ethanol nicht kristallisieren. Es wären also weitere Aufarbeitungsschritte nötig, um reines Produkt zu erhalten.

5.3 Flüssig-Flüssig-Extraktion

5.3.1 Prinzip

Bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion wird ein in einer Flüssigkeit gelöster Stoff durch ein Lösungsmittel extrahiert. Das Lösungsmittel und die Abgeberflüssigkeit sollten möglichst unlöslich ineinander sein. Die nach der Extraktion mit dem zu extrahierenden Stoff beladene Phase nennt man hierbei auch Extrakt.

¹Sigma-Aldrich Katalog, Stand 2002

Die verarmte Phase heißt Raffinat.

Im Gleichgewicht beschreibt der Nernst'sche Verteilungssatz das Verhalten des zu extrahierenden Stoffes. Da es ein Grenzesetz ist, gilt es nur für hinreichend verdünnte Lösungen sowie für nichtmischbare Flüssigkeiten [165]. Außerdem sind gleiche Volumina der beiden Phasen erforderlich.

$$(5.2) \quad K_D = \frac{c_{Extrakt}}{c_{Raffinat}}$$

In der Praxis gibt man in der Regel den Extraktionsgrad E an:

$$(5.3) \quad E = \left(\frac{c_{Extrakt}}{c_0} \right)$$

Wobei c_0 die Einlaufkonzentration vor der Extraktion darstellt. Hieraus läßt sich dann eine einfache Gleichung, in der alle Komponenten experimentell einfach bestimmbar sind, formulieren:

$$(5.4) \quad E = \left(\frac{c_0 - c_{Raffinat}}{c_0} \right)$$

5.3.2 Verteilungskoeffizienten

Um herauszufinden, welches Lösungsmittel für die Extraktion geeignet ist, wurden für eine Reihe von gängigen Lösungsmitteln die Verteilungskoeffizienten für (2*R*,5*R*)-Hexandiol bestimmt (Tabelle 5.2).

Lösungsmittel	E
MTBE	0,13
Ethylacetat	0,13
Diethylether	0,15
<i>iso</i> -Octan	unlöslich
<i>iso</i> -Hexan	unlöslich

Tabelle 5.2: Extraktionsgrad für verschiedene Lösungsmittel

Für diese Messungen wurde eine Stammlösung der Konzentration 50 mmol·L⁻¹ (2*R*,5*R*)-Hexandiol hergestellt. 50 mL dieser Lösung wurden dann mit

50 mL des jeweiligen Lösungsmittel im Scheidetrichter extrahiert. Nach Trennung der Phasen wurde der wässrigen Phase eine Probe zur Analyse entnommen und der Extraktionsgrad nach Gleichung 5.4 berechnet.

Die Entscheidung, welches Lösungsmittel für die Aufarbeitung in Frage kommt, fiel zu Gunsten von Ethylacetat. Dies hat verschiedene Gründe. Chlorierte Lösungsmittel wie Chloroform oder Methylenchlorid kamen nicht in Frage, da das zu entwickelnde Verfahren "nachhaltig" sein sollte. MTBE wäre ebenfalls ein geeigneter Kandidat. Da aber das Gefährdungspotential, im Hinblick auf gesundheitliche Aspekte (MTBE steht im Verdacht cancerogen zu sein) oder stoffliche Aspekte (z.B. Explosionsgrenzen), wesentlich höher sind als bei Ethylacetat, und die Verteilungskoeffizienten nahezu identisch sind, kam MTBE nicht in Frage.

Um den Verteilungskoeffizienten zu erhöhen, wurden Extraktionsversuche bei erhöhter und erniedrigter Temperatur durchgeführt. In Abbildung 5.7 sind die Ergebnisse dargestellt. Mit einer Erhöhung der Temperatur auf 40°C konnte der Verteilungskoeffizient um Faktor 2,5 gesteigert werden.

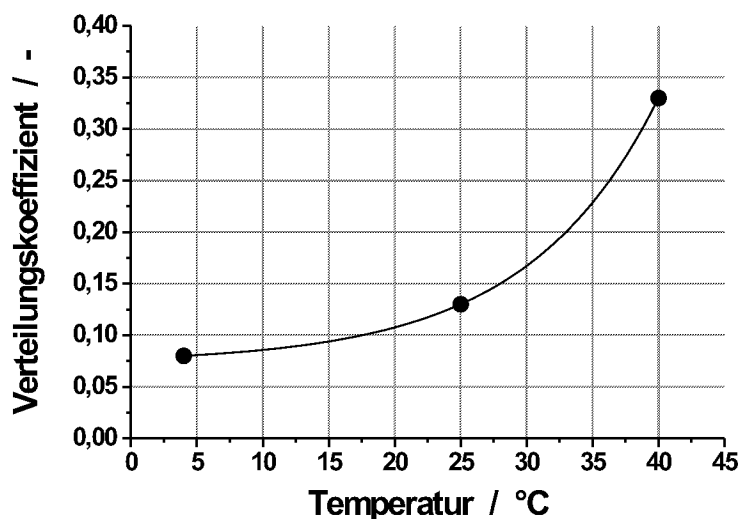


Abbildung 5.7: Verteilungskoeffizient in Abhängigkeit der Temperatur. Bedingungen: $V_{H_2O} = 0,1 \text{ L}$, $V_{Ethylacetat} = 0,1 \text{ L}$, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (2,5)-Hexandiol.

5.3.3 Kontinuierliche Extraktion

5.3.3.1 Aufbau

Um von den hohen Verlusten durch Azeotropbildung mit Wasser und der arbeitsintensiven manuellen Extraktion im Scheidetrichter wegzukommen, mußte ein möglichst effizientes und wenig arbeitsintensives Konzept zur Aufarbeitung gefunden werden. Die Anforderungen an dieses Konzept sind eine möglichst effektive Extraktion, welche auch die großen Mengen an anfallendem Material verarbeiten kann. Außerdem müssen selbstverständlich alle Materialien stabil gegen Ethylacetat sein. Daher kommt eine membrangestützte Extraktion, wie sie beispielsweise von *Rissom* [31] und *Maaß* [166] entwickelt wurde, nicht in Frage. Seitens der Hersteller werden alle kommerziell verwendeten Membranen in Extraktionsmodulen als nicht kompatibel mit Ethylacetat angegeben.

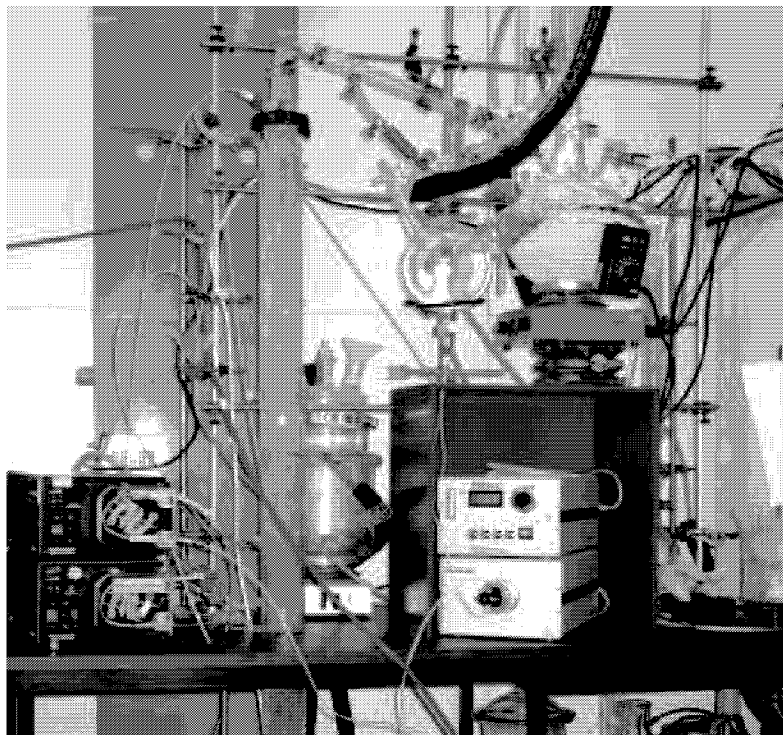
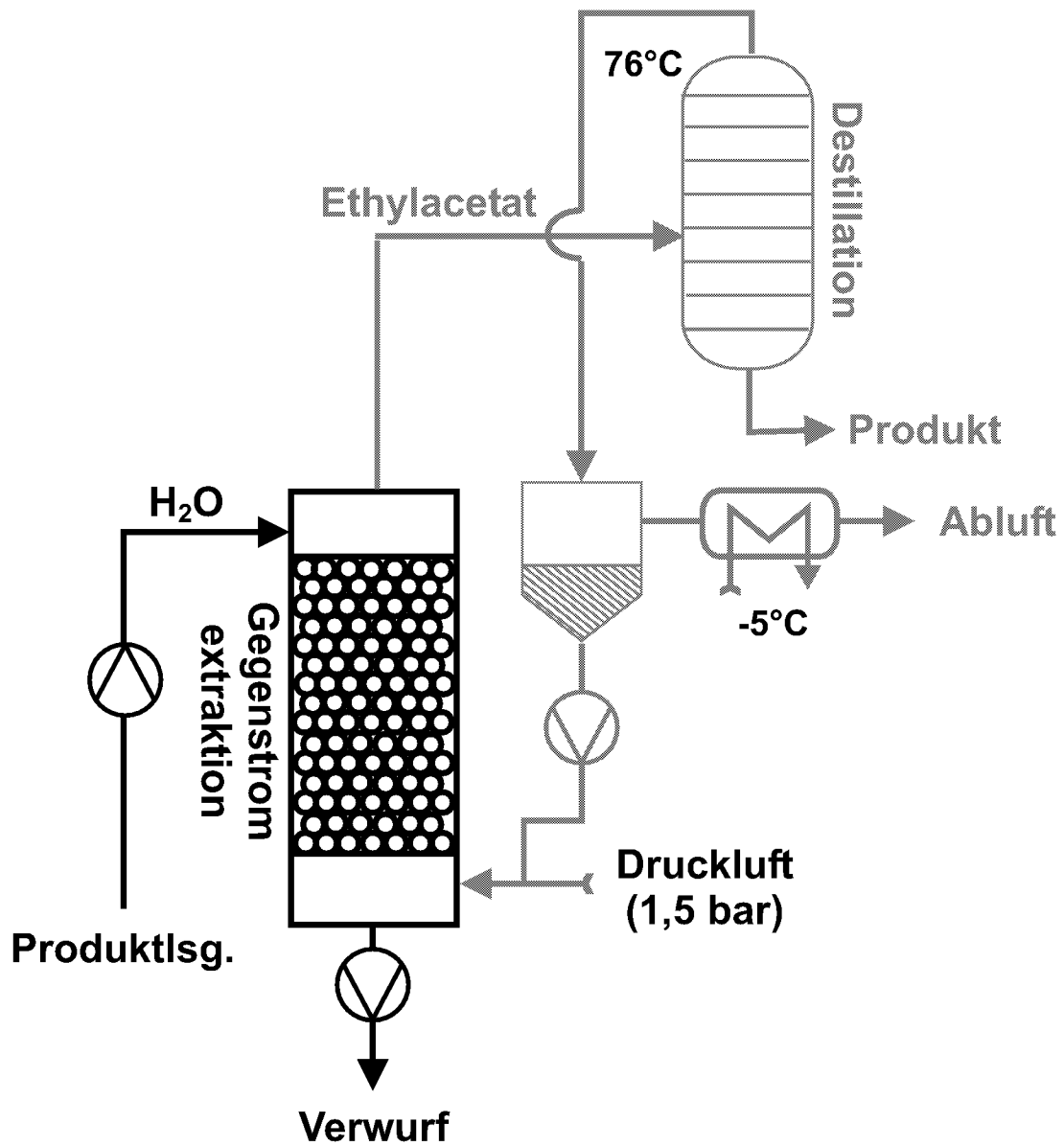
Entwickelt wurde die in Abbildung 5.8 auf Seite 109 dargestellte Extraktionsanlage. Herzstück dieser Anlage ist eine gepackte Säule zur Gegenstromextraktion. Zwei verschiedene Säulen kamen hier zum Einsatz. Die Parameter beider Säulen sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst.

Parameter	Säule 1	Säule 2
Länge	48 cm	130 cm
Volumen	660 mL	1600 mL
Innendurchmesser	45 mm	45 mm
Kühlmantel	-	+
Temperatur	RT	50°C

Tabelle 5.3: Kolonnenparameter

Am Kopf der Säule wird die wäßrige Produktlösung eingeleitet. Aufgrund der höheren Dichte sinkt das Wasser nach unten und wird am Boden der Säule als Raffinat abgeführt. Frisches Ethylacetat wird kurz oberhalb des Säulenbodens und oberhalb der Phasengrenze eingeleitet und produktreich am Säulenkopf in die kontinuierliche Destillation abgeführt. Zur besseren Durchmischung innerhalb der Packung wird die gesamte Säule mit Druckluft ($12 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$) begast. Zur Erhöhung der Extraktionsleistung ist die Extraktionssäule mit einem Doppelmantel versehen, welcher mittels eines Thermostaten auf 50°C erwärmt wird, um eine Mindesttemperatur von 40°C im Säulenquerschnitt zu garantieren. Am Vorlagekolben der kontinuierlichen Destillation wird die Druckluft abgeführt und aus Sicherheitsgründen durch einen Rückflußkühler geleitet. Das mitgeschleppte Ethylacetat wird hier entfernt. Auf diesem Wege können außerhalb der Apparatur keine explosionsfähigen Gemische entstehen.

Bei der Konzeption der Extraktionssäule gab es noch ein regelungstechnisches Problem zu lösen. Die Phasengrenze muß, um eine konstant hohe Extraktion zu gewährleisten, unterhalb der Eintrittsstelle des Ethylacetats liegen. Nur wenn



die gesamte Säule mit Ethylacetat gefüllt ist, verläuft die Extraktion effizient. Es mußte ein Regelungsmechanismus etabliert werden, der dieses gewährleistet. Da wäßriger und organischer Zustrom nach Möglichkeit konstant sein sollten, blieb als einzige ansteuerbare Pumpe diejenige, welche die wäßrige Phase nach der Extraktion dem Abwasser zuführt.

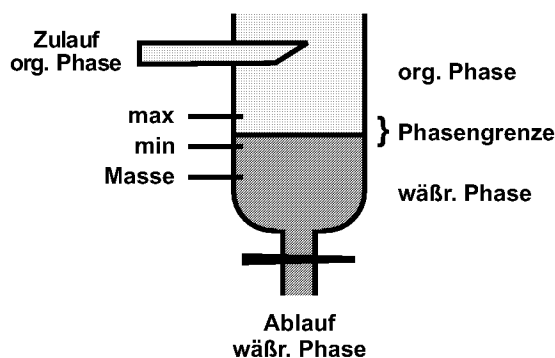


Abbildung 5.9: Fixierung der Phasengrenze am Säulenboden

Durch Einlassen von drei Wolframdrähten in die Säule (siehe Abbildung 5.9) konnte durch einfache Leitfähigkeitsmessung die Phasengrenze unterhalb des Zustromes von Ethylacetat gehalten werden. Bei Erreichen des oberen Drahtes (max) wird der Kontakt aufgrund der höheren Leitfähigkeit geschlossen und die Pumpe im wäßrigen Ablauf angeschaltet. Die Phasengrenze sinkt. Bei Unterschreitung des mittleren Drahtes (min) wird der Stromkreis geöffnet, und die Pumpe stoppt. Da die beiden Drähte min und max in etwa 1 cm Höhenunterschied angeordnet sind, wird die Phasengrenze in einem sehr engen Bereich fixiert.

Das mit Produkt beladene und mit Wasser gesättigte Ethylacetat wird, wie oben bereits erwähnt, in eine kontinuierliche Destillation geleitet. Das Ethylacetat destilliert in ein Zwischengefäß über, und das Produkt verbleibt im Sumpf. Da Ethylacetat und Wasser ein Azeotrop bilden, wird auch das Wasser aus dem Sumpf entfernt. Insgesamt befinden sich etwa 4 L Ethylacetat im Kreislauf.

Das Gesamtverfahren der Produktaufarbeitung stellt sich wie in Abbildung 5.10 schematisch skizziert dar.

Nach einer Online-Extraktion findet sich das Produkt im Sumpf der Destillation wieder. Täglich wird chargenweise der Sumpf mit Produkt entnommen und das Ethylacetat abdestilliert. Nach Überschichten mit *Iso*-octan kristallisiert (2*R*,5*R*)-Hexandiol aus.

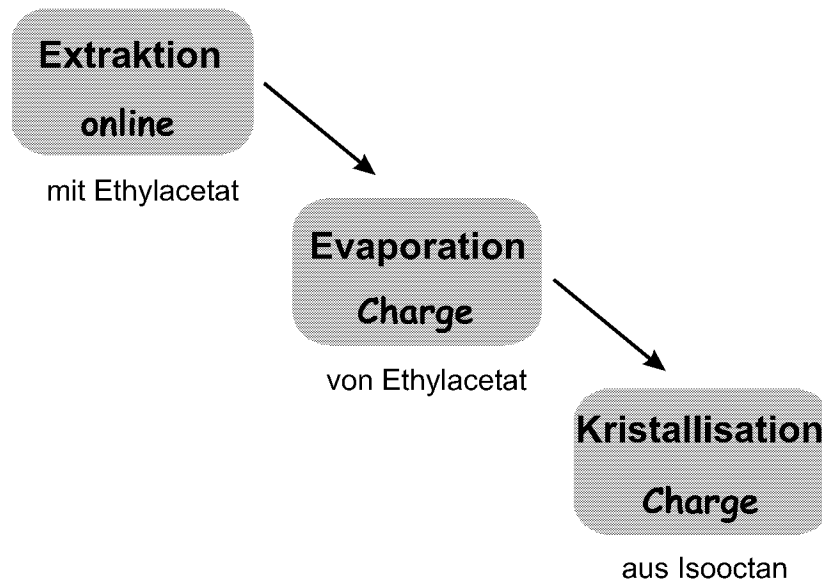


Abbildung 5.10: Schematische Darstellung der Produktaufarbeitung/-isolierung

5.3.3.2 Packungen

Die Extraktionssäule wurde mit verschiedenen Packungsmaterialien gefüllt. Diese in Abbildung 5.11 auf Seite 112 gezeigten Materialien wurden auf ihre Einsatzfähigkeit untersucht. Für diese Experimente wurde die kleinere der beiden Säulen (Säule 1) eingesetzt. In Tabelle 5.4 sind die Parameter der verschiedenen Materialien zusammengefaßt.

Angestrebt wird ein Verfahren, welches es ermöglicht, die anfallende Menge von $0,5 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ online zu bewältigen. Daher wurden die verschiedenen Packungsmaterialien bei einem Fluß von $0,5 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ Produktlösung getestet. Für die organische Phase (Ethylacetat) wird ein Fluß von $1,7 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ eingestellt, welcher sich durch die Geometrie der angeschlossenen Destillation zur Recyklierung des Ethylacetat ergibt.

In Abbildung 5.12 auf Seite 112 ist das Ergebnis dargestellt. Raschig-Ringe eignen sich am besten, während die Glaskugeln den schlechtesten Extraktionsgrad aufweisen. Da bei allen Messungen die Phasengrenzfläche nicht bekannt bzw. bestimmbar ist, können keine theoretischen Bodenzahlen angegeben werden.

Die Sulzer Elemente, welche eigentlich als Gleichstrommischer konzipiert sind, wurden noch einmal getrennt untersucht, da sie die Möglichkeit einer rechnerischen Lösung für das Strömungsverhalten bieten würden. Bei verschiedenen Flußraten der Produktlösung wurde der Extraktionsgrad ermittelt. In Abbildung 5.13 auf Seite 114 ist der Extraktionsgrad E als Funktion des Flusses aufgetragen.

Bis etwa $0,25 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ nimmt der Extraktionsgrad zu. Um eine effektive Durchmischung durch die Elemente zu erhalten, muß eine Mindestströmung erreicht

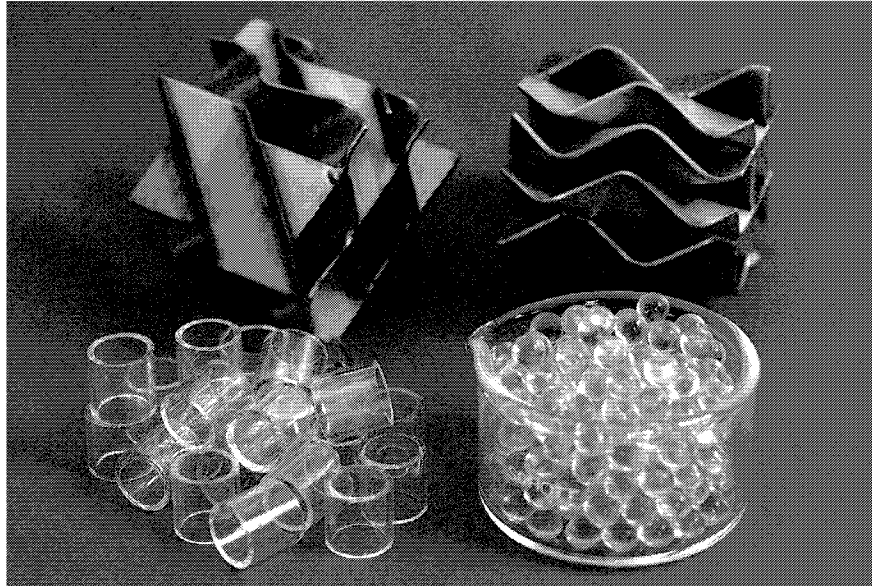


Abbildung 5.11: Kolonnenpackungen

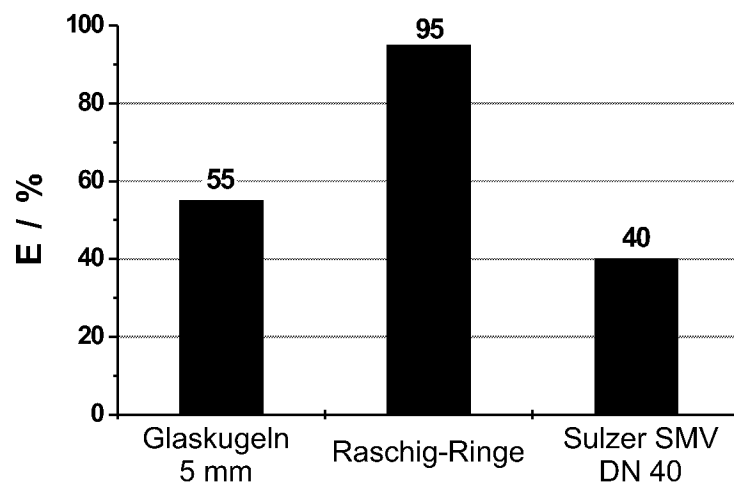


Abbildung 5.12: Extraktionsgrad für verschiedene Packungsmaterialien

Glaskugeln	
Material	Glas
Durchmesser	5 mm
Menge	2 kg
Zwischenkornvolumen	590 mL
Raschig-Ringe	
Material	Glas
Länge	10 mm
Außendurchmesser	10 mm
Innendurchmesser	5 mm
Menge	1,8 L
Zwischenkornvolumen	1170 mL
Sulzer-Elemente	
Typ	SMV, DN 40
Material	Edelstahl
Länge	48 mm
Durchmesser	43 mm
Menge	12 Stück
Zwischenkornvolumen	660 mL

Tabelle 5.4: Parameter der verschiedenen Säulenpackungen.

werden. An diesem Punkt erreichen die Mischer maximale Effektivität. Der Extraktionsgrad beträgt hier 75 %. Bei höheren Strömungsgeschwindigkeiten nimmt der Extraktionsgrad ab. Der Mischer wird überladen.

Somit fiel die Entscheidung zu Gunsten von Raschig-Ringen. Diese wurden nun in der für die kontinuierlichen Aufarbeitung konzipierten größeren Säule 2 eingesetzt.

Im Folgenden wird untersucht, wie sich verschiedene Flußraten sowohl auf der wäßrigen Seite als auch auf der organischen Seite, auf den Extraktionsgrad auswirken. Es gibt jedoch eine Einschränkung. Die kontinuierliche Destillation liefert maximal $1,7 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ redestilliertes Ethylacetat. Dies bedeutet, daß im Betrieb maximal diese Flußrate für die organische Phase eingesetzt werden kann. Alle höheren Flüsse bedürfen einer Maßstabsvergrößerung. Abbildung 5.14 gibt eine Übersicht über die erhaltenen Ergebnisse.

Mit steigendem Fluß der wäßrigen Phase sinkt der Extraktionsgrad deutlich ab. Erst ab einem Fluß von $5,7 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ der organischen Phase spielt der wäßrige Fluß keine Rolle mehr. Für die Standardeinstellung von $1,7 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ für Ethylacetat erreicht man erst im Bereich um $0,1 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ der wäßrigen Phase Werte von über 90% für den Extraktionsgrad. Auch hier spielt, wie bei dem Sulzer-Mischer, die

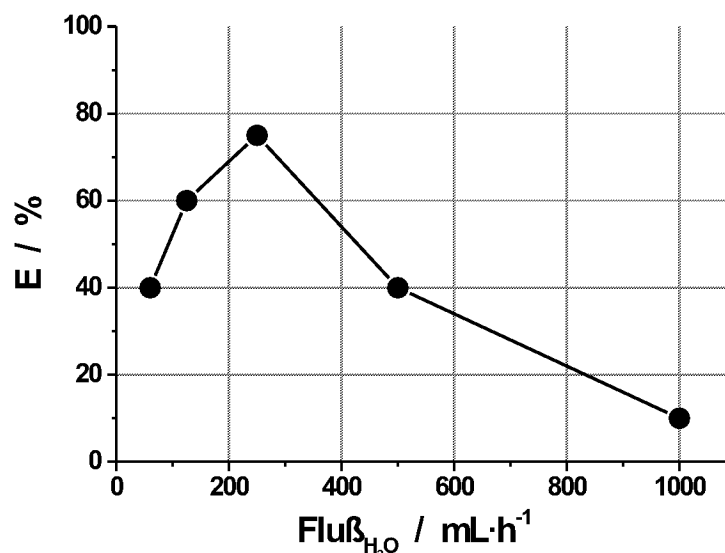


Abbildung 5.13: Charakterisierung der Sulzer SMV Mischer. Extraktionsgrad als Funktion des Flusses der wäßrigen Produktlösung, Fluß Ethylacetat $1,7 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$.

Strömung wieder eine Rolle. Das am Säulenkopf eingeführte Wasser fällt mit der Schwerkraft und der Dichtedifferenz durch die Säule nach unten. Dies ist unabhängig von der Menge. Daher erreicht man bei einem Fluß der organischen Phase von $0,67 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ schlechte Resultate. Es kommt zu einem Sättigungseffekt. Steigt der Fluß an Ethylacetat, wird das Extraktionsverhalten besser.

5.3.4 Destillation

Die kontinuierliche Redestillation des Ethylacetats zur Anreicherung des Produktes im Sumpf bedarf ebenfalls einer Charakterisierung. Eine wichtige Fragestellung hierbei ist, ob mit dem Ethylacetat auch wieder $(2R,5R)$ -Hexandiol redestilliert wird. Wie zu Beginn des Kapitels schon erwähnt, wird durch das Abdestillieren des Wassers bei der bisherigen Methode ein sehr großer Verlust an Produkt verursacht. Dieser soll bei einem effektiven, kontinuierlichen Verhalten gleich Null sein.

Zur Charakterisierung der Destillation wird eine Gillespie-Apparatur eingesetzt. Diese dient der Bestimmung des Siedegleichgewichtes. Das Prinzip ist das folgende: Der aus der siedenden Flüssigkeit aufsteigende Dampf wird total kondensiert und wieder in die siedende Flüssigkeit zurückgeführt. Nach genügend langer Zeit stellt sich ein stationärer Zustand ein, bei dem sich die Zusammensetzungen in Sumpf und Dampf bzw. Kondensat nicht mehr ändern.

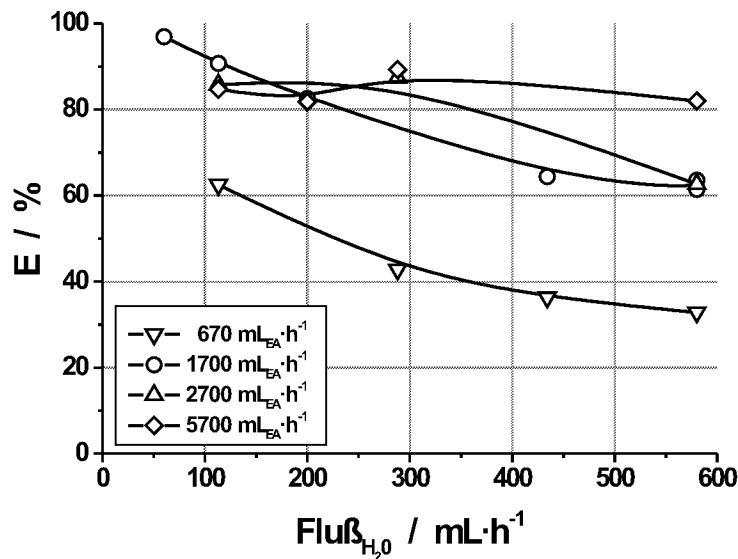


Abbildung 5.14: Charakterisierung der Raschig-Ringe in der für die Produktion vorgesehenen Säule 2.

Die hier eingesetzte Gillespie-Apparatur funktioniert wie folgt: Im unteren Teil der etwa 250 mL fassenden Siedeblase werden durch direkte Beheizung Dampfblasen erzeugt, die beim Aufsteigen die Flüssigkeit durchwirbeln und umrühren. Die Siedeblase wird bis kurz vor den Ansatz des nach oben führenden Cottrell-Rohres gefüllt, so daß die emporsteigenden Dampfblasen Flüssigkeit vor sich herschieben, wenn sie das Cottrell-Rohr passieren. Hierbei wird ein direkter Kontakt von Dampf und Flüssigkeit erzwungen. Das Dampf-Flüssigkeitsgemisch ergießt sich dann über die Temperaturmeßstelle und trennt sich in nach oben entweichenden Dampf und nach unten abfließende Flüssigkeit. Der Spritzschutz und die Querschnittserweiterung im Cottrell-Rohr sollen das Mitreißen von Flüssigkeitströpfchen verhindern. Die Cottrell-Pumpe und der Dampfraum sind in einen Vakuummantel eingebaut, dessen äußere Wände von einem Umlaufthermostaten (Heizmantel) auf Siedetemperatur gehalten werden. Diese Maßnahme soll eine partielle Kondensation des Dampfes vermeiden. Der Dampf strömt in den Kühlmantel hinüber und wird dort totalkondensiert. Das Kondensat mit der Dampfzusammensetzung Y läuft nach Passieren des Tropfenzählers und des Sammelgefäßes zurück in die Siedeblase. Das Kondensat wird schon vor Eintritt in die Siedeblase mit der aus der Cottrell-Pumpe über ein Probenahmegefäß ablaufenden Flüssigkeit vermischt. Es werden also zwei Umläufe überlagert: der Kreislauf des Dampfes und der Kreislauf der Flüssigkeit. Aus den beiden Probenahmegefäßen werden nach Abschalten der Heizung die Proben zur analytischen

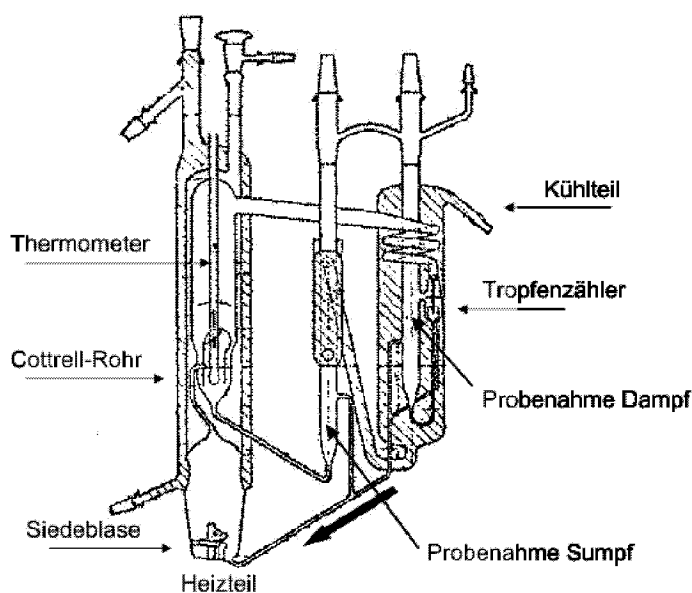
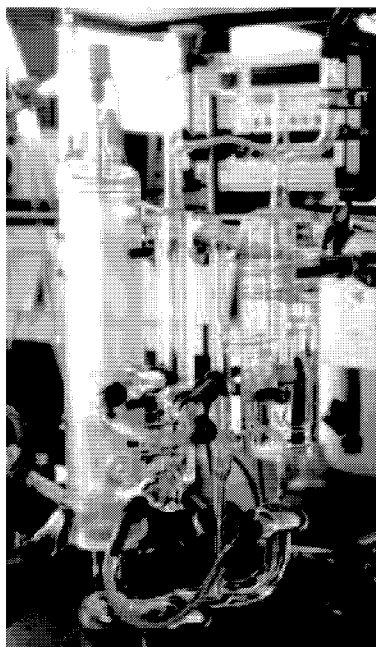


Abbildung 5.15: Gillespie-Apparatur. Links: Foto der Gillespie-Apparatur. Rechts: Schematische Darstellung

Bestimmung entnommen.

Es werden zwei Versuchsreihen durchgeführt. Bei der ersten wird ein Gemisch von $(2R,5R)$ -Hexandiol und Wasser eingesetzt; bei der zweiten ein Gemisch von $(2R,5R)$ -Hexandiol und Ethylacetat, begonnen wird jeweils mit einer sehr verdünnten Lösung. Nach jeder Gleichgewichtseinstellung wird der Anteil von $(2R,5R)$ -Hexandiol im Sumpf erhöht. Die Ergebnisse dieser beiden Versuchsreihen zeigt Abbildung 5.16.

Aus dem Diagramm ist zu entnehmen, daß bei steigender Sumpfkonzentration die Konzentration im Dampf, also dessen was entfernt wird, linear steigt. Bei Wasser als Lösungsmittel ist der Effekt wesentlich deutlicher als bei Ethylacetat. Vergleicht man die Steigungen der beiden Geraden, dann ist der Effekt bei Wasser etwa 17 mal größer als bei Ethylacetat.

Dies erklärt nun auch, warum bei der Einengung von Fermentationsüberständen am Rotationsverdampfer solch ein großer Verlust zustande kommt. Da der Sumpf immer mehr eingengt wird, nimmt im gleichen Maße der Anteil des mit dem Wasser entfernten Produktes zu.

5.3.5 Evaporation und Kristallisation

Nach Leerung des Destillationssumpfes, welcher das Produkt enthält, wird das hier noch enthaltene Ethylacetat evaporiert. Zurück bleibt eine ölige Flüssigkeit.

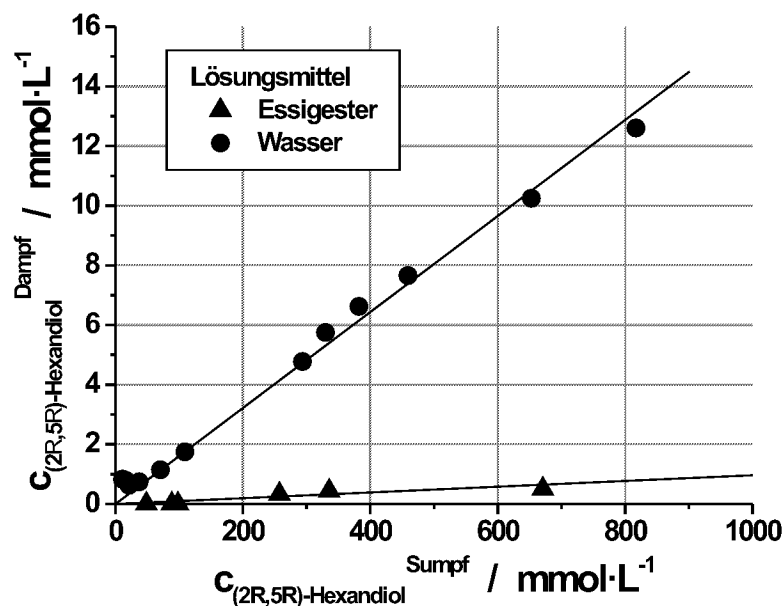


Abbildung 5.16: Charakterisierung der Destillation mit der Gillespie-Apparatur

Nach Überschichten mit *iso*-Octan kristallisiert (2*R*,5*R*)-Hexandiol aus. Durch Filtration und waschen mit kaltem *iso*-Octan lassen sich weiße Nadeln erhalten. Die Reinheit liegt hierbei in der Regel bei 99%. Bei geringerer Reinheit kann diese durch Umkristallisation erhöht werden. Die Mutterlaugen der verschiedenen Experimente werden gesammelt und nach erneutem Einengen wieder der Kristallisation zugeführt

5.3.6 Kopplung

Durch Zwischenschalten eines Puffergefäßes kann die Flüssig-Flüssig-Extraktion direkt an die kontinuierliche Biotransformation gekoppelt werden.

Das Gesamtverfahren ist in Abbildung 5.17 gezeigt.

5.4 Zwischenbilanz

Im vorhergehenden Kapitel Aufarbeitung konnten die in der folgenden Aufstellung gezeigten Ergebnisse erarbeitet werden:

- Sprühtrocknung

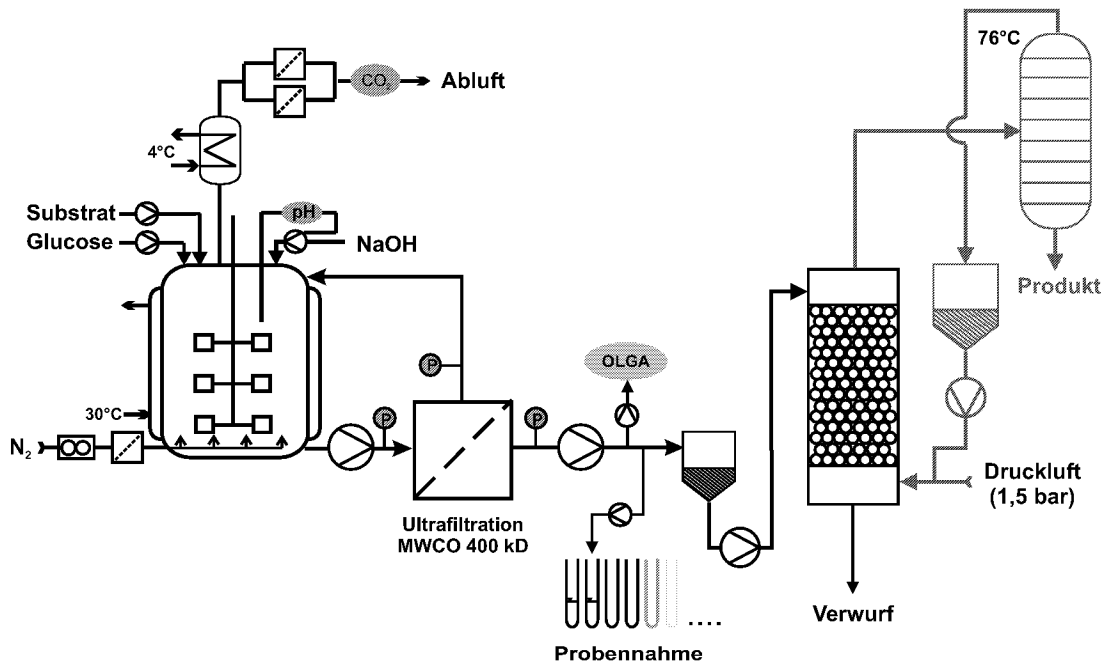


Abbildung 5.17: Fließbild des entwickelten Verfahrens

- Es wurde festgestellt, daß Sprühtrocknung kein geeignetes Verfahren zur Aufarbeitung darstellt.
- Fest-Flüssig-Extraktion
 - Es konnte eine geeignete Phase zur Fest-Flüssig-Extraktion gefunden werden. Die Kapazitäten sind mit etwa $10 \mu\text{mol} \cdot \text{g}_{XAD}^{-1}$ allerdings zu gering für eine Anwendung im technischen Maßstab. Das Verfahren würde zu teuer.
 - Es konnte mit Ethanol ein geeigneter Eluent für (2*R*,5*R*)-Hexandiol gefunden werden.
 - Es konnte mit zwei präparativen Säulen gezeigt werden, daß das Verfahren mit 90%-iger Wiederfindung prinzipiell einsetzbar ist.
- Flüssig-Flüssig-Extraktion
 - Es wurde ein Versuchsaufbau zur kontinuierlichen Flüssig-Flüssig-Extraktion entwickelt, etabliert und charakterisiert.
 - Ethylacetat wurde als Extraktionsmittel der Wahl identifiziert.
 - Der Extraktionsgrad wurde durch Temperaturerhöhung auf 50 °C während der Extraktion um Faktor 2,5 gesteigert.

- Es wurden verschiedene Packungen für die Extraktionssäule untersucht. Raschig-Ringe erwiesen sich als die beste Lösung.
- Im kontinuierlichen Experiment konnte ein Extraktionsgrad von 90% erreicht werden.
- Das Flüssig-Flüssig-Verfahren konnte erfolgreich an eine kontinuierliche Biotransformation gekoppelt werden. Es handelt sich hierbei um ein praktikables und realisiertes Konzept zur Online-Aufarbeitung.
- Der Schritt der kontinuierlichen Destillation zur Recyclierung des Ethylacetats wurde untersucht und charakterisiert.

6 Diskussion und Ausblick

Das folgende Kapitel soll eine Gesamtbetrachtung der erzielten Ergebnisse vornehmen und mögliche Ausblicke für zukünftige Arbeiten aufzeigen. Betrachtet wird zunächst die Reaktionsseite gefolgt von den Aspekten der Aufarbeitung. Zum Schluß soll noch ein kurzer Kostenvergleich mit dem bisherigen industriellen Produktionsverfahren erfolgen, um zu zeigen, daß das neu etablierte Verfahren auch kostengünstiger als dieses ist.

6.1 Reaktion

6.1.1 Potential

Im Vergleich mit chemischen und biochemischen Methoden hat sich die Ganzzellbiotransformation mit *L. kefir* als hervorragendes Werkzeug zur Reduktion von Carbonylverbindungen erwiesen. Keine der chemischen Methoden erreicht sowohl die chemischen, als auch die optischen Ausbeuten im Falle von (2*R*,5*R*)-Hexandiol. Als einzige richtige Konkurrenz sind die biotechnologischen Methoden zu sehen. Hierbei natürlich, wie schon in der Einleitung erwähnt, muß das Verfahren von *Ohta et. al* [48] besonders erwähnt werden, da im Prinzip die gleiche Technologie mit einem anderen Stamm zu Grunde liegt. Eine konkrete Bewertung im Vergleich zu dem derzeitigen industriellen Verfahren folgt weiter unten.

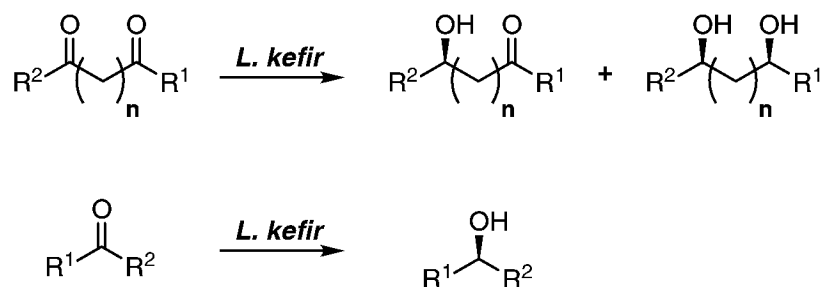


Abbildung 6.1: Durch Reduktion darstellbare Produkte

Ein großer Vorteil der Biotransformation mit *Lactobacillus kefir* ist die vielfältige Einsetzbarkeit auf Grund des weiten Substratspektrums der ADH.

Wie in Abbildung 6.1 gezeigt, kann man sich schon nur auf Basis der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse ein relativ großes Spektrum an Produkten vorstellen. Hierzu gehören neben Verbindungen mit nur einer Carbonylfunktion, die verschiedenste Reste besitzen können, auch solche mit zwei Carbonylverbindungen. Bei diesen kann selbstverständlich der Fokus, wie in dieser Arbeit, auf der Synthese von Diolen liegen. Durch Einführung von sekundären Resten können so auch Verbindungen mit mehr als zwei Stereozentren hergestellt werden. Auch die Synthese der intermediären Hydroxyketone könnte eine Technologie mit Zukunft werden. Bis heute ist in der Literatur noch kein technischer Zugang zu diesen Verbindungen beschrieben. Auf Grund ihrer Struktur mit einer bereits eingeführten Chiralität und einer prochiralen Ketofunktion haben diese Verbindungen ein großes Potential als Synthesebaustein. Da man hier auch zu unsymmetrisch funktionalisierten Produkten gelangen kann (Abbildung 6.2).

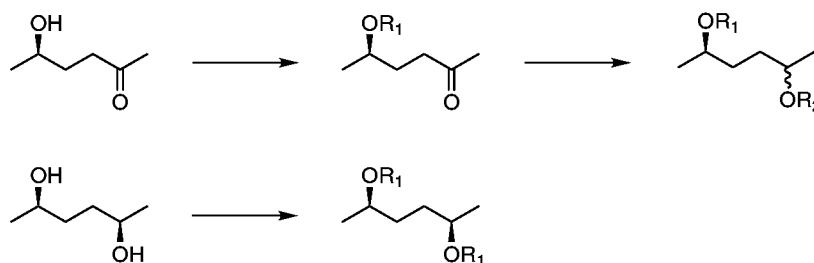


Abbildung 6.2: Symmetrische und asymmetrische Folgeprodukte

6.1.2 Biokatalysator

Der Kenntnisstand über *L. kefir* ist generell eine der Schwierigkeiten dieser Arbeit, viele Erkenntnisse bewegen sich am Rande der Spekulation. So daß hier noch Aufklärungsbedarf auf Seiten der Mikrobiologie vorhanden ist. Gerade solche Parameter wie z.B. intrazelluläre Poolgrößen müssen aufgeklärt werden, um die Vorgänge während der Biotransformation besser zu verstehen und um Anhaltspunkte für eine zukünftige Optimierung des Stammes zu haben.

Der Einsatz von “Designer-Bugs“ hat sich bereits bei vielen Produktionsprozessen bewährt. In diesem Fall wäre ein Ansatz für eine Optimierung die Deletion der Lactat-Dehydrogenase. Durch die Entfernung wären möglicherweise mehr Redoxäquivalente verfügbar. Allerdings ist noch nicht geklärt, ob die Lactat-Dehydrogenase NADH oder NADPH abhängig ist. Entscheidend für die angestrebte Reduktion der Diketone ist der Pool an NADPH.

Ein Vorteil des Einsatzes der ganzen Zellen als Biokatalysator ist die Umgehung von “künstlichen“ Systemen zur Kofaktorregenerierung, welche durch einfachen Zusatz von sehr billiger Glucose von der Zelle durchgeführt wird. Dies ist

ein großer Vorteil, da gerade die Stabilität von NADPH in *in vitro* Systemen eine kritische Größe darstellt.

6.1.3 Systemparameter

Wirft man einen Blick speziell auf die im Kapitel “Systemuntersuchungen“ erzielten Ergebnisse, dann werden die großen Probleme deutlich, die noch auszuräumen sind.

Ein besonders kritisches Problem ist die immer noch vorhandene Unkenntnis über *Lactobacillus kefir*. Es konnte zwar eine Stöchiometrie bestimmt werden, welche Stoffwechselwege darin aber enthalten sind, kann nicht gesagt werden. Ob die angenommene alkoholische Gärung existent ist kann durch kein Literaturbeispiel von anderen *Lactobacillus* Spezies belegt werden. Prinzipiell bleibt an dieser Stelle auch die Frage offen, ob die Erkenntnisse über den Stoffwechsel einer wachsenden Zelle direkt auf den Stoffwechsel einer ruhenden Zelle übertragbar sind.

Auf Seiten der Mikrobiologie besteht auch hier noch enormer Nachholbedarf. Einerseits natürlich auf Seiten der Aufklärung der Stoffwechselwege, andererseits auf Seiten einer eventuellen Verbesserung des Stammes, sofern die Limitierungen im Stoffwechsel erkannt werden können. Bei all diesen Arbeiten darf nicht vergessen werden, daß dieser Stamm nicht mit *E. coli* oder *S. cerevisiae* vergleichbar ist. Bei diesen beiden Stämmen kennt man schon sehr große Teile des Netzwerkes und seiner Funktion. Dies ist hier nicht der Fall.

Die kinetischen Untersuchungen waren in soweit überraschend, als daß erstmals die Rückreaktion in oxidativer Richtung bei Einsatz der ganzen Zelle sichtbar wurde. Bisher wurde immer eine irreversible Reaktion angenommen. Dies ist unter Produktionsbedingungen auch der Fall, da bei einer laufenden Kofaktoregnerierung alles NADP sofort umgesetzt wird. Auch hier ist der entscheidende Parameter die Poolgröße, welche bisher noch nicht bestimmbar ist. Es ist unbedingt erforderlich, daß für zukünftige Arbeiten ein Zellaufschlußverfahren etabliert wird, welches es ermöglicht alle Kofaktoren (NAD^+ , NADH, NADP^+ , NADPH) gleichzeitig zu quantifizieren.

6.2 Kontinuierliche Produktion

6.2.1 mit *L. kefir*

Bei der kontinuierlichen Produktion von (2*R*,5*R*)-Hexandiol wurde eine Raum-Zeit-Ausbeute von $63,8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ erzielt. Hiermit konnte gegenüber dem Fed-Batch Verfahren die Produktivität um den Faktor 12 gesteigert werden. Um die Attraktivität dieses kontinuierlichen Verfahrens für den industriellen Einsatz zu erhöhen, muß die Produktivität des Verfahren und die Stabilität des Biokataly-

sators noch weiter gesteigert werden. Um die Produktivität weiter zu erhöhen, bestehen folgende Möglichkeiten:

- Einsatz von mehr Biomasse. Durch die Erhöhung der Konzentration an Biomasse kann mehr Produkt umgesetzt werden. Hierdurch steigt die Raum-Zeit-Ausbeute.
- Einsatz eines gentechnisch veränderten Organismus. Durch Optimierung der Biosynthesewege in der Zelle kann die Produktivität erhöht werden.

Um die Stabilität zu erhöhen, können die folgenden Möglichkeiten in Betracht gezogen werden:

- Identifizierung von möglichen Zellgiften und Verhinderung der Expression von diesen.
- Weitere Optimierung der Reaktionsbedingungen.
- Einsatz eines gentechnisch optimierten Organismus.

Es konnte gezeigt werden, daß die neue Anlage auch für die Produktion von weiteren chiralen Alkoholen, wie z.B. (2*R*)-Oktanol, eingesetzt werden kann.

Hierbei ist allerdings auf die Stabilität der Reaktormaterialien bei höheren Konzentrationen der Reaktanden zu achten. So ist z.B. die Verklebung der Polymermembranen in dem eingesetzten Hohlfasermodule in Gegenwart von 2-Oktanon nicht stabil. Eine Alternative könnte hier der Einsatz von keramischen Membranen darstellen (vgl. [167]).

6.2.2 mit *S. cerevisiae*

Die kontinuierlichen Ganzzellbiotransformationen zeigen, daß Bäckerhefe im Hinblick auf die Stabilität wesentlich besser geeignet ist als *L. kefir*. Da aber der Enantiomerenüberschuß des Produktes, (3*S*)-Hydroxybuttersäureethylester, im zeitlichen Verlauf deutlich abnimmt, muß festgestellt werden, daß das System Bäckerhefe unter den eingestellten Bedingungen für eine industrielle Applikation nicht einsetzbar ist. In Fed-Batch Experimenten wurde gezeigt, daß eine Restkonzentration an Substrat vermieden werden muß, um den Enantiomerenüberschuß konstant hoch zu halten. Dies würde aber bedeuten, daß bei noch geringeren Substratkonzentrationen gearbeitet werden müßte. Bei viel höheren Biomassekonzentrationen kann nicht gearbeitet werden, da hier Sauerstofflimitierung eintritt. Mit $15,4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ist die Raum-Zeit-Ausbeute schon eher niedrig, und sie würde dann weiter abnehmen.

Hier wäre zu überlegen, ob sich das Arbeiten unter anaeroben Bedingungen lohnen könnte. Es müßten dann wahrscheinlich auch größere Mengen an Glucose eingesetzt werden. Die Frage ist, ob dies nicht zu viel zu großen Mengen an Metaboliten führt, die dann wiederum die Aufarbeitung stören könnten. Als Kostenpunkt ist Glucose in jedem Fall vernachlässigbar.

6.2.3 Produktivität

Die Arbeit zeigt auch, daß die technische Entwicklung von der einfachen Batch Reaktion, über das FedBatch-Verfahren, hin zur kontinuierlichen Synthese, eine Evolution erfahren hat. In Abbildung 6.3 sind sowohl die Produktivität (links) als auch die Wertschöpfung¹ (rechts) über die drei Entwicklungsstufen aufgetragen.

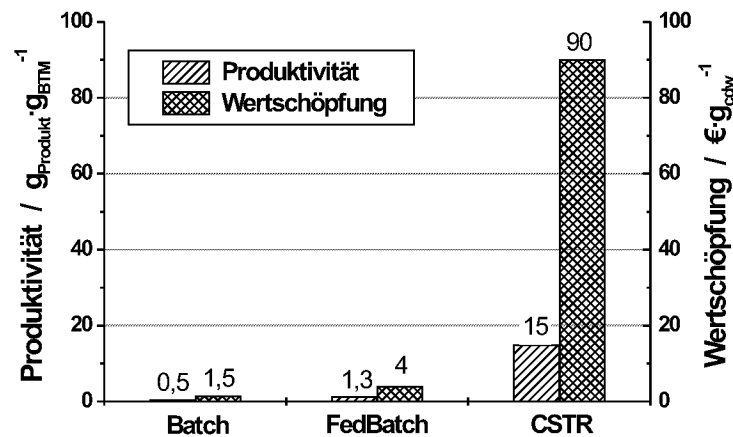


Abbildung 6.3: Produktivität und Wertschöpfung für die verschiedenen Reaktortypen.

Beide Werte konnten vom Batch zum CSTR deutlich gesteigert werden. Die Produktivität um Faktor 30 und die Wertschöpfung um Faktor 60. Da im CSTR nur eine Ausbeute von 78% erreicht wird, und auch der eingesetzte Konzentrationsbereich durch Verwendung von mehr Biomasse noch steigerungsfähig ist, ist die Skala nach oben hin noch offen. Ob dieses Verhalten für andere Diöle auch zutrifft, bleibt offen, und muß in zukünftigen Experimenten noch geprüft werden.

6.3 Aufarbeitung

Das bisherige Aufbereitungsverfahren der Batch und Fed-Batch Prozesse zeigte immer große Verluste. Gerade das Einengen der wäßrigen Lösung am Rotationsverdampfer, und die unvollständige Extraktion des Konzentrates im Scheidetrichter brachten diese Verluste.

Hier wurden alternative Methoden untersucht, welche gegebenenfalls auch kontinuierlich betrieben werden können.

¹Wertschöpfung bezieht sich hier auf die Differenz zwischen den Kosten für das eingesetzte Substrat und den Wert des erhaltenen Produktes.

Sprühtrocknung als sehr einfaches und industriell häufig genutztes Verfahren erwies sich als ungeeignet. Der Vorteil dieses Verfahren liegt auf der Hand. Die aus der kontinuierlichen Synthese kommende wäßrige Lösung wäre direkt ohne weitere Vorbehandlung in den Sprühtrockner geführt worden. Dort hätte man im idealen Fall sofort ein kristallines Produkt erhalten.

Fest-Flüssig-Extraktion ist ein im Bereich der Proteinaufarbeitung häufig eingesetztes Verfahren. Hier kann man es aber nicht einsetzen. Erstens sind die Kapazitäten der Festenphasen mit $10 \mu\text{mol} \cdot \text{g}_{\text{XAD}}^{-1}$ viel zu gering. Außerdem konnte kein geeigneter Eluent gefunden werden, aus dem eine Kristallisation stattgefunden hätte. Somit wäre noch ein weiterer Extraktionsschritt nötig.

Flüssig-Flüssig-Extraktion hat sich als das System der Wahl zur Produktaufarbeitung erwiesen. Nachdem die Konstruktionsprobleme beim Aufbau der Extraktionssäule überwunden waren, steht nun ein brauchbares Verfahren zur Verfügung.

Der erreichte Extraktionsgrad von 90% für (2*R*,5*R*)-Hexandiol bei einem Fluß der wäßrigen Phase von $0,1 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ kann noch weiter gesteigert werden. Dieses ist durch eine Maßstabsvergrößerung der eingesetzten Extraktionssäule möglich. Ein Problem für die Modellierung stellt die Tatsache dar, daß die Phasengrenzfläche nicht bekannt ist.

Ethylacetat als Extraktionsmittel hat den Vorteil, daß es im Gegensatz zu anderen Lösungsmitteln relativ ungefährlich ist und daß es kostengünstig ist. Ein Nachteil ist, daß Ethylacetat in Wasser nicht unlöslich ist. Daher wird mit der wäßrigen Phase nach der Extraktion auch Ethylacetat ausgetragen. Man verliert etwa 0,1 L Ethylacetat in 24 h.

Das Gesamtverfahren der Flüssig-Flüssig-Extraktion hat noch einen weiteren Nebeneffekt. Da sowohl Diol **3** als auch Hydroxyketon **2** extrahiert werden, finden sich beide Substanzen im Sumpf der Destillation. Durch das Abtrennen des Ethylacetats werden auch beide aufkonzentriert. Erreicht man eine Selektivität von größer 60%, dann kristallisiert das Diol nach Übersichten mit Isooctan. Zurück bleibt eine Mutterlauge, welche in großen Mengen das Hydroxyketon enthält. Diesen Effekt kann man sich zunutze machen, um, wie Abbildung 6.4 zeigt, das Hydroxyketon ebenfalls aufzureinigen.

So können alle anfallenden Reduktionsprodukte isoliert und aufgereinigt werden. Das Dion **1** wird quantitativ verwertet. Wie oben bereits beschrieben hat auch das intermediäre Hydroxyketon ein großes Potential.

6.4 Kostenvergleich des Verfahrens

In Abbildung 6.5 auf Seite 129 sind das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren (oben) und das von Chiretech genutzte Verfahren dargestellt. In die Abschätzung der Kosten gehen nur die Materialkosten ein. Als Grundlage dienen die in Kapitel 4 gezeigten Ergebnisse und die von *Taylor et al.* veröffentlichte Vorgehensweise

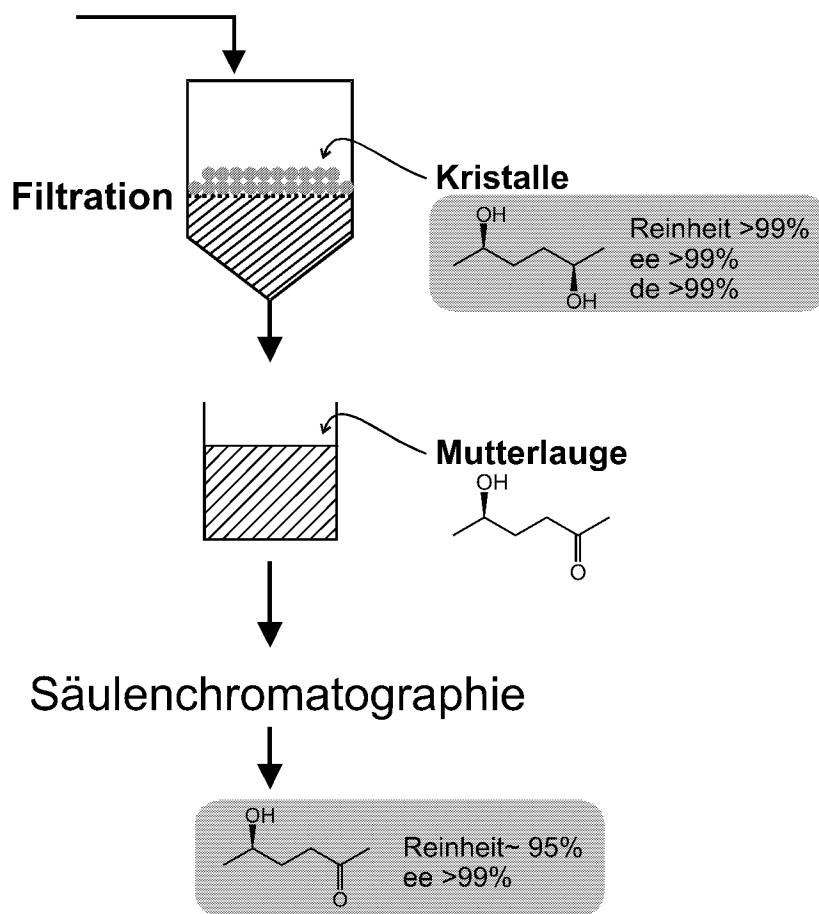


Abbildung 6.4: 100%-ige Nutzung des Substrates durch Isolierung aller Produkte

[53] von Chirotech.

Für das Verfahren mit *L. kefir* kann kommerziell erhältliches (2,5)-Hexandion (Wacker, 97% Reinheit, 55 Euro·kg⁻¹) als Substrat genutzt werden, während Chirotech das racemische/*meso*-(2,5)-Hexandiol selber herstellt, um einen kostengünstigen Zugang zu haben. Hierbei wird das Diol aus 3-Hexion-2,5-diol (Fluka, 80 Euro·kg⁻¹) durch Hydrierung mit Raney-Nickel hergestellt. Vor der Verwendung ist im Anschluß eine destillative Aufreinigung nötig.

Das Verfahren von Chirotech bedarf noch drei chemischer Folgeschritte, um die Ausbeute an (2*R*,5*R*)-Hexandiol zu erhöhen. Auch diese Kosten werden im folgenden berücksichtigt. Da für beide Verfahren die Aufarbeitung gleich oder sehr ähnlich ist, werden die dafür anfallenden Kosten nicht berücksichtigt.

In Tabelle 6.1 sind die Kosten für beide Verfahren aufgeführt. Hier wird deutlich, daß die abgeschätzten Materialkosten des neu etablierten Verfahrens bei etwa einem Drittel der des Chirotech-Verfahrens liegen. Abgesehen von Materialkosten ist das neue Verfahren durch Vermeidung dreier chemischer Schritte

nachhaltiger, da auf Lösungsmittel und andere umweltgefährliche Substanzen bei der Herstellung verzichtet werden kann.

Berücksichtigen muß man noch, daß bei beiden Verfahren das Substrat 100%ig genutzt werden kann. Im Falle des Chirotech-Verfahrens fällt ungefähr ein Viertel (2*S*,5*S*)-Hexandiol an, welches allerdings auch von kommerziellem Interesse ist. Das Verfahren mit *L. kefir* produziert etwa ein Viertel (5*R*)-Hydroxyhexan-2-on, welches ebenfalls kommerzialisiert werden kann.

Verfahren mit *L. kefir*

Chemikalie	kg-Preis Euro	kg/kg-Produkt kg	Euro/kg-Produkt Euro
(2,5)-Hexandion	55	1,3	71
Kaliumphosphatpuffer	30	1	30
Glucose·H ₂ O	1	2,6	3
NaOH	15	2	30
<i>L. kefir</i> _{BTM}	2869	0,07	200
		Summe :	334

Verfahren von Chirotech

Chemikalie	kg-Preis Euro	kg/kg-Produkt kg	Euro/kg-Produkt Euro
(2,5)-Hexandiol	80	1,7	136
Propionsäurevinylester	240	1,8	432
Triethylamin	14	1,8	25
Methansulfonylchlorid	27	1,2	32
Methylenchlorid	5	2	10
Kaliumacetat	15	2	30
DMF	12	2	24
KOH	13	1	13
Methanol	9	2	18
2-Butanon	15	2	30
Chirazym L2	1750	0,175 U	310
		Summe :	1060

Tabelle 6.1: Kostenvergleich der beiden Verfahren. Preise laut Fluka-Katalog 2002.

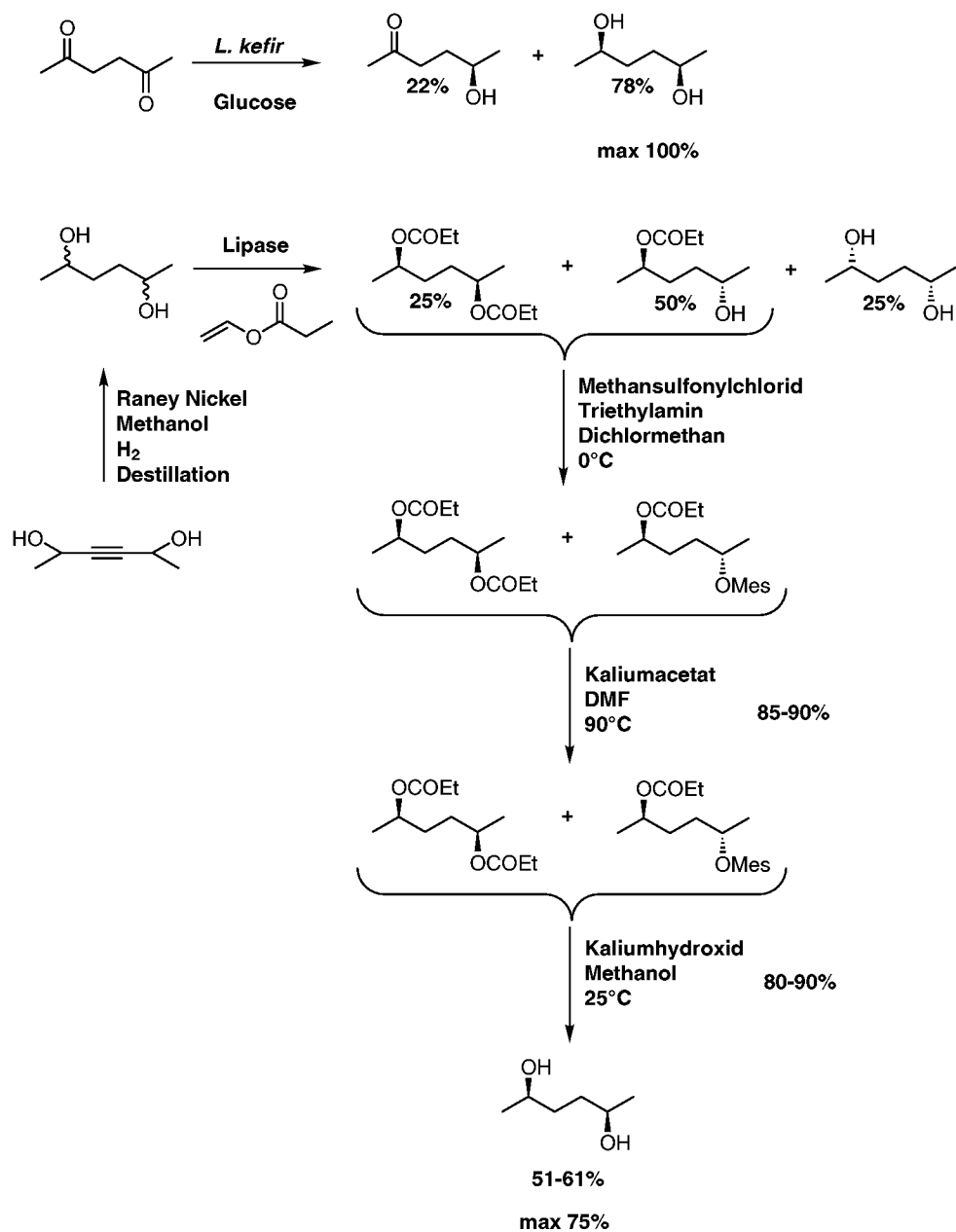


Abbildung 6.5: Vergleich der Verfahren

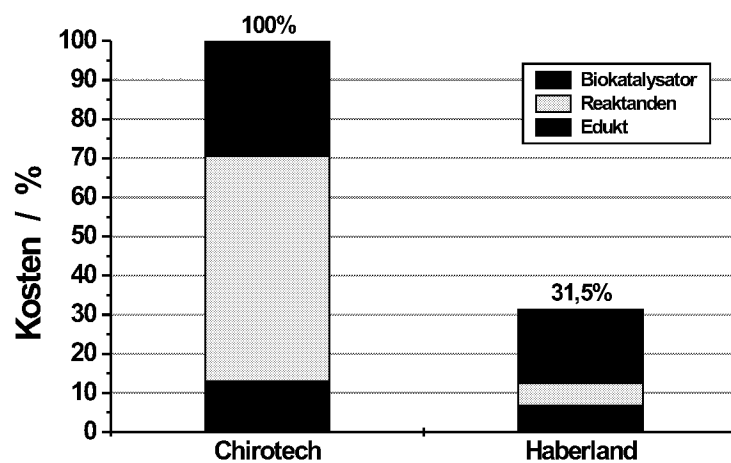


Abbildung 6.6: Prozentualer Kostenvergleich

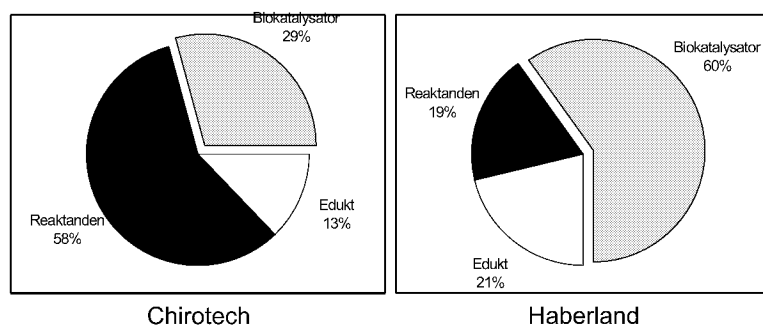


Abbildung 6.7: sProzentualer Kostenvergleich

7 Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit ist die Entwicklung eines Produktionsverfahrens zur reduktiven Herstellung enantiomerenreiner Diole mit *Lactobacillus kefir*. Als technisch relevante Modellreaktion wurde die Reduktion von (2,5)-Hexandion zu (2*R*,5*R*)-Hexandiol, welches das primäre Zielprodukt darstellt, herangezogen. Das Verfahren soll eine Alternative zu dem in der Einleitung beschriebenen derzeitigen Produktionsprozeß darstellen.

Die folgenden Ergebnisse wurden erreicht:

- Systemuntersuchungen
 - Die Bereitstellung von Biokatalysator konnte durch eigene Fermentation sichergestellt werden. Es wurden 5 kg Biofeuchtmasse selber fermentiert, weitere in Auftragsfermentation durch JFC.
 - Die kinetischen Daten der Ganzzellbiotransformation konnten größtenteils quantifiziert werden.
 - Es konnte hierbei erstmalig gezeigt werden, daß auch die Reaktion in oxidativer Richtung möglich ist.
 - Alle im Überstand auftretenden Metabolite konnten identifiziert und quantifiziert werden. Alle Bilanzen konnten geschlossen werden.
 - Die Stöchiometrie der Reaktion wurde ermittelt.
- Produktion
 - In FedBatch-Experimenten konnte die Selektivität auf 93% gesteigert werden und die Produktivität auf $0,9 \text{ g}_{\text{Produkt}} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$.
 - Durch Einführung der *fsbc* konnte ein rationaler Ansatz zwischen Reaktionsbedingungen und Selektivität hergestellt werden.
 - Es konnte ein kontinuierlich betriebener Rührkessel mit Zellrückhaltung etabliert und charakterisiert werden.
 - Eine maximale Raum-Zeit-Ausbeute von $63,8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ wurde erreicht. Hierbei lag der Umsatz bei 98% und die erreichte Selektivität bei 78%.

7 Zusammenfassung

- Das etablierte Reaktorkonzept konnte auf die Reduktion von 2-Oktanon übertragen werden. Bei dieser Reduktion wurde ein $ee > 98\%$ und eine Raum-Zeit-Ausbeute von $42,4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ erreicht.
 - Das etablierte Reaktorkonzept konnte auf die aerobe Reduktion von 3-Oxobuttersäureethylester zu (3*S*)-Hydroxybuttersäureethylester mit Bäckerhefe übertragen werden.
 - Eine maximale Raum-Zeit-Ausbeute von $15,4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ wurde für dieses System erreicht.
 - Im Laufe der gesamten Arbeiten zur Produktion wurden insgesamt etwa 2 m^3 Produktlösung hergestellt.
- Aufarbeitung
 - Verschiedene Methoden der Produktaufarbeitung wurden auf ihre Einsatzfähigkeit untersucht.
 - Flüssig-Flüssig-Extraktion wurde als die Methode der Wahl identifiziert.
 - Es wurde eine kontinuierliche Gegenstromextraktion etabliert und charakterisiert.
 - Mit Ethylacetat als Extraktionsmittel konnte ein maximaler Extraktionsgrad von 90% erreicht werden.
 - Im Laufe der Arbeiten konnten 2 kg (2*R*,5*R*)-Hexandiol mit einer Reinheit $> 99\%$ isoliert werden. ee und de waren ebenfalls $> 99\%$.
 - Es wurden 50 g des intermediären (5*R*)-Hydroxyhexan-2-on aufgereinigt und isoliert.

Das resultierende Verfahren stellt sich wie in der folgenden Abbildung gezeigt dar und konnte voll kontinuierlich betrieben werden.

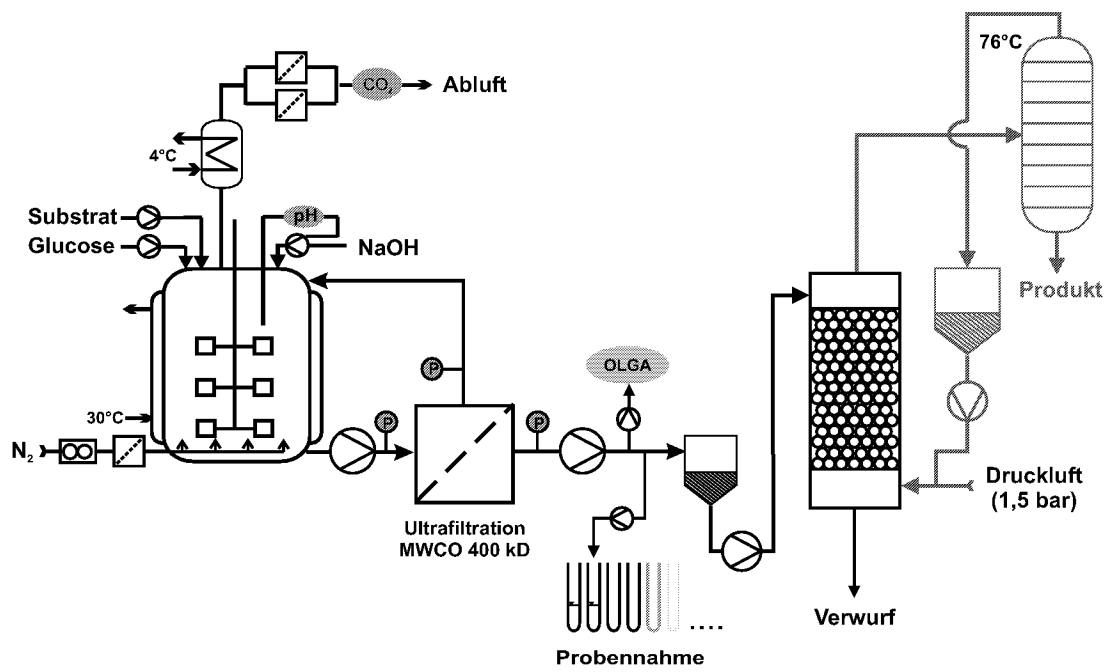


Abbildung 7.1: Fließbild des entwickelten Verfahrens

8 Material und Methoden

8.1 Material

8.1.1 Geräte

Agilent Technologies GmbH, Waldbronn	GC-System 6890 GC-System 5890 ChemStation Software 8.0
B.E.S.T., Bornheim	Swadgelok Verschraubungen
Biorad, München	HPLC-Säule : Aminex HPX-87H
Büchi Labortechnik, Konstanz	Rotationsverdampfer Rotavapor RE-111 Vakuumpumpe Vac V-513 Sprühtrockner B-191
Chemap AG, Schweiz	300-L Fermenter
Chromatographie-Service, Langerwehe	GC Kapillarsäule : β -I/P-Cyclodextrin
CTC Analytics AG, Zwingen, Schweiz	Flüssigprobengeber A200S Flüssigprobengeber CombiPal
Eppendorf, Hamburg	Laborzentrifuge Zentrifuge in Halle Zentrifugenbecher
Fedegari Autoclavi Spa, Italien	Autoklav 4507 E
Fischer-Rosemount, Haan	CO ₂ -Sensor BINOS 100 (0-2%) O ₂ -Sensor BINOS 100 (0-100%)
IKA Labortechnik, Staufen	Magnetrührer RET-G

Infors, Basel, Schweiz	3-L Labfors Fermenter
JASCO, Gross-Umstadt	Pumpe PU 1580 Mixer LG 1580-62 Degasser DG 1580-53 Autosampler AS 1550 Detektor DAD MD 1510
Kronwald Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren	GC Kapillarsäule : Permabond CW 20 M ChromaFil Einmalfilter aus Cellulose-Acetat
MembraPure, Bodenheim	KrosFlo Filtrationsmodul
Metrohm, Herisau, Schweiz	Dosimat 665 Impulsomat 614 pH-Meter 691
Mettler Toledo, Giessen	pH-Elektrode 405-DPAS-SC-K8S/150 pH-Elektrode 405-DPAS-SC-K8S/325 pO ₂ -Elektrode pO ₂ -Messverstärker
National Instruments, München	LabView 6.01
Pharmacia LKB, Freiburg	Fraktionssammler Frac-100 Wechselkolbenpumpe P500
Polymer Laboratories, Darmstadt	Detektor PL-ELS 1000
Sartorius AG, Göttingen	diverse Sterilfilter diverse Waagen
Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg	Spektrophotometer UV-160
Watson-Marlow GmbH, Rommerskirchen	div. Peristaltikpumpen div. Pumpenschläuche
Westfalia Separator AG, Ölte	Zellseparator KA 2

8.1.2 Chemikalien

Die im Folgenden aufgelisteten Chemikalien sind sofern nicht anders gekennzeichnet in pp.a.Qualität eingesetzt worden.

Aldrich, Steinheim	Chloroform-d6 Trifluoressigsäureanhydrid
Fluka, Neu-Ulm	Ammoniumsulfat Chloroform Dikaliumhydrogensulfat Ethanol (2,5)-Hexandiol (2,5)-Hexandion (2,5)-Hexandion (Wacker-Qualität, 97%) (3 <i>S</i>)-Hydroxybuttersäureethylester Kaliumdihydrogenphosphat Kaliumhydroxid Natriumborhydrid Natriumchlorid Natriumhydroxid <i>iso</i> -Octan 3-Oxobuttersäureethylester <i>n</i> -Pentan Trifluoressigsäure
Juelich Fine Chemicals GmbH	<i>Lactobacillus kefir</i> DSM20587 (2 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-Hexandiol
Linde Technische Gase GmbH, Köln	Prüfgas - 1,5 % CO ₂ in N ₂
Merck, Darmstadt	Casein Pepton Diethylether Ethylacetat Fleischextrakt Hefeextrakt Magnesiumsulfat·7H ₂ O Mangansulfat·H ₂ O Natriumacetat wasserfrei 2-Propanol Silica Gel 60
Sigma, Neu-Ulm	Diammoniumhydrogencitrat Tween 20

8 *Material und Methoden*

Tween 80
XAD-Harze

Roche-Diagnostics GmbH, Mannheim	Kit zur Bestimmung von D-/L-Milchsäure Produkt-Nr. E 1112 821 Universal Protease Substrat Produkt-Nr. 1 080 733
----------------------------------	--

8.2 Methoden

8.2.1 Fermentationsprotokoll zur Biomassegewinnung

Lactobacillus kefir wird auf MRS-Medium kultiviert. Das Medium besitzt die in Tabelle 8.3 aufgelistete Zusammensetzung.

Komponente	Einwaage $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
Casein Pepton	10
Fleischextrakt	10
Hefeextrakt	5
Glucose·H ₂ O	22
Natriumacetat	5
Dikaliumhydrogenphosphat	2
Diammoniumhydrogencitrat	2
Tween [®] 80	1
Magnesiumsulfat·7H ₂ O	0,2
Mangansulfat·H ₂ O	0,05

Tabelle 8.3: Medienzusammensetzung (MRS-Medium) für die Fermentation von *L. kefir*

Das Medium wird zu Beginn der Fermentation auf pH 6,5 eingestellt. Während der Fermentation wird keine pH-Kontrolle durchgeführt (siehe Abbildung 3.3 auf Seite 26). Die dreistufige Fermentation wird mit 5 Schüttelkolben á 100 ml begonnen. Diese werden für 2 Tage bei 30°C im Brutschrank bei 60 rpm inkubiert. Nach Ablauf der 48 h wird die OD_{660nm} kontrolliert und alle 5 Kolben in eine 10 L Schottflasche überführt, welche bereits 9,5 L Medium enthält. Die Schottflasche wird wiederum für 48 h im 30°-Raum inkubiert und mittels Magnetrührer (300 rpm) gerührt. Nach 48 h wird der Inhalt der Flasche in einen 300 L Fermenter überführt. Dieser enthält 190 L des MRS Mediums. Wichtig ist hierbei, daß das Medium nicht mit Stickstoff entgast wurde, sondern mit Luft gesättigt ist. Es wird nun wieder für 48 h bei 30°C inkubiert und mit 300 rpm gerührt. Es wird eine OD_{660nm} von 4 bis 4,5 erreicht. Die Zellen werden dann mittels einer Kontifuge geerntet und anschließend bei -20°C gelagert.

8.2.2 Assay zur Aktivitätsbestimmung

Um die verschiedensten Einflüsse auf die Aktivität untersuchen zu können, bedarf es eines Standardaktivitätsassays. Da keine einfache Photometermessung, wie z.B. bei isolierten Enzymen, möglich ist, werden alle Messungen per Gaschromatographie durchgeführt.

Der Standardaktivitätsassay wird im 100 mL Maßstab durchgeführt. Im Falle von wenig verfügbarer Biomasse kann dieser auch im 60 mL Maßstab durchgeführt werden. Die eingesetzten Zellen (in der Regel 2 g Biofeuchtmasse) werden vor ihrem Einsatz mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6) gewaschen und abzentrifugiert. Danach wird die Biomasse mittels der angesetzten Glucoselösung in das Reaktionsgefäß suspendiert. Der pH wird auf 6 eingestellt. 15 min wird das Gefäß mit Stickstoff oder Argon gespült. Schließlich wird durch Zugabe des Substrates die Reaktion gestartet (für exakte Durchführung siehe **Material und Methoden**). Vor Start der Reaktion wird noch 1 mL Lösung zur BTM Bestimmung entnommen.

Die Linearität des Assays wird überprüft. Bei verschiedenen Biomassekonzentrationen wird die Aktivität bestimmt. In Abbildung 8.1 sind die Ergebnisse dargestellt. Es zeigt sich, daß in einem Bereich bis etwa 27% Biofeuchtmasse oder $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ BTM die Aktivität linear von der Biomassekonzentration abhängt. Für die Aktivität ergibt sich ein Wert von 56 U/g_{BTM} .

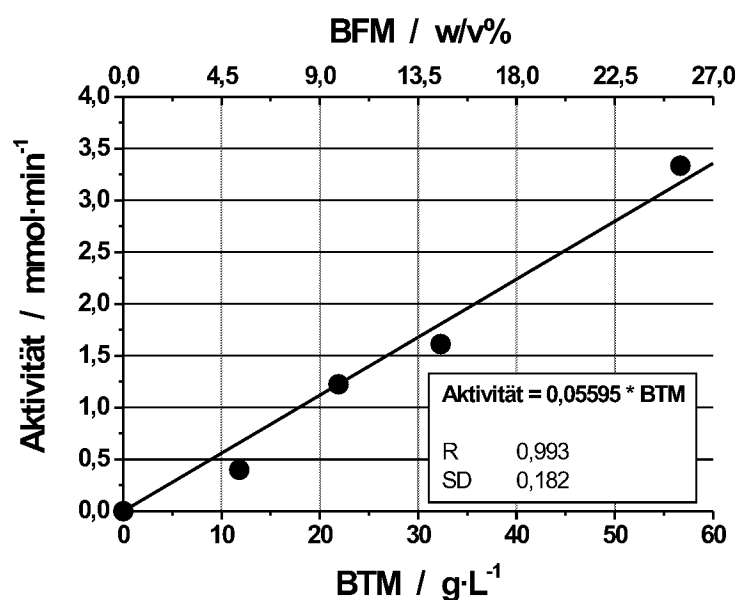


Abbildung 8.1: Abhängigkeit der Aktivität von Biotrockenmasse (unten) bzw. Biofeuchtmasse (oben). Bedingungen : $V = 0.06 \text{ L}$, 30°C , pH 6. 75 mM (2,5)-Hexandion, 400 mM Glucose, 50 mM Phosphatpuffer

Somit ist eine Standardmethode zum Vergleich der Aktivitäten etabliert.

8.2.3 Protokoll zur Bestimmung der Stöchiometrie

8.2.3.1 Aufbau

Die Biotransformationen mit *L. kefir* wird in einem 3-L Labfors Fermenter mit 1-L Arbeitsvolumen ($H = 38$ cm, $D = 11,6$ cm) durchgeführt. Das Fließbild ist in Abbildung 3.25 auf Seite 47 dargestellt.

Der Fermenter wird vor seinem Einsatz sterilisiert (121°C , 20 min). Glucose-Lösung bestehend aus Glucose, Phosphatpuffer und MgSO_4 werden über einen Sterilfilter ($0,45$ plus $0,2\ \mu\text{m}$) in ein vorher sterilisiertes Gefäß gefüllt.

Der Fermenter ist mit zwei 6-blättrigen Impellern ($\varnothing 4,5$ cm, Flügel $8,5$ mm) ausgerüstet. Die Rührgeschwindigkeit beträgt 1200 UpM. Um einen Verlust an Wasser bzw. Ethanol zu vermeiden, wird der Abluftkühler auf 2°C gekühlt. Der Fermenter wird mit $4\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ Stickstoff begast. Im Abgas wird CO_2 (BINOS 100 0-2%) gemessen. Die Fermentertemperatur beträgt 30°C . Der pH wird gemessen und mit 4 N Natronlauge auf 6,0 geregelt.

Alle Online-Daten werden mittels LabView 6.01 aufgezeichnet.

8.2.3.2 Durchführung

50 g_{BFM} *L. kefir* werden zweimal mit 1000 mL Phosphatpuffer (pH 6) gewaschen, mit 0,2 mL Antischaum versetzt und in den Fermenter gefüllt. 6 mL (2,5)-Hexandion werden zugegeben. Der Stickstoffstrom (4 vvm) wird angeschaltet und man wartet so lange, bis alles CO_2 ausgetrieben ist und der Sensor Null zeigt. Dann wird der pH mit 4N NaOH auf 6 eingestellt und das Experiment durch starten des Glucosefeedes begonnen. Proben (5 mL) werden manuell genommen und sofort abzentrifugiert (14000 UpM, 2 min).

8.2.4 Protokoll für FedBatchversuche

8.2.4.1 Aufbau

Alle FedBatch Versuche werden parallel in einer FedBatch Pro[©] der Firma DAS-GIP durchgeführt. Es werden vier Schüttelkolben als Reaktoren genutzt. Vor Beginn des Experimentes werden die Schüttelkolben und die Glucoselösung ($2\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) sterilisiert (121°C , 20 min). Alle Schläuche werden zunächst mit 1 N Natronlauge sterilisiert und anschließend mit sterilem Wasser nachgespült. (2,5)-Hexandion ($2\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) wird ohne weitere Vorbehandlung eingesetzt. Der Schüttler in dem das Experiment durchgeführt wird, wird auf 30°C und 60 UpM eingestellt. Der pH wird durch Dosierung von 4 N NaOH auf 6 geregelt.

8.2.4.2 Durchführung

Zunächst werden 50 g_{BFM} *L. kefir* in 500 mL Phosphatpuffer (pH 6) suspendiert. In jeden Schüttelkolben werden dann 100 mL dieser Suspension gefüllt. Nach 15

min Akklimatisierungszeit wird durch starten der Feedpumpen das Experiment gestartet. Alle 15 min wird der Schüttler gestoppt und mit 1 mL Einwegspritzen wird aus jedem Schüttelkolben je eine Probe genommen und abzentrifugiert (14000 UpM, 2 min). Nach Probennahme wird der Schüttler sofort wieder angeschaltet.

8.2.5 Protokoll zum Betrieb eines CSTR mit *L. kefir*

8.2.5.1 Aufbau

Die kontinuierlichen Biotransformationen mit *L. kefir* werden in einem 3-L Labfors Fermenter mit 2L Arbeitsvolumen ($H = 38$ cm, $D = 11,6$ cm) durchgeführt. Das Fließbild ist in Abbildung 4.8 auf Seite 68 dargestellt.

Der Fermenter wird vor seinem Einsatz sterilisiert (121°C , 20 min). Glucose-Lösung bestehend aus Glucose, Phosphatpuffer und MgSO_4 werden über einen Sterilfilter ($0,45$ plus $0,2\ \mu\text{m}$) in ein vorher sterilisiertes Gefäß gefüllt. Filtrationsmodul und Schläuche werden mit 1 N Natronlauge in betriebsbereitem Zustand sterilisiert. (2,5)-Hexandion wird direkt aus der angelieferten 25-kg Trommel verwendet. Für die kontinuierlichen Experimente wird (2,5)-Hexandion in Wacker-Qualität (97%) eingesetzt.

Der Fermenter ist mit zwei 6-blättrigen Impellern ($\varnothing 4,5$ cm, Flügel 8,5 mm) ausgerüstet. Die Rührgeschwindigkeit beträgt 1200 UpM. Um einen Verlust an Wasser bzw. Ethanol zu vermeiden, wird der Abluftkühler auf 2°C gekühlt. Der Fermenter wird mit $4\text{--}6\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ Stickstoff begast. Im Abgas wird CO_2 (BINOS 100 0-2%) gemessen. Die Fermentertemperatur beträgt 30°C . Der pH wird gemessen und mit 4 N Natronlauge auf 6,0 geregelt.

Alle Online-Daten werden mittels LabView 6.01 aufgezeichnet.

Zur Zellrückhaltung wird eine Ultrafiltrationsmembran (Fasern $\varnothing 0,5$ mm, $A = 1,7\ \text{m}^2$, MWCO 400 kD) eingesetzt. Das Volumen im Umlauf beträgt etwa 200 mL, der Umlaufstrom $60\ \text{L}\cdot\text{h}^{-1}$. Der Füllstand des Fermenters wird mit einer Schaumsonde und einer ansteuerbaren Permeatpumpe kontrolliert.

8.2.5.2 Durchführung

Zuerst werden 1 L Pufferlösung (pH 6) und 0,4 mL Antischaum in den Reaktor gefüllt. $200\ \text{g}_{\text{BFM}}\ L. kefir$ werden zunächst in 1 L Pufferlösung suspendiert und dann in den Fermenter gefüllt. Die 2 L Zellsuspension werden für 30 min gerührt und mit Stickstoff begast, um die Lactobacillen zu akklimatisieren und das vorhandene CO_2 auszutreiben. Dann wird der Umlauf gestartet und etwa 10 min umgepumpt. Durch den Start von Glucosefeed und (2,5)-Hexandionfeed wird die Biotransformation gestartet.

8.2.6 Protokoll zum Betrieb eines CSTR mit *S. cerevisiae*

8.2.6.1 Aufbau

Die kontinuierlichen Biotransformationen mit Bäckerhefe werden in einem 3-L Labfors Fermenter mit 2L Arbeitsvolumen ($H = 38$ cm, $D = 11,6$ cm) durchgeführt. Das Flowscheme ist in Abbildung 4.28 dargestellt.

Der Fermenter wird vor seinem Einsatz sterilisiert (121°C , 20 min). Glucose-Lösung und Substratlösung bestehend aus Glucose, **EOB**, Phosphatpuffer und MgSO_4 werden über einen Sterilfilter ($0,45$ plus $0,2\ \mu\text{m}$) in ein vorher sterilisiertes Gefäß gefüllt. Filtrationsmodul und Schläuche werden mit 1 N Natronlauge in betriebsbereitem Zustand sterilisiert.

Der Fermenter ist mit vier 6-blättrigen Impellern ($\varnothing 4,5$ cm, Flügel 8,5 mm) ausgerüstet. Die Rührgeschwindigkeit beträgt 1200 UpM. Um einen Verlust an Substrat bzw. Produkt zu vermeiden, wird der Abluftkühler auf 2°C gekühlt. Der Fermenter wird mit $6\text{--}8\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ Druckluft begast. Im Abgas werden sowohl CO_2 (BINOS 100 0-2%), als auch Sauerstoff (BINOS 100 0-100%) gemessen. Die Fermentertemperatur beträgt 30°C .

Der pH wird gemessen und mit 4 N Natronlauge auf 5,5 geregelt. Der gelöste Sauerstoff wird ebenfalls gemessen und über 20% gehalten.

Alle Online-Daten werden mittels LabView 6.01 aufgezeichnet.

Zur Zellrückhaltung wird eine Ultrafiltrationsmembran (Fasern $\varnothing 0,5$ mm, $A = 1,7\ \text{m}^2$, MWCO 400 kD) eingesetzt. Das Volumen im Umlauf beträgt etwa 200 mL, der Umlaufstrom $60\ \text{L}\cdot\text{h}^{-1}$. Der Füllstand des Fermenters wird mit einer Schaumsonde und einer ansteuerbaren Permeatpumpe kontrolliert.

8.2.6.2 Durchführung

Zuerst werden 1 L Pufferlösung (pH 5,5) und 0,4 mL Antischaum in den Reaktor gefüllt. $200\ \text{g}_{BFM}$ (ca. $56\ \text{g}_{BTM}$) Bäckerhefe werden zunächst in 1 L Pufferlösung suspendiert und dann in den Fermenter gefüllt. Die 2 L Zellsuspension werden für 30 min gerührt und mit Druckluft begast, um die Hefe zu akklimatisieren. Dann werden sowohl der Umlauf, als auch der Glucosefeed (ca. $12\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ mit $500\ \text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$ gestartet. Nach etwa 2 h wird ein konstanter Sauerstoffverbrauch erreicht. Jetzt wird der Glucosefeed gestoppt und der Feed der Substratlösung mit gleichem Volumenstrom gestartet.

8.3 Analytische Methoden

8.3.1 Bestimmung der optischen Dichte

Zur Bestimmung der optischen Dichte wird eine Probe der Zellsuspension um den Faktor 1000 verdünnt (ist für den Bereich in dem gearbeitet wird voll ausrei-

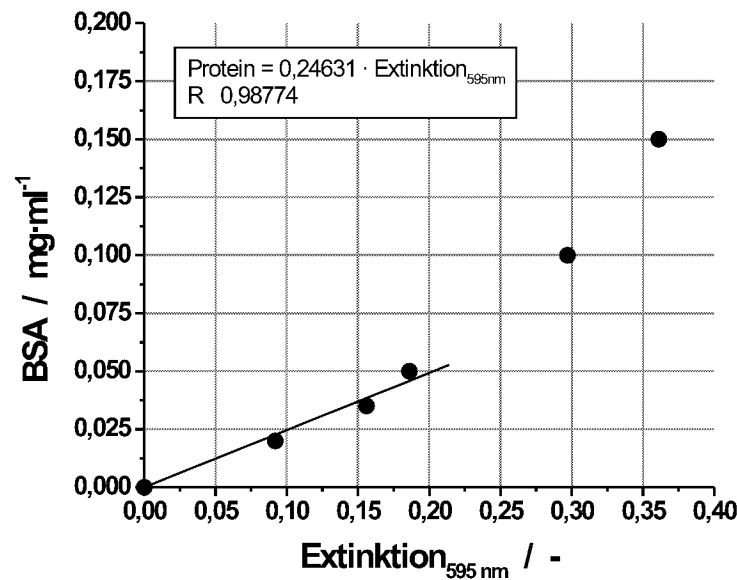


Abbildung 8.2: Kalibriergerade zur Proteinbestimmung.

chend). Diese wird im Photometer bei 660 nm und 25°C vermessen. Verwendet wird ein Spectrophotometer UV-160 von Shimadzu.

8.3.2 Bestimmung der Biotrockenmasse

Einmalfilter (ø25 mm, Porengröße 0,2 µm) werden im Trockenofen bei 70°C bis zur Gewichtskonstanz (3 Tage) getrocknet, ausgewogen und anschließend im Exsikkator über Blaugel aufbewahrt.

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse wird 1 mL Probe durch einen Einmalfilter filtriert, gegebenenfalls wird vorher 1:2 verdünnt. Es wird mit demineralisiertem Wasser gewaschen (2 x 1 mL), der Filter erneut im Trockenofen bei 70°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (3 Tage) und dann ausgewogen.

8.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung des Proteingehaltes werden die entnommen Biomasseproben abzentrifugiert (10 min, 13.000 g) und der Überstand abgenommen. In der Regel wird dieser 1:10 verdünnt. 100 µL Überstand werden mit 900 µL Bradfordlösung versetzt und im Photometer bei 595 nm vermessen. Die Kalibrierung wird mit BSA durchgeführt.

8.3.4 Gaschromatographie

8.3.4.1 Umsatzanalytik

Für die Umsatzbestimmung und Bilanzierung aller Reaktionen müssen die in Abbildung 8.3 dargestellten Verbindungen analysiert werden. Neben Substrat, Zwischenprodukt und Produkt der Reduktion wird auch Ethanol, welches als Stoffwechselprodukt gebildet wird, analysiert. Alle Verbindungen werden mit der in Tabelle 8.4 aufgelisteten Methode analysiert und quantifiziert.

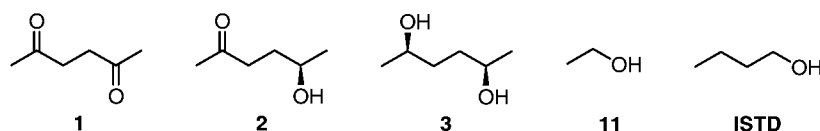


Abbildung 8.3: Umsatzanalytik

GC	HP 5890A		
Detektor	FID		
	Temperatur	220°C	
	Make-Up (He)	2,5 bar	
	Luft	2 bar	
	Wasserstoff	1,2 bar	
Injektor	Split/Splitless		
	Temperatur	220°C	
	Split	1:100	
Trärgas	Helium		
Säulenvordruck	1,5 bar		
Temperatur	70°C, 6 min		
	25°C/min → 160°C		
	160°C, 19 min		
Säule	Permabond CW 20 M		
	Hersteller	Macherey-Nagel, Düren	
	Länge	50 m	
	Durchmesser	320 μm	
	Filmdicke	0,5 μm	

Tabelle 8.4: GC-Methode zur Umsatzbestimmung

Um den Injektionsfehler des Autosamplers zu eliminieren wird für alle Messungen 25 mM *n*-Butanol als interner Standard (ISTD) verwendet. Alle Proben werden im Verhältnis 1:2 mit diesem versetzt. Mit der in Tabelle 8.4 verwendete-

ten Methode werden die folgenden Retentionszeiten (Tabelle 8.5) gemessen. Ein Beispiel einer Messung ist in Abbildung 8.4 dargestellt.

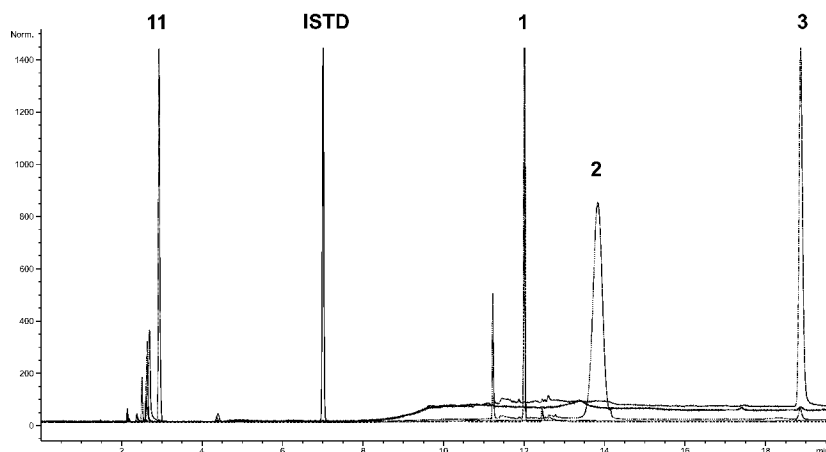


Abbildung 8.4: Beispielchromatogramm GC

Verbindung	Retentionszeit [min]
1	15,47
2	18,43
3	26,588
11	5,49
ISTD	9,30

Tabelle 8.5: Retentionszeiten der Umsatzbestimmung

Für die Kalibrierung des GC wird dann der Flächenquotient Q berechnet. Der hier verwendete Detektor zeigt eine sehr hohe Linearität. Die Kalibriergeraden für die Analyten **1** - **4** sind in Abbildung 8.5 dargestellt.

$$(8.1) \quad Q = \frac{\text{Fläche Analyt}}{\text{Fläche ISTD}}$$

8.3.4.2 ee- und de-Bestimmung

Die in Abbildung 8.6 dargestellten Verbindungen müssen zur Diastereomeren- bzw. Enantiomerenüberschußanalytik getrennt werden. In Abhängigkeit der verwendeten Methode in Tabelle 8.6 müssen die Analyten vorher derivatisiert werden.

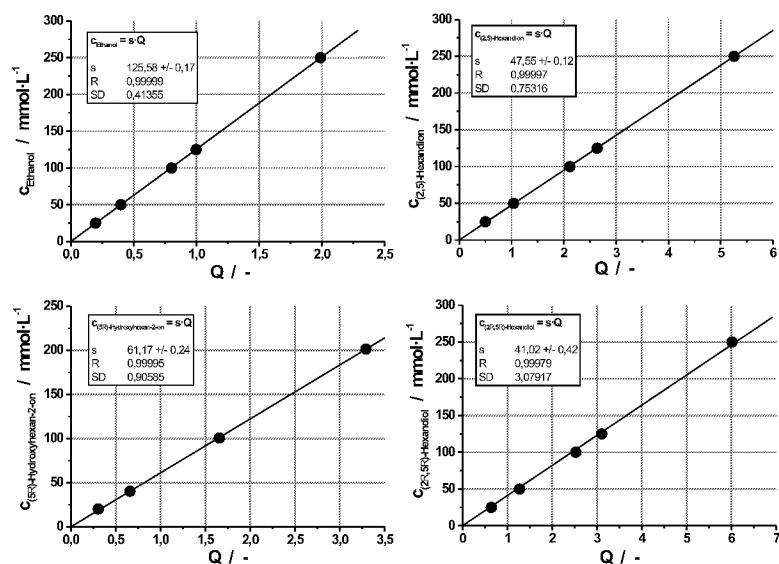


Abbildung 8.5: Kalibriergeraden für die Gaschromatographie

300 μL der wässrigen Probe werden zweimal mit je 300 μL Chloroform versetzt und 30 s auf dem Vortex geschüttelt. Die vereinigten organischen Phase werden mit 100 μL Trifluoressigsäureanhydrid versetzt und für 15 min im Wasserbad auf 60°C erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel bis zur Trockne abdestilliert. Nach Aufnahme in 300 μL Chloroform wird die Probe analysiert.

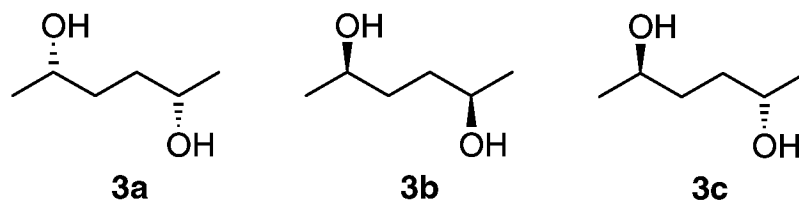


Abbildung 8.6: Diastereomeren- und Enantiomerenanalytik

Da die Bestimmung des *de* bzw. des *ee* keine quantitative, sondern nur eine qualitative Messung ist, wird kein interner Standard benötigt. Die gemessenen Retentionszeiten sind in Tabelle 8.7 dargestellt. In Abbildung 8.7 ist die Auftrennung des racemischen 2,5-Hexandiols gezeigt.

8.3.5 HPLC

Bei der HPLC Messung werden Für organische Säuren und Zucker gibt es Standardmethoden für die HPLC. Hier wurden durch Wahl von Trifluoressigsäure als

GC	HP 6890A								
Detektor	FID <table> <tr><td>Temperatur</td><td>250°C</td></tr> <tr><td>Make-Up (He)</td><td>45 mL/min</td></tr> <tr><td>Luft</td><td>450 mL/min</td></tr> <tr><td>Wasserstoff</td><td>40 mL/min</td></tr> </table>	Temperatur	250°C	Make-Up (He)	45 mL/min	Luft	450 mL/min	Wasserstoff	40 mL/min
Temperatur	250°C								
Make-Up (He)	45 mL/min								
Luft	450 mL/min								
Wasserstoff	40 mL/min								
Injektor	Split/Splitless <table> <tr><td>Temperatur</td><td>250°C</td></tr> <tr><td>Split</td><td>splitless</td></tr> </table>	Temperatur	250°C	Split	splitless				
Temperatur	250°C								
Split	splitless								
Trärgas	Wasserstoff								
Säulenvordruck	0,9 bar								
Temperatur	70°C								
Säule	FS-Cyclodex beta-1/P <table> <tr><td>Hersteller</td><td>Chromatographie-Service, Langerwehe</td></tr> <tr><td>Länge</td><td>50 m</td></tr> <tr><td>Durchmesser</td><td>320 μ m</td></tr> </table>	Hersteller	Chromatographie-Service, Langerwehe	Länge	50 m	Durchmesser	320 μ m		
Hersteller	Chromatographie-Service, Langerwehe								
Länge	50 m								
Durchmesser	320 μ m								

Tabelle 8.6: GC-Methode zur Enantioselektivitätsbestimmung

Verbindung	Retentionszeit [min]
3a	29,77
3b	28,83
3c	33,50

Tabelle 8.7: Retentionszeiten der Selektivitätsbestimmung

Laufmittel und zwei verschiedener Detektionsmethoden beide Methoden kombiniert. Die in Abbildung 8.8 dargestellten Verbindungen galt es zu trennen und zu quantifizieren. In Tabelle 8.8 sind die dazugehörigen Methodenparameter aufgelistet.

Für die Quantifizierung werden im Gegensatz zur Gaschromatographie direkt die Flächen mit den Konzentrationen korreliert. Auf Grund der Injektionsmethode ist eine Verwendung von einem Standard nicht notwendig. Die Kalibriergeraden für die Analyten **5** - **7** sind in Abbildung 8.10 gezeigt.

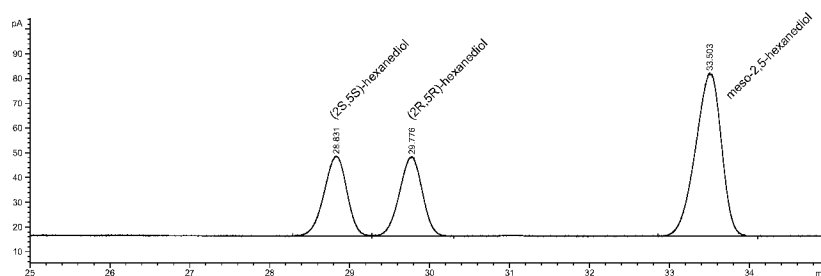


Abbildung 8.7: Auftrennung der Diole

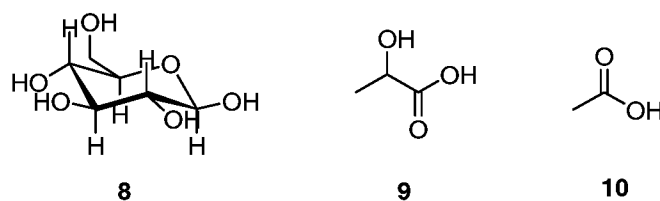


Abbildung 8.8: Organische Säuren und Zucker die mittels HPLC nachgewiesen werden.

HPLC	Jasco
Detektor	DAD
	Wellenlänge 220 nm
	Lichtstreuendetektor
	Temperatur Nebuliser 90°C
	Temperatur Evaporator 120°C
	Stickstoff 0,7 L·min ⁻¹
Injektor	20 µL
Laufmittel	H ₂ O, 0,5% Trifluoressigsäure
Säulentemperatur	65°C
Säule	Aminex HPX-87H
	Hersteller Biorad
	Länge 300 mm
	Innendurchmesser 7,5 mm

Tabelle 8.8: HPLC-Methode zur organische Säuren/Zucker-Analytik

Verbindung	Retentionszeit [min]
5	10,8
6	14,9
7	17,3

Tabelle 8.9: Retentionszeiten der HPLC-Bestimmung

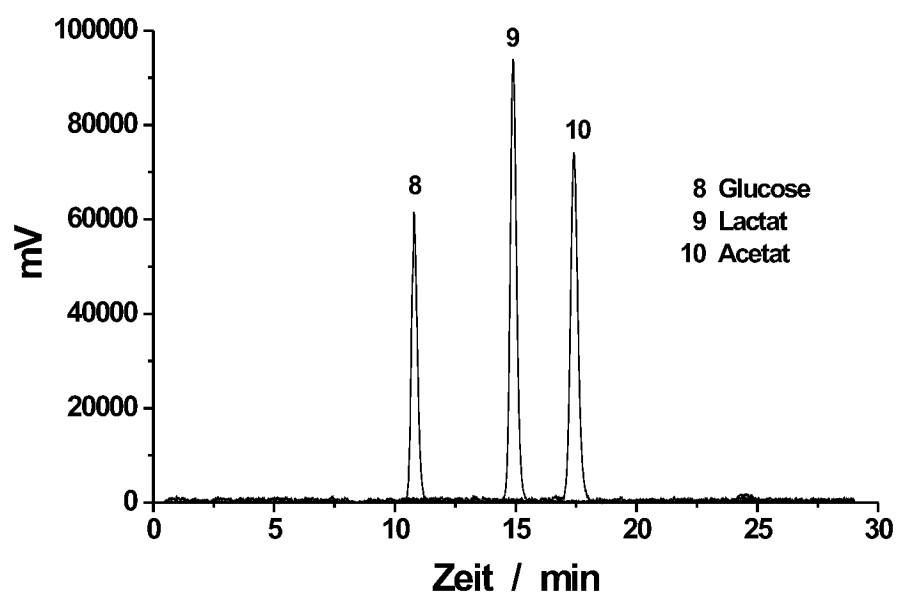


Abbildung 8.9: Beispielchromatogramm HPLC

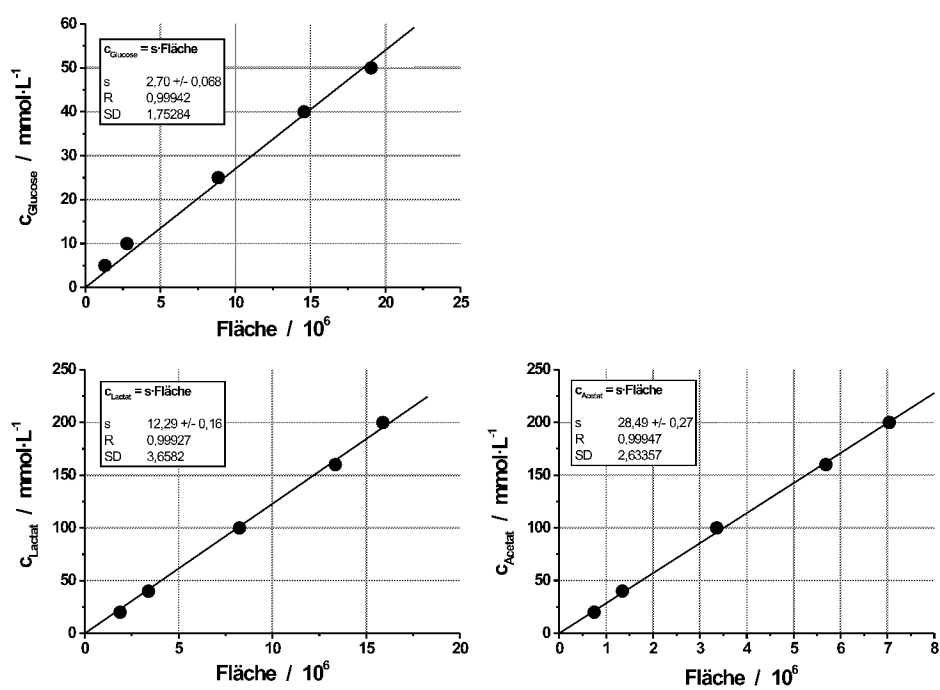


Abbildung 8.10: Kalibriergerade für die HPLC

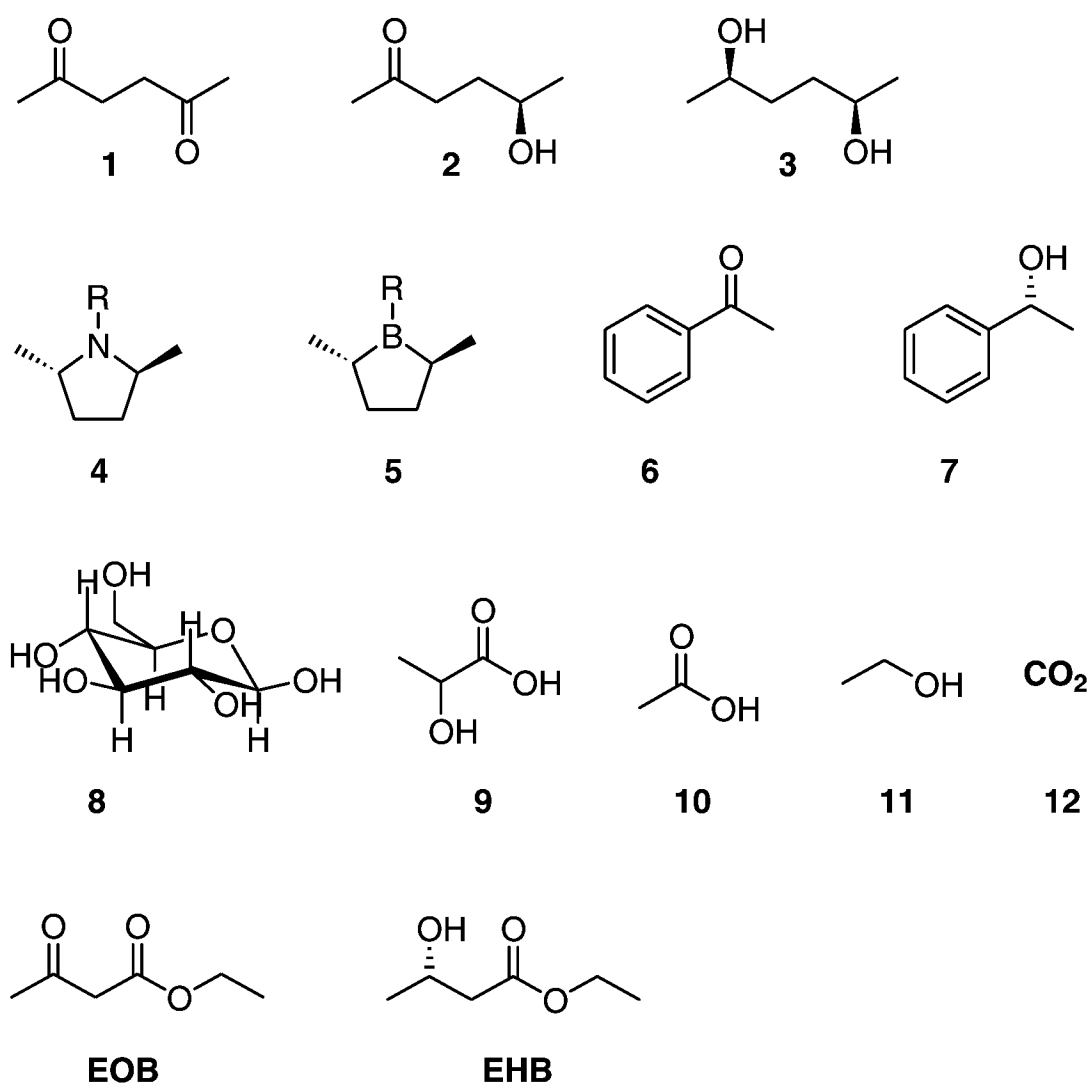


Abbildung 8.11: Übersicht der verwendeten Verbindungen

Literaturverzeichnis

- [1] J Young. Lefties, righties and anxieties. *Forbes Magazine*, July:19, 1993.
- [2] S.C. Stinson. Fda may confer new status on enantiomers. *Chemical and Engineering News*, 75(2):28–29, 1997.
- [3] S.C. Stinson. Counting on chiral drugs. *Chemical and Engineering News*, 76(38):83–104, 1998.
- [4] J.J. Blumenstein. Chiral drugs: Regulatory aspects. In A.N. Collins, G.N. Sheldrake, and J. Crosby, editors, *Chirality in Industry II*, pages 11–18. John Wiley & Sons, New York, 1997.
- [5] S.C. Stinson. Chiral chemistry. *Chemical and Engineering News*, 79(20):45–57, 2001.
- [6] D.J. Ager. *Handbook of Chiral Chemicals*. Marcel Dekker Inc., New York, 1999.
- [7] A. Liese, K. Seelbach, A. Buchholz, and J. Haberland. Processes. In A. Liese, K. Seelbach, and C. Wandrey, editors, *Industrial Biotransformations*, pages 93–392. Wiley-VCH, Weinheim, 2000.
- [8] E.G. Occhiato, A. Guarna, F. De Sarlo, and D. Scarpi. Baker’s yeast reduction of prochiral .gamma.-nitro ketones. ii. straightforward enantio-selective synthesis of 2,7-dimethyl-1,6-dioxaspiro[4.4]nonanes. *Tetrahedron: Asymmetry*, 6(12):2971–2976, 1995.
- [9] A. Matsuyama and Y. Kobayashi. Large-scale preparation of (r)-(-)-1,3-butanediol from the racemate by *candida parapsilosis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58(6):1148–1149, 1994.
- [10] T. Nakatsuka, H. Iwata, R. Tanaka, S. Imajo, and M. Ishiguro. A facile conversion of the phenylthio group to acetoxy by copper reagents for a practical synthesis of 4-acetoxiazetidin-2-one derivatives from (r)-butane-1,3-diol. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 9:662–664, 1991.

- [11] T. Kometani, H. Yoshii, E. Kitatsuji, and R. Matsuno. Large-scale preparation of (*r*)-1,2-propandiol through bakers' yeast-mediated bioreduction. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76:414–415, 1993.
- [12] M.J. Burk, J.E. Feaster, and R.L. Harlow. New electron-rich chiral phosphines for asymmetric catalysis. *Organometallics*, 9:2653–2655, 1990.
- [13] M.J. Burk, J.E. Feaster, and R.L. Harlow. New chiral phospholanes; synthesis, characterization, and use in asymmetric hydrogenation reactions. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2(7):569–592, 1991.
- [14] J. Haberland, A. Kriegesmann, E. Wolfram, W. Hummel, and A. Liese. Distereoselective synthesis of optically active (2*r*,5*r*)-hexanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(5):595–599, 2002.
- [15] W. Hummel, A. Liese, and C. Wandrey. *Verfahren zur Reduktion von Ketogruppen enthaltenden Verbindungen*. Number DE 199 32 040.3. Forschungszentrum Jülich GmbH, 1999.
- [16] B.R. Davis, G.W. Rewcastle, R.J. Stevenson, and P.D. Woodgate. Clemmensen reduction. part 5. chiral γ -hydroxy-ketones. *Journal of the Chemical Society. Perkin I*, pages 2148–2154, 1977.
- [17] M.J. Burk. C₂-symmetric bis(phospholanes) and their use in highly enantioselective hydrogenation reactions. *Journal of the American Chemical Society*, 113:8518–8519, 1991.
- [18] T. Daußmann. *Persönliche Mitteilung*, 2002.
- [19] M.J. Burk, M.F. Gross, and J.P. Martinez. Asymmetric catalytic synthesis of β -branched amino acids via highly enantioselective hydrogenation reactions. *Journal of the American Chemical Society*, 117:9375–9376, 1995.
- [20] M.J. Burk, M.F. Gross, T.G.P. Harper, C.S. Kalberg, J.R. Lee, and J.P. Martinez. Asymmetric catalytic routes to chiral building blocks of medicinal interest. *Pure & Applied Chemistry*, 68(1):37–44, 1996.
- [21] J.M. Chong, I.S. Clarke, I. Koch, P.C. Olbach, and N.J. Taylor. Asymmetric synthesis of trans-2,5-diphenylpyrrolidine: A c₂-symmetric chiral amine. *Tetrahedron: Asymmetry*, 6(2):409–418, 1995.
- [22] M.-J. Kim and I.S. Lee. Combined chemical and enzymatic synthesis of (*s,s*)-2,5-dimethylpyrrolidine. *Synlett*, 10:767–768, 1993.
- [23] M. Pichon and B. Figadere. Synthesis of 2,5-disubstituted pyrrolidines. *Tetrahedron: Asymmetry*, 7(4):927–964, 1996.

- [24] J.K. Whitesell. C2 symmetry and asymmetric induction. *Chemical Reviews*, 89:1581–1590, 1989.
- [25] J.K. Whitesell and S.W. Felman. Asymmetric induction. 2. enantioselective alkylation of cyclohexanone via a chiral enamine. *Journal of Organic Chemistry*, 42(9):1663–1664, 1977.
- [26] S. Masamune, T. Sato, B.M. Kim, and T.A. Wollman. Organoboron compounds in organic synthesis. 4. asymmetric aldol reactions. *Journal of the American Chemical Society*, 108:8279–8281, 1986.
- [27] T. Yamazaki, J.T. Welch, J.S. Plummer, and R.H. Gimi. The enantioselective fluoroacetamide acetal claisen rearrangements of n-fluoroacetyl-trans-(2*r*,5*r*)-2,5-dimethylpyrrolidine. *Tetrahedron Letters*, 32(34):4267–4270, 1991.
- [28] L.-Y. Chen and L. Ghosez. Intramolecular cycloadditions of keteniminium salts. a practical asymmetric synthesis of prostaglandins. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2(12):1181–1184, 1991.
- [29] T. Imai, T. Tamura, and A. Yamamuro. Organoboron compounds in organic synthesis. 2. asymmetric reduction of dialkyl ketones with (*r,r*)- or (*s,s*)-2,5-dimethylborolane. *Journal of the American Chemical Society*, 108(7402–7404), 1986.
- [30] S.R. Wilson and A. Pasternak. Preparation of a new class of c2-symmetric chiral phosphines: The first asymmetric staudinger reaction. *Synlett*, pages 199–200, 1990.
- [31] S. Rissom. *Membranverfahren für Redoxenzyme, Gasversorgung - Reaktion - Produktextraktion*. Dissertation, Universität Bonn, 1999.
- [32] M. Bertau and M. Bürli. Enantioselective microbial reduction with baker's yeast on an industrial scale. *Chimia*, 54(9):503–507, 2000.
- [33] P. Saravanan, S. Raina, T. Sambamurthy, and V.K. Singh. A practical synthesis of (2*r*,5*r*)-2,5-hexandiol. *Journal of Organic Chemistry*, 62:2669–2670, 1997.
- [34] G. Solladie, N. Huser, J.L. Garcia-Ruano, J. Adrio, M.C. Carreno, and A. Tito. Asymmetric synthesis of both enantiomers of 2,5-hexane diol and 2,6-heptane diol induced by chiral sulfoxides. *Tetrahedron Letters*, 35(29):5297–5300, 1994.
- [35] R. Kuwano, M. Sawamura, J. Shirai, M. Takahashi, and Y. Ito. Asymmetric hydrosilylation of symmetrical diketones catalyzed by a rhodium

- complex with trans-chelating chiral diphosphine ettrap. *Tetrahedron Letters*, 36(29):5239–5242, 1995.
- [36] M.J. Burk. *Optically Pure 1,4-Diols*. Number US 5,021,131. E.I. du Pont de Nemours and Company, 1991.
- [37] M.J. Burk. *Chiral Phospholanes via Chiral 1,4-Diol Cyclic Sulfates*. Number US 5,171,892. E.I. du Pont de Nemours and Company, 1992.
- [38] C.C. Cumbo. *Process for Preparing Alkanediols by Electrochemical Coupling of Halohydrins, Alkanediols, when Produced by such Process, and an Electrolytic Cell Suitable for Carrying out the Process*. Number EP 0 024 178 A2. E.I. du Pont de Nemours and Company, 1981.
- [39] C.C. Cumbo. *Process for Preparing Alkanediols by Electrochemical Coupling of Halohydrins*. Number US 4,324,625. E.I. du Pont de Nemours and Company, 1982.
- [40] J. Bach, R. Berenguer, J. Garcia, M. Lopez, J. Manzanal, and J. Vilarrasa. Oxazaborolidine-catalysed reduction of alk-2-ene-1,4-diones. a convenient access to chiral 1,4-diols. *Tetrahedron*, 54:14947–14962, 1998.
- [41] J. Bach, R. Berenguer, J. Garcia, T. Loscertales, J. Manzanal, and J. Vilarrasa. Stereoselective reduction of unsaturated 1,4-diketones. a practical route to chiral 1,4-diols. *Tetrahedron Letters*, 38(6):1091–1094, 1997.
- [42] G.J. Quallich, K.N. Keavey, and T.M. Woodall. Enantioselective synthesis of *c2*-symmetric diols. *Tetrahedron Letters*, 36(27):4729–4732, 1995.
- [43] H. Brunner, K. Amberger, T. Wischert, and J. Wiehl. Asymmetrische katalysen, 69[1], enantioselektive hydrierung von dicarbonylverbindungen mit nabr/l-(+)-weinsäure modifizierten nickelskatalysatoren. *Bulletin des societes chimiques belges*, 100(8):585–595, 1991.
- [44] M.E. Maier and S. Reuter. Double asymmetric dihydroxylation of 1,5-hexadiene. *Liebigs Annalen/Recueil*, pages 2043–2046, 1997.
- [45] M.-J. Kim and I.S. Lee. Lipase-catalyzed transesterification as a route to each stereoisomer of 2,5-hexanediol and 3-hexyne-2,5-diol. synthesis of (2*r*,5*r*)-2,5-dimethyltetrahydrofuran. *Journal of Organic Chemistry*, 58:6483–6485, 1993.
- [46] G. Caron and R.J. Kazlauskas. Isolation of racemic 2,4-pentanediol and 2,5-hexanediol from commercial mixtures of racemic and meso isomers by way of cyclic sulfites. *Tetrahedron: Asymmetry*, 5(4):657–664, 1994.

- [47] H. Nagai, T. Morimoto, and K. Achiwa. Facile enzymatic synthesis of optically active 2,5-hexandiol derivatives and its application to the preparation of optically pure cyclic sulfate for chiral ligands. *Synlett*, 4:289–290, 1994.
- [48] H. Ikeda, E. Sako, T. Sugai, and H. Ohta. Yeast-mediated synthesis of optically active diols with *c*₂-symmetry and (*r*)-4-pentanolide. *Tetrahedron*, 52(24):8113–8122, 1996.
- [49] A. Kriegesmann. *Ganzzellbiotransformationen mit Saccharomyces cerevisiae und Lactobacillus kefir zur Darstellung enantiomerenreiner 2,5-Hexandiole - Reaktionstechnische Untersuchungen -*. Diplomarbeit, Universität Bonn, 1999.
- [50] J.K. Lieser. A simple synthesis of (*s,s*)-2,5-hexandiol. *Synthetic Communications*, 9(13):765–767, 1983.
- [51] T. Tsujigami, T. Sugai, and H. Ohta. Microbial asymmetric reduction of α -hydroxyketones in the anti-prelog selectivity. *Tetrahedron: Asymmetry*, 12:2543–249, 2001.
- [52] T. Yamazaki, A. Kuboki, H. Ohta, T.M. Mitzel, L.A. Paquette, and T. Sugai. *Yamadazyma Farinosa* ifo 10896 - mediated reduction of 4,4-dimethoxy-2-butanone as the key-step for the preparation of 1,3-diols with unsymmetrical substituents. *Synthetic Communications*, 30(16):3061–3072, 2000.
- [53] S.J.C. Taylor, K.E. Holt, R.C. Brown, P.A. Keene, and I.N. Taylor. Choice of biocatalyst in the development of industrial biotransformations. In R.N. Patel, editor, *Stereoselective Biocatalysis*, pages 397–404. Marcel Dekker, Inc., New York, 2000.
- [54] A. Schmid, J.S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, and B. Witholt. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 409:258–268, 2001.
- [55] C. Walsh. Enabling the chemistry of life. *Nature*, 409:226–231, 2001.
- [56] H. Yamada and S. Shimizu. Mikrobielle und enzymatische verfahren zur production biologisch und chemisch wertvoller verbindungen. *Angewandte Chemie*, 100:640–661, 1988.
- [57] K. Buchta. Lactic acid. In H. Dellweg, editor, *Biomass, Microorganisms for Special Applications, Microbial Products I, Energy from Renewable Resources*, volume 3 of *Biotechnology*, pages 409–417. VCH, Weinheim, 1983.

- [58] J.S. Kascak, J. Kominek, and M. Roehr. Lactic acid. In M. Roehr, editor, *Products of Primary Metabolism*, volume 6 of *Biotechnology*, pages 293–306. VCH, Weinheim, 1996.
- [59] N. Kosaric. Ethanol - potential source of energy and chemical products. In M. Roehr, editor, *Products of Primary Metabolism*, volume 6 of *Biotechnology*, pages 123–200. VCH, Weinheim, 1996.
- [60] N. Kosaric, A. Wieczorek, G.P. Cosentino, R.J. Magee, and J.E. Prenosil. Ethanol fermentation. In H. Dellweg, editor, *Biomass, Microorganisms for Special Applications, Microbial Products I, Energy from Renewable Resources*, volume 3 of *Biotechnology*, pages 257–385. VCH, Weinheim, 1983.
- [61] J. O’Sullivan. β -lactam antibiotics. In H. Pape and H.-J. Rehm, editors, *Microbial Products II*, volume 4 of *Biotechnology*, pages 247–281. VCH, Weinheim, 1986.
- [62] A. Matsuyama, Y. Kobayashi, and H. Ohnishi. Microbial production of optically active 1,3-butanediol from the racemate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 54(4):685–686, 1993.
- [63] M. Chartrain, R. Greasham, J. Moore, P. Reider, D. Robinson, and B. Buckland. Asymmetric bioreductions: application to the synthesis of pharmaceuticals. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11:503–512, 2001.
- [64] M. Chartrain, C. Roberge, J. Chung, J. McNamara, D. Zhao, R. Olewinski, G. Hunt, P. Salmon, D. Roush, S. Yamazaki, T. Wang, E. Grabowski, B. Buckland, and R. Greasham. Asymmetric bioreduction of (2-(4-nitro-phenyl)-*n*-(2-oxo-2-pyridin-3-yl-ethyl)-acetamide) to its corresponding (*r*) alcohol [(*r*)-*n*-(2-hydroxy-2-pyridin-3-yl-ethyl)-2-(4-nitro-phenyl)-acetamide] by using *candida sorbophila* my1833. *Enzyme and Microbial Technology*, 25:489–496, 1999.
- [65] J. Chung, G.-J. Ho, M. Chartrain, C. Roberge, D. Zhao, J. Leazer, R. Farr, M. Robbins, K. Emerson, D.J. Mathre, J. McNamara, D.L. Hughes, E. Grabowski, and P. Reider. Practical chemoenzymatic synthesis of a 3-pyridylethanolamino β_3 adrenergic receptor agonist. *Tetrahedron Letters*, 40:6739–6743, 1999.
- [66] M.R. Gerigk, D. Maass, A. Kreutzer, G. Sprenger, J. Bongaerts, M. Wubolts, and R. Takors. Enhanced pilot-scale fed-batch l-phenylalanine production with recombinant *escherichia coli* by fully integrated reactive extraction. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 25:43–52, 2002.

- [67] D. Maass, M.R. Gerigk, A. Kreutzer, D. Weuster-Botz, M. Wubbolts, and R. Takors. Integrated l-phenylalanine separation in an *e. coli* fed-batch process: from laboratory to pilot scale. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 25:85–96, 2002.
- [68] R. Takors, M. Gerigk, H. Paschold, and C. Wandrey. Principal-component analysis for microbial l-phenylalanine production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 24:93–99, 2001.
- [69] G. Stephanopoulos and J. Kelleher. How to make a superior cell. *Nature Biotechnology*, 292:2024–2026, 2001.
- [70] O. Zelder and B. Hauer. Environmentally directed mutations and their impact on industrial biotransformation and fermentation processes. *Current Opinion in Biotechnology*, 3:248–251, 2000.
- [71] K.-E. Jaeger, T. Eggert, A. Eipper, and M.T. Reetz. Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55:519–530, 2001.
- [72] A. Matsuyama, H. Yamamoto, N. Kawada, and Y. Kobayashi. Industrial production of (*r*)-1,3-butanediol by new biocatalysts. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11:513–521, 2001.
- [73] S. Parekh, V.A. Vinci, and R.J. Strobel. Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54:287–301, 2000.
- [74] G. Stephanopoulos and D.E. Stafford. Metabolic engineering: a new frontier of chemical reaction engineering. *Chemical Engineering Science*, 57:2595–2602, 2002.
- [75] F.H. Arnold. Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. *Nature*, 409:253–257, 2001.
- [76] M. Roehr. *Products of Primary Metabolism*, volume 6 of *Biotechnology*. VCH, Weinheim, 1996.
- [77] A. Mountain, U. Ney, and D. Schomburg. *Recombinant Proteins, Monoclonal Antibodies, and Therapeutic Genes*, volume 5a of *Biotechnology*. VCH, Weinheim, 1998.
- [78] L. Micheli, D. Uccelletti, C. Palleschi, and V. Crescenzi. Isolation and characterisation of a ropy *lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefiran. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53:69–74, 1999.

- [79] G.J. Grobбен, W.H.M. van Casteren, H.A. Schols, A. Oosterveld, G. Sala, M.R. Smith, J. Sikkema, and J.A.M. deBont. Analysis of the exopolysaccharides produced by *lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ncfb 2772 grown in continuous culture on glucose and fructose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48:516–521, 1997.
- [80] G.J. Grobбен, I. Chin-Joe, V.A. Kitzen, I.C. Boels, F. Boer, J. Sikkema, M.R. Smith, and J.A.M. deBont. Enhancement of exopolysaccharide production by *lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ncfb 2772 with a simplified defined medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(4):1333–1337, 1998.
- [81] A. Mäyrä-Mäkinen and M. Bigret. Industrial use and production of lactic acid bacteria. In S. Salminen and A. von Wright, editors, *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects*, volume 2, pages 73–102. Marcel Dekker, New York, 1998.
- [82] G. Reid. The scientific basis for probiotic strains of *lactobacillus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9):3763–3766, 1999.
- [83] M. Saarela, G. Mogensen, R. Fonden, J. Mättö, and T. Mattila-Sandholm. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84:197–215, 2000.
- [84] C.J. Saloff-Coste. Health benefits of fermented milks and probiotics. *Danone World Newsletter*, 15, 1997.
- [85] R. Csuk and B.I. Glänzer. Bakers' yeast mediated transformations in organic chemistry. *Chemical Reviews*, 91:49–97, 1991.
- [86] E. Santaniello, P. Ferraboschi, P. Grisenti, and A. Manzocchi. The biocatalytic approach to the preparation of enantiomerically pure chiral building blocks. *Chemical Reviews*, 92:1073–1140, 1992.
- [87] S. Shimizu and M. Kataoka. Production of chiral c3- and c4-units by microbial enzymes. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 63:109–123, 1999.
- [88] N. Hoffmann. Bäckerhefe - ein lebendes reagens für die organisch-chemische synthese. *Chemie in unserer Zeit*, 30(4):201–212, 1996.
- [89] T. Kometani, H. Yoshii, and R. Matsuno. Large-scale production of chiral alcohols with bakers' yeast. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1:45–52, 1996. Review.

- [90] Y. Hasegawa, S. Adachi, and R. Matsuno. Microbial production of 2-chloro- α -methylbenzyl alcohol and its adsorptive recovery. *Biochemical Engineering Journal*, 6:59–64, 2000.
- [91] O. Kandler and N. Weiss. Regular, non-sporing gram-positive rods. In Krieg N.R., J.G. Holt, and R.G.E. Murray, editors, *Bergey's manual of systematic bacteriology*, pages 1208–1234. William and Wilkins, Baltimore, 1984.
- [92] K.H. Schleifer and W. Ludwig. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *System. Appl. Microbiol.*, 18:461–467, 1995.
- [93] P. Vandamme, B. Pot, M. Gillis, P. de Vos, K. Kersters, and J. Swings. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, 60(2):407–438, 1996.
- [94] L. Axelsson. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In S. Salminen and A. von Wright, editors, *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects*, volume 2, pages 1–72. Marcel Dekker, New York, 1998.
- [95] S.E. Lindgren and W.J. Dobrogosz. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews*, 87:149–163, 1990.
- [96] K.H. Schleifer and E. Stackebrandt. Molecular systematics of procaryotes. *Annual Reviews in Microbiology*, 37:143–187, 1983.
- [97] C.J. Saloff-Coste. Lactic acid bacteria. *Danone World Newsletter*, 11, 1996.
- [98] O. Kandler and P. Kunath. *Lactobacillus kefir* sp. nov., a component of the microflora of kefir. *System. Appl. Microbiol.*, 4:286–294, 1983.
- [99] T.D. Brock, M.T. Madigan, J.M. Martinko, and J. Parker. *Biology of Microorganisms*. Prentice-Hall International, Inc., London, 1994.
- [100] B.E. Davidson, R.M. Llanos, M.R. Cancilla, N.C. Redman, and A.J. Hillier. Current research on the genetics of lactic acid production in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 5:763–784, 1995.
- [101] G. Gottschalk. *Bacterial Metabolism*. Springer, New York, 1986.
- [102] O. Kandler. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49:209–224, 1983.
- [103] H. Richter, D. Vlad, and G. Unden. Significance of pantothenate for glucose fermentation of *Oenococcus oeni* and for suppression of the erythritol and acetate production. *Arch Microbiol*, 175:26–31, 2001.

- [104] A. Zourari, J.P. Accolas, and M.J. Desmazeaud. Metabolism and biochemical characteristics of yoghurt bacteria. a review. *Lait*, 72:1–34, 1992.
- [105] W. Hummel. Reduction of acetophenone to *r*(+)-phenylethanol by a new alcohol dehydrogenase from *lactobacillus kefir*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34:15–19, 1990.
- [106] W. Hummel. New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Advances in Biochemical Engineering, Biotechnology*, 58:145–184, 1997.
- [107] W. Hummel and B. Riebel. Chiral alcohols by enantioselective enzymatic oxidation. *Enz. Eng.*, 13:713–716, 1996.
- [108] B. Riebel. *Biochemische und molekularbiologische Charakterisierung neuer mikrobieller NAD(P)-abhängiger Alkoholdehydrogenasen*. Dissertation, Universität Düsseldorf, 1996.
- [109] L. Tarhan and W. Hummel. Immobilization and characterization of phenylethanol dehydrogenase from *lactobacillus kefir* and its application in a flow-injection analysis system. *Process in Biotechnology*, 30:49–55, 1995.
- [110] C.W. Bradshaw, W. Hummel, and C.-H. Wong. *Lactobacillus kefir* alcohol dehydrogenase: A useful catalyst for synthesis. *Journal of Organic Chemistry*, 57:1532–1536, 1992.
- [111] D. Kihumbu, T. Stillger, W. Hummel, and A. Liese. Enzymatic synthesis of all stereoisomers of 1-phenylpropane-1,2-diol. *Tetrahedron: Asymmetry*, page in press, 2002.
- [112] M. Wolberg, W. Hummel, and M. Müller. Biocatalytic reduction of β,δ -diketo esters: A highly stereoselective approach to all four stereoisomers of a chlorinated β,δ -dihydroxy hexanoate. *Chemistry - A European Journal*, 7(21):4562–4571, 2001.
- [113] M. Wolberg, W. Hummel, C. Wandrey, and M. Müller. Highly regio- and enantioselective reduction of 3,5-dioxocarboxylates. *Angewandte Chemie International Edition English*, 39:4306–4308, 2000.
- [114] W. Hummel. *unveröffentlichte Ergebnisse*, 2000.
- [115] G. Birkmayer. *NADH the energizing Coenzyme*. Keats Publishing, Los Angeles, 1998.
- [116] H.K. Chenault and G.M. Whitesides. Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 14:147–197, 1987.

- [117] R. Devaux-Basseguy, A. Bergel, and M. Comtat. Potential applications of nad(p)-dependent oxidoreductases in synthesis: A survey. *Enzyme and Microbial Technology*, 20:248–258, 1997.
- [118] M.D. Leonida. Redox enzymes used in chiral syntheses coupled to coenzyme regeneration. *Current Medicinal Chemistry*, 8:345–369, 2001.
- [119] R. Ruppert, S. Herrmann, and E. Steckhan. Very efficient reduction of nad(p)+ with formate catalysed by cationic rhodium complexes. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, pages 1150–1151, 1988.
- [120] D. Westerhausen, S. Herrmann, W. Hummel, and E. Steckhan. Formiatgetriebene, nicht-enzymatische nad(p)h-regeneration bei der durch alkoholdehydrogenasen katalysierten stereoselektiven reduktion von 4-phenyl-2-butanon. *Angewandte Chemie*, 104(11):1496–1501, 1992.
- [121] E. Steckhan, S. Herrmann, R. Ruppert, J. Thömmes, and C. Wandrey. Kontinuierliche erzeugung von nadh aus nad und formiat mit einem molekulargewichtsvergrößerten homogenkatalysator in einem membranreaktor. *Angewandte Chemie*, 104(4):445–447, 1990.
- [122] A.J. Fry, S.B. Sobolov, M.D. Leonida, and K.I. Voivodov. Electroenzymatic synthesis (regeneration of nadh coenzyme): Use of nafion ion exchange films for immobilization of enzyme and redox mediator. *Tetrahedron Letters*, 35(31):5607–5610, 1994.
- [123] W. Hummel and M.-R. Kula. Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *European Journal of Biochemistry*, 184:1–13, 1989.
- [124] W. Hummel. Large-scale applications of nad(p)-dependent oxidoreductases: recent developments. *TIBTECH*, 17:487–492, 1999.
- [125] T. Stillger, M. Bönitz, M. Villela Filho, and A. Liese. Überwindung von thermodynamischen limitierungen in substratgekoppelten cofaktorregenerierungsverfahren. *Chemie Ingenieur Technik*, 74(7):1035–1039, 2002.
- [126] K. Seelbach, B. Riebel, W. Hummel, M.-R. Kula, V.I. Tishkov, A.M. Egorov, C. Wandrey, and U. Kragl. A novel, efficient regenerating method of nadph using a new formate dehydrogenase. *Tetrahedron Letters*, 37(9):1377–1380, 1996.
- [127] V.I. Tishkov, A.D. Matorin, A.M. Rojkova, V.V. Fedorchuk, P.A. Savitsky, L.A. Dementieva, V.S. Lamzin, A.V. Mezentzev, and V.O. Popov. Site-directed mutagenesis of the formate dehydrogenase active centre: role of the his332-gln313 pair in enzyme catalysis. *FEBS Letters*, 390:104–108, 1996.

- [128] S. Suje and S. Yokoyama. Nadph production from nadp⁺ using malic enzyme of *achromobacter parvulus* ifo-13182. *Enzyme and Microbial Technology*, 7:418–424, 1985.
- [129] M. Kataoka, Y. Nomura, S. Shimizu, and H. Yamada. Enzymes involved in the nadph regeneration system coupled with asymmetric reduction of carbonyl compounds in microorganisms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 56(5):820–821, 1992.
- [130] J.C. De Man, M. Rogosa, and M.E. Sharpe. Medium for the cultivation of *lactobacilli*. *Journal of Applied Bacteriology*, 23:130–135, 1960.
- [131] C.J. Saloff-Coste. Lactic acid bacteria. *Danone World Newsletter*, 5, 1994.
- [132] S. Arrhenius. Über die reaktionsgeschwindigkeit bei der inversion von rohrzucker durch säuren. *Zeitschrift für physikalische Chemie*, 4:226–248, 1889.
- [133] A.K. Buchholz. *Quantifizierung intrazellulärer Metabolitdynamiken zur Untersuchung mikrobieller Stoffwechselnetzwerke*. Dissertation, Universität Bonn, 2002.
- [134] M. Schmitz. *Entwicklung analytischer Methoden zur Quantifizierung ausgewählter Metabolite in Escherichia coli K12*. Diplomarbeit, Universität Bonn, 2000.
- [135] R. Takors. *Persönliche Mitteilung*, 2001.
- [136] J.A. Roels. *Energetics and kinetics in biotechnology*. Elsevier, Amsterdam, 1983.
- [137] M.S. Kharasch. Heats of combustion of organic compounds. *Bureau of Standards Journal of Research*, 2:359–430, 1929.
- [138] W.J. Payne. Energy yields and growth of heterotrophs 1541. *Annual Reviews in Microbiology*, 24:17–52, 1970.
- [139] C. Hellenga. *MACROBAL V2.2*. PhD thesis, TU Delft, 1992.
- [140] J. Altenbach-Rehm and D. Weuster-Botz. Einsatz von fedbatch-schüttelkolben zur bioprozessentwicklung. *Bio World*, 5:22–23, 1996.
- [141] J. Altenbach-Rehm, D. Weuster-Botz, T. Drescher, and C. Wandrey. Fedbatch-schüttelkolbentechnik - werkzeug für die biotechnologische prozeßentwicklung. *Chemie-Ingenieur-Technik*, 68:1432–1436, 1996.
- [142] E.P. Wolfram. *Parallele Substratkontrolle in Bioreaktoren mit geringem Volumen*. Dissertation, Universität München, 2002.

- [143] J. Hagen. *Chemische Reaktionstechnik*. VCH, Weinheim, 1992.
- [144] W.F.H. Sybesma, A.J.J. Straathof, J.A. Jongejan, J.T. Pronk, and J.J. Heijnen. Reductions of 3-oxo esters by baker's yeast : Current status. *Biocatalysis and Biotransformation*, 16:95–134, 1998.
- [145] A. Fishman, M. Eroshov, S.S. Dee-Noor, J. vanMil, U. Cogan, and R. Effenberger. A two-step enzymatic resolution process for large-scale production of (*s*)- and (*r*)-ethyl-3-hydroxybutyrate. *Biotechnology and Bioengineering*, 74(3):256–263, 2001.
- [146] A.J. Blacker and R.A. Holt. Development of a multi-stage chemical and biological process for an optically active intermediate for an anti-glaucoma drug. In A.N. Collins, G.N. Sheldrake, and J. Crosby, editors, *Chirality in Industry II*, pages 245–261. John Wiley & Sons, New York, 1997.
- [147] T. Sato and T. Fujisawa. Stereocontrol in baker's yeast reduction leading to natural product synthesis. *Biocatalysis*, 3:1–15, 1990.
- [148] R. Tanaka, H. Iwata, and M. Ishiguro. Synthesis of 5,6-cis-penems. *Journal of Antibiotics*, 43(12):1608–1610, 1990.
- [149] M. Bucchiarelli, P. Davoli, A. Forni, I. Moretti, and F. Prati. Enantioselective lipase-catalyzed acetylation of β -lactam precursors of carbapenem antibiotics. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transaction I*, pages 2489–2494, 1999.
- [150] K. Mori. A simple synthesis of (*s*)-(+)-sulcatol, the pheromone of *gnathotrichus retusus*, employing baker's yeast for asymmetric reduction. *Tetrahedron*, 37:1341–1342, 1981.
- [151] K. Mori. Synthesis of optically active pheromones. *Tetrahedron*, 45:3233–3298, 1989.
- [152] I. Chin-Joe, P.M. Nelisse, A.J.J. Straathof, J.A. Jongejan, J.T. Pronk, and J.J. Heijnen. Hydrolytic activity in baker's yeast limits the yield of asymmetric 3-oxo ester reduction. *Biotechnology and Bioengineering*, 69(4):370–376, 2000.
- [153] I. Chin-Joe, A.J.J. Straathof, J.T. Pronk, J.A. Jongejan, and J.J. Heijnen. Influence of the ethanol and glucose supply rate on the rate and enantioselectivity of 3-oxo ester reduction by baker's yeast. *Biotechnology and Bioengineering*, 75(1):29–38, 2001.

- [154] W.R. Shieh, A.S. Gopalam, and C.J. Sih. Stereochemical control of yeast reductions. 5. characterization of the oxidoreductases involved in the reduction of β -keto esters. *Journal of the American Chemical Society*, 107:2993–2994, 1985.
- [155] K. Nakamura, S. Kondo, Y. Kawai, N. Nakajima, and A. Ohno. Purification and characterization of α -keto ester reductases from baker's yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2:433–437, 1994.
- [156] J. Heidlas, K. Engel, and R. Tressl. Purification and characterization of two oxidoreductases involved in the enantioselective reduction of 3-oxo, 4-oxo and 5-oxo esters in baker's yeast. *European Journal of Biochemistry*, 172:633–639, 1988.
- [157] J. Heidlas and R. Tressl. Purification and properties of two oxidoreductases catalyzing the enantioselective reduction of diacetyl and other diketones from baker's yeast. *European Journal of Biochemistry*, 188:165–174, 1990.
- [158] J. Heidlas and R. Tressl. Purification and characteritization of a (*r*)-2,3-butanediol dehydrogenase from *saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, 154:267–273, 1990.
- [159] C.S. Chen, B.N. Zhou, G. Girdaukas, W.R. Shieh, F. Vanmiddlesworth, A.S. Gopalan, and C.J. Sih. Stereochemical control of yeast reductions. 2. quantitative treatment of the kinetics of competing enzyme systems for a single substrate. *Bioorganic Chemistry*, 12:98–117, 1984.
- [160] M.-C. Hennion. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 856:3–54, 1999.
- [161] M. Held, S. Panke, H.-P. Kohler, H.-J. Feiten, A. Schmid, and M. Wubbolts. Solid phase extraction for biocatalytic production of toxic compounds. *Bio-World*, 5:3–6, 1999.
- [162] J.T. Vicenzi, M.J. Zmijewski, M.R. Reinhard, B.E. Landen, W.L. Muth, and P.G. Marler. Large-scale stereoselective enzymatic ketone reduction with in situ product removal via polymeric adsorbens resins. *Enzyme and Microbial Technology*, 20:494–499, 1997.
- [163] K. Nakamura, M. Fujii, and Y. Ida. Asymmetric reduction of ketones by *geotrichum candidum* in the presence of amberlite xad, a solid organic solvent. *Journal of the Chemical Society: Perkin Transaction 1*, 20:3205–3211, 2000.

- [164] W.-I. Song, Z.-I. Zhi, and L.-S. Wang. Amberlite xad resin solid-phase extraction coupled on-line to a flow injection approach for the rapid enrichment and determination of phenols in water and waste waters. *Talanta*, 44:1423–1433, 1997.
- [165] E. Treybal. *Liquid Extraction*. McGraw-Hill, New York, 2nd edition, 1963.
- [166] D. Maaß. *Prozeßentwicklung zur simultanen Produktabtrennung von L-Phenylalanin*. Dissertation, Technische Universität Berlin, 2001.
- [167] N. Brinkmann. *Polymerunterstützte Synthese von Oligosacchariden in homogener flüssiger Phase*. Dissertation, Universität Bonn, 2002.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 1999 bis September 2002 am Lehrstuhl für Biotechnologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Prof. Dr. C. Wandrey angefertigt. Die praktischen Arbeiten wurden am Institut für Biotechnologie 2 der Forschungszentrum Jülich GmbH durchgeführt.

Mein Dank gilt :

- Herrn Prof. Dr. C. Wandrey für die Betreuung dieser Arbeit, die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut für Biotechnologie 2 der Forschungszentrum Jülich GmbH sowie für die vielen interessanten Diskussionen und Anregungen.
- Herrn Prof. Dr. H. Wamhoff für die freundliche Übernahme der Koreferates.
- Herrn Dr. A. Liese für die vielen umtriebigen Diskussionen und Anregungen sowie für die Durchsicht der Arbeit.
- Herrn Dr. T. Daussmann, Herrn Dipl.-Ing. T. Kalthoff und Herrn Dipl.-Ing. R. Feldmann, Juelich Fine Chemicals GmbH, Jülich, für die sehr gute und reibungslose Zusammenarbeit im “Diol“-Projekt sowie für das immer offene Ohr und die Diskussionsbereitschaft bei allen Problemen.
- Herrn Dr. W. Hummel, Institut für Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, für die gute Zusammenarbeit im “Diol“-Projekt.
- Herrn Dipl.-Chem. F. Schneider und Frau Dipl.-Chem. A. Weckbecker, Institut für Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für die gute Zusammenarbeit und Hilfe bei der Proteinidentifizierung.
- Frau U. Mackfeld, Frau H. Offermann und Herrn M. Lievre für die enthusiastische Unterstützung bei der Laborarbeit.
- Herrn Dipl.-Chem. L. Greiner und Frau Dipl.-Chem. I. Schröder für das Durchsehen der Arbeit und den immer offen geführten Diskussionen zu allen Aspekten meiner Arbeit.
- Allen Mitgliedern der Enzymgruppe für das gute Arbeitsklima und den Spaß bei der Arbeit und allen anderen Aktivitäten.
- Frau Prof. Dr. D. Vasic-Racki und Herrn Dr. N. Rao für das Interesse am Fortgang der Arbeiten in den viel zu kurzen Zeiten, in denen sie in Jülich weilten.

- Herrn Prof. Dr. J.J. Heijnen und Dr. A. Straathof, Kluyver Laboratorium für Biotechnologie der Technischen Universität Delft, Niederlande, für die freundlichen und immer sehr hilfreichen Diskussionen zur Realisierung der kontinuierlichen Ganzzellbiotransformation mit Bäckerhefe.
- Frau Dr. I. Chin-Joe für die tolle Zusammenarbeit in Jülich und den geglückten Versuch mit Bäckerhefe statt Bier und Brot herzustellen, spannende Ganzzellbiotransformationen durchzuführen.
- Allen Damen und Herren der Werkstätten für die hervorragende Unterstützung in allen Bereichen.
- Der Glaswerkstatt für wahre Wunder bei der Realisierung der Extraktionskolonne.
- Allen Mitgliedern des Instituts für das gute Arbeitsklima.
- Meinen Eltern und meiner Schwester Stefanie für die Hilfe in allen Lebenslagen während der Zeit meines Studiums bis heute.
- Meiner Frau Petra dafür, daß sie mich trotz der turbulenten Jahre immer unterstützt hat.
- Natürlich auch allen, die hier nicht namentlich genannt sind.

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Jül-4059
Mai 2003
ISSN 0944-2952