

Technische Universität Hamburg-Harburg

ENTWICKLUNG EINES BIODKATALYTISCHEN VERFAHRENS ZUR
ASYMMETRISCHEN PRODUKTION VON ALKOHOLEN

Katja Goldberg
2010

Entwicklung eines biokatalytischen Verfahrens zur
asymmetrischen Produktion von Alkoholen

Vom Promotionsausschuss der
Technischen Universität Hamburg-Harburg
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Dissertation

von
Katja Goldberg

aus
Rheine

2010

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom April 2005 bis April 2010 am Institut für Biochemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster und am Institut für Technische Biokatalyse der Technischen Universität Hamburg-Harburg angefertigt.

Vorsitzender des Prüfungsausschusses:

Prof. Dr.-Ing. F. Keil

1. Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. A. Liese

2. Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. G. Antranikian

Tag der mündlichen Prüfung:

9. April 2010

Für Markus

Veröffentlichungen

M. Neumann, K. Goldberg, S. Kara, J. Müller, A. Liese (2010) *Online monitoring of biotransformations in aqueous, organic and solvent-free media by FT-IR spectroscopy and chemometrics*. Eingereicht.

F. R. P. Oliveira, K. Goldberg, A. Liese, B. Hitzmann (2008) *Chemometric modelling for process analyzers using just a single calibration sample*. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 94: 118-122.

K. Goldberg, A. Krueger, T. Meinhardt, W. Kroutil, B. Mautner, A. Liese (2008) *Novel immobilization routes for the covalent binding of an alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus ruber* DSM 44541*. *Tetrahedron: Asymmetry* 19: 1171-1173.

K. Goldberg, K. Schroer, S. Lütz, A. Liese (2007) *Biocatalytic ketone reduction—a powerful tool for the production of chiral alcohols—part I: processes with isolated enzymes*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76: 237-248.

K. Goldberg, K. Schroer, S. Lütz, A. Liese (2007) *Biocatalytic ketone reduction—a powerful tool for the production of chiral alcohols—part II: whole-cell reductions*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76: 249-255.

K. Goldberg, K. Edegger, W. Kroutil, A. Liese (2006) *Overcoming the thermodynamic limitation in asymmetric hydrogen transfer reactions catalyzed by whole cells*. *Biotechnology and Bioengineering* 95: 192-198.

Patent

Verfahren zur Auftrennung von Alkohol-Keton-Gemischen zum Patent beim Deutschen Patent- und Markenamt angemeldet. Angemeldet durch die Süd-Chemie AG .

Poster

European BioPerspectives, DECHEMA, Hannover (07.10.-09.10.2008)

K. Goldberg, A. Krueger, T. Meinhardt, W. Kroutil, B. Mautner, A. Liese

Covalent immobilization of an alcohol dehydrogenase on novel carrier materials.

4th International Congress on Biocatalysis, Hamburg (31.08.-04.09.2008)

K. Goldberg, A. Krueger, T. Meinhardt, W. Kroutil, B. Mautner, A. Liese

Amino-functionalized enzyme carriers for alcohol dehydrogenase immobilization.

European BioPerspectives, DECHEMA, Köln (30.05.-01.06.2007)

K. Goldberg, W. Kroutil, A. Liese

Procedural approach for the thermodynamic limitation in alcohol dehydrogenase-catalyzed biotransformations.

3rd International Congress on Biocatalysis, Hamburg (03.09.-07.09.2006)

K. Goldberg, T. Scheper, J. Gross, A. Liese

The influence of nicotinamide cofactors on asymmetric biocatalytic hydrogen transfer reactions.

From μL to m^3 Strategies in Bioprocess Development, DECHEMA, Hamburg (28.03.-29.03.2006)

K. Goldberg, K. Edegger, W. Kroutil, A. Liese

Procedural development of alcohol dehydrogenase-catalyzed biotransformations.

1st International Symposium on Biothermodynamics, DECHEMA, Frankfurt (16.02.-17.02.2006)

K. Goldberg, K. Edegger, W. Kroutil, A. Liese

Overcoming thermodynamic limitations in alcohol dehydrogenase-catalyzed biotransformations.

Vorträge

Mini-Symposium on Technical Biocatalysis, Hamburg (18.06.2007)

K. Goldberg, A. Liese

Recent Advances in Biocatalytic Redoxreactions.

Danksagung

Ich bedanke mich recht herzlich bei Prof. Andreas Liese für die Bereitstellung des interessanten Themas, die stete Diskussionsbereitschaft und konstruktive Unterstützung während dieser Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Ulrike, die immer ein offenes Ohr für mich hatte und mich bei allen organisatorischen Dingen unterstützt hat.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Technische Biokatalyse für das angenehme Arbeitsklima und die intensive Zusammenarbeit bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Garabed Antranikian für die Übernahme des Co-Lektorates und bei Prof. Frerich Keil in seiner Funktion als Prüfungsvorsitzender.

Marco danke ich für die Korrektur dieser Arbeit und die schönen Abende im Forsthaus.

Vielen Dank auch meinen Bürokollegen Nils und Simon für viele Diskussionen, die oftmals über den üblichen Bürosmalltalk hinausgingen. Vielen Dank Nils für deine vielen kleinen Anekdoten.

Lutz und Sebastian möchte ich danken für viele anregende Diskussionen und das Aufwerfen neuer Denkanstöße.

Ich bedanke mich bei meinem Nachfolger Paul für sein großes Interesse und wünsche ihm viel Erfolg für seine Dissertation. Vielen Dank auch für das Aufnehmen der sehr gelungenen Partikel-Fotos.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Ana Gabriela, Selin, Ulrike, Patrick, Jakob, Simon, Ruslan, Nils, Marco, Paul, Sebastian, Lutz, Rudi, Maryam, Benjamin, Britta, Dennis, Martin, Bastian, Hendrich und allen anderen für die gute Zusammenarbeit und die vielen gemeinsamen Unternehmungen.

Besonderer Dank gilt auch Prof. Wolfgang Kroutil vom Institut für Chemie der Universität Graz für die Bereitstellung des Katalysatorsystems und den hilfreichen Diskussionen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Dr. Ulrich Sohling von der Süd-Chemie AG für die Bereitstellung der Adsorptionsmaterialien und dem intensiven Meinungsaustausch.

Prof. Bernd Hitzmann und Prof. Thomas Scheper vom Institut für Technische Chemie der Universität Hannover danke ich für die Unterstützung und Kooperation beim Einsatz der 2D-Fluoreszenz-spektroskopie.

Bei Prof. Anke Krüger vom Institut für Organische Chemie der Universität Kiel möchte ich mich für die Bereitstellung der Nanodiamanten bedanken.

Vielen Dank an Kirsten Schroer und Dr. Stephan Lütz vom Forschungszentrum Jülich für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei der Erstellung der Reviews.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Praktikanten bedanken, die mich bei der Ausführung der praktischen Arbeiten unterstützt haben.

Besonders danke ich meinen Eltern für die stete Unterstützung während und vor dieser Arbeit.

Und schließlich möchte ich mich bei meinem Mann Markus bedanken, der sich auf das "Abenteuer" Hamburg eingelassen und mich in der ganzen Zeit so liebevoll unterstützt hat.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Synthese chiraler Alkohole	2
1.1.1. Chemische Verfahren zur Herstellung chiraler Alkohole	3
1.1.2. Biokatalytische Verfahren zur Herstellung chiraler Alkohole.....	4
1.2. Biotechnologische Verfahrensentwicklung	7
1.2.1. Charakterisierung des Biokatalysators	8
1.2.2. Optimierung der Reaktionsbedingungen	14
1.2.3. Wahl des Reaktors	15
2. Zielsetzung	19
3. Katalysator	21
3.1. Eigenschaften der ADH-'A'.....	21
3.2. Kinetische Charakterisierung.....	23
3.3. Immobilisierung.....	27
3.3.1. Amino-funktionalisierte Träger	27
3.3.2. Epoxy-funktionalisierte Träger	33
3.4. Stabilität.....	34
3.4.1. Lagerstabilität der ADH-'A'	34
3.4.2. Prozessstabilität der ADH-'A'	35
3.4.3. Prozessstabilität der immobilisierten ADH-'A'	36
3.5. Fazit	39
4. Reaktion	41
4.1. Wahl der Substrate.....	42
4.2. Synthese von Referenzverbindungen.....	42
4.3. <i>In-situ</i> Produktabtrennung	43
4.4. Produktabtrennung durch Adsorption	45
4.5. Charakterisierung der Adsorption	45
4.5.1. Acetophenon / Phenylethanol-Adsorption	47
4.5.2. 2-Acetylfuran / 2-(1-Hydroxyethyl)furan-Adsorption.....	48
4.5.3. Hexandion / Hexandiol-Adsorption.....	49
4.5.4. Kontinuierliche Adsorption in einem Festbett	50
4.5.5. Desorption der abgetrennten Verbindungen.....	50
4.5.6. Kompatibilität des adsorptiven Verfahrens.....	51
4.5.7. Adsorption aus Essigsäureethylester.....	53
4.6. Coproduktabtrennung.....	55
4.6.1. ISPR von Aceton.....	55
4.6.2. ISPR von 2-Propanol	56
4.6.3. Schaumproblematik.....	56
4.7. Fazit	57

5. Analytik	59
5.1. Wahl der <i>online</i> -Methode	60
5.2. ¹ H-NMR-Spektroskopie	60
5.2.1. Stand der Forschung	61
5.2.2. Reduktion von Acetophenon	61
5.2.3. Reduktion von Acetylfuran	62
5.2.4. Fazit	63
5.3. Fluoreszenz-Spektroskopie	64
5.3.1. Multivariate Datenanalyse	65
5.3.2. Reduktion von Acetophenon	66
5.3.3. Fazit	67
5.4. FTIR-Spektroskopie	67
5.4.1. Durchführung der Messungen	68
5.4.2. Reduktion von Acetophenon	70
5.4.3. Fazit	72
6. Reaktor	73
6.1. Charakterisierung des Reaktors	73
6.2. Setup des Reaktors	74
6.3. Simulation der kontinuierlichen Produktion	75
6.4. Kontinuierliche Reduktion von Acetophenon	76
6.4.1. Optimierung der Reaktionsbedingungen: Teil 1	78
6.4.2. Optimierung der Reaktionsbedingungen: Teil 2	79
6.5. Fazit	80
7. Diskussion	83
7.1. Leistung	83
7.2. Optimierung	84
7.3. Maßstabsvergrößerung	87
7.4. Produktaufarbeitung	89
7.5. Wirtschaftlichkeit	89
7.6. Fazit	91
8. Zusammenfassung	93
9. Material und Methoden	97
9.1. Biokatalysatoren, Chemikalien und Partikel	97
9.2. Geräte	98
9.3. Synthese von Referenzverbindungen und Substraten	101
9.3.1. Synthese heteroaromatischer Alkohole	101
9.3.2. Synthese von <i>meso</i> -2,5-Hexandiol	102
9.4. Partielle Reinigung und Charakterisierung der Alkohol Dehydrogenase	103
9.4.1. Zellaufschluss und partielle Reinigung	103
9.4.2. Proteingehaltsbestimmung nach Bradford	103
9.4.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese	103

9.4.4.	Standardaktivitätsassays	104
9.5.	Immobilisierung der ADH-'A'	105
9.5.1.	Amino-funktionalisierte Träger	105
9.5.2.	Epoxy-funktionalisierte Träger	107
9.5.3.	Adsorptive Immobilisierung	107
9.6.	Adsorptive <i>in-situ</i> Produktabtrennung.....	108
9.6.1.	Amberlite® XAD-2, XAD-4, XAD-7HP, Supelite™ DAX-8.....	108
9.6.2.	Disintex™ 75	110
9.6.3.	Smektische Schichtsilikate.....	110
9.6.4.	γ -Aluminiumoxid und Alumosilicat.....	110
9.7.	Stabilität von NADH	111
9.8.	Umsetzungen im Satzreaktor	111
9.8.1.	Satzreaktorversuche mit <i>in-situ</i> Coproduktabtrennung.....	111
9.8.2.	Satzreaktorversuche mit integrierter <i>online</i> Analytik	112
9.8.3.	Satzreaktorversuche in Toluol mit immobilisierter ADH-'A'.....	113
9.9.	Kontinuierliche Reaktionsführung.....	114
9.9.1.	Umsetzung im kontinuierlich betriebenen Satzreaktor (CSTR).....	114
9.9.2.	Umsetzung im Enzym-Membran-Reaktor (EMR)	114
Anhang		
A	Chromatogramme	119
A.1	Gaschromatographie	119
A.2	Flüssigkeitschromatographie.....	122
B	Stabilität Katalysatorformulierungen	123
C	Übersicht der Gesamtkinetik.....	125
D	Definition der Kennzahlen.....	127
E	MATLAB-Skripte.....	129
E.1	Bestimmung kinetischer Parameter	129
E.2	Simulation von Umsetzungen.....	130
E.3	Chemometrische Auswertung.....	132
F	Abkürzungsverzeichnis	133
G	Abbildungsverzeichnis.....	135
H	Tabellenverzeichnis	139
I	Literaturverzeichnis.....	141

1. Einleitung

In der weißen Biotechnologie werden Chemie, Biochemie, Biologie und Verfahrenstechnik kombiniert, um effektive Syntheseverfahren für Wertstoffe zu entwickeln. Die Verwendung von Organismen oder deren Bestandteile ermöglicht die hoch selektive Darstellung von Produkten in umweltfreundlichen Prozessen. Eine Vielzahl von Fortschritten in der Biochemie bezüglich der Aufklärung biologischer Systeme und ihrer Steuerungs- und Regulationsmechanismen verbessert die Verfügbarkeit von Biokatalysatoren und ermöglicht so ein starkes Ansteigen der Anzahl biotechnologischer Verfahren in der chemischen Industrie [Hilterhaus 2007, Liese 2006].

Eine besondere Stellung nimmt die Gruppe der chiralen Wirkstoffe ein. Die unterschiedliche physiologische Aktivität verschiedener Enantiomere ist durch die Wechselwirkung der Wirkstoffe mit chiralen Bestandteile lebender Systeme wie zum Beispiel DNA, Enzyme, Hormone oder Antikörper gegeben. In der Regel zeigt nur ein Enantiomer die gewünschte pharmazeutische Aktivität, während das andere Enantiomer wirkungslos bleibt oder Nebenwirkungen verursachen kann. Aus diesem Grund wird heutzutage die Einführung neuer chiraler Wirkstoffe durch Vorschriften der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA), des European Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) oder des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) reguliert. Vor der Zulassung muss die physiologische Wirkung jedes Enantiomers eines Pharmawirkstoffs daher einzeln charakterisiert werden. Heutzutage werden etwa 80 % der Wirkstoffe im Sortiment von Pharmafirmen in enantiomerenreiner Form hergestellt [Breuer 2004].

Die Biotechnologie und insbesondere die Chemo-, Regio- und Enantioselektivität biokatalytischer Verfahren wird für die Herstellung einer Vielzahl von Produkten eingesetzt. Mögliche Anwendungsfelder sind die Substitution fossiler Energieträger durch Produkte wie Biodiesel, die Produktion von Enzymen für pharmazeutische Anwendungen, als Waschmittelzusatz oder das biotechnologische Bleichen von Textilien, Leder oder Papier. Des Weiteren können mehrstufige Synthesen komplexer Moleküle wie Vitamine oder Hormone durch biokatalytische Verfahren vereinfacht werden. Beispiele sind hier die Synthese von *L-tert*-Leucin als Futtermittelzusatz und Geschmacksverstärker (*Evonik Industries AG*) [Menzel 2004], *L*-Cystein als Aromaverstärker und für kosmetische Anwendungen (*Wacker Chemie AG*) [Winterhalter 1998] oder etwa Vitamin B2 als Zusatz in Lebensmitteln (*BASF SE*) [Karos 2001].

Neben der direkten Produktion von Wirkstoffen können enzymatische Prozesse zur Herstellung optisch aktiver Substanzen als Vorstufen bzw. Bausteine für komplexere Moleküle eingesetzt werden, sogenannte *Building Blocks*. Dabei werden insbesondere optisch aktive sekundäre Alkohole für die Einführung chiraler Informationen in Zielverbindungen wie chemische Katalysatoren, Flüssigkristalle, Agrochemikalien oder pharmazeutische Wirkstoffe verwendet [Daußmann 2006]. Beispiele für derartige Zielverbindungen sind der in der asymmetrischen Hydrierung von α,β -ungesättigten Aminosäuren eingesetzte DuPhosTM-Ligand [Burk 1993], das Tuberkulose Arzneimittel Cucubalol [Cheng 2002], der anti-HIV Wirkstoff PNU-142721 [Wishka 1998] oder der Entzündungshemmer Fenlenton für Haustiere [Thomas 1997]. Alle genannten Beispiele kön-

nen ausgehend von einfachen chiralen Alkoholen wie Hexandiol oder Pyridinylethanol hergestellt werden.

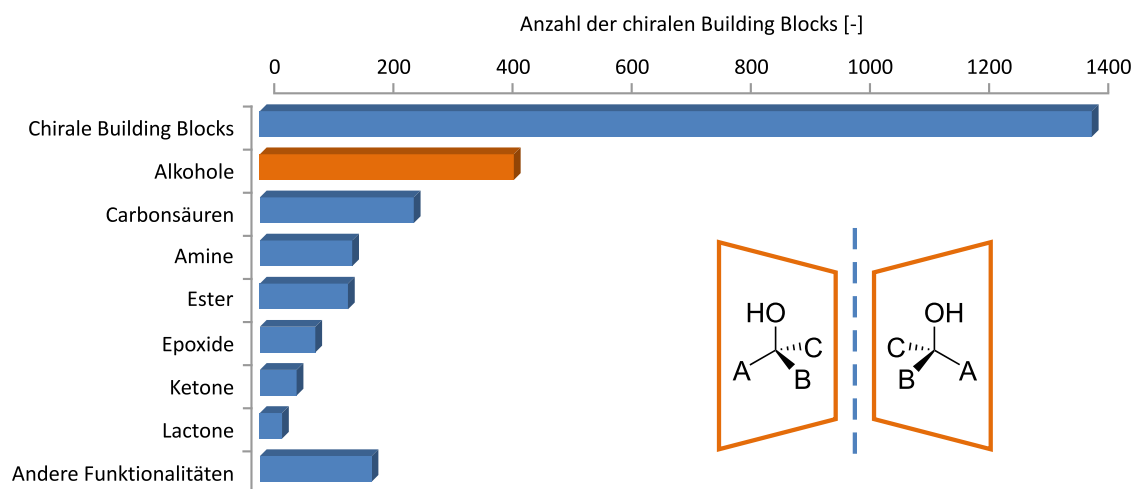


Abbildung 1.1: Anteil der Alkohole in der Produktgruppe chirale *Building Blocks* bei *Sigma-Aldrich Co.*

Viele Firmen haben ihr Produktportfolio in den letzten Jahren im Bereich niedermolekularer, optisch aktiver Alkohole erweitert, die in der Regel über asymmetrische Synthese mit Bio- oder Chemokatalysatoren hergestellt werden. Bei großen Chemikalienlieferanten wie *Sigma-Aldrich Co.* haben chirale Alkohole den größten Anteil an der Gruppe der chiralen *Building Blocks* (Abbildung 1.1). In diesem Fall nehmen chirale Alkohole 30 % der insgesamt 1386 Verbindungen ein¹.

1.1. Synthese chiraler Alkohole

Die Produktion chiraler Alkohole kann im Allgemeinen in verschiedenen Verfahren verwirklicht werden. Zum Einen kann auf den "Chiral Pool" zurückgegriffen werden. Natürliche, chirale Verbindungen wie Aminosäuren, Weinsäure, Milchsäure, Kohlenhydrate, Terpene oder Alkaloide können in diesem Fall als Substrat eingesetzt werden. Eine weitere Methode ist die unselektive Herstellung des Zielmoleküls mit anschließender Auftrennung des vorliegenden Racemates über physikalische Methoden wie Diastereomeren-Kristallisation oder Chromatographie. Derartige Verfahren sind im Vergleich recht aufwendig, wurden aber in der Vergangenheit auch im industriellen Maßstab zum Beispiel in der Synthese der nicht-proteinogenen α -Aminosäure L-Dopa eingesetzt (*Hoffman-LaRoche*) [Knowles 2002]. Die Verwendung chiraler Auxiliare oder die asymmetrische Synthese in chiralen Lösungsmitteln ist eine weitere Möglichkeit, ist jedoch in den meisten Fällen auf den Labormaßstab begrenzt [Gnas 2006, Reichardt 2003].

Die direkte asymmetrische katalytische Synthese optisch aktiver Verbindungen ist die Methode mit den meisten Vorteilen. Eine geringe Menge an chiraler Information in Form des chemischen oder biologischen Katalysators wird in eine große Menge eines chiralen Produktes umgesetzt.

¹ Abfrage des Online-Kataloges am 24. Januar 2010.
<http://www.sigmaaldrich.com/chemistry/chemistry-products.html?TablePage=16273952>

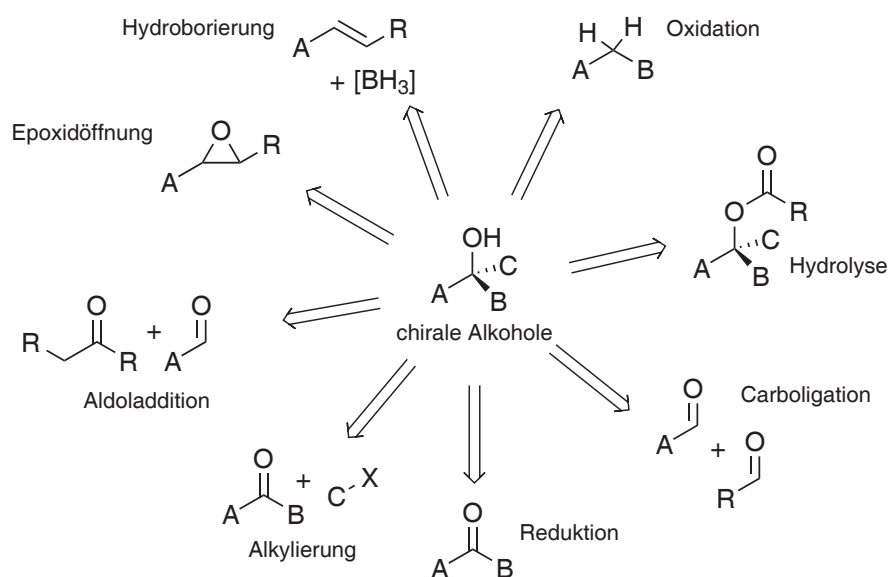


Abbildung 1.2: Retrosynthetische Analyse chiraler Alkohole.

Im Folgenden werden etablierte chemokatalytische und biokatalytische Methoden zur Darstellung chiraler Alkohole im Detail besprochen. Einen ersten Überblick gibt die retrosynthetische Analyse (Abbildung 1.2).

1.1.1. Chemische Verfahren zur Herstellung chiraler Alkohole

In der Literatur wird eine Vielzahl chemischer Verfahren zur Herstellung chiraler Alkohole beschrieben. Die retrosynthetische Analyse (Abbildung 1.2) zeigt eine Reihe von Synthesemöglichkeiten ausgehend von prochiralen Ketonen, Epoxiden, Alkenen, Aldehyden, Alkanen oder Estern. Die asymmetrische Reduktion von Ketonen zu sekundären Alkoholen ist vielleicht die offensichtlichste Methode. Durch die Addition von Wasserstoff an die Carbonyl-Doppelbindung wird das Produkt erhalten. Klassisch entspricht diese Reaktion einer Transferhydrierung, bekannt seit über 80 Jahren als *Meerwein-Ponndorf-Verley* Reduktion [Meerwein 1925, Ponndorf 1926, Verley 1925]. Als Reduktionsmittel wird in den meisten Fällen 2-Propanol verwendet, dabei wird formal ein Hydrid vom 2-Propanol auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Ketons übertragen. Als Katalysator können Aluminium- und Magnesiumalkoholate eingesetzt werden. Bereits 1950 wurden erste asymmetrische Varianten beschrieben. Durch Verwendung chiraler Alkohole wurden Enantioselektivitäten von bis zu 22 % erreicht werden [Doering 1950]. Heutzutage ermöglichen die Kombinationen aus chiralen Diaminliganden mit Ruthenium-, Rhodium- und Iridium-Zentren deutlich höhere Selektivitäten [Ikariya 2007]. Neben der Transferhydrierung sind weitere Methoden zur Übertragung von Hydriden auf Carbonylverbindungen etabliert. Bei der *Corey-Bakshi-Shibata* (CBS) Reduktion werden Borane und chirale Oxazaborolodine eingesetzt, um chirale Alkohole mit sehr guten chemischen und optischen Ausbeuten zu erhalten [Corey 1987]. Die direkte Hydrierung von Ketonen mit geeigneten Übergangsmetallkatalysatoren wie Ruthenium-Binaphthylphosphin (BINAP) und Wasserstoff stellt eine weitere Möglichkeit dar [Bakos 1985, Kitamura 1988].

Alternativ zur direkten Reduktion von Ketonen führt die selektive Addition von Alkylgruppen an das Carbonyl-Kohlenstoffatom zu tertiären chiralen Alkoholen [Funabashi 2003]. Darüber hinaus ist die Aldol-Addition von Enolaten an Aldehyde eine weitere Variante zur Darstellung chiraler Alkohole aus achiralen Carbonyl-Verbindungen [Northrup 2002].

Die Oxidation von Alkenen mit Peroxycarbonsäuren führt zu Epoxiden (Oxacyclopropane) die in einer selektiven Ringöffnungsreaktion in Gegenwart von Cobalt-Salen Komplexen zu enantiomerenreinen Alkoholen umgesetzt werden können [Larrow 2003]. Eine weitere Methode zur Umsetzung von Alkenen zu Alkoholen ist die klassische Hydroborierung [Zweifel 1963]. Auch hier können durch Verwendung chiraler Katalysatoren optisch aktive Produkte erhalten werden [Moteki 2006, Lillo 2007].

Viele chemische Verfahren zur Synthese chiraler Alkohole benötigen Übergangsmetalle, aufwändig zu synthetisierende Ligandensysteme und extreme Reaktionsbedingungen. In der Regel werden dabei organische Lösungsmittel als Reaktionsmedium eingesetzt. Diese Lösungsmittel sind klassischerweise die Produkte der Erdölindustrie und damit in ihrer langfristigen Verfügbarkeit begrenzt. Aus all diesen Gründen stellt heute die Anwendung der weißen Biotechnologie eine überzeugende Alternative dar.

1.1.2. Biokatalytische Verfahren zur Herstellung chiraler Alkohole

Die industrielle Produktion chiraler Alkohole kann mit isolierten Enzymen oder ganzen Zellen als Biokatalysator durchgeführt werden. Sie können enzymatisch über Oxidation und Reduktion (Oxidoreduktasen, Enzymklassifikation (EC 1)), Hydrolyse (Hydrolasen, EC 3) oder C-C Verknüpfung von Aldehyden (Lyasen, EC 4) dargestellt werden (Abbildung 1.2).

Hydrolasen (EC 3)

In den meisten enzymatischen industriellen Prozessen werden Hydrolasen eingesetzt [Liese 2006]. Zwischen 1987 und 2004 wurden Hydrolasen in 60 % der veröffentlichten Literatur im Bereich der Biokatalyse behandelt [Faber 2004]. Die Lipasen als Untergruppe (EC 3.1.1.3) der Hydrolasen ermöglichen die Hydrolyse von Carbonsäureestern, bzw. die Veresterung von Alkoholen und Säurederivaten. Weitere Anwendungen finden sich in der Umesterung und in der Produktion von Polymeren [Bommarius 2004]. Die industrielle Anwendbarkeit von Lipasen in der Synthese ergibt sich aus der hohen Selektivität und Stabilität in nicht-konventionellen Medien, wie organischen Lösungsmitteln oder den reinen Substraten [Jaeger 2002, Bornscheuer 2006].

Der Einsatz von Lipasen in der Produktion chiraler Alkohole besteht meist in der kinetischen Racematspaltung eines Enantiomeregemisches (Abbildung 1.3).

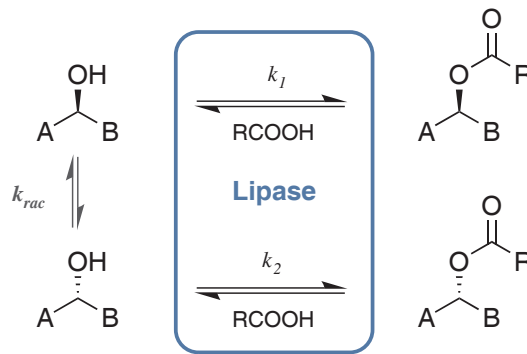


Abbildung 1.3: Schema der (dynamisch) kinetischen Racematspaltung sekundärer Alkohole mit Lipasen.

Bei der kinetischen Racematspaltung wird das eine Enantiomer deutlich schneller umgesetzt als das andere Enantiomer. Es gilt $k_1 \gg k_2$ oder $k_1 \ll k_2$. Aus diesem Grund verändert sich die Enantiomerenreinheit im Laufe der Reaktion, im optimalen Fall wird bei 50 % Umsatz eine optische Reinheit von 100 % erreicht [Kagan 1988]. Eine Weiterentwicklung dieses Verfahrens ist die dynamisch kinetische Racematspaltung. In diesem Fall wird die Substratverbindung *in-situ* mittels chemischer oder biokatalytischer Verfahren racemisiert, für eine technische Anwendung sollte $k_{rac} > 0$ und $k_{rac} > k_1, k_2$ gelten.

Lyasen (EC 4)

Eine Möglichkeit zum direkten Aufbau einer chiralen Hydroxyfunktion ist die Kopplung zweier Aldehyde zu Hydroxyketonen (Abbildung 1.4). Diese Reaktion wird durch Enzyme aus der Gruppe der Lyasen (EC 4) ermöglicht. Viele dieser Enzyme katalysieren in ihrer natürlichen Aktivität die Decarboxylierung von α -Ketosäuren wie u.a. Pyruvat (Brenztraubensäure) oder Benzoylformiat (Phenylglyoxylat). Beispiele sind die Pyruvat Decarboxylase aus *Zymomonas mobilis* (EC 4.1.1.1), die Benzoylformiat Decarboxylase aus *Pseudomonas putida* (EC 4.1.1.7) oder die α -Ketosäure Decarboxylase (EC 4.1.1.72) aus *Lactococcus lactis* [Bruhn 1995, Gonzáles 1989, Demir 1999, Iding 2000]. Um die C-C Kupplungsreaktion durchführen zu können, benötigen diese Enzyme ein zweiwertiges Metallion wie z. B. Magnesium (Mg^{2+}) und Thiamindiphosphat (ThDP, Vitamin B1-diphosphat) als Cofaktor [Kluger 2008]. Thiamindiphosphat reagiert nucleophil mit dem Substrat und aktiviert damit ein Aldehydmolekül.

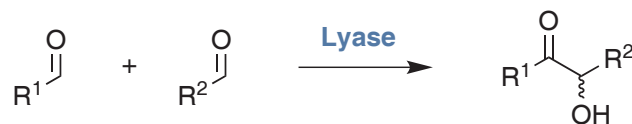


Abbildung 1.4: Lyase-katalysierte C-C Knüpfungsreaktion von Aldehyden.

Auch die Lyasen werden industriell eingesetzt, um chirale Alkohole zu produzieren. Ein Beispiel ist die Synthese von Phenylacetylcarbinol mit einer Pyruvat Decarboxylase aus *Saccharomyces cerevisiae* bei *BASF SE* oder *Malladi Drugs* (Indien) [Cheetham 1994]. Der Biokatalysator wird in Form ganzer Zellen eingesetzt. Die weitere Umsetzung von Phenylacetylcarbinol ergibt Ephedrin-derivate, die in der Asthmatherapie eingesetzt werden.

Oxidoreduktasen (EC 1)

Neben den Hydrolasen sind die Oxidoreduktasen (EC 1) weit verbreitet in der Synthese chiraler Alkohole. Der direkte Aufbau eines Hydroxy-Stereozentrums durch Reduktion von prochiralen Ketonen oder Oxidation von aktivierten oder nicht aktivierten C-H Bindungen ermöglicht im Vergleich zur Hydrolase-katalysierten kinetischen Racematspaltung eine Ausbeute von bis zu 100 %. Monooxygenasen katalysieren Bayer-Villiger Oxidationen, Epoxidierungen, Oxidation von Heteroatomen, sowie aromatische und aliphatische Hydroxylierungen [Flitsch 2002, van Beilen 2003, Urlacher 2007]. Die größte und vielleicht wichtigste Gruppe der hydroxylierenden Monooxygenasen gehören zur Cytochrom P450 Familie, die Häm als prostetische Gruppe enthalten und von β -1,4-Nicotinamadenindinucleotid(phosphat) (NAD(P)) abhängig sind. Ein Beispiel ist die aus *Pseudomonas putida* isolierte Cytochrome P450_{cam} (EC 1.14.15.1). Das natürliche Substrat D-Campher (**1**) wird regio- und stereoselektiv zum 5-exo-Hydroxycampher (**2**) oxidiert (Abbildung 1.5).

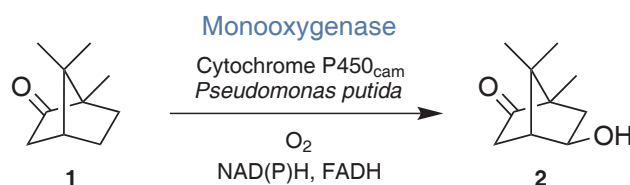


Abbildung 1.5: Monooxygenase-katalysierte Hydroxylierung von D-Campher.

Neben einigen Beispielen zur industriellen Produktion achiraler Alkohole gibt es nur wenige Beispiele für eine Anwendung von Monooxygenasen in der asymmetrischen Synthese. In vielen Fällen wurden geringe Ausbeuten und Selektivitäten berichtet [Urlacher2007].

Den größten Teil der industriell genutzten Oxidoreduktasen nehmen die Alkohol Dehydrogenasen (ADHs, EC 1.1.1.1) ein [Xu 2005, Goldberg 2007a, Liese 2006]. Bei der ADH-katalysierten Reduktion von Ketonen wird formell ein Hydrid vom Cofaktor auf das Carbonylkohlenstoffatom übertragen. Der Cofaktor ist in der Regel NADH oder NADPH. In seltenen Fällen werden Enzymgebundene Cofaktoren der Gruppe der Flavine (FAD) [Walsh 1980] oder Methoxatine (Pyrrolochinolinchinon, PQQ) [McWirter 1990] beschrieben. Durch den hohen Preis der Cofaktoren (z.B. *Sigma-Aldrich Co.*², NAD⁺: 17.8 k€ mol⁻¹ bis zu PQQ: 16.3 M€ mol⁻¹) ist der stöchiometrische Einsatz unökonomisch und daher wurden eine Reihe von Cofaktorregenerierungsverfahren entwickelt [Lee 1985, Chenault 1987, Wichmann 2005, Lütz 2006]. Im Allgemeinen wird die Cofaktorregenerierung parallel zur eigentlichen Produktionsreaktion durchgeführt. Bei Einsatz von ADHs und NAD(P)H können elektrochemische, chemische, photochemische und enzymatische Ansätze verwendet werden. Alternativ können Ganzzellsysteme eingesetzt werden, die den Cofaktor in ihrem Metabolismus wieder regenerieren [Goldberg 2007b, Haberland 2002a]. Eine detaillierte Diskussion der einzelnen Verfahren findet sich in Kapitel 1.2.1.

² Preisabfrage des Online-Kataloges am 24. März 2009, <http://www.sigmaaldrich.com/>
Größte Einheit: NAD⁺: N7004, 25 g, 670,- €/PQQ: D7783, 10 mg, 494,- €.

Eine Vielzahl von Alkohol Dehydrogenasen aus bakteriellen, pflanzlichen oder tierischen Quellen bzw. aus Pilzen werden in der Literatur beschrieben³. Viele dieser ADHs sind sehr gut dokumentiert und zum Teil kommerziell erhältlich, wie z.B. aus Pferdeleber (*Equus caballus*) [Maret 1979, Andersson 1982] oder aus Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) [Drewke 1988, Leskovac 2002]. Nur ein Teil dieser ADHs sind industriell relevant [Liese 2006].

Bei *Codexis* wird das Diketon 2,5-Hexandion mit ganzen Zellen von *Lactobacillus kefir* zu (*R, R*)-2,5-Hexandiol umgesetzt [Hummel 2000, Haberland 2002a, Haberland 2002b]. Das enantiomerenreine Produkt kann in einer Vielzahl von Anwendungen eingesetzt werden, u. a. in der Synthese von chiralen Ligandensystemen [Burk 1991, Burk 1993] oder chiraler Auxiliare für die asymmetrische Induktion bei einer Reihe enantioselektiver Verfahren [Chartrain 2001]. Bei der Wacker Chemie AG wird ein Enzymrohextrakt aus *Lactobacillus brevis* für die asymmetrische Reduktion von β -Ketoestern wie Ethylacetoacetat eingesetzt [Hummel 1999]. Die in *Neurospora crassa* enthaltene ADH wird bei *AstraZeneca GmbH* zur Darstellung eines Intermediates (**4**) der Trusopt® (Dorzolamid, Augentropfenpräparat gegen erhöhten Augeninnendruck, **5**)-Synthese eingesetzt [Blacklock 1993, Holt 1996a, Holt 1996b] (Abbildung 1.6).

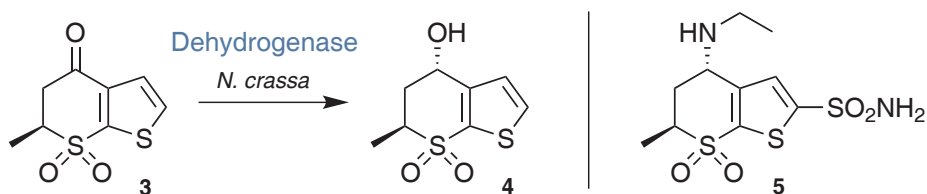


Abbildung 1.6: Anwendung von *N. crassa* in der Synthese von Trusopt®.

1.2. Biotechnologische Verfahrensentwicklung

Die Entwicklung eines biokatalytischen Prozesses gliedert sich in drei große Teile: Charakterisierung des Biokatalysators, Optimierung der Reaktionsbedingungen und Wahl des geeigneten Reaktortyps [Kragl 1999, Biselli 2002] (Abbildung 1.7). Als Maß für die Effizienz des geplanten Prozesses können Umsatz, Zykluszahl (*TTN*, total turnover number) und Raum-Zeit Ausbeute (*RZA*) betrachtet werden.

³ BRENDA (Braunschweig Enzyme Database), <http://www.brenda-enzymes.info/>, [Chang 2008].

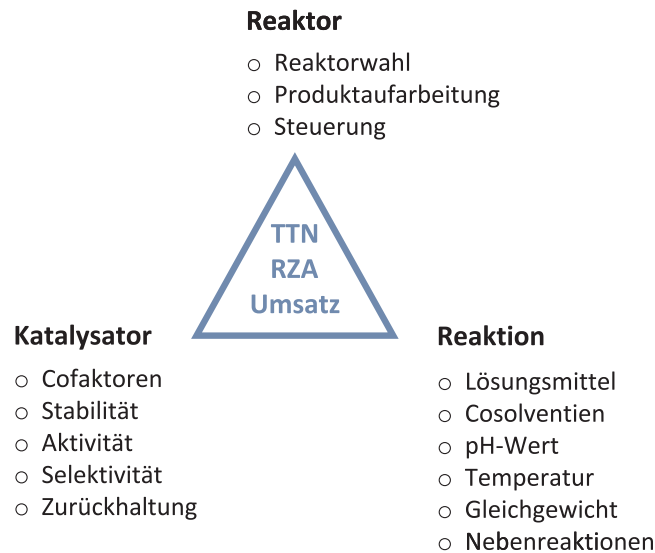


Abbildung 1.7: Schema der Verfahrensentwicklung biokatalytischer Prozesse.

1.2.1. Charakterisierung des Biokatalysators

Die Wahl eines Enzyms für einen Prozess zur Herstellung chiraler Alkohole ist der erste Schritt in der Charakterisierung des Biokatalysators. Bei der vorliegenden Arbeit stand durch den Kooperationspartner *Prof. Wolfgang Kroutil* eine Alkohol Dehydrogenase (EC 1.1.1.1) zur Verfügung (siehe Kapitel 3). Bei der Verwendung von Oxidoreduktasen ist vor allem die Wahl des Cofaktors, bzw. die Wahl einer geeigneten Cofaktorregenerierungsmethode elementar. Die genaue Kenntnis von Stabilität, Aktivität und Selektivität des Biokatalysators ermöglicht die Verwendung der optimalen Reaktionsbedingungen wie Temperatur, pH-Wert oder auch Substratkonzentrationen oder Reaktorkonfiguration. Eine Rückhaltung des Biokatalysators in einem kontinuierlichen Prozess über Membranen, Immobilisierung oder durch Verwendung ganzer Zellen erlaubt die mehrfache Verwendung des Katalysators und führt auf diese Weise zu einem effizienteren Verfahren. Im Folgenden sollen diese Punkte im Detail erläutert werden.

1.2.1.1. Cofaktorregenerierung

Wie bereits in Kapitel 1.1.2 erwähnt, können Nicotinamiddinucleotid-Cofaktoren über elektrochemische, chemische, photochemische und enzymatische Ansätze regeneriert werden.

Elektrochemische Cofaktorregenerierung

Die Reduktion von Ketonen zu Alkoholen bzw. der entsprechenden Oxidation des Cofaktors entspricht dem einfachen Transfer von Elektronen. Der Einsatz elektrochemischer Methoden zur Regenerierung bietet sich daher an. Die direkte Reduktion des Cofaktors an einer Kathode bewirkt allerdings häufig geringe Selektivitäten oder Nebenreaktionen. Die Versorgung der Elektrode mit Elektronen ist in der Regel deutlich schneller als die Regenerationsreaktion und führt damit zu Überpotentialen [Simon 1985, Biade 1992, Hollmann 2004]. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, ist die Verwendung von organischen oder metallorganischen Verbindun-

gen zum Transfer der Elektronen von Elektrode zu Cofaktor [Steckhan 1990, 1991, Schröder 2003, Hollmann 2006].

Chemische Cofaktorregenerierung

Bei der chemischen Regenerierung werden Elektronen von einfachen Reduktionsmitteln auf den Cofaktor übertragen und während der Reaktion stöchiometrisch verbraucht [Lütz 2006]. Ein älteres Beispiel ist das anorganische Salz Natriumdithionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), welches zwar eine sehr einfache Handhabung erlaubt, aber bei höheren Konzentrationen zur Desaktivierung des jeweiligen Enzyms führt [Raunio 1971, Jones 1972]. Ein alternatives und im Vergleich sehr günstiges Reduktionsmittel ist Wasserstoff. Mit Hilfe von Übergangsmetallkomplexen mit Rhodium-, Ruthenium- oder Platin-Zentren können die Reduktionsequivalente auf den entsprechenden Cofaktor übertragen werden [Abril 1982, Wagenknecht 2003].

Photochemische Cofaktorregenerierung

Für die photochemische Regenerierung von Nicotinamiddinucleotiden werden nur wenige Beispiele beschrieben. Beispiele für Verbindungen, die von Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden, sind homogene Ruthenium- oder Zink-Komplexe, Farbstoffe wie Methyleneblau oder Kolloide wie Cadmiumsulfid oder Titandioxid [Willner 1990, Rickus 2002, Julliard 2004]. Die auf diese Weise gewonnenen Elektronen werden mit gängigen Elektronentransportern auf den Cofaktor übertragen.

Enzymatische Cofaktorregenerierung

Die offensichtlichste Methode zur Regenerierung von enzymatischen Cofaktoren ist der Einsatz von Enzymen. Die Durchführung einer parallelen, Cofaktor-abhängigen Reaktion mit entgegengesetzter Redox-Richtung ermöglicht den Transfer von Elektronen von einem günstigen Cosubstrat auf die Produktionsreaktion (Abbildung 1.8). Es können zwei verschiedenen Ansätze unterschieden werden: Enzym-gekoppelte und Substrat-gekoppelte Cofaktorregenerierung. Bei der Enzym-gekoppelten Cofaktorregenerierung wird ein zweites Enzym in das System eingebracht, während bei der Substrat-gekoppelten Cofaktorregenerierung das Produktionsenzym Substrat und Cosubstrat umsetzt.

Eine Vielzahl von Enzymen können in der Enzym-gekoppelten Cofaktorregenerierung eingesetzt werden. Im Folgenden sollen nur einige Beispiele besprochen werden.

Die Umsetzung von Formiat zu Kohlendioxid mittels Formiat Dehydrogenase (FDH, EC 1.2.1.2) ist eine weit verbreitete Methode zur Regenerierung von NAD(P)H [Hummel 1989, Seelbach 1996, Tishkov 1999]. Das Gleichgewicht liegt deutlich auf Seite des entstehenden Kohlendioxids, so dass die Reaktion annähernd irreversibel ist. Die FDH aus *Candida boidinii* wird in der industriellen Produktion von *L-tert*-Leucin verwendet [Bommarius 1995]. Die Veränderung des pH-Wertes im Verlauf der Reaktion kann zu einer Inhibierung des Enzyms führen [Nidetzky 1996]. Dieses kann durch die Anwendung eines Fed-Batch Verfahrens oder durch Einstellung des pH-Wertes durch Titration überwunden werden [Neuhauser 1998].

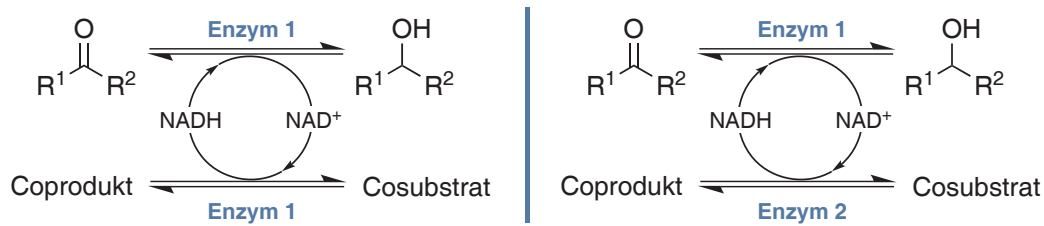


Abbildung 1.8: Substrat-gekoppelte (links) und Enzym-gekoppelte (rechts) Cofaktorregenerierung.

Die Oxidation von Glukose durch Glukose Dehydrogenasen (GDH, EC 1.1.1.47) führt zum Glukonolacton, das in wässriger Lösung irreversibel zur Glukonsäure hydrolysiert [Kizaki 2001, Weckbecker 2005]. Eine weitere Dehydrogenase für die Cofaktorregenerierung ist die Lactat Dehydrogenase (LDH, EC 1.1.1.27) [Kim 1988]. L-Lactat (Milchsäure) wird zu Pyruvat (Brenztraubensäure) oxidiert.

Die direkte Regenerierung von NAD(P)H mit Wasserstoff und Hydrogenasen ist eine sehr effektive und elegante Methode. Das günstige Cosubstrat wird komplett verbraucht und es wird kein Coprodukt gebildet [Klibanov 1980, Wong 1981, Greiner 2003, Mertens 2003, 2004].

1.2.1.2. Aktivität und Stabilität des Biokatalysators

Die Bestimmung von Aktivität und Stabilität des Biokatalysators in Abhängigkeit sämtlicher Reaktionsparameter ist elementar für die Entwicklung eines enzymatischen Prozesses. Mit Hilfe der Analyse des Reaktionssystems in Hinblick auf den Einfluss der Konzentration aller Komponenten ist die Aufstellung eines kinetischen Modells möglich [Bergmeyer 1977, Cornish-Bowden 2004, Hilterhaus 2006]. Dieses kann in Verbindung mit den Stabilitätsdaten eingesetzt werden, um einen Reaktionsverlauf zu simulieren und somit *in-silico*⁴ die optimalen Bedingungen zu bestimmen.

Kinetische Analyse

Die Abhängigkeit der Geschwindigkeit enzymatischer Reaktionen von der Substratkonzentration wird durch das Modell von *Michaelis* und *Menten* beschrieben [Michaelis 1913], welches eine Weiterentwicklung der Ergebnisse von *Brown* und *Henri* darstellt [Brown 1902, Henri 1902].

Im *Michaelis-Menten* Modell bilden Substrat und Enzym im ersten Schritt einen Enzym-Substrat-Komplex, welcher im zweiten Schritt zu Produkt und Enzym zerfällt (Abbildung 1.9, rechts). Dieser erste Schritt ist reversibel und sehr viel schneller als der zweite Schritt. Es resultiert ein Gleichgewicht ("*rapid equilibrium*") zwischen Enzym und Substrat. Die Aufstellung der drei Elementarreaktionen mit den entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten k_i und die Annahme einer konstanten Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes (*Steady-State*) ermöglicht die Vereinfachung des Modells zur *Michaelis-Menten* Gleichung. Die Parameter dieser Gleichung sind die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} und die *Michaelis*-Konstante K_m .

⁴ Computergestützte Simulation biochemischer Prozesse.

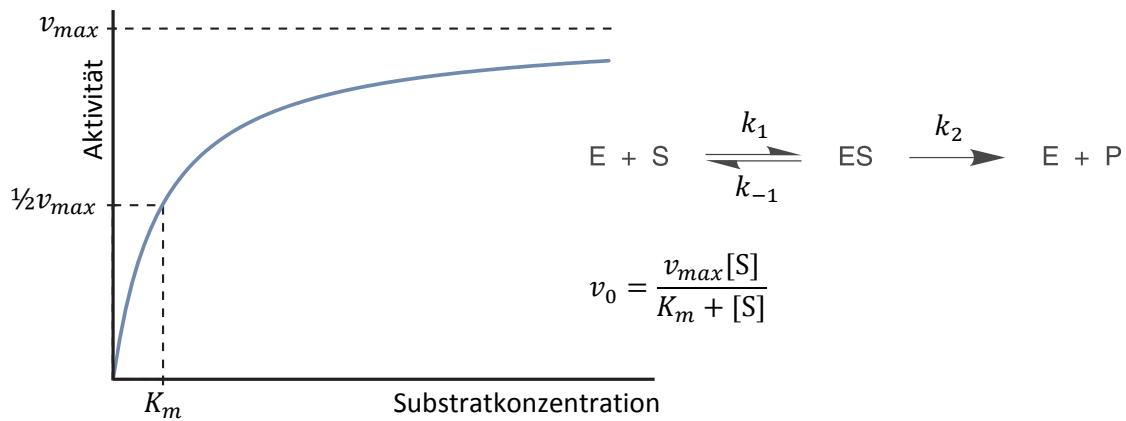


Abbildung 1.9: Graphische Darstellung der *Michaelis-Menten* Gleichung und ihrer Parameter.

Eine graphische Darstellung der *Michaelis-Menten* Gleichung (Abbildung 1.9) ergibt eine hyperbolische Funktion, die mit zunehmender Substratkonzentration der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit zustrebt. Die *Michaelis*-Konstante beschreibt die Substratkonzentration mit halber maximaler Reaktionsgeschwindigkeit. Eine Bestimmung der kinetischen Parameter wird klassisch durch eine Linearisierung der Geschwindigkeitsgleichung durch reziproke Auftragung von Reaktionsgeschwindigkeit und Substratkonzentration erreicht [Lineweaver 1934], dieses kann aufgrund einer Verstärkung von Messfehlern bei der reziproken Darstellung zu einer Verfälschung des Ergebnisses führen. Heute werden in der Regel nicht-lineare Regressionen mit Hilfe entsprechender Software-Pakete wie *OriginLab Origin* oder *The Mathworks MATLAB* verwendet.

Neben der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der (den) Substratkonzentration(en) können auch Beeinflussungen durch Produkte und weitere in der Reaktionslösung vorhandene Komponenten auftreten, die sich durch eine Aktivierung oder Inhibierung des Enzyms auszeichnen können. Aktivatoren verändern in der Regel die Konformation des Enzyms durch Ausbildung kovalenter oder nicht-kovalenter Wechselwirkungen [Hilterhaus 2006]. Inhibitoren hingegen bewirken eine Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit.

Stabilitätsmessungen

Neben der Kenntnis der Kinetik einer enzymatischen Reaktion ist insbesondere die Stabilität des Biokatalysators ein entscheidender Punkt in der Entwicklung eines kontinuierlichen Prozesses. Die Wirtschaftlichkeit des Prozesses hängt direkt von der Lebensdauer und damit den Kosten des Katalysators ab. Viele Faktoren können zu einer Denaturierung des Proteins führen. Diese können unterteilt werden in physikalische, chemische und biologische Einwirkungen (Tabelle 1.1) [Schmid 1979].

Tabelle 1.1: Varianten der Proteindenaturierung.

Physikalische Einwirkung	Chemische Einwirkung	Biologische Einwirkung
Temperatur	pH-Wert	Proteasen
Mechanische Kräfte	Salzkonzentration	
Strahlung	Lösungsmittel	
	Detergentien	
	Oxidantien	
	Schwermetalle	
	Chelatbildner	

Für die Denaturierung eines Enzyms wird ein zweistufiger Prozess angenommen. In einem ersten, reversiblen Schritt wird das Enzym durch Konformationswechsel denaturiert, kann aber durch geeignete Bedingungen wieder in den aktiven Zustand versetzt werden. Sekundäre Prozesse, wie stärkere Konformationswechsel, kovalente Modifizierungen oder Aggregation des Proteins führen zu einer vollständigen, irreversiblen Denaturierung [Zentgraf 1991].

Es existieren vielfältige Methoden zur Erhöhung der Stabilität von Enzymen, etwa durch Zugabe von Additiven, wie Liganden, kleinen organischen Molekülen, bestimmten Ionen oder Polymeren [Gray 1988], durch chemische Modifizierung des Enzyms [Mozhaev 1990] oder auch durch Immobilisierung des Enzyms (Kapitel 1.2.1.3).

1.2.1.3. Rückhaltung des Biokatalysators

Die Rückhaltung des Biokatalysators in einem kontinuierlichen Prozess ist elementar für die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens. Neben einer Verringerung der Katalysatorkosten ermöglicht die Wiederverwendung des Enzyms auch eine vereinfachte Produktaufarbeitung.

Rückhaltung durch Membranverfahren

Homogen gelöste Enzyme können durch geeignete Membranen aus einer Lösung abgetrennt oder in einem Reaktor zurückgehalten werden. Es werden Mikrofiltration (0.2-2 μm), Ultrafiltration (0.02-0.2 μm), Nanofiltration (2-20 nm) und Umkehrosmose (0.2-2 nm) unterschieden [Liese 2006]. Für die Rückhaltung von Enzymen werden Ultrafiltrationsmembranen verwendet.

Für die Verwendung von Ultrafiltrationsmembranen in der kontinuierlichen Reaktionsführung gibt es verschiedene Möglichkeiten. Die einfachste Variante ist der Einsatz des Enzyms in einem Dialyseschlauch, der mit der Reaktionslösung kontaktiert wird [Kragl 1992]. Ein Austausch von Substrat und Produkt findet nur durch Diffusion über die Membran statt, so dass nur geringe Produktivitäten erreicht werden können. Eine Anwendung findet sich hauptsächlich bei der Verwendung scherempfindlicher Katalysatoren [Briechle 2006]. Die meisten Membranverfahren werden konvektiv betrieben, wobei der Fluss des Reaktionsmediums durch die Membran geführt wird [Kruse 1996]. Beispiele in der industriellen Produktion sind die *Rhodococcus erythropolis* ADH-katalysierte Reduktion von Phenylpropanon [Kruse 1996], die *Leuconostoc mesenteroides* D-Lactat Dehydrogenase-katalysierte Reduktion von fluorierten α -Ketosäuren [Tao 2002]

oder die *Bacillus sphaericus* Leucin Dehydrogenase-katalysierte reduktive Aminierung von Trimethylpyruvat [Kragl 1996].

Zweiphasensysteme

Die Verwendung eines Zweiphasensystems zur räumlichen Trennung von Substrat / Produkt und dem Biokatalysator ist eine weitere Möglichkeit zur Retention eines nicht-immobilisierten Enzyms in einem Produktionsprozess [Liese 2004]. Das Enzym verbleibt in der Regel in der wässrigen Phase, während in der organischen Phase Substrate und Produkt gelöst sind. Für eine effektive Nutzung eines solchen Verfahrens sind eine möglichst geringe Konzentration von Substrat und Produkt in der wässrigen Phase, sowie eine hohe Stabilität des Enzyms gegenüber organischen Lösungsmitteln und Phasengrenzen notwendig.

Ein industriell relevantes Beispiel ist die bei *Merck Research Laboratories* entwickelte Synthese eines Schlüsselintermediats für die Herstellung eines β_3 -Agonisten basierend auf einer enzymatischen Reduktion mit der Hefe *Candida sorbophila* [Chartrain 1999].

Immobilisierung

Mit Hilfe der Immobilisierung von Enzymen oder ganzen Zellen werden die Vorteile der Biokatalyse mit den Vorteilen der klassischen heterogenen Katalyse kombiniert [Přenosil 2002, Bornscheuer 2003, Cao 2005, Sheldon 2007]. Durch das Vorliegen des Katalysators in ungelöster, fester Form ist eine leichte Abtrennung vom Reaktionsmedium durch beispielsweise Filtration oder Zentrifugation möglich. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit einer kontinuierlichen Reaktionsführung in Fest- und Fließbettreaktoren oder in konventionellen Rührreaktoren unter Verwendung eines Filtersystems zur Rückhaltung des Katalysators.

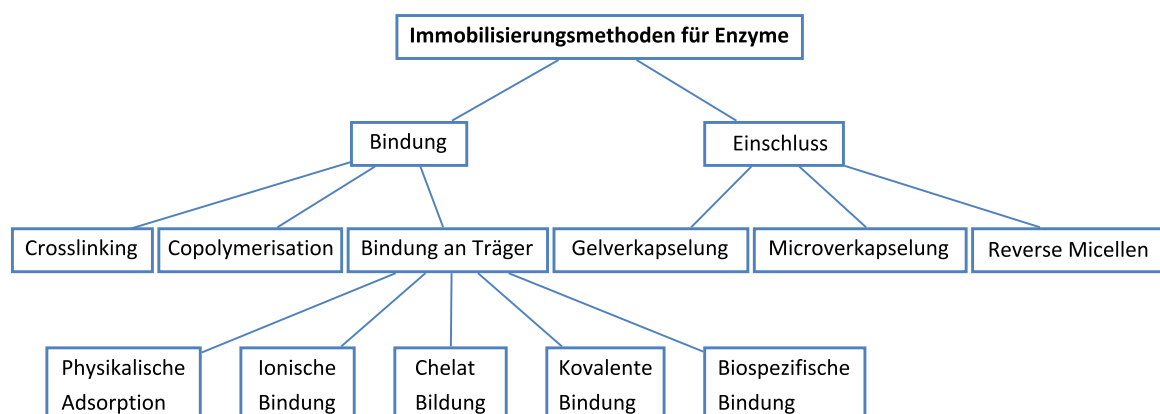


Abbildung 1.10: Methoden zur Immobilisierung von Enzymen.

Die Methoden der Enzymimmobilisierung lassen sich in zwei große Gruppen teilen: Ausbildung einer Bindung und Einschluss in eine bestimmte Matrix (Abbildung 1.10). Es gibt keine universelle Methode zur Immobilisierung eines Biokatalysators. Die Wahl der entsprechenden Bedingungen richtet sich nach der Natur der Reaktion, der Stabilität des Enzyms und den Anforderungen an die Eigenschaften des Immobilisates.

Die Ausbildung einer Bindung zur Immobilisierung eines Enzyms ist weit verbreitet. Bei der Verlinkung von Enzymen zu größeren Aggregaten werden Immobilisate ohne Zugabe zusätzlicher Träger erhalten. Zur Verbindung der Enzymmoleküle werden die aktiven Gruppen der Enzymoberfläche genutzt und verlinkt. Diese Art der Immobilisierung wird insbesondere von der *CLEA Technologies B.V.*, Delft, Niederlande weiterentwickelt und angewendet (CLEA: cross-linked enzyme aggregate) [Cao 2001]. Eine sehr ähnliche Methode ist die Copolymerisation von Enzymen, bei der Vinylgruppen (o.ä.) auf der Enzymoberfläche eingeführt werden und das Enzym so als Monomer bei einer Copolymerisation eingesetzt werden kann [Přenosil 2002].

Die Bindung eines Enzyms auf ein festes Trägermaterial kann aufgrund der Ausbildung bestimmter Wechselwirkungen unterschieden werden. Als einfachste Variante treten bei der physikalischen Adsorption eines Enzyms auf der Trägeroberfläche nur schwache Wechselwirkungen wie Van-der-Waals Kräfte auf. Ein sehr bekanntes Beispiel für eine adsorptive Immobilisierung ist die kommerzielle Form der *Candida antarctica* Lipase B (CaLB) [Kirk 2002], die bei *Novozymes A/S*, Bagsværd, Dänemark als Novozyme 435 vertrieben wird. Weiterhin werden in der Produktion von High Fructose Corn Syrup (Fructose-Glucose Sirup) auf diese Weise immobilisierte Xylose (Glucose) Isomerasen für die Isomerisierung von Glucose zu Fructose eingesetzt [Pedersen 1993]. Die ionische Bindung nutzt Ion-Ion Wechselwirkungen, die zwar deutlich stärker sind als einfache Adsorptionsbindungen, aber auch stark vom pH-Wert abhängen. Bei der Bildung von Chelaten werden Übergangsmetallionen für eine Bindung zwischen Träger und Enzym eingesetzt [z.B. Kurlemann 2004]. Bei der kovalenten Bindung werden funktionelle Gruppen der Enzymoberfläche, wie Amino-, Hydroxy-, Thiol- oder Phenol-Gruppen, chemisch mit der Oberfläche eines Trägermaterials verbunden. Die Stabilität dieser Bindung ist abhängig von der chemischen Natur der verwendeten Gruppen und kann teilweise durch Modifizierung von z.B. Imino- zu Amino-Bindungen durch Reduktion verbessert werden [Miller 1983]. Die Verwendung biospezifischer Bindungen zwischen Enzym und Trägermaterial ist eine weitere Möglichkeit zur Immobilisierung. So werden auf einer Oberfläche gebundene, biologisch aktive Moleküle wie Antikörper zur Ausbildung einer Enzym-spezifischen Bindung eingesetzt [Přenosil 2002].

Der Einschluss eines Enzyms in eine Polymermatrix ist die zweite Hauptgruppe der Immobilisierungsmethoden. Bei der Gelverkapselung werden wasserunlösliche natürliche und synthetische Polymere wie Polysaccharide, Alginate, Agar, κ -Carrageenane oder Polyacrylamide eingesetzt. Die Gelbildung wird in der Regel in Gegenwart des verwendeten Enzyms durchgeführt, welches auf diese Weise eingeschlossen wird. Bei der Mikroverkapselung werden Enzyme in permeable Membranen eingeschlossen [Yu 1982]. Die Bildung reverser Micellen durch Zugabe amphiphiler Detergenzien ist eine Methode zur Immobilisierung von Enzymen in Lösungsmitteln wie Kohlenwasserstoffen. Die gebildeten Micellen enthalten Wasser, welches das Enzym vor dem Lösungsmittel schützt und die biologische Aktivität erhält.

1.2.2. Optimierung der Reaktionsbedingungen

In einem biokatalytischen Produktionsprozess beeinflussen Enzyme die Kinetik der Reaktion, also die Reaktionsgeschwindigkeit der einzelnen katalysierten Elementarreaktionen. Das thermo-

dynamische Gleichgewicht zwischen den Reaktionskomponenten wird dabei nicht verändert. Des Weiteren können chemische Nebenreaktionen auftreten.

Thermodynamisches Gleichgewicht

Das Verhältnis von Substraten und Produkten einer chemischen oder biokatalytischen Reaktion bleibt nach Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichts konstant. Diese thermodynamische Limitierung kann durch gezielte Veränderung der Reaktionsbedingungen überwunden werden und somit ein maximaler Umsatz in der Produktionsreaktion erreicht werden.

Auftreten chemischer Nebenreaktionen

Neben der enzymatisch katalysierten Hauptreaktion können weitere, chemische Nebenreaktionen auftreten. Darunter fällt die Zersetzung oder Racemisierung von Substraten oder Produkten bei bestimmten Reaktionsbedingungen oder das Vorliegen einer unselektiven Nebenreaktion, etwa eine Racemat-bildende Reaktion neben einer enantioselektiven enzymatischen Reaktion.

Möglichkeiten zur Überwindung einer ungünstigen Gleichgewichtsverteilung oder zur Unterdrückung von Nebenreaktionen sind [Biselli 2002]:

- Variation der Substratkonzentrationen
- Kontinuierliche Zugabe von Substrat
- Kontinuierliche Entfernung von Produkten durch z.B. Kristallisation, Extraktion, Elektrodialyse, Komplexierung oder Ausgasen
- Kopplung mit einer irreversiblen Reaktion, z.B. über eine Cofaktorregenerierung mit Glucose / Glucose Dehydrogenase
- Veränderung der Temperatur
- Veränderung des Drucks
- Veränderung des pH-Wertes bei Säuren oder Basen als Reaktionskomponenten
- Verwendung von Cosolventien

1.2.3. Wahl des Reaktors

Die Wahl eines geeigneten Reaktors ist elementar für die Entwicklung eines biokatalytischen Prozesses. Grundsätzlich können zwei verschiedene Gruppen von Reaktoren unterschieden werden: diskontinuierlich betriebene Satzreaktoren und kontinuierlich betriebene Reaktoren [Biselli 2002].

1.2.3.1. Ideale Reaktortypen

Der gerührte Satzreaktor (STR, stirred tank reactor) ist ein typisches Beispiel für den ersten Fall (Abbildung 1.11, A). Der Reaktor wird zu Beginn mit dem Reaktionsgemisch gefüllt und nach der Reaktion wieder entleert. Die Konzentrationen verändern sich im Laufe der Zeit - Substrat wird

verbraucht und Produkt wird gebildet. Weiterhin wird von einer idealen Vermischung ausgegangen, so dass die Konzentrationen zu einem Zeitpunkt t_i im gesamten Reaktor gleich sind.

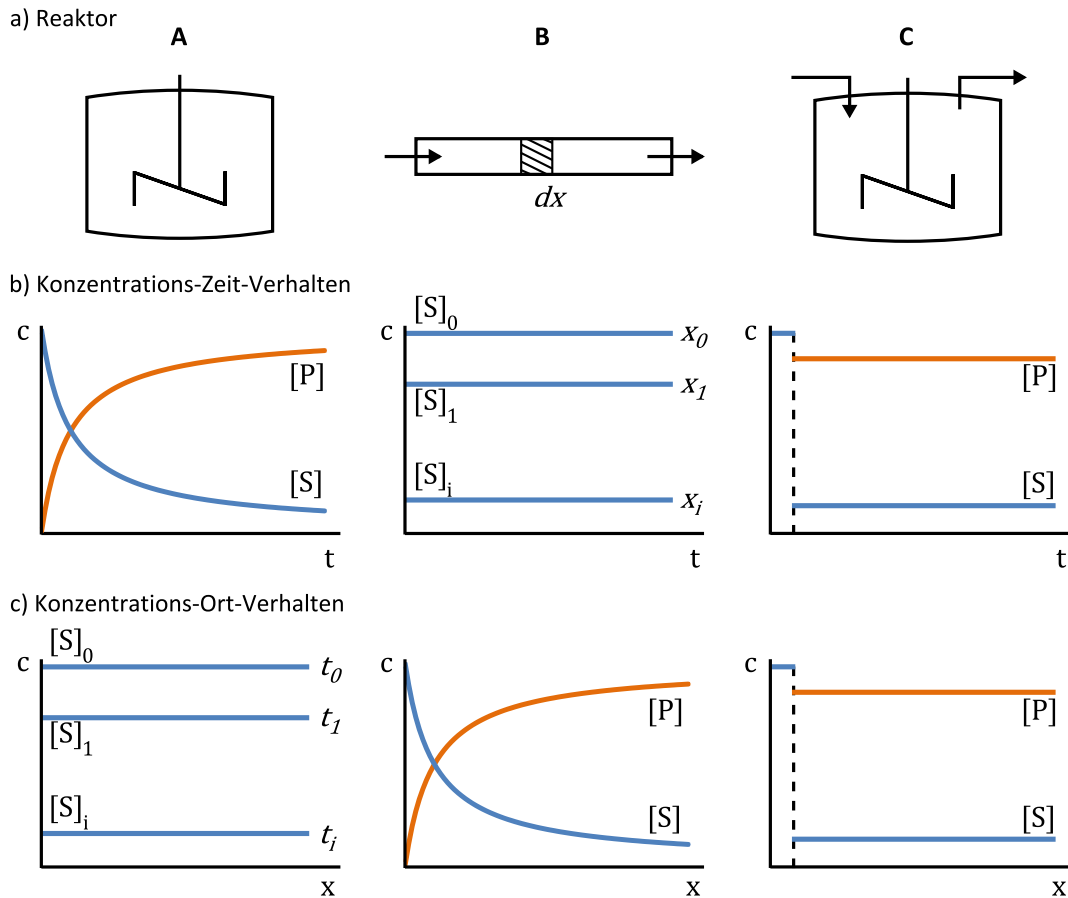


Abbildung 1.11: Grundlegende ideale Reaktortypen (A Satzreaktor, B Strömungsrohr und C kontinuierlich betriebener Satzreaktor) und ihr Verhalten

Die Konzentrationsprofile des Strömungsrohres (PFR, plug flow reactor) (Abbildung 1.11, **B**) verhalten sich entgegengesetzt zu denen des Satzreaktors. Über den Verlauf der Reaktion sind die Konzentrationen der Komponenten in einzelnen Rohrabschnitten konstant. Eine Verringerung der Substratkonzentration bzw. Erhöhung der Produktkonzentration tritt ortsabhängig auf. Der kontinuierlich betriebene Satzreaktor (CSTR, continuous stirred tank reactor) besitzt analog zum Strömungsrohr einen Zu- und Ablauf, besteht allerdings sonst aus einem Satzreaktor (Abbildung 1.11, **C**). Charakteristisch ist das konstante Konzentrationsprofil in Abhängigkeit von Zeit und Ort bei Vorliegen eines Gleichgewichtes (*Steady State*) im Reaktor. Die gestrichelte Linie markiert die Zeit bzw. den Ort des Eintretens des *Steady State* im kontinuierlich betriebenen Reaktor.

Neben den drei idealen Reaktortypen existieren viele Variationen, wie Rührkesselkaskaden oder Festbettreaktoren. Für jeden geplanten Prozess muss die geeignete Variante ausgewählt und eventuell modifiziert werden.

1.2.3.2. Produktaufarbeitung

Die Aufarbeitung und Isolierung des Produktes (DSP, down-stream-processing) aus einem Produktionsprozess nimmt in vielen Fällen einen großen Teil der Verfahrensentwicklung und der späteren Kosten ein. In vielen Verfahren werden verschiedene Aufarbeitungsschritte nacheinander durchgeführt, um das gewünschte Produkt in ausreichender Reinheit zu gewinnen [Liese 2006]. Typische Methoden sind:

- Mikro-, Ultra-, Nanofiltration
- Kristallisation
- Ausfällung
- Extraktion mit organischen Lösungsmitteln
- Destillation / Rektifikation
- Adsorption
- Chromatographische Trennung

Die direkte, *in-situ* Abtrennung eines Produktes aus dem Reaktionsgemisch (ISPR, *in-situ* product removal) ist eine alternative Methode zur klassischen, nachgeschalteten Produktaufarbeitung [Freeman 1993, Buque-Taboada 2006]. Die Entwicklung eines kontinuierlichen Verfahrens wird auf diese Weise erleichtert. Des Weiteren ermöglicht die direkte Abtrennung des Produktes eine Verhinderung von Produktinhibierungen und den Ausgleich einer ungünstigen Gleichgewichtslage.

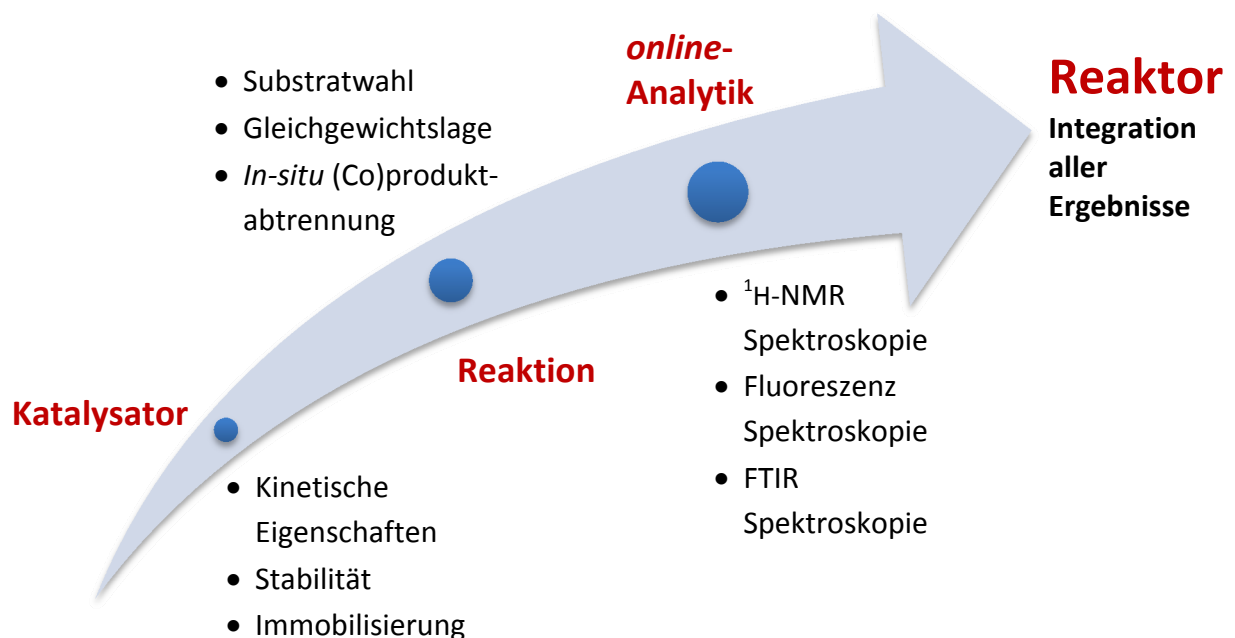
1.2.3.3. Reaktorsteuerung

Die Überwachung und Steuerung eines Reaktors ist notwendig für einen produktiven Einsatz. Eine *online* Bestimmung von Parametern wie Substrat- oder Produktkonzentrationen ermöglicht die schnelle Überprüfung des Betriebszustandes und somit eine Optimierung des Prozesses. Weiterhin werden lange Probenaufarbeitungen und Messzeiten verringert, sowie Änderungen in der Probenzusammensetzung während der Analyse vermieden. Etablierte Methoden in der Biotechnologie sind die Messung von Temperatur, pH-Wert oder Sauerstoffsättigung im Reaktor [Schnepple 2006]. Für die Bestimmung von Konzentrationen der Reaktionskomponenten werden Methoden wie Ultraviolet-Spektroskopie [Kandelbauer 2008], Fluoreszenz-Spektroskopie [Oliveira 2008], Biolumineszenz [del Busto-Ramos 2008], Kalorimetrie [Štefuca 2006] oder Infrarot-Spektroskopie [Naumann 1991, Workman 1999] verwendet.

2. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung eines Reaktormodells zur asymmetrischen biokatalytischen Synthese chiraler Alkohole. Dieses Modell soll einen effektiven und umweltfreundlichen Ansatz zur Produktion chiraler Verbindungen aufzeigen, die ein hohes Potential als Intermediate bei der Synthese pharmazeutisch aktiver Substanzen besitzen.

Die Entwicklung des Verfahrens innerhalb dieser Arbeit gliedert sich im Wesentlichen in vier Teile. Das folgende Schema gibt eine Übersicht über die einzelnen Schritte:



Ein rekombinanter Biokatalysator für die Prozessentwicklung soll ausgewählt und vollständig charakterisiert werden. Dabei sollen die kinetischen Parameter und die Stabilität des Katalysators untersucht werden, um für die Produktion geeignete Reaktionsbedingungen zu identifizieren. Die Rückhaltung des Katalysators soll über Membranen oder Immobilisierungsverfahren versucht werden, so dass die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens maximiert werden kann.

Nach Auswahl des Katalysators und damit der zum Produkt führenden Grundreaktion sollen geeignete Substrate für die Synthese von chiralen Alkoholen ausgewählt werden. Zusätzlich zur kinetischen Charakterisierung soll die Thermodynamik des Reaktionssystems betrachtet werden. Dabei soll insbesondere auf die Lage des Gleichgewichtes und die Maximierung des Umsatzes durch *in-situ* Abtrennung von Produkt oder Coprodukt eingegangen werden.

Eine schnelle und direkte Analyse eines Reaktionsgemisches ermöglicht eine zeitnahe Regelung des Prozesses und minimiert Fehler durch eine manuelle Probenaufarbeitung. Aus diesem Grund sollen geeignete spektroskopische *online*-Analysemethoden für die vorliegende Reaktion etabliert und verglichen werden.

Auf der Basis der erhaltenen Ergebnisse soll ein Reaktormodell erstellt und im Labormaßstab betrieben werden. Die Leistung des Reaktors soll dabei auf Grundlage des erreichten Umsatzes, der Zykluszahl und der Raum-Zeit-Ausbeute optimiert werden.

3. Katalysator⁵

Zu Beginn einer biokatalytischen Verfahrensentwicklung steht die Suche nach einem geeigneten Enzym. Durch den Kooperationspartner *Prof. Wolfgang Kroutil* (Graz, Österreich) steht die Alkohol Dehydrogenase ADH-'A' (EC 1.1.1.1) aus *Rhodococcus ruber* DSM 44541 zur Verfügung [Stampfer 2002, 2003a, Kosjek 2004]. Die ADH-'A' wird rekombinant in *Escherichia coli* (*E. coli*) Tuner (DE3) produziert [Edegger 2006a, 2006b].

Im Folgenden werden die Eigenschaften der ADH-'A', die kinetische Charakterisierung des freien Enzyms und die Immobilisierung des Enzyms bzw. der lyophilisierten, rekombinanten Zellen auf verschiedene Trägermaterialien erläutert, sowie die Stabilität verschiedener Katalysatorpräparationen verglichen.

3.1. Eigenschaften der ADH-'A'

Die ADH-'A' ist NADH-abhängig und katalysiert die stereoselektive Reduktion von Ketonen, bzw. Oxidation von sekundären Alkoholen. Sie zeichnet sich durch eine hohe Stereoselektivität bei einer Vielzahl von Substraten aus [Stampfer 2003a]. Weiterhin zeigt die ADH-'A' eine besonders hohe Toleranz gegenüber organischen Lösungsmittel wie n-Hexan, Cyclohexan, Toluol, Dichlormethan, Aceton und 2-Propanol [Stampfer 2002, 2003b, de Gonzalo 2007a]. Auch ionische Flüssigkeiten können bis zu einem Anteil von 90 % als Medium für Umsetzungen eingesetzt werden [de Gonzalo 2007b]. Das Enzym zeigt eine hohe Thermostabilität bis zu 65 °C. Der nutzbare pH-Bereich ist abhängig von der betrachteten Redox-Richtung. Über 50 % relative Aktivität liegen zwischen pH 6 und 9 bei der Reduktion (Optimum: pH 6.5) und pH 6.5 bis 11 bei der Oxidation (Optimum: pH 9) vor [Kosjek 2004]. Die ADH-'A' besteht aus zwei Untereinheiten mit einer Gesamtgröße von 72 kDa [Kosjek 2004].

Mechanismus

ADH-'A' gehört der Familie der Zink-enthaltenden medium-chain Dehydrogenasen / Reduktasen an [Persson 1994]. Das Zn^{II}-Zentralatom ist fest gebunden und lässt sich nicht mit Chelatbildnern wie Ethylendiamintetraacetat (EDTA) entfernen [Kosjek 2004].

Die Bindung von Substrat und Cofaktor für die ADH aus Pferdeleber (*Equus caballus*) ist durch eine Röntgenstrukturanalyse dokumentiert [Eklund 1976, Brändén 1980]. Das aktive Zentrum enthält ein tetraedrisch durch zwei Cystein(Pos. 46, 174)-Schwefelatome, ein Histidin(Pos. 67)-Stickstoffatom und das Substrat bzw. Wasser koordiniertes Zn^{II}-Metallion (Abbildung 3.1). Das Substrat- bzw. Wassermolekül wird weiterhin durch ein Serin(Pos. 48) gebunden. Die Katalyse folgt dem Theorell-Chance-Mechanismus [Theorell 1961]. Zunächst bindet der Cofaktor NADH,

⁵ Teile dieses Kapitels sind publiziert in: Goldberg K, Krueger A, Meinhardt T, Kroutil W, Mautner B, Liese A (2008) Novel immobilization routes for the covalent binding of an alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus ruber* DSM 44541. *Tetrahedron: Asymmetry* 19: 1171-1173.

was zu einer Konformationsänderung im aktiven Zentrum führt [Eklund 1984, 1989]. Das Substrat wird gebunden und die Carbonylfunktion durch eine Erhöhung des elektrophilen Charakters aktiviert. Der Hydridtransfer zwischen Substrat und Cofaktor wird auf diese Weise erleichtert. Die Protonierung des entstehenden Alkoholates wird ausgehend vom Lösungsmittel Wasser über die Aminosäuren Serin(Pos. 48) und Histidin(Pos. 61) erreicht. Nach dem Ausdiffundieren des Alkohol-Produktes wird der oxidierte Cofaktor abgespalten.

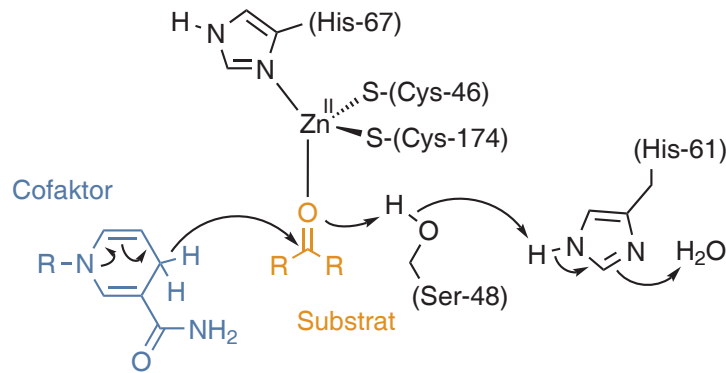


Abbildung 3.1: Schematische Übersicht über das aktive Zentrum der Pferdeleber ADH [Eklund 1989].

Substratspektrum

Das Substratspektrum der ADH-'A' ist sehr vielfältig [Stampfer 2003a]. Neben aliphatischen Ketonen mit einfachen Kohlenwasserstoffketten bis zu einer Kettenlänge von 10 (Abbildung 3.2, **6a-h**) werden verschiedene ungesättigte (**7, 8**) und aromatische (**9-13**) Ketone umgesetzt. Auch Ketone mit zwei Resten, die größer als eine Methylgruppe sind, können umgesetzt werden. Dabei sind verschiedenste Funktionalitäten möglich (**14-17**). Insgesamt wird hier nur eine kleine Auswahl des Substratspektrums dargestellt. Substrate wie Diketone oder andere heteroaromatische Ketone werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit behandelt.

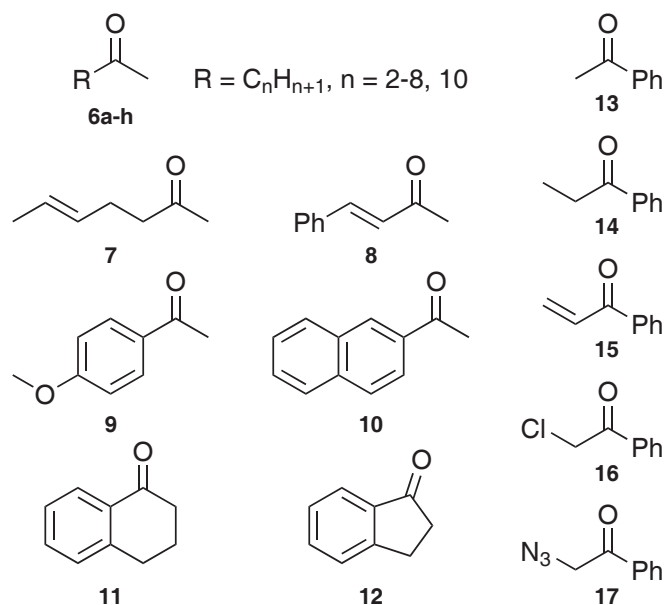


Abbildung 3.2: Auswahl aus dem Substratspektrum der ADH-'A'.

Partielle Reinigung

Die rekombinanten ADH-'A'-aktiven *E. coli*-Zellen stehen in lyophilisierter Form zur Verfügung. Diese können direkt als Biokatalysator eingesetzt werden, in der Regel wird aber partiell gereinigte Enzymlösung verwendet. Dazu wird eine bestimmte Menge an lyophilisierten Zellen in Puffer suspendiert und unter Ultraschall aufgeschlossen. Eine partielle Aufreinigung erfolgt über eine thermische Ausfällung von Fremdbestandteilen bei 65 °C. Die erhaltene Enzymlösung wird bei -20 °C gelagert. Eine Auftragung der Enzymlösung, sowie der Gesamtproteine aus den lyophilisierten Zellen auf ein Polyacrylamidgel nach *Laemmli* (SDS-PAGE, sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) [Laemmli 1970] zeigt die Leistung des Aufarbeitungsschrittes (Abbildung 3.3). Die ADH-'A'-Bande ist bei 36 kDa zu finden, dieses entspricht der Größe einer der zwei Untereinheiten und stimmt mit den Literaturangaben überein [Kosjek 2004].

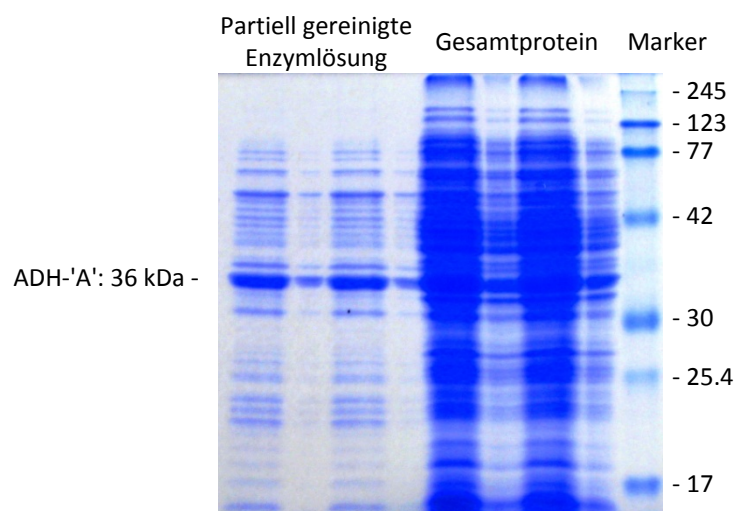


Abbildung 3.3: SDS-PAGE der partiell gereinigten ADH-'A'-Lösung.

3.2. Kinetische Charakterisierung

Die vollständige kinetische Charakterisierung der ADH-'A' ermöglicht die Vorhersage von diskontinuierlichen und kontinuierlichen Produktionsprozessen. Dazu wird die Aktivität des Enzyms in Abhängigkeit der Konzentration der einzelnen Reaktionskomponenten bestimmt und ein kinetisches Modell erstellt. Neben dieser Methode, bei der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten (initial rate) gemessen werden, können ein kinetisches Modell bzw. die kinetischen Parameter aus dem Verlauf kompletter biokatalytischer Reaktionen (progress curve) bestimmt werden.

Festlegung der notwendigen Experimente

Zu Beginn der kinetischen Charakterisierung müssen die gewünschten Bedingungen wie Temperatur, pH-Wert, Substrat und Cofaktorregenerierung festgelegt werden. Die Temperatur wird auf 30 °C gesetzt und es wird bei einem neutralen pH-Wert von 7.0 gearbeitet. Variationen dieser Werte werden hier nicht betrachtet.

Durch die hohe Lösungsmittelstabilität der ADH-'A' (s.o.) bietet sich die Verwendung einer Substrat-gekoppelten Cofaktorregenerierung mit 2-Propanol an. In diesem Fall muss der Einfluss von 2-Propanol und des Coproduktes Aceton mit in das kinetische Modell eingehen.

Als Modellsubstrat wird zunächst Acetophenon verwendet. Acetophenon ist das einfachste aromatische Keton und Umsetzungen mit diesem Keton werden in der Literatur vielfach beschrieben. Dadurch ergibt sich eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit anderen Enzymsystemen. Das Produkt aus dieser Reaktion ist (*S*)-1-Phenylethanol. Als Resultat besteht das System mit der Substrat-gekoppelten Cofaktorregenerierung aus zwei Reaktionen, die Reduktion von Acetophenon und die Oxidation von 2-Propanol. Durch die Reversibilität der Reaktionen ergeben sich vier Teilreaktionen (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Teilreaktionen der Substrat-gekoppelten Reduktion von Acetophenon.

Teilreaktion	Substrat	Cofaktor	Produkt	Cofaktorprodukt
I	Acetophenon AP	NADH	Phenylethanol PE	NAD ⁺
II	2-Propanol IP	NAD ⁺	Aceton AC	NADH
III	Phenylethanol PE	NAD ⁺	Acetophenon AP	NADH
IV	Aceton AC	NADH	2-Propanol IP	NAD ⁺

Für jede dieser Teilreaktionen muss der Einfluss sämtlicher Komponenten auf die Aktivität des Enzyms untersucht werden. Die Aktivität bezeichnet dabei die Geschwindigkeit, mit der eine bestimmte Stoffmenge an Substrat pro Zeiteinheit umgesetzt wird. Die gängige Einheit ist U (Unit bzw. $\mu\text{mol min}^{-1}$) pro Enzymmenge.

Die Bestimmung der Aktivität erfolgt in photometrischen Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit. Dazu werden die jeweiligen Reaktionsmischungen in einer Küvette vorgelegt und der Verbrauch bzw. die Bildung von NADH bei 340 nm für eine Minute verfolgt. Mit Hilfe des *Lambert-Beerschen* Gesetzes kann die Extinktionsänderung pro Minute in die Aktivität umgerechnet werden. Für jede Teilreaktion und jede Komponente werden Konzentration und Aktivität gegeneinander aufgetragen und mit Hilfe einer nicht-linearen Regression nach *Michaelis-Menten* ausgewertet.

Kinetisches Modell

Bei der Aufstellung des kinetischen Modells (Formel 3.1-3.4) werden Gleichungen für jede Teilreaktion aufgestellt. Je nachdem, ob die untersuchten Komponenten auf die entsprechende Reaktion einen Einfluss haben, werden diese in das Modell integriert. Dabei ist darauf zu achten, dass ein inhibierender Effekt ebenso eine Rück- oder Parallelreaktion darstellen kann. Daher muss bei der Aufstellung eines kinetischen Modells parallel die Validierung des Modells erfolgen. Das wird dadurch erreicht, dass die kinetischen Daten für die Vorhersage einer Umsetzung im Satzreaktor verwendet werden (s.u.).

$$3.1 \quad v_1 = \frac{v_{max,1}[AP][NADH]}{\left(K_{m,AP} \left(1 + \frac{[PE]}{K_{i,PE}}\right) + [AP]\right) \left(K_{m,NADH} \left(1 + \frac{[NAD^+]}{K_{i,NAD^+}}\right) + [NADH]\right)}$$

$$3.2 \quad v_2 = \frac{v_{max,2}[IP][NAD^+]}{\left(K_{m,IP} \left(1 + \frac{[AC]}{K_{i,AC}}\right) + [IP]\right) \left(K_{m,NAD^+} \left(1 + \frac{[NADH]}{K_{i,NADH}}\right) + [NAD^+]\right)}$$

$$3.3 \quad v_3 = \frac{v_{max,3}[PE][NAD^+]}{\left(K_{m,PE} \left(1 + \frac{[AC]}{K_{i,AC}}\right) + [PE]\right) \left(K_{m,NAD^+} \left(1 + \frac{[NADH]}{K_{i,NADH}}\right) + [NAD^+]\right)}$$

$$3.4 \quad v_4 = \frac{v_{max,4}[AC][NADH]}{\left(K_{m,AC} \left(1 + \frac{[PE]}{K_{i,PE}}\right) + [AC]\right) \left(K_{m,NADH} \left(1 + \frac{[NAD^+]}{K_{i,NAD^+}}\right) + [NADH]\right)}$$

Das verwendete kinetische Modell enthält nur die Abhängigkeiten, bei denen eine Beeinflussung der Aktivität zu finden ist. Es ergibt sich eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den experimentell bestimmten Aktivitäten und dem angenommenen kinetischen Modell.

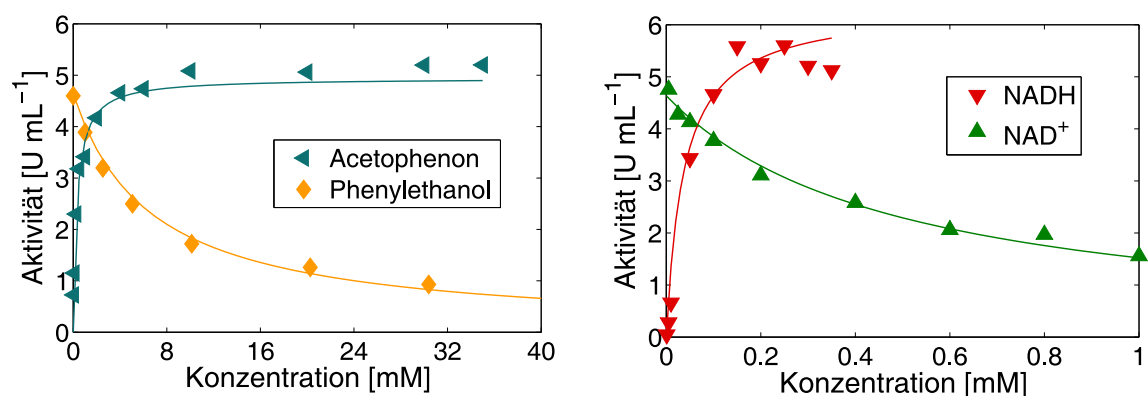


Abbildung 3.4: Kinetische Abhängigkeiten für die Reduktion von Acetophenon. Die durchgezogenen Linien entsprechen dem kinetischen Modell. Bedingungen links: 0,05-35 mM Acetophenon und 0,1 mM NADH bzw. 5 mM Acetophenon, 0-30 mM *rac*-1-Phenylethanol und 0,1 mM NADH. Bedingungen rechts: 5 mM Acetophenon und 0,001-0,35 mM NADH bzw. 5 mM Acetophenon, 0,005-1 mM NAD⁺ und 0,1 mM NADH. Jeweils in KP_i-Puffer (100 mM, pH 7,0), Reaktionstemperatur 30 °C, $4,4 \cdot 10^{-2}$ U ADH-'A'.

Als Beispiel wird an dieser Stelle die erste Teilreaktion, also die Reduktion von Acetophenon betrachtet (Abbildung 3.4). Deutlich ist die *Michaelis-Menten* Abhängigkeit zwischen der Substrat- bzw. Cofaktorkonzentration und der Aktivität zu beobachten. Das Produkt und das Cofak-

torprodukt haben eine kompetitiv inhibierende Wirkung auf den Katalysator. Im Folgenden sind alle ermittelten Parameter zusammengefasst (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Ermittelte kinetische Parameter.

Teilreaktion	v_{max} [U mL ⁻¹]	K_m [mM]		K_i [mM]	
I	6.77 ± 0.73	0.33 ± 0.13 (AP)	0.037 ± 0.015 (NADH)	4.65 ± 3.09 (IP)	0.132 ± 0.060 (NAD ⁺)
II	3.37 ± 0.32	21.9 ± 11.2 (IP)	0.046 ± 0.014 (NAD ⁺)	24.5 ± 8.43 (AP)	0.024 ± 0.007 (NADH)
III	1.88 ± 0.12	0.13 ± 0.05 (PE)	0.023 ± 0.008 (NAD ⁺)	0.83 ± 0.35 (AC)	0.005 ± 0.002 (NADH)
IV	15.2 ± 2.87	47.8 ± 20.8 (AC)	0.090 ± 0.025 (NADH)	3.55 ± 1.68 (PE)	3.550 ± 1.685 (NAD ⁺)

Simulation

Mit Hilfe des kinetischen Modells, der bestimmten Parameter und der eingesetzten Enzymkonzentration ist die Simulation einer Umsetzung möglich.

$$3.5 \quad \frac{d[\text{AP}]}{dt} = +v_3 - v_1$$

$$3.6 \quad \frac{d[\text{PE}]}{dt} = +v_1 - v_3$$

$$3.7 \quad \frac{d[\text{NADH}]}{dt} = +v_3 - v_1 + v_2 - v_4$$

$$3.8 \quad \frac{d[\text{NAD}^+]}{dt} = +v_4 - v_3 + v_1 - v_2$$

$$3.9 \quad \frac{d[\text{IP}]}{dt} = +v_4 - v_2$$

$$3.10 \quad \frac{d[\text{AC}]}{dt} = +v_2 - v_4$$

zentrationsänderung einzelner Komponenten von den vier kinetischen Gleichungen definiert. Bei Zunahme der Konzentration wird ein positives Vorzeichen, bei einer Abnahme ein negatives Vorzeichen verwendet. Die Cofaktorkonzentrationen sind von allen vier Teilreaktionen abhängig.

Die Lösung des Gleichungssystems erfolgt mit Hilfe von *The Mathworks* MATLAB. In einem Iterationsverfahren werden die Konzentrationsverläufe im angegebenen Zeitrahmen berechnet. Zur Validierung des kinetischen Modells werden Reaktionen mit verschiedenen Reaktionsbedingungen durchgeführt und der Verlauf mit Hilfe des Modells simuliert (Abbildung 3.5).

Zur Bestimmung der Abweichung werden die Verläufe von Substrat und Produkt, sowie der Umsatz zwischen Experiment und Simulation verglichen. Es zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung zwischen Experiment und Simulation. Die Fehler liegen bei nur 1.6 % (80 mM AP) bzw. 2.5 % (40 mM AP).

Die resultierenden Konzentrationsänderungen je Zeiteinheit berechnet werden. Dazu wird ein Differentialgleichungssystem aufgestellt (Formel 3.5-3.10). Darin wird die Abhängigkeit der Konzentrationsänderung einzelner Komponenten von den vier kinetischen Gleichungen definiert. Bei Zunahme der Konzentration wird ein positives Vorzeichen, bei einer Abnahme ein negatives Vorzeichen verwendet.

Die Cofaktorkonzentrationen sind von allen vier Teilreaktionen abhängig.

Die Lösung des Gleichungssystems erfolgt mit Hilfe von *The Mathworks* MATLAB. In einem Iterationsverfahren werden die Konzentrationsverläufe im angegebenen Zeitrahmen berechnet. Zur Validierung des kinetischen Modells werden Reaktionen mit verschiedenen Reaktionsbedingungen durchgeführt und der Verlauf mit Hilfe des Modells simuliert (Abbildung 3.5).

Zur Bestimmung der Abweichung werden die Verläufe von Substrat und Produkt, sowie der Umsatz zwischen Experiment und Simulation verglichen. Es zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung zwischen Experiment und Simulation. Die Fehler liegen bei nur 1.6 % (80 mM AP) bzw. 2.5 % (40 mM AP).

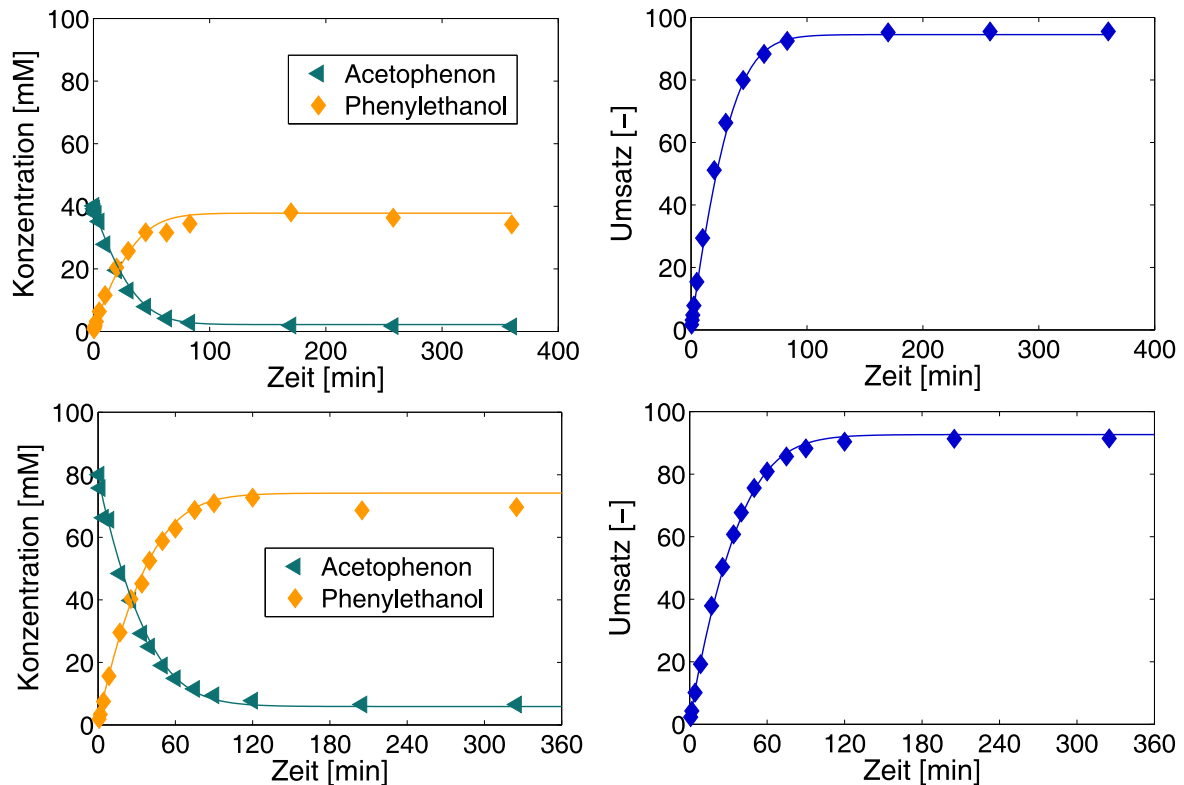


Abbildung 3.5: Umsetzungen von Acetophenon mit der ADH-'A'. Die durchgezogene Linie entspricht der Simulation. Oben: 40 mM Acetophenon, 18 % v v⁻¹ 2-Propanol, 0,3 mM NAD⁺ in KP_i-Puffer (100 mM, pH 7,0), 66 U. Unten: 80 mM Acetophenon, 18 % v v⁻¹ 2-Propanol, 1,0 mM NADH in KP_i-Puffer (100 mM, pH 7,0), 52 U. Batchvolumen 25 mL, 30 °C.

3.3. Immobilisierung

Die Immobilisierung eines Enzyms ermöglicht eine einfache Rückhaltung des Biokatalysators in einem kontinuierlichen Prozess. Durch die Wiederverwendung des Katalysators können Prozesskosten erheblich gesenkt werden. Für die ADH-'A' wird aus den vielfältigen Möglichkeiten der Immobilisierung (Kapitel 1.2.1.3) die Herstellung einer kovalenten Bindung zwischen Biokatalysator und Träger gewählt. Vorteile dieser Methode sind eine stärkere Bindung im Vergleich zu adsorptiven Bindungen und eine geringere Diffusionslimitierung im Vergleich zu Einschlussverfahren.

Neben der Immobilisierung des gelösten Enzyms kann auch durch eine Immobilisierung ganzer Zellen ein stabiler Biokatalysator erhalten werden. In Hinblick auf die Identifikation eines geeigneten Katalysators für eine kontinuierliche Produktion chiraler Alkohole werden auch die ADH-'A'-aktiven *E. coli*-Zellen immobilisiert und mit den anderen Enzympräparationen verglichen.

3.3.1. Amino-funktionalisierte Träger

Die Immobilisierung von Enzymen oder Zellen auf amino-funktionalisierte Träger ist eine etablierte Methode zur Entwicklung stabiler Biokatalysatoren. Durch geeignete Linker wie Glutaral-

dehyd werden die Aminogruppen auf der Trägeroberfläche mit denen der Enzym- bzw. Zelloberfläche über Iminbindungen miteinander verknüpft.

3.3.1.1. Immobilisierung ganzer Zellen

Für die Immobilisierung der rekombinanten *E. coli*-Zellen werden diese in Puffer rehydratisiert und an poröse Glaspartikel der Firma *Dennert Poraver GmbH* mit einem Durchmesser von 200-700 μm (Abbildung 3.7) gebunden. Die Träger sind unfunktionalisiert, so dass in einem ersten Schritt Aminogruppen an die Oberfläche gebunden werden. Dazu werden sie mit Aminopropyltriethoxysilan behandelt. Es bilden sich nach der Abspaltung von Ethoxy-Einheiten Bindungen zur Trägeroberfläche aus, so dass über einen C_3 -Spacer Amino-Gruppen gebunden sind (Abbildung 3.6, Teil I).

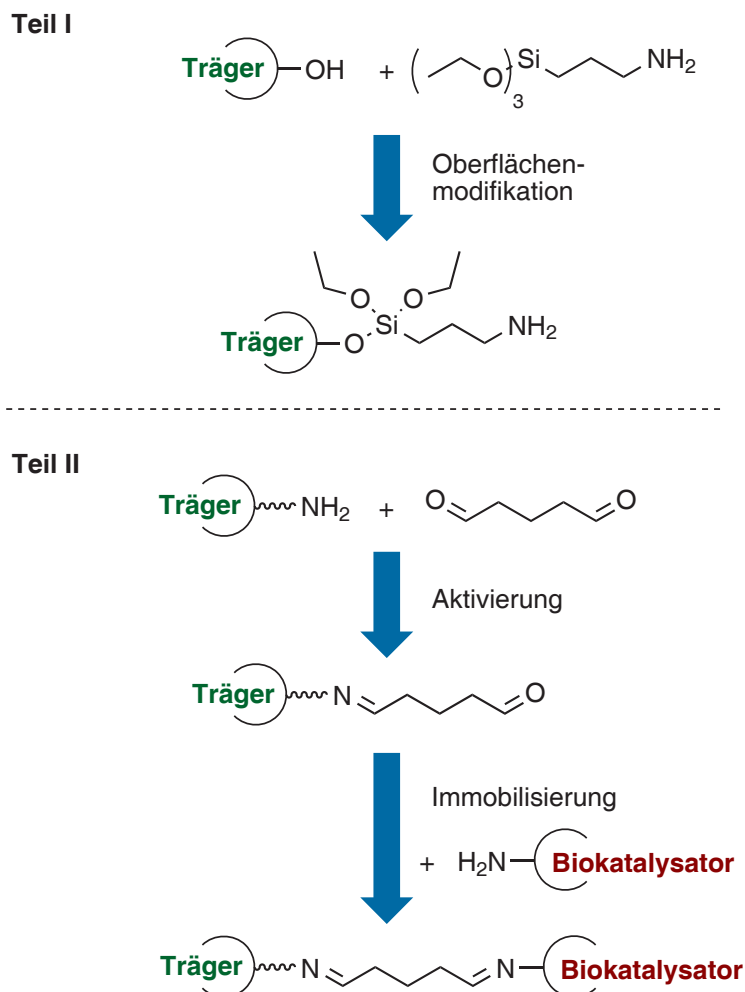


Abbildung 3.6: Mechanismus der Aminofunktionalisierung von Glaspartikeln (Teil I) und der kovalenten Immobilisierung eines Biokatalysators mit Glutaraldehyd (Teil II).



Abbildung 3.7: Poröse Glaspartikel der Firma *Dennert Poraver GmbH*, Durchmesser 200-700 μm ⁶.

Die Verlinkung zwischen funktionalisiertem Träger und den Aminogruppen der Peptide an der Zelloberfläche wird mit dem symmetrischen Glutaraldehyd erreicht. Nacheinander wird zunächst Glutaraldehyd an die Aminogruppen des Trägers und der auf diese Weise aktivierte Träger anschließend an die Zelloberfläche gebunden (Abbildung 3.6, Teil II). Um eine leichte adsorptive Anbindung der Zellen an die Trägeroberfläche auszuschließen wird der immobilisierte Biokatalysator vor der Verwendung in mehreren Waschschrinen mit Puffer gewaschen.

Der Erfolg der Immobilisierung, sowie die Stabilität des Immobilisates werden durch den wiederholten Einsatz in Satzreaktorversuchen festgestellt (Abbildung 3.8). Zwischen den Versuchen werden die Träger mehrmals mit Wasser gewaschen, um die tatsächliche Stabilität der Katalysatorpräparation zu bestimmen

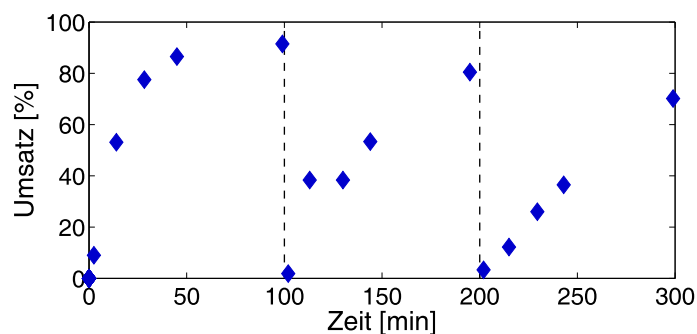


Abbildung 3.8: Umsetzungen von Acetophenon mit auf porösen Glasträgern immobilisierten ADH-'A'-*E. coli*-Zellen (300 mg_{FM} Träger immobilisiert mit 16 mg ADH-'A'-*E. coli*-Zellen / $0.89 \text{ U mg}_{\text{Zellen}}^{-1}$), Bedingungen: 80 mM Acetophenon, 18 % v v⁻¹ 2-Propanol, 1.0 mM NADH in KPi -Puffer (50 mM, pH 7.5), Batchvolumen 1 mL, 30 °C.

Die erste Umsetzung zeigt den Erfolg der Immobilisierung. Nach etwa 100 Minuten wird ein Gleichgewichtsumsatz von 91 % erreicht. Bei der Wiederverwendung tritt jedoch ein deutlicher Abfall der Aktivität des Immobilisates auf. Ob der Aktivitätsverlust durch eine Desaktivierung des Enzyms / der Zellen auf der Trägeroberfläche oder durch ein Abwaschen des Katalysators verursacht wird, wurde nicht bestimmt. Festzuhalten ist, dass die Immobilisierung möglich ist, aber der erhaltene Katalysator eine nicht ausreichende Stabilität für einen produktiven Einsatz aufweist.

⁶ Herstellerangabe.

3.3.1.2. Immobilisierung der gelösten ADH-'A'

Für die Immobilisierung der gelösten ADH-'A' werden vier verschiedene amino-funktionalisierte Träger verwendet: poröse Glasträger *Vitrabio* TRISOPERL® und TRISOPOR®, *ATG: biosynthetics* magnetische Träger und Nanodiamanten⁷ [Goldberg 2008]. Aufgrund der unterschiedlichen Charakteristiken der Trägermaterialien ist eine Vielzahl von möglichen Anwendungen bzw. Reaktorkonfigurationen denkbar. Die Immobilisierung wird analog zur Immobilisierung ganzer *E. coli*-Zellen durchgeführt (Abbildung 3.6, Teil II).

Poröse Glaspartikel

Die porösen, amino-funktionalisierten Glasträger TRISOPERL® und TRISOPOR® [Spohn 1994, Harborn 1997, Graebner 2001] werden in den Immobilisierungsexperimenten eingesetzt. Die Größe der Partikel liegt bei 100-200 µm mit einer Porengröße von 100.46 bzw. 49.8 nm⁸ (Abbildung 3.10).

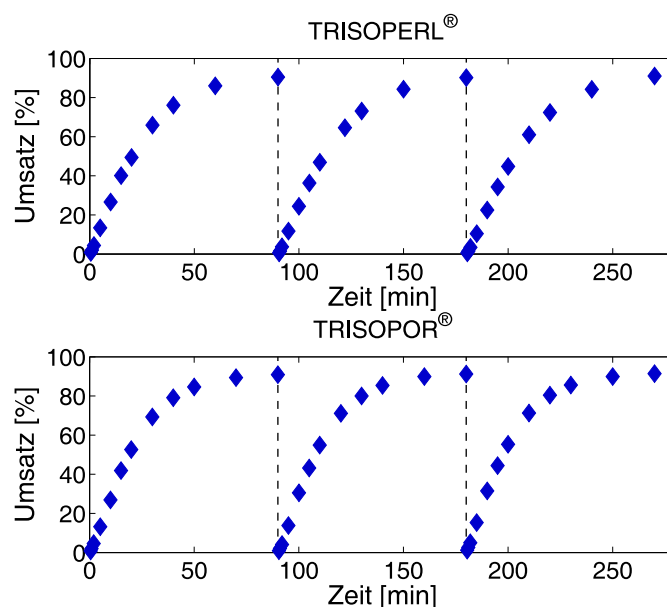


Abbildung 3.9: Umsetzungen von Acetophenon mit auf porösen Glasträgern – oben TRISOPERL®, unten TRISOPOR® – immobilisierter ADH-'A' (200 mg_{TM} Träger immobilisiert mit ADH-'A' (11.6 U⁹ für TRISOPERL® und 16.1 U für TRISOPOR®), Bedingungen: 80 mM Acetophenon, 18 % v⁻¹ 2-Propanol, 1.0 mM NADH in KP_i-Puffer (100 mM, pH 7.0), Batchvolumen 10 mL, Raumtemperatur.

Während der Immobilisierung wird in den Poren enthaltene Luft durch Anlegen eines Unterdruckes von 60 mbar entfernt und so die Effektivität der Anbindung erhöht. Die Ausbildung von Iminbindungen zwischen Glutaraldehyd und Trägeroberfläche und die daraus resultierende intensive Färbung der Suspension ermöglicht eine visuelle Beobachtung der Bindungsbildung.

⁷ Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Anke Krüger, Otto-Diels-Institut für Organische Chemie, Kiel.

⁸ Herstellerangaben.

⁹ Die Angabe der Gesamtaktivität für die folgenden amino-funktionalisierten Träger resultiert aus der Aktivität des zugegebenen Enzyms, der Aktivitätsausbeute der Träger und der Immobilisierungsausbeute.

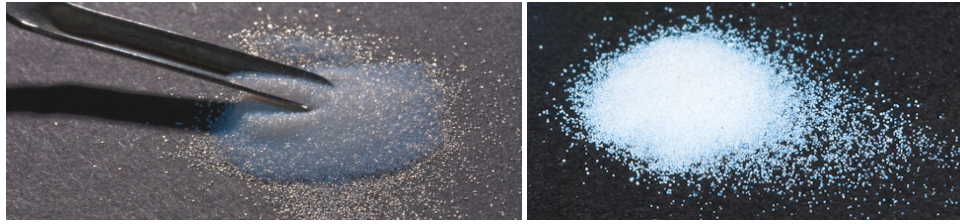


Abbildung 3.10: links TRISOPERL[®], rechts TRISOPOR[®].

Die Immobilisierungsausbeute ist in Hinblick auf Restaktivität in Überstand und Waschlösung nach der Immobilisierung in beiden Fällen annähernd quantitativ (TRISOPERL[®]: 99 % / TRISOPOR[®]: 100 %). Allerdings ist die Aktivität der immobilisierten ADH-'A' deutlich geringer. Die Gesamtaktivität des eingesetzten Enzyms von 26.3 U reduziert sich auf 11.8 U (45 %, 0.059 U mg⁻¹_{TRISOPERL}) bzw. 16.2 U (62 %, 0.081 U mg⁻¹_{TRISOPOR}) für die Immobilisate. Wie zu erwarten, ist die höhere Aktivität bei den Trägern mit dem geringeren Porendurchmesser, also der größeren Oberfläche (TRISOPOR[®]) zu finden.

Der Einsatz der beiden Immobilisate in wiederholten Satzreaktorumsetzungen zeigt die sehr gute Stabilität des gebundenen Katalysators, die Aktivität bleibt annähernd konstant (Abbildung 3.9). Zwischen den einzelnen Umsetzungen werden die Träger mit Phosphatpuffer (100 mM, pH 7) gewaschen, so dass die Aktivität nicht von frei gelösten Enzym resultieren kann.

Magnetische Träger

Eine Alternative zu porösen Glasträgern stellen magnetische Trägermaterialien dar. Sie ermöglichen durch ihre Eigenschaft eine einfache Reaktionsführung, da die Abtrennung der Träger von einem Reaktionsmedium durch Anlegen eines magnetischen Feldes möglich ist. Weiterhin kann der Katalysator in magnetisch stabilisierten Wirbelschichten eingesetzt werden [Halling 1980, Koneracká 1999, Arica 2000].

In den Immobilisierungsversuchen werden Magnetit (Fe₃O₄)-enthaltene amino-funktionalisierte Träger von *ATG:biosynthetics* mit einem Durchmesser von 1 µm eingesetzt. Das Verfahren entspricht der bereits oben erläuterten Vorgehensweise.

Die Immobilisierungsausbeute wird durch Vergleich der Aktivitäten von Immobilisat, überstehender Lösung und den kombinierten Waschlösungen bestimmt. Im Gegensatz zu den porösen Glasträgern wird keine vollständige Immobilisierung erreicht, die Ausbeute beträgt 86 %. Insgesamt verliert der Biokatalysator bei der Immobilisierung an Aktivität, die Aktivitätsausbeute beträgt 49 %.

Das Immobilisat zeigt eine hohe Stabilität in Satzreaktorversuchen. Zwischen den beiden Umsetzungen ist bei Wiederverwendung des immobilisierten Enzyms kein Aktivitätsverlust zu beobachten (Abbildung 3.11).

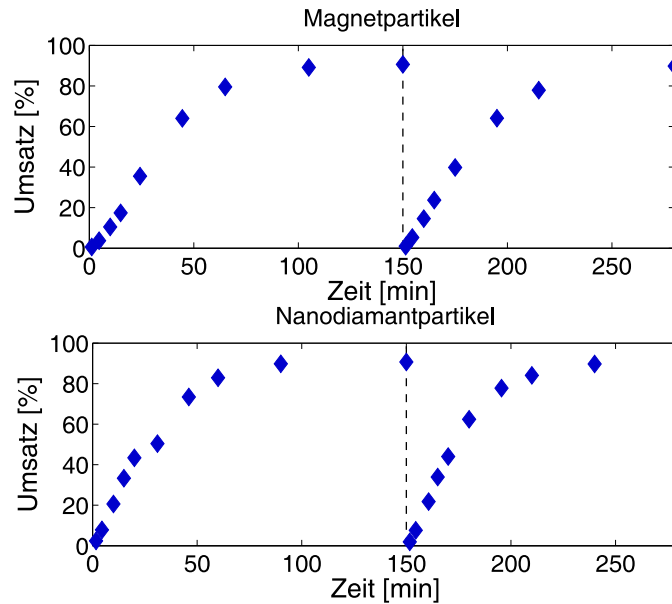


Abbildung 3.11: Umsetzungen von Acetophenon mit auf Magnetpartikel bzw. Nanodiamantpartikel immobilisierter ADH-'A' (14 mg Magnetpartikel immobilisiert mit ADH-'A' (0.7 U), 20 mg Nanodiamantpartikel immobilisiert mit ADH-'A' (1.4 U), Bedingungen: 80 mM Acetophenon, 18 % v v⁻¹ 2-Propanol, 1.0 mM NADH in KP_i-Puffer (100 mM, pH 7.0), Batchvolumen 1.05 mL, RT).

Nanodiamanten

Neben den klassischen porösen Glaspartikeln und den Magnetträgern werden Detonationsdiamanten in Nanogröße eingesetzt [Krüger 2006a, 2006b, Ozawa 2007]. Die unfunktionalisierten Nanodiamanten bilden als 4-5 nm große Partikel Agglomerate von etwa 300 nm [Krüger 2006b]. Die amino-funktionalisierten Partikel wurden von der Firma *micromod Partikeltechnologie GmbH*¹⁰ mittels Photonenkorrelationspektroskopie in Vergleich zu einem 204 nm Standard vermessen und haben eine Größenverteilung von etwa 200-1000 nm mit einem Verteilungsmaximum bei 406.1 nm (Abbildung 3.12).

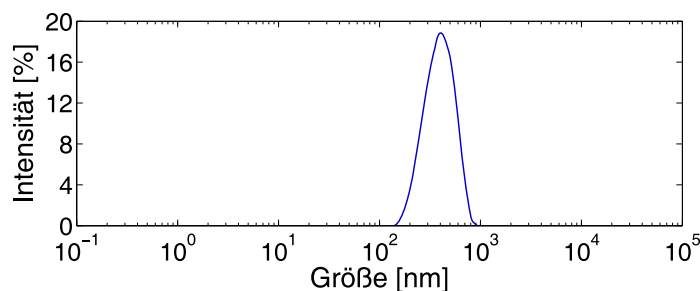


Abbildung 3.12: Größenverteilung der amino-funktionalisierten Nanopartikel.

Der Vorteil der geringen Partikelgröße im Allgemeinen ist die Vermeidung von Diffusionslimitierungen, die insbesondere bei porösen Trägern oder beim Einschluss von Enzymen auftritt. Für einen Vergleich kann die Größe des Proteins **3.11** $r \sim 0.72M^{1/3}$ aus der molekularen Masse (M) abgeschätzt werden [Tanford 1961]. Für den Radius eines globulären Proteins gilt dabei Formel 3.11. Der Durchmesser des ADH-'A'-Dimers (72 kDa) ist somit

¹⁰ <http://www.micromod.de/>

6 nm. Die in der Immobilisierung eingesetzten Partikel besitzen etwa die 70-fache Größe. Eine Abtrennung der Partikel ist nicht über einfache Filtration, sondern nur per Zentrifugation möglich.

Die Immobilisierung der ADH-'A' auf Nanodiamanten erfolgt analog zu den oben beschriebenen Verfahren. Die Immobilisierungsausbeute beträgt > 99.9 % und die Aktivitätsausbeute 49 %. Beim wiederholten Einsatz des Immobilisates in Satzreaktorversuchen kann keine signifikante Reduzierung der Aktivität gefunden werden.

Ein Vergleich der verschiedenen Immobilisierungsversuche auf amino-funktionalisierten Trägern zeigt in allen Fällen eine hohe bis sehr hohe Immobilisierungsausbeute (Abbildung 3.13). Es ist anzunehmen, dass bei über 99 % Ausbeute keine vollständige Absättigung der Trägeroberfläche mit dem Enzym erreicht wird.

Weiterhin ist in allen Fällen eine deutliche Reduzierung der Gesamtaktivität der ADH-'A' zu beobachten. Ob die Desaktivierung des Biokatalysators auf der Trägeroberfläche oder während der Immobilisierung auftritt ist nicht bekannt.

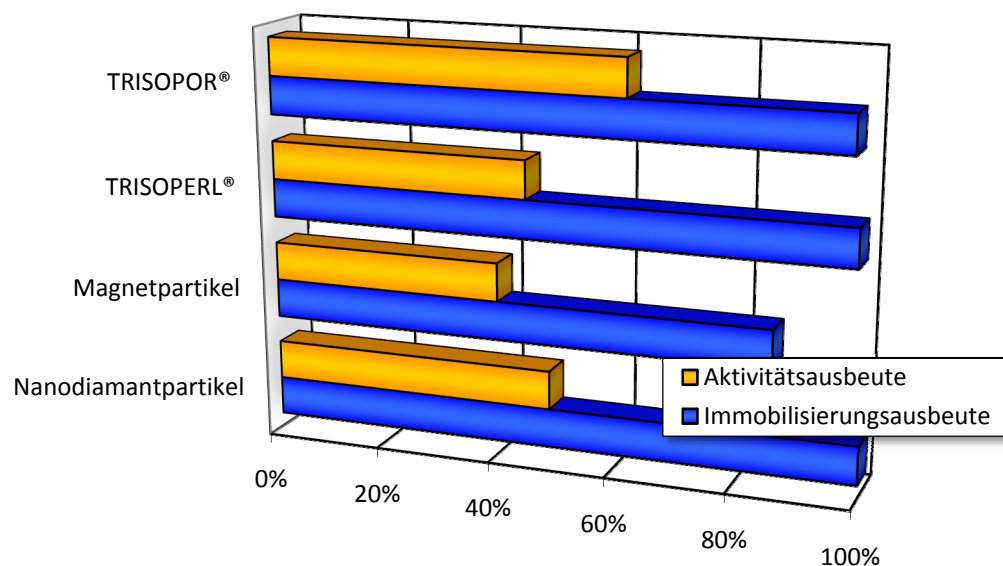


Abbildung 3.13: Aktivitäts- und Immobilisierungsausbeuten für Glas-, Magnet- und Nanodiamantpartikel.

3.3.2. Epoxy-funktionalisierte Träger

Neben den Enzymträgern mit einer Aminofunktionalisierung ist der Einsatz von Epoxy-funktionalisierten Trägern sehr verbreitet. Bindungen zwischen den Epoxyfunktionen und dem Enzym werden durch nucleophile Ringöffnung ausgehend von Amino-, Hydroxy- oder Thiol-Gruppen auf der Oberfläche ausgebildet [Mateo 2000]. In der Regel werden hydrophobe Trägermaterialien verwendet, um eine adsorptive Anbindung des Enzyms vor Ausbildung der kovalenten Bindungen zu unterstützen. Dieser Prozess wird durch hohe Ionenkonzentrationen begünstigt [Wheatley 1993].

Durch die universelle Art der Anbindung von Biokatalysatoren an Epoxy-Träger ist diese Immobilisierungsmethode weit verbreitet und daher werden eine Reihe kommerzieller Träger angeboten. Beispiele sind Sepabeads® EP [Ghazi 2005, Hilterhaus 2008, Mateo 2002], Eupergit C [van Langen 2002, Mateo 2000] oder TRISOPERL®-Epoxy¹¹. Um eine gute Vergleichbarkeit der Immobilisierungsexperimente mit den porösen, amino-funktionalisierten Glasträgern zu gewährleisten, wurden die TRISOPERL®-Epoxy-Gläser gewählt. Die verwendeten Träger haben einen Durchmesser von 100-200 µm und einen Porendurchmesser von 100 nm.

Die Immobilisierung der ADH-'A' wird mit verschiedenen Ionenstärken getestet, im Detail wird Kaliumphosphatpuffer in Konzentrationen von 100 mM und 500 mM eingesetzt. Die TRISOPERL®-Epoxy-Träger werden mit dem Enzym für 24 Stunden inkubiert und anschließend mit dem entsprechenden Puffer gewaschen. Zur Absättigung der eventuell verbleibenden Epoxy-Gruppen auf der Trägeroberfläche wird eine Glycinlösung eingesetzt. Sämtliche Waschlösungen und Überstände werden auf ihre Aktivität hin untersucht. Dabei stellt sich heraus, dass fast die gesamte Aktivität im Überstand nach der Immobilisierung zu finden ist. Für das Immobilisat kann in beiden Fällen keine Aktivität detektiert werden.

3.4. Stabilität

Die Stabilität des Biokatalysators ist ein elementarer Punkt in der Entwicklung eines kontinuierlichen Prozesses, unterschieden wird dabei in Lagerstabilität und Prozessstabilität. Eine lange und effektive Nutzung des Katalysators erhöht die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens. Eine Beeinflussung der Stabilität ist durch biologische, chemische oder physikalische Einflüsse gegeben (Kapitel

1.2.1.2).
3.12 $t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_d}$ Für die Bestimmung der Stabilität des Biokatalysators können die Parameter Halbwertszeit oder Biokatalysatordesaktivierung betrachtet werden (Formel 3.12-3.13) [Liese 2006]. Die Halbwertszeit $t_{1/2}$ kann ausgehend von der Desaktivierungsrate k_d berechnet werden. Diese ist definiert durch den Verlust an Aktivität pro Zeiteinheit und kann auf diese Weise experimentell bestimmt werden.

3.4.1. Lagerstabilität der ADH-'A'

Die Lagerstabilität der aufgereinigten ADH-'A' in lyophilisierter oder eingefrorener Form bei -20 °C in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7.0, 0.15 M NaCl) ist sehr hoch. Nach 10 Monaten Lagerung ist kein signifikanter Aktivitätsverlust zu beobachten [Kosjek 2004].

Für die Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten partiell gereinigten Enzymlösung wurde die Lagerstabilität unter den gegebenen Bedingungen vermessen. Die Lösung wird bei -20 °C insgesamt 3 Monate aufbewahrt und in regelmäßigen Abständen die Aktivität in Satzreaktorversuchen bestimmt. Analog zu den literaturbekannten Ergebnissen ist kein Verlust an Aktivität zu detektieren.

¹¹ <http://www.vitrabio-gmbh.com/>

3.4.2. Prozessstabilität der ADH-'A'

Die Lagerstabilität zeigt die Haltbarkeit des Biokatalysators nach dem Zellaufschluss. In einem Prozess liegen allerdings andere Bedingungen vor, so dass die Prozessstabilität getrennt untersucht werden muss. Unterschieden wird dabei zwischen Stabilität bei Prozesstemperatur und im Prozess selbst.

Stabilität in Puffer bei 30 °C

Die Durchführung von Biotransformationen erfolgt standardmäßig in Kaliumphosphatpuffer bei pH 7 und einer Temperatur von 30 °C. Unter diesen Bedingungen wird partiell gereinigte Enzymlösung inkubiert und in definierten Zeitabständen wird die Aktivität vermessen. Der beobachtete Aktivitätsverlust wird verwendet, um mit den entsprechenden Gleichungen (Formel 3.12-3.13) die Desaktivierungskonstante und die Halbwertszeit zu bestimmen.

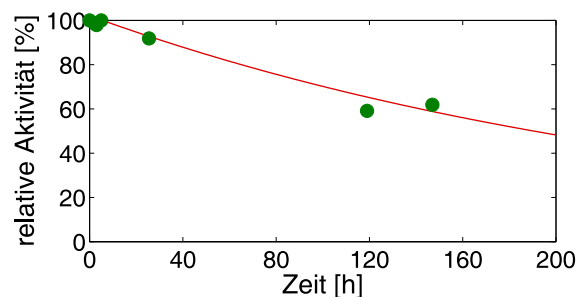


Abbildung 3.14: Aktivitätsabnahme der ADH-'A' bei 30 °C.

Die Aktivität wird in relativen Einheiten angegeben, v_0 ist gleich 100 %. Aus dem Fit ergibt sich $k_d = 0.037 \text{ h}^{-1}$ und $t_{1/2} = 185 \text{ h}$.

Stabilität im Enzym-Membran-Reaktor

Die Stabilität des Biokatalysators kann neben pH-Wert und Temperatur auch durch die Konzentration der Reaktionskomponenten oder Scherkräfte im Reaktor beeinflusst werden. Um alle üblichen Reaktionskomponenten in Kontakt mit dem Enzym zu bringen und gleichzeitig ein Maß für die Aktivität zu haben, bietet sich ein kontinuierlich betriebener Satzreaktor mit integrierter Membran für die Enzymrückhaltung an: der Enzym-Membran-Reaktor (EMR) [Wichmann 1981].

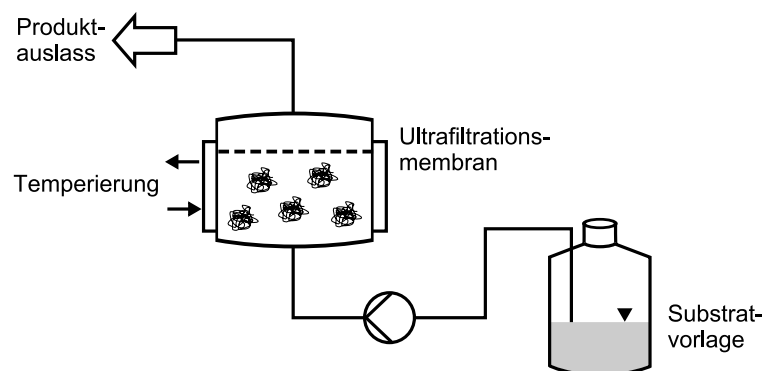


Abbildung 3.15: Fließbild des Enzym-Membran-Reaktors.

Der EMR besteht aus einem Stahlreaktor mit einem Volumen von 10 mL (Abbildung 3.15). Die Membran wird oberhalb des magnetisch betriebenen Rührers mit einer Lochsinterplatte in Position gehalten. Aus einem Vorlagebehälter wird Substratlösung mit einer Pumpe durch den Reaktor geleitet und dort vom zurückgehaltenen Enzym umgesetzt. Betrieben wird der Reaktor auf diese Weise als kontinuierlicher Rührkesselreaktor.

Für die Stabilitätsmessungen wird eine Substratlösung mit 2-Propanol und NADH verwendet. Das Vorlagegefäß wird auf 5 °C gekühlt, die Reaktion bei 30 °C ausgeführt. Am Auslass werden die Lösungen mit einem Fraktionssammler aufgefangen und gaschromatographisch analysiert.

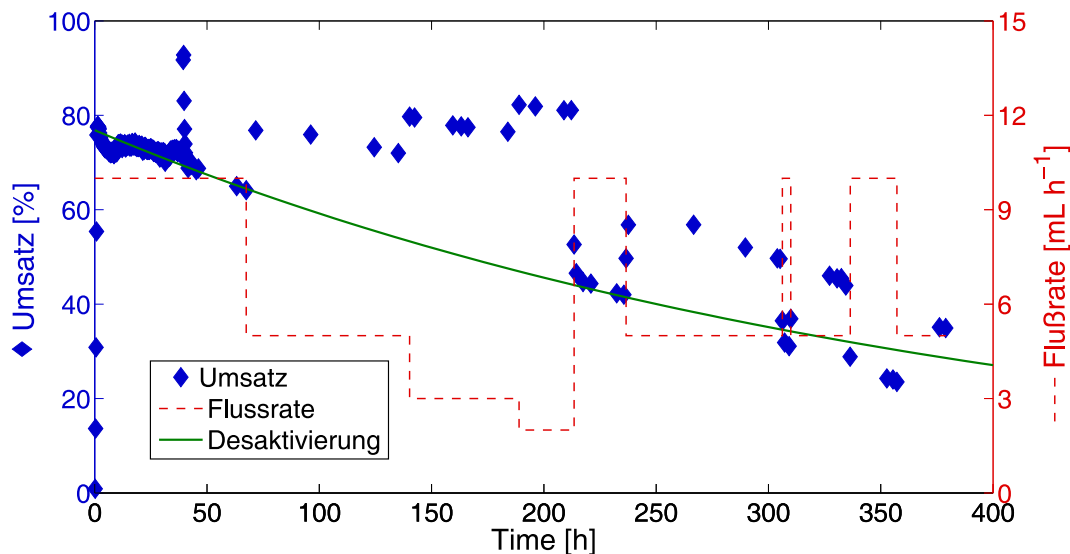


Abbildung 3.16: Umsetzung von Acetophenon im EMR mit partiell gereinigter ADH-'A' (◆: gaschromatographisch bestimmter Umsatz / ---: Flussrate / —: Desaktivierung) Bedingungen: 20 mM Acetophenon, 18 % v v⁻¹ 2-Propanol, 1.0 mM NADH bzw. 1 mM NAD⁺ (ab 32.5 h) in KP_i-Puffer (100 mM, pH 7.0), Reaktionstemperatur 30 °C, Substratvorlage 5 °C, Flussrate: 2 mL h⁻¹ - 10 mL h⁻¹, Enzymbeladung 25.8 U. Die Halbwertszeit wird für die Flussrate 10 mL h⁻¹ bestimmt. Das Enzym wird über eine Membran (MWCO 10 kDa) zurückgehalten.

Der Umsatz am EMR-Auslass steigt bis zur Einstellung des Gleichgewichtes auf ein Maximum an und fällt durch die Desaktivierung des Enzyms oder durch Verlust des Biokatalysators durch die Membran langsam ab (Abbildung 3.16). Während der Betriebszeit wird die Flussrate im Bereich von 2-10 mL h⁻¹ variiert. Deutlich sind höhere Umsätze bei niedrigeren Flussraten und damit höheren Verweilzeiten zu beobachten. In allen Fällen nimmt der jeweilige erreichte Umsatz stetig ab. Der hohe Umsatz bei etwa 40 Stunden kann durch einen Ausfall der Pumpe und dem damit verbundenen Weiterreagieren der Reaktionslösung im Reaktor erklärt werden. Für die Flussrate von 10 mL h⁻¹ wurde die Desaktivierung bestimmt, die Halbwertszeit unter den verwendeten Bedingungen liegt bei 11.1 Tagen.

3.4.3. Prozessstabilität der immobilisierten ADH-'A'

Die Immobilisierung der ADH-'A' ermöglicht eine vereinfachte Reaktionsführung und Wiederverwendung des Biokatalysators. Auch eine zusätzliche Stabilisierung eines Enzyms durch eine

Immobilisierung ist denkbar. Für eine Anwendbarkeit der Immobilisate in einem produzierenden Prozess ist die Stabilität ausschlaggebend. Aus diesem Grund wird die Stabilität von zwei Immobilisaten bestimmt: poröse Glaspartikel TRISOPOR®-Amino und Nanodiamanten. Analog zur Bestimmung der Prozessstabilität des freien Enzyms (s.o.) wird der erreichte Umsatz in einem kontinuierlichen Rührkesselreaktor gemessen.

TRISOPOR®-Amino-Immobilisat

Die Umsetzung von Acetophenon mit dem TRISOPOR®-Amino-Immobilisat wird in einem thermostatisierten Rundkolben durchgeführt. Eine Zuleitung von Substratlösung und das gleichzeitige Abpumpen der Produktmischung werden durch eine Schlauchpumpe mit zwei Schläuchen verwirklicht. Die Geschwindigkeit von Zu- und Ableitung ist somit gleich. Veränderungen des Füllstandes im Reaktor, bedingt durch einen geringfügig unterschiedlichen Durchmesser des Pumpenschlauches, werden über eine manuelle Zugabe von Substratlösung in den Reaktor kompensiert. Der Auslassschlauch ist mit einem Filter versehen, um ein Verlust an Immobilisat zu verhindern.

Unter den gegebenen Bedingungen¹² mit einer Gesamtaktivität¹³ von 58.4 U im Reaktor und einem Fluss von 10 mL h⁻¹ kann ein Umsatz von 90 % erreicht werden. Nach etwa vier Tagen wird das Experiment abgebrochen und die Halbwertszeit aus dem sinkenden Umsatz zu 11.2 Tage bestimmt.

Nanodiamanten

Der Versuchsaufbau für die Untersuchung der Prozessstabilität poröser Glaträger kann nicht direkt auf die Nanodiamanten übertragen werden, da diese mit üblichen Filtern nicht retentiert werden können. Aus diesem Grund werden analog zu den Versuchen mit gelöstem Enzym Membranen eingesetzt. Zur Abschätzung der benötigten Größe wird erneut Formel 3.11 verwendet. Mit einem Durchmesser von 406.1 nm würde ein globuläres Enzym eine Masse von etwa $2.2 \cdot 10^7$ kDa besitzen und kann damit von einer Membran mit einer Ausschlussgröße von 100 kDa zurückgehalten werden. Von der Trägersoberfläche frei gelöstes Enzym kann durch diese Membran aus dem Reaktor gespült werden. Um die Stabilität der Bindung des Enzyms zu bestimmen, wird ein weiteres Experiment unter Verwendung einer 10 kDa Membran durchgeführt. Die Verwendung der auf Nanodiamanten immobilisierten ADH-'A' im Enzym-Membran-Reaktor ergibt bei einer Flussrate von 10 mL h⁻¹ nur einen geringen Umsatz von etwa 30 %. Dies kann vor allem durch die geringe Gesamtaktivität von 3.0 U im Reaktor erklärt werden. Um während der Stabilitätsmessungen direkt auch eine Optimierung der Reaktionsführung zu ermöglichen, wird die gebundene Katalysatormenge erhöht und eine zusätzliche Stabilisierung des Immobilisates durchgeführt. Dazu wird der verwendete partiell gereinigte Rohextrakt in einer Ultrafiltrations-

¹² 20 mM Acetophenon, 18 % v v⁻¹ 2-Propanol, 1.0 mM NADH in KP_i-Puffer (100 mM, pH 7.0), Reaktionstemperatur 30 °C, Substratvorlage 5 °C, Flussrate: 10 mL h⁻¹, Enzymbeladung 58.4 U, 400 mg TRISOPOR®-Amino-Trägermaterial. Die Durchmischung erfolgt mit Hilfe eines Fish-Clip®-Rührers.

¹³ Gesamtaktivität resultiert aus der Aktivität des zugegebenen Enzyms, der allgemeinen Aktivitätsausbeute der Träger und der speziellen Immobilisierungsausbeute.

Zelle aufkonzentriert und für die Immobilisierung eingesetzt. Das Immobilisat wird durch Behandlung mit Glutaraldehyd zusätzlich verlinkt. Die Gesamtaktivität¹⁴ im entsprechenden kontinuierlichen Versuch erhöht sich so auf über 14.0 U. Weiterhin wird die Flussrate auf 5 mL h⁻¹ erniedrigt.

Beide Versuche zeigen einen langsamen Abfall des erreichten Umsatzes (Abbildung 3.17). Deutlich ist der höhere Umsatz bei der Verwendung des optimierten Immobilisates zu erkennen. Auch die Stabilität ist im Vergleich erhöht. Die Halbwertszeit im ersten Experiment beträgt 1.2 Tage und nach der Optimierung des Verfahrens 4.0 Tage, was einer Steigerung um den Faktor 3 entspricht.

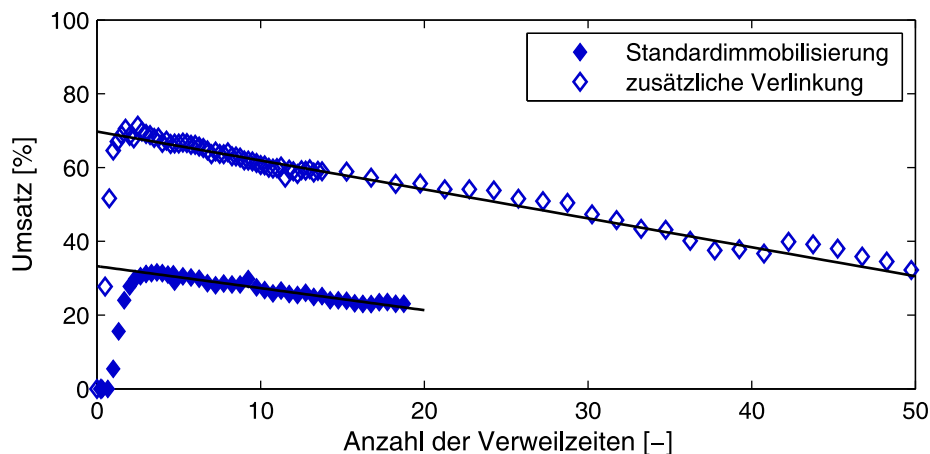


Abbildung 3.17: Stabilitätsbestimmung der Nanodiamanten-Immobilisate. Umsetzung von Acetophenon im EMR (MWCO 100 kDa) mit auf Nanopartikeln immobilisierter ADH-'A'. Bedingungen: 20 mM Acetophenon, 18 % v v⁻¹ 2-Propanol, 1.0 mM NADH in KP_i-Puffer (100 mM, pH 7.0), Reaktionstemperatur 30 °C, Substratvorlage 5 °C, Enzymbeladung und Flussrate: A) Standardimmobilisierung: 3.0 U / 20 mg Partikel, 10 mL h⁻¹ B) zusätzliche Verlinkung: 14.0 U / 20 mg Partikel, 5 mL h⁻¹.

Bei der Betrachtung der Umsatzkurve aus dem optimierten Experiment fällt auf, dass der Umsatz fast linear bis auf den Nullwert abfällt. Dies widerspricht dem üblichen Zerfall nach Formel 3.12, könnte aber beispielsweise durch ein Austragen von abgelöstem Enzym aus dem Reaktor erklärt werden. Um dies auszuschließen, wird der Versuch unter Standardbedingungen mit einer 10 kDa Membran wiederholt. Auf diese Weise wird ein Verlust von gelöstem Enzym aus dem Reaktor verhindert und der Umsatzverlust basiert hauptsächlich auf einer Desaktivierung des Biokatalysators.

¹⁴ Für die Berechnung der Gesamtaktivität wurde die allgemeine Aktivitätsausbeute von 49 %, die sich bei dem Standardimmobilisierungsprotokoll für die Nanodiamantpartikel ergibt, angenommen.

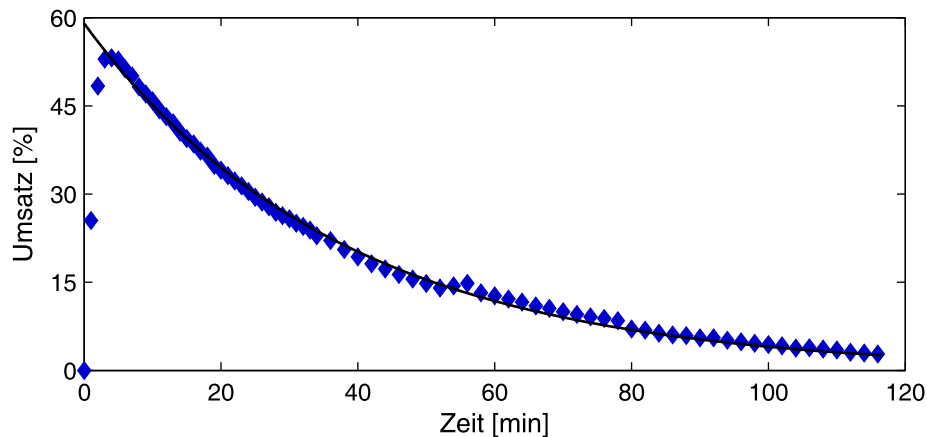


Abbildung 3.18: Umsetzung von Acetophenon im EMR (MWCO 10 kDa) mit auf Nanopartikeln immobilisierter ADH-'A'. Bedingungen: 20 mM Acetophenon, 18 % v v⁻¹ 2-Propanol, 1.0 mM NADH in KP_i-Puffer (100 mM, pH 7.0), Reaktionstemperatur 30 °C, Substratvorlage 5 °C, Enzymbeladung und Flussrate: 2.2 U / 20 mg Partikel, 5 mL h⁻¹.

Der Verlauf der Umsatzabnahme entspricht weitestgehend einer typischen Desaktivierungskurve. Die Halbwertszeit von 1.1 Tagen entspricht der unter den gleichen Bedingungen mit der 100 kDa Membran bestimmten, so dass davon auszugehen ist, dass in diesem Fall kein Verlust von aktivem Enzym von der Trägeroberfläche vorliegt.

3.5. Fazit

Die ausführlichen Untersuchungen des Biokatalysators ADH-'A' bilden die Basis für die Entwicklung eines Produktionsverfahrens für chirale Alkohole. Grundlegende Eigenschaften wie das Substratspektrum sind literaturbekannt und können direkt in die Prozessentwicklung integriert werden. Die Bestimmung der kinetischen Parameter anhand des Modellsubstrates Acetophenon ermöglicht eine Simulation von Prozessen und somit eine vorherige Optimierung der Reaktionsparameter am Computer. Die Übertragung des kinetischen Modells auf tatsächliche Reaktionen mit verschiedenen Startkonzentrationen wurde gezeigt.

Die Immobilisierung der ADH-'A' wurde mit verschiedenen Kopplungsmethoden an unterschiedliche Trägermaterialien durchgeführt. Die Auswahl der Träger ermöglicht den Einsatz eines Immobilisates in verschiedensten Reaktorkonfigurationen. Die Immobilisierungsausbeute ist in der Regel quantitativ, die Aktivitätsausbeute liegt bei maximal 62 %.

Die Prozessstabilität verschiedener Biokatalysator-Präparationen zeigt einen sehr hohen Wert für das gelöste Enzym. Auch das TRISOPOR®-Amino-Immobilisat ist über einen langen Zeitraum stabil, jedoch ist die Desaktivierungsrate deutlich höher. In allen Experimenten wird eine unterschiedliche Aktivitätsmenge auf die verschiedenen Trägermaterialien aufgebracht. Zu einer besseren Vergleichbarkeit wird die ermittelte Halbwertszeit durch die Aktivitätsmenge geteilt, um zu einer normierten Halbwertszeit zu gelangen. Für die Festlegung der Aktivität des Immobilisates wird bei den TRISOPOR®-Amino-Präparationen eine Aktivitätsausbeute von 62 % bzw. für die Nanodiamanten 49 % angenommen.

Tabelle 3.3: Übersicht über die durchgeführten Stabilitätsmessungen.

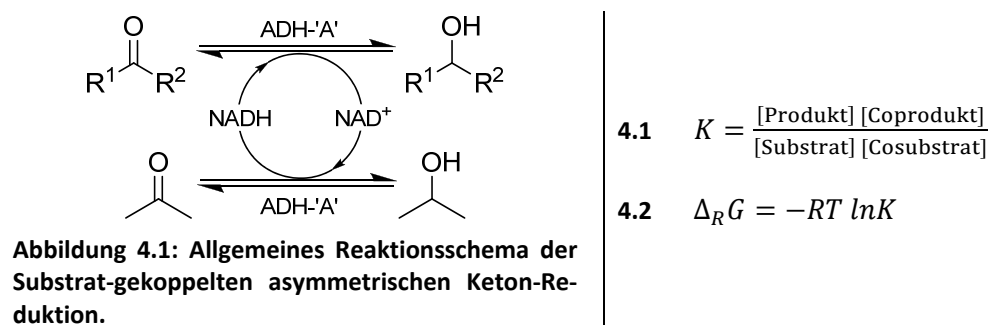
Art der Stabilitätsstudie	Desaktivierungsrate [h ⁻¹]	Halbwertszeit [d]	normierte Halbwertszeit [d U ⁻¹]
ADH-'A' bei 30 °C	0.037	7.7	-
Prozess mit gelöster ADH-'A' 10 kDa MWCO	0.003	11.1	0.43
TRISOPOR®-Amino-Immobilisat	0.002	11.2	0.19
Nanodiamanten, Standard	0.017	1.2	0.41
100 kDa MWCO			
Nanodiamanten, optimiert	0.011	4.0	0.29
100 kDa MWCO			
Nanodiamanten, Standard	0.027	1.1	0.50
10 kDa MWCO			

Die gelöste ADH-'A' zeigt ähnliche Desaktivierungsraten und Halbwertszeiten, wie das TRISOPOR®-Amino-Immobilisat. Allerdings ist die Gesamtaktivität im Reaktor beim immobilisierten Biokatalysator mehr als doppelt so hoch, so dass bei einer Normierung die Halbwertszeit des freien Enzyms deutlich höher ist. Bei den Nanodiamanten-Versuchen werden geringere Aktivitäten eingesetzt, so dass die normierten Halbwertszeiten erhöht sind. Eine Erhöhung der Stabilität durch Optimierung der Immobilisierungsbedingungen führt nicht zu dem gewünschten Ergebnis. Im Vergleich wird im optimierten Fall die geringste normierte Halbwertszeit erreicht.

Aufgrund der Tatsache, dass die Stabilität der gelösten ADH-'A' durch eine Immobilisierung nicht verbessert werden konnte und der zusätzlichen Kosten einer Immobilisierung wird das freie Enzym in der Prozessentwicklung bevorzugt.

4. Reaktion¹⁵

Die Entwicklung eines (bio)chemischen Prozesses erfordert neben der Charakterisierung und Optimierung des Biokatalysators die Betrachtung der Reaktion selbst, bzw. die Betrachtung der thermodynamischen Gleichgewichtslage. Im vorliegenden Fall einer Oxidoreduktasen-katalysierten Reduktion prochiraler Ketone mit Substrat-gekoppelter Cofaktorregenerierung (Abbildung 4.1) liegt ein Gleichgewicht zwischen Substrat, Produkt, Cosubstrat und Coprodukt vor. Der maximale Umsatz ist durch die Gleichgewichtslage begrenzt, es liegt in diesem Fall eine thermodynamische Limitierung vor.



Beim Erreichen des chemischen Gleichgewichtes ist die Reaktionsgeschwindigkeit für Hin- und Rückreaktion gleich schnell. Eine Veränderung oder Austausch des Katalysators beschleunigt dabei nur die Einstellung dieses Zustandes, aber nicht die absolute Lage. Der Quotient aus Produkt- und Substratkonzentrationen im Massenwirkungsgesetz ergibt die Gleichgewichtskonstante K (Formel 4.1). Desweiteren lässt sich die Gleichgewichtskonstante aus der Standardreaktionsenthalpie berechnen (Formel 4.2). Es zeigt sich dabei, dass auch die Temperatur einen Einfluss auf die Gleichgewichtslage hat.

Für den geplanten biokatalytischen Prozess kann eine Verschiebung der Gleichgewichtslage zugunsten des gewünschten Produktes durch Erhöhung der Cosubstratkonzentration oder durch Entfernen des Produktes bzw. Coproduktes aus dem Reaktionsgemisch erfolgen. Die Cosubstratkonzentration kann im vorliegenden Reaktionssystem mit der Alkohol Dehydrogenase ADH-'A' bis auf 80 % v^{-1} erhöht werden, da das Enzym unter diesen Bedingungen noch ausreichende Stabilität aufweist [Stampfer 2002, 2003b]. Allerdings ist mit dieser Methode das Erreichen eines vollständigen Umsatzes nicht möglich. Aus diesem Grund wird die *in-situ* Coproduktabtrennung aus der Reaktionsmischung und damit aus dem Gleichgewicht heraus ausgiebig untersucht.

Eine Anpassung der Temperatur ist bei der Verwendung von Enzymen nur in einem geringen Rahmen möglich, da die Stabilität des Enzyms berücksichtigt werden muss.

¹⁵ Teile dieses Kapitels sind publiziert in: Goldberg K, Edegger K, Kroutil W, Liese A (2006) Overcoming the thermodynamic limitation in asymmetric hydrogen transfer reactions catalyzed by whole cells. *Bio-technology and Bio-engineering* 95: 192-198.

4.1. Wahl der Substrate

Zu Beginn der Prozessentwicklung werden die zu verwendenden Substrate bzw. die gewünschten Produkte erwählt. Dazu soll zum einen ein Standardsubstrat verwendet werden, um einen Vergleich der Ergebnisse mit Prozessen aus der Literatur zu erleichtern. Zum anderen sollen Produkte produziert werden, die eine tatsächliche Anwendung in der Synthese von Wirkstoffen oder anderen Wertstoffen finden können.

Die Reduktion von Acetophenon zu 1-Phenylethanol ist ein Standardredoxsystem in vielen Publikationen und wird aufgrund der guten Vergleichbarkeit auch in dieser Arbeit als Standardsystem verwendet.

Heteroaromatische Ketone wie 2-Acetylfuran und 2-Acetylpyridin bzw. die entsprechenden chiralen Alkohole können in der Synthese verschiedener pharmazeutisch wirksamer Verbindungen eingesetzt werden. Bekannte weiterführende Synthesen führen zu Inhibitoren der Reversen Transkriptase von HIV-1 [Wischka 1998, Uenishi 1999] oder von Macropheliden zur Behandlung von Leukämie [Kobayashi 2001].

Die Reduktion von 2,5-Hexandion bietet zwei mögliche Produkte: 5-Hydroxyhexan-2-on und 2,5-Hexandiol [Tan 2006]. γ -Hydroxyketone können in der Synthese von Polymeren, Parfümen oder Pharmaka eingesetzt werden [Watanabe 1994]. Enantiomerenreines 2,5-Hexandiol ist Ausgangssubstanz für die Synthese von Übergangsmetallliganden wie DuPhos™ (1,2-Bis (phosphonalo)ethan) oder BPE (1,2-Bis(phosphonalo)benzol) [Burk 1991, 1995].

4.2. Synthese von Referenzverbindungen

Die Analyse der Reaktionszusammensetzung wird über die Bestimmung von Substraten und Produkten mittels Gaschromatographie erreicht. Für die Zuordnung von Peaks in den erhaltenen Chromatogrammen ist es notwendig, alle Verbindungen zuvor in reiner Form zu vermessen. Die zu erwartenden Produkte der einzelnen betrachteten Biotransformationen können entweder gekauft werden, oder je nach Preis oder Verfügbarkeit auch chemisch synthetisiert werden.

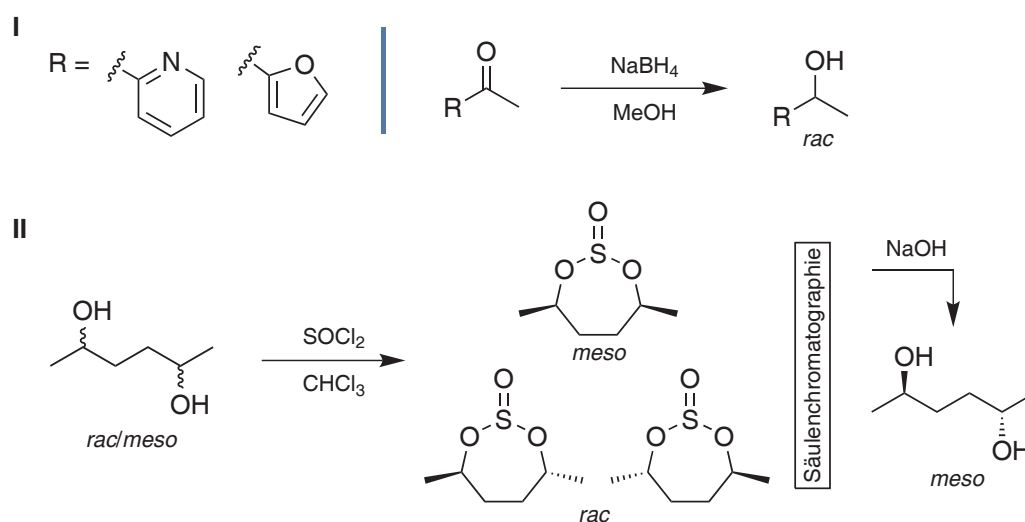


Abbildung 4.2: Synthese von Referenzverbindungen.

Die aus der Reduktion von 2-Acetylpyridin und 2-Acetylfuran erhaltenen Alkohole werden in racemischer Form durch Reduktion mit Natriumborhydrid in Methanol erhalten. Nach erfolgter Hydrolyse werden die Produkte (*rac*-2-(1-Hydroxyethyl)pyridin 63 % / *rac*-2-(1-Hydroxyethyl)furan, 77 %) durch Extraktion erhalten.

Aufgrund der Symmetrie von 2,5-Hexandiol liegt in unselektiv hergestellten Produkten ein Diastereomeregemisch aus *rac*-2,5-Hexandiol (2*R*, 5*R* bzw. 2*S*, 5*S*) und *meso*-2,5-Hexandiol (2*S*, 5*R* = 2*R*, 5*S*) vor. Bei der ADH-'A'-katalysierten, selektiven Reduktion von 2,5-Hexandion wird nur das 2*S*,5*S*-Isomer gebildet. Um alle drei möglichen Produkte in der GC-Analytik identifizieren zu können, ist eine Auftrennung des Isomeregemisches notwendig. Des Weiteren wird *meso*-2,5-Hexandiol als Substrat in der selektiven Oxidation zu (*R*)-5-Hydroxyhexan-2-on eingesetzt (Kapitel 4.6.2). Durch Umsetzung von *rac/meso*-2,5-Hexandiol mit Thionylchlorid wird ein cyclisches Sulfit erhalten, dessen Diastereomere säulechromatographisch aufgetrennt werden können. Das gewünschte Isomer wird unter basischen Bedingungen hydrolysiert und *meso*-2,5-Hexandiol in reiner Form erhalten (27 %).

4.3. *In-situ* Produktabtrennung

Die *in-situ* Produktabtrennung bzw. *in-situ* product removal ist die integrierte Abtrennung eines oder mehrerer Produkte aus einem laufenden Produktionsprozess [Lye 1999, Takors 2004]. Im Gegensatz zur klassischen Produktaufarbeitung nach der Beendigung des Prozesses bietet die *in-situ* Produktabtrennung einige Vorzüge [Freeman 1993]:

- Vermeidung von Produktinhibierungen
- Vermeidung von toxischen Effekten ausgehend vom Produkt
- Minimierung eines möglichen Produktabbaus
- Reduzierung des zu prozessierenden Flüssigkeitsvolumen
- Verringerung der Aufarbeitungsschritte
- Verschiebung des thermodynamischen Gleichgewichtes

Trotz des höheren Aufwands eines ISPR-Verfahrens werden die Gesamtprozesskosten in der Regel gesenkt [Takors 2004].

Eine Vielzahl biokatalytischer Produkte können *in-situ* aus einem Prozess entfernt werden. Die Betrachtung der Zielverbindungen literaturbekannter ISPR-Ansätze zeigt einen deutlichen Trend (Abbildung 4.3) [Stark 2003]. In mehr als einem Drittel aller Prozesse werden organische Lösungsmittel wie Ethanol, Butanol, Aceton oder Propanol abgetrennt. Die zweite große Gruppe umfasst die organischen Säuren wie Milchsäure, Essigsäure oder Buttersäure.

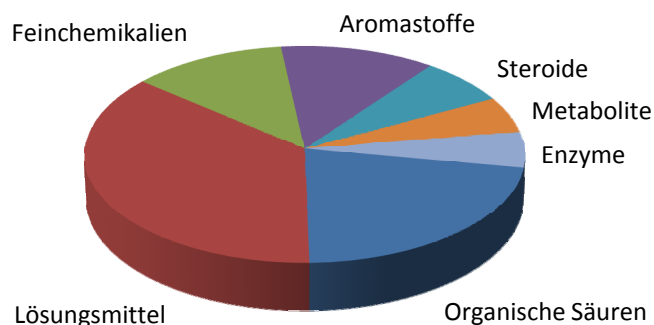


Abbildung 4.3: In der Literatur beschriebene ISPR-Prozesse im Zeitraum 1977-1997.

Die gewählte ISPR-Methode muss entsprechend der Eigenschaften der abzutrennenden Verbindung angepasst werden (Tabelle 4.1) [Stark 2003, Buque-Taboada 2006]. Bei Betrachtung des Reaktionsschemas (Abbildung 4.1) sind zwei Produkte mit unterschiedlichen Eigenschaften vorhanden.

Tabelle 4.1: Methoden der *in-situ* Produktabtrennung.

Methode	Beispiele	Anwendungsfelder
Evaporation	Ausgasen (Vakuum-)Destillation Pervaporation	flüchtige, niedermolekulare Verbindungen
Extraktion	Organische Lösungsmittel Überkritische Gase Reaktivextraktion	organische, hydrophobe Verbindungen
Permeation	Dialyse Elektrodialyse Umkehrosmose Nanofiltration	Hochpolare Verbindungen, organische Säure, Salze
Adsorption	Hydrophobe Adsorption Ionenaustauscher Affinitätsadsorption	Komplexere Verbindungen, organische Säure, Proteine
Präzipitation	Kristallisation	organische Säuren

Das Produkt ist ein chiraler Alkohol, der je nach Art der Substituenten hydrophob oder hydrophil bzw. auch flüchtig oder nichtflüchtig sein kann. In diesem Fall bietet sich eine Extraktion oder Adsorption der Verbindung an. Die Extraktion hat im vorliegenden Fall jedoch den Nachteil, dass das Enzym durch das Lösungsmittel desaktiviert werden könnte und weiterhin das Cosubstrat 2-Propanol als Molekül mit ähnlichen Eigenschaften mit extrahiert werden könnte. Aus diesem Grund wird die Adsorption des Produktes untersucht.

Das Coprodukt Aceton ist im Vergleich die flüchtigste Verbindung des Reaktionssystems und kann daher durch Ausgasen, also durch Einleiten eines Luftstroms durch die Lösung entfernt werden.

4.4. Produktabtrennung durch Adsorption

Die Adsorption ist die Anlagerung und Bindung von Stoffen aus Gas- oder Flüssigkeitsgemischen an der Oberfläche grenzflächenaktiver, meist poröser Feststoffe. Zu unterscheiden sind dabei die physikalische und die chemische Anlagerung. Bei der physikalischen Adsorption liegen elektrostatische oder van-der-Waals Kräfte zwischen Adsorbens und zu adsorbierender Verbindung vor. Eine spätere Desorption ist in der Regel unproblematisch. Die chemische Adsorption führt zu einer festen Valenzbindung [Sattler 2001].

Die Adsorption als thermisches Trennverfahren bietet einige Eigenschaften, die für die Integration in einen Bioprozess vorteilhaft sind. Die Adsorption läuft bei Umgebungstemperatur und somit bei energetisch besonders günstigen Bedingungen ab. Die Kompatibilität zu biokatalytischen Prozessen ist somit gegeben. Bei geeigneter Kapazität und Selektivität ist die Abtrennung nur geringer Konzentrationen oder die gleichzeitige Adsorption mehrerer Verbindungen möglich [Sattler 2001].

Die Wahl eines geeigneten Adsorbens-Materials ist von bestimmten Anforderungen abhängig. Dazu gehören hohe Kapazität, hohe Selektivität, günstige Desorptionseigenschaften und gute Regenerierbarkeit, hohe chemische und physikalische Beständigkeit und geringer Preis [Sattler 2001].

Für die *in-situ* Abtrennung von Produkten aus der ADH-'A' katalysierten Reduktion prochiraler Ketone wird die Verwendung einer adsorptiven Methode getestet. Dazu werden gängige, kommerzielle Adsorptionsstoffe, sowie neu-entwickelte Adsorptionspartikel des Kooperationspartners *Süd-Chemie AG* verwendet (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Verwendete Adsorbentien.

Adsorbens	Partikelgröße	Porengröße	Matrix
Alumosilicat	50 µm	7.2 nm	Al ₂ O ₃ : SiO ₂ - 60 : 40 % ww ⁻¹
γ-Aluminiumoxid	35 µm	17.2 nm	γ-Al ₂ O ₃
Amberlite® XAD-2	250-840 µm	9.0 nm	Styrol-Divinylbenzol-Copolymer
Amberlite® XAD-4	250-840 µm	4.0 nm	Styrol-Divinylbenzol-Copolymer
Amberlite® XAD-7HP	250-840 µm	9.0 nm	Acrylesterpolymer
Disintex™ 75	75 µm	n.b.	Polyvinylpyrrolidon
Smektische Schichtsilikate	n.b.	n.b.	Tonminerale (Bentonite)
Supelite™ DAX-8	250-400 µm	22.5 nm	Acrylesterpolymer

n.b.: nicht bekannt

4.5. Charakterisierung der Adsorption

Bei der Adsorption einer gelösten Verbindung an die Oberfläche eines Adsorbens bildet sich ein dynamisches Gleichgewicht aus. Für eine gegebene, konstante Temperatur wird die Beziehung zwischen der Beladung der Adsorbentien und der Konzentration in der Lösung aufgestellt. Die

daraus erhaltene Kurve ist die Adsorptionsisotherme. Aus der Form dieser Isotherme kann in empirischen Modellen auf die Art der Adsorption bzw. den Mechanismus geschlossen werden. Dazu werden die Messdaten in einer nicht-linearen Regression an verschiedene Modelle angepasst (Abbildung 4.4).

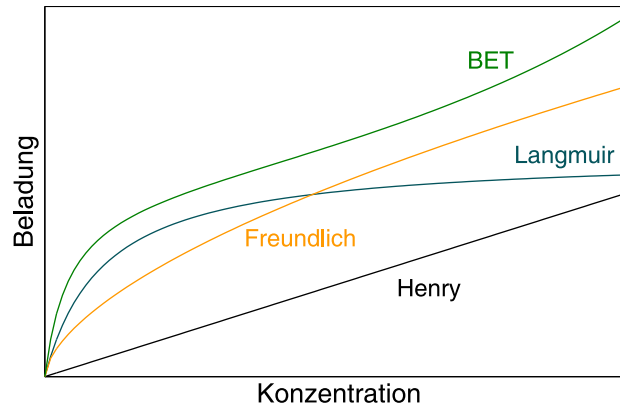


Abbildung 4.4: Verbreitete Isothermen zur Beschreibung von Adsorptionsvorgängen.

Die einfachste Beschreibung eines Adsorptionsvorganges ist die Isotherme nach *Henry* oder lineare Isotherme [Yang 2003]. Im Falle einer stark verdünnten Lösung kann ein linearer Zusammenhang zwischen Beladung q des Adsorbens und Konzentration c der adsorbierenden Verbindungen gefunden werden.

Ein weit verbreitetes Modell zur Beschreibung der physikalischen Vorgänge der Adsorption ist die *Langmuir*-Isotherme (Formel 4.3)

[Langmuir 1933]. Dabei wird angenommen, dass die Adsorption zu einer monomolekularen Schicht führt, die

$$4.3 \quad \text{Langmuir} \quad q = \frac{K_S q_{max} c}{1 + K_S c}$$

Adsorptionsenthalpie überall gleich ist und keine Wechselwirkung zwischen den adsorbierten Molekülen bestehen.

$$4.4 \quad \text{Freundlich} \quad q = K_S c^n$$

$$4.5 \quad \text{BET} \quad q = \frac{K_S q_{max} c}{(c_{sat} - c) \left(1 + (K_S - 1) \frac{c}{c_{sat}} \right)}$$

Das Resultat ist eine Sättigungskurve, so dass eine maximale Beladung q_{max} , also Besetzung aller Adsorptionsplätze, erreicht werden kann. Eine Abnahme der Adsorptionsenthalpie mit steigender Beladung des Adsorbens, insbesondere hervorgerufen durch Vorliegen verschiedener Adsorptionsmechanismen oder Wechselwirkungen zwischen den adsorbierten Verbindungen führt zur *Freundlich*-Isotherme (Formel 4.4) [Freundlich 1907]. Ein Nachteil dieses Modells ist jedoch, dass eine maximale Beladung durch den potentiellen Anstieg der Isotherme nicht beschrieben werden kann. Eine Weiterentwicklung des *Langmuir*-Modells ist die *BET*-Isotherme (*Brunauer, Emmet, Teller*, Formel 4.5) [Brunauer 1938]. Das Vorliegen einer Adsorption über eine Sättigung hinaus wird beim Aufbau von mehreren molekularen Schichten erreicht. Die Beladung kann auf diese Weise ins Unendliche steigen.

Für die in dieser Arbeit untersuchten Adsorbentien wird die Form der Adsorptionsisothermen bestimmt und die entsprechenden Sorptionskoeffizienten K_S berechnet.

4.5.1. Acetophenon / Phenylethanol-Adsorption

Die Adsorption von Acetophenon und Phenylethanol wird an Amberlite®-Trägern XAD-2, XAD-4 und XAD-7HP, Supelite™ DAX-8 und Disintex™ 75 untersucht.

Amberlite® XAD-2 ist ein polyaromatisches Adsorbens für hydrophobe Verbindungen bis zu einem Molekulargewicht von 20000 g mol^{-1} ; unter anderem von Phenolen, organischen Verbindungen und oberflächenaktiven Substanzen¹⁶. Die Eigenschaften von Amberlite® XAD-4 sind sehr ähnlich, der Unterschied zwischen den beiden Adsorbentien liegt nur in der Porengröße (Tabelle 4.2). Der dritte Amberlite®-Träger basiert im Vergleich auf einer anderen Matrix: XAD-7HP sind Polyacrylesterpartikel, die u.a. für die Adsorption niedermolekularer Verbindungen verwendet werden können. Auch Supelite™ DAX-8 basiert auf Acrylestern und wird für die Adsorption von Alkoholen, oberflächenaktiven Substanzen und Farbstoffen eingesetzt. Der Träger Disintex™ 75 basiert auf Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) und wird in der Getränkeindustrie zu Entfernung von Polyphenolen eingesetzt¹⁷. Es wird die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Adsorbens und den adsorbierten Polyphenolen angenommen, so dass eine Anwendung im vorliegenden Reaktionssystem vielversprechend ist.

Als Medium für die Adsorptionsversuche wird der übliche Reaktionspuffer (Kaliumphosphat 100 mM, pH 7) mit einem Anteil von 18 v v^{-1} 2-Propanol verwendet, um die direkte Übertragung der Ergebnisse in eine Produktionsreaktion zu gewährleisten.

Die Trägermaterialien werden zum Teil vor der Verwendung mit Methanol und Wasser gewaschen, um Anlagerungen und Verunreinigungen aus der Produktion der Partikel zu entfernen. Die Adsorbentien werden portionsweise zu den jeweiligen Lösungen gegeben und die Konzentrationsabnahme gaschromatographisch untersucht.

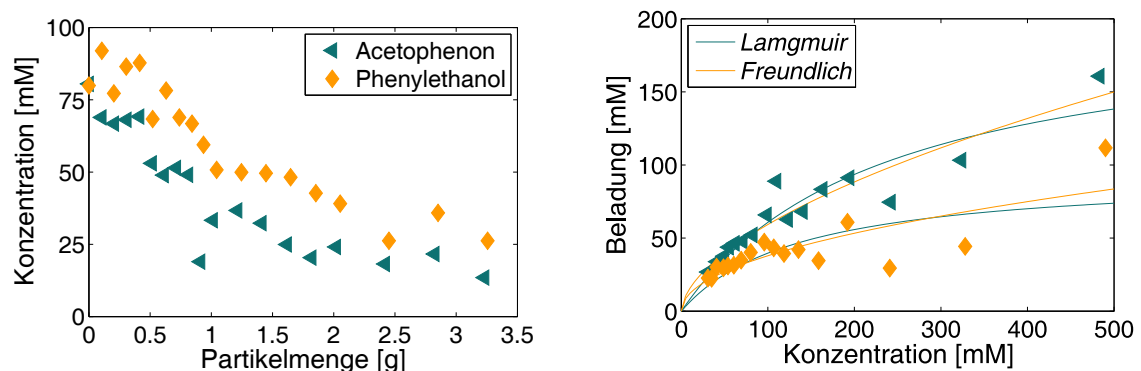


Abbildung 4.5: Konzentrationsabnahme von Acetophenon (80 mM) und *rac*-1-Phenylethanol (80 mM) in 18 v v^{-1} 2-Propanol, KPi -Puffer (100 mM, pH 7.0) durch Adsorption an Amberlite® XAD-4 (links), Trägeraliquots (100-400 mg), entsprechende Normierung der Ergebnisse auf 1 g Adsorbens (rechts).

Am Beispiel des Trägers Amberlite® XAD-4 wird die Adsorptionsleistung in Abhängigkeit von der Trägermenge veranschaulicht (Abbildung 4.6, links). Deutlich ist die Abnahme der Phenylethanolmenge in der Lösung zu beobachten. Allerdings nimmt neben der Produktkonzentration auch

¹⁶ Eigenschaften und Anwendungen der Adsorbentien: Produktkatalog auf <http://www.sigma-aldrich.com/>.

¹⁷ Produktbroschüre auf <http://online1.ispcorp.com/> (ISP International Specialty Products).

die Substratkonzentration ab. Es ist dabei keine hohe Selektivität zugunsten einer Komponente zu erkennen.

Bei der Bestimmung der Adsorptionsleistung durch Anwendung der Adsorptionsisothermen müssen die Daten umgewandelt werden. Im Experiment werden zu einer Lösung mit einer definierten Konzentration von Substrat und Produkt verschiedene Mengen an Adsorbens gegeben. Adsorptionsisothermen beziehen sich jedoch auf eine konstante Menge an Adsorptionspartikeln, so dass die Konzentration der Lösung und die adsorbierte Menge auf 1 g Adsorbens normiert werden (Abbildung 4.6, rechts). Eine eindeutige Zuordnung einer der beschriebenen Adsorptionsisothermen ist aufgrund der hohen Streuung der Werte nicht möglich. Es wird keine Sättigung des Trägermaterials erreicht, so dass prinzipiell die Isothermen nach *Langmuir* und *Freundlich* möglich wären. Beide Korrelationen geben die erzielten Ergebnisse mit ähnlicher Genauigkeit wieder. Es ist festzustellen, dass im betrachteten Bereich eine einschichtige Anlagerung der Verbindungen auf der Oberfläche des Adsorbens feststeht.

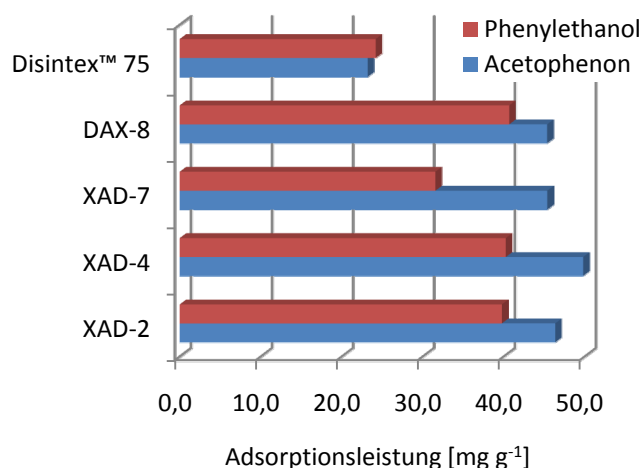


Abbildung 4.6: Adsorptionsleistung gegenüber Acetophenon und *rac*-1-Phenylethanol. 3.2 g Trägermaterial, Acetophenon (80 mM) bzw. *rac*-1-Phenylethanol (80 mM) in 18 % v v⁻¹ 2-Propanol, KP_i-Puffer (100 mM, pH 7). Disintex™ 75: 4 g Trägermaterial (4-fache Extraktion mit je 1 g), Acetophenon (40 mM) / *rac*-1-Phenylethanol (40 mM) in 18 % v v⁻¹ 2-Propanol, KP_i-Puffer (100 mM, pH 7).

Um die Leistung der einzelnen Träger miteinander vergleichen zu können, wird die absolute Abnahme der Konzentration pro Masse an Trägern miteinander verglichen (Abbildung 4.6). Die Amberlite® XAD- und der Supelite™-DAX8-Träger zeigen in allen Fällen eine geringe Selektivität zugunsten des Substrates Acetophenon. Die Adsorptionsleistung für Acetophenon ist etwa 3-5 % höher. Im Vergleich dazu zeigt das Disintex™ 75-Adsorbens eine geringere Adsorptionsleistung und Selektivität. Der Unterschied zwischen Acetophenon und Phenylethanol liegt im Bereich des Messfehlers.

4.5.2. 2-Acetylfuran / 2-(1-Hydroxyethyl)furan–Adsorption

Die Adsorption von 2-Acetylfuran und 2-(1-Hydroxyethyl)furan wird analog zum vorherigen Unterkapitel bestimmt. Verwendet werden die Amberlite® XAD-Träger.

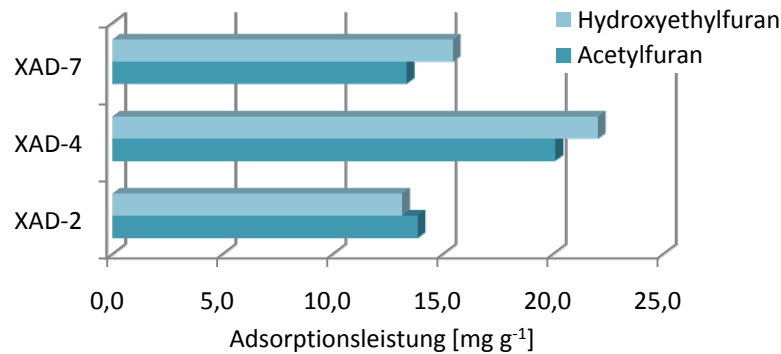


Abbildung 4.7: Adsorptionsleistung gegenüber 2-Acetylfuran und 2-(1-Hydroxyethyl)furan. 3 g Trägermaterial, 2-Acetylfuran (40 mM) / 2-(1-Hydroxyethyl)furan (40 mM) in 18 % v v⁻¹ 2-Propanol, KP_i-Puffer (50 mM, pH 7.5).

Die Adsorptionsleistung gegenüber 2-Acetylfuran und 2-(1-Hydroxyethyl)furan ist deutlich geringer im Vergleich zum System Acetophenon / Phenylethanol (Abbildung 4.7). Die höchste Affinität zeigt der Amberlite® XAD-4 Träger mit einer Kapazität von etwa 20 mg g⁻¹. Die Selektivität aller Träger ist eher gering, eine durchgehende Präferenz für Substrat oder Produkt ist nicht erkennbar.

4.5.3. Hexandion / Hexandiol-Adsorption

Smektische Schichtsilikate der Firma *Süd-Chemie AG* werden für die Adsorption von Hexandion

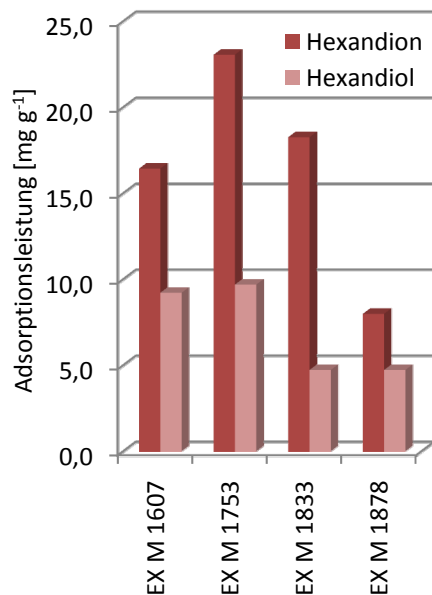


Abbildung 4.8: Adsorptionsleistung für Hexandion und Hexandiol. 3 x 0.5 g Trägermaterial, 2,5-Hexandion (50 mM) und *rac/meso*-2,5-Hexandiol (50 mM) in 18 % v v⁻¹ 2-Propanol, KP_i-Puffer (50 mM, pH 7.5) (20 mL).

und Hexandiol eingesetzt. Die Chargennummern der verschiedenen Proben sind EX M 1607, 1753, 1833 und 1878. Es handelt sich dabei in allen Fällen um Bentonite, also Mischungen verschiedener Tonminerale. Die Bentonitstruktur stellt einen mineralischen Kationenaustauscher dar und hat eine hohe Affinität zu verschiedensten organischen Verbindungen [Lagaly 2006], so dass ein Einsatz als Adsorbentmaterial naheliegend ist.

Die Bentonite werden ohne zusätzliche Waschschritte direkt für die Adsorptionsversuche eingesetzt. Die beobachtete Adsorptionsleistung für die Schichtsilikate liegt zwischen 5 und 25 mg g⁻¹, dabei ist eine Selektivität gegenüber dem Substrat Hexandion zu finden. Die vorliegende Adsorptionsleistung ist allerdings für einen produktiven Einsatz in der *in-situ* Abtrennung von Hexandiol zu gering. Für die Abtrennung von 100 mM (11.8 g L⁻¹) Hexandiol aus einem Liter Lösung mit dem Träger EX M 1753 wäre eine Zugabe von über 1.2 kg Partikel nötig.

4.5.4. Kontinuierliche Adsorption in einem Festbett

Ein alternativer Ansatz zur Abtrennung des Produktes durch Adsorption an Partikel direkt aus der Reaktionsmischung ist die Auslagerung der Abtrennung in ein externes Modul. Durch kontinuierliches Umpumpen der entsprechenden Reaktionslösung durch ein Festbett der Adsorptionspartikel und Zurückhalten des Katalysators im Reaktor können Reaktion und ISPR voneinander räumlich getrennt werden. Die modulare Bauweise bietet dabei eine hohe Flexibilität und erlaubt eine schnelle Umstellung eines Produktionsprozess auf andere Substrate und Produkte.

Eingesetzt werden Amberlite® XAD-7HP Partikel (12.7 g_{FM}) in einer *Pharmacia* Kunststoff-Säule (Füllhöhe 105 x 16 mm) mit einer Flussrate von 1 mL min⁻¹. Das Festbett wird unter Umlaufbedingungen betrieben und die Konzentration im Vorratsbehälter (100 mL) in regelmäßigen Abständen gaschromatographisch bestimmt. Als Medium wird eine typische Reaktionslösung mit Acetophenon und Phenylethanol (je 40 mM) verwendet (Abbildung 4.9).

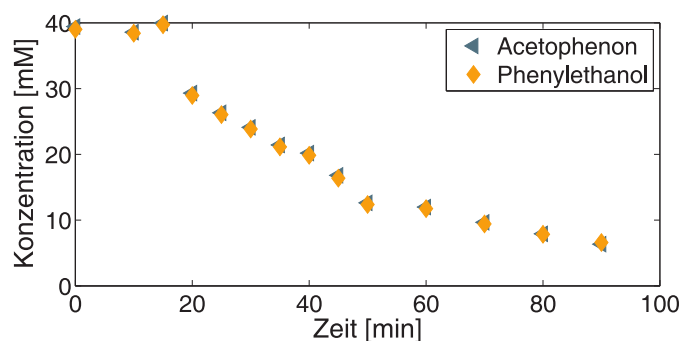


Abbildung 4.9: Konzentrationsabnahme von Acetophenon (40 mM) / *rac*-1-Phenylethanol (40 mM) in 18 % v v⁻¹ 2-Propanol, KP_i-Puffer (100 mM, pH 7.0), Gesamtvolumen 100 mL, in einem Festbett aus Amberlite® XAD-7-HP Partikel (Flussrate 1 mL min⁻¹).

Die Konzentration beider Komponenten im Vorratsbehälter nimmt im Verlauf des Umpumpens ab. Durch Verwerfen eines Säulenvolumens zu Beginn des Experimentes ist ein Verdünnungseffekt auszuschließen. Eine Selektivität gegenüber einer Komponente ist nicht festzustellen, ein Einsatz zur kontinuierlichen Abtrennung des Produktes zur Überwindung der thermodynamischen Limitierung ist so nicht möglich.

4.5.5. Desorption der abgetrennten Verbindungen

Ein adsorptives Verfahren zur *in-situ* Abtrennung von Produkten kann nur dann eingesetzt werden, wenn abgetrennte Verbindungen nach der Reaktion möglichst quantitativ wieder eluiert werden können.

Für die Eignung als Desorptionsmittel werden verschiedene Lösungsmittel betrachtet: Essigsäureethylester, Aceton, und verschiedene 2-Propanol-Lösungen in Puffer (50, 65 und 100 % 2-Propanol in 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7). Die Wahl der Lösungsmittel erfolgt nach hoher Löslichkeit der Substrate und Produkte bzw. nach möglichst hoher Kompatibilität zu einem eventuell angebondenen Enzym. Acetophenon und Phenylethanol werden an Amberlite® XAD-7HP-

Partikel gebunden. Die beladenen Träger werden dreimal mit jedem Lösungsmittel extrahiert und die Summe der gelösten Verbindungen verglichen (Abbildung 4.10).

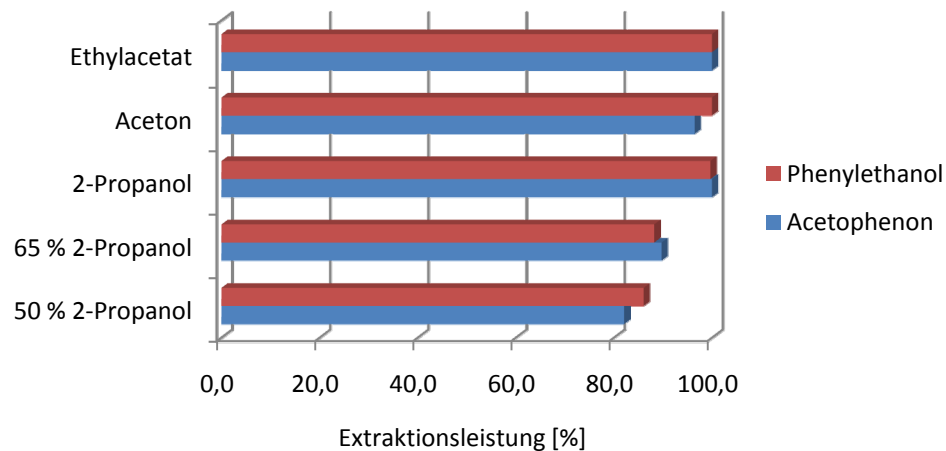


Abbildung 4.10: Desorption von Acetophenon und *rac*-1-Phenylethanol mit verschiedenen Lösungsmitteln. 5 g Trägermaterial, Acetophenon (40 mM) / *rac*-1-Phenylethanol (40 mM)-Lösung (20 mL) in 18 % v⁻¹ 2-Propanol, KP_i-Puffer (100 mM, pH 7.0). Dreifache Extraktion mit jeweils 20 mL des jeweiligen Lösungsmittels.

Die Verwendung von Lösungsmitteln wie Essigsäureethylester, Aceton und 2-Propanol führt zu einer fast quantitativen Extraktion von Acetophenon und Phenylethanol. Wird ein 2-Propanol-Puffer-Gemisch verwendet, ist die maximale wiedergewonnene Substanzmenge von der Lösungsmittelkonzentration abhängig. Bei 65 % 2-Propanol können etwa 90 %, bei 50 % 2-Propanol etwa 80 % der adsorbierten Verbindungen in drei Extraktionsschritten gelöst werden.

4.5.6. Kompatibilität des adsorptiven Verfahrens

Bei der Betrachtung einer adsorptiven Methode zur *in-situ* Abtrennung eines Produktes aus einem biokatalytischen Prozess muss neben der Adsorptionsleistung und Selektivität bzgl. Substrat oder Produkt auch der Einfluss auf den Katalysator selbst und auf den Cofaktor betrachtet werden.

4.5.6.1. Adsorption des Cofaktors

Die Adsorption des Cofaktors NADH wird in zwei verschiedenen Medien untersucht, Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7) und Kaliumphosphatpuffer mit 18 % v⁻¹ 2-Propanol. Der Puffer ohne Cosubstrat-Zugabe wird verwendet, da neben der Substrat-gekoppelten Cofaktorregenerierung mit 2-Propanol auch eine alternative Cofaktorregenerierung verwendet werden könnte. Die Versuche werden analog zu den Substrat / Produkt-Adsorptionsversuchen durch Zugabe der einzelnen Adsorbentien und Bestimmung der Gehaltsveränderungen durchgeführt. Die Konzentration an NADH in der Lösung wird photometrisch bei 340 nm bestimmt.

Die Versuche zeigen deutlich die Adsorption von NADH an die verschiedenen Träger, insbesondere aus der reinen Pufferlösung (Abbildung 4.11). Der stärkste Effekt ist bei Amberlite® XAD-4 zu finden, nur etwa 20 % des NADHs verbleibt in Lösung. Die Anwesenheit von 2-Propanol in der

Reaktionsmischung führt zu einer geringeren Adsorption des Cofaktors. Nur 5-10 % NADH werden bei Anwesenheit von 2-Propanol von den Trägern adsorbiert. Die geringste Affinität zur Adsorption des Cofaktors mit und ohne Anwesenheit des Cosubstrates ergibt sich für Amberlite® XAD-7HP.

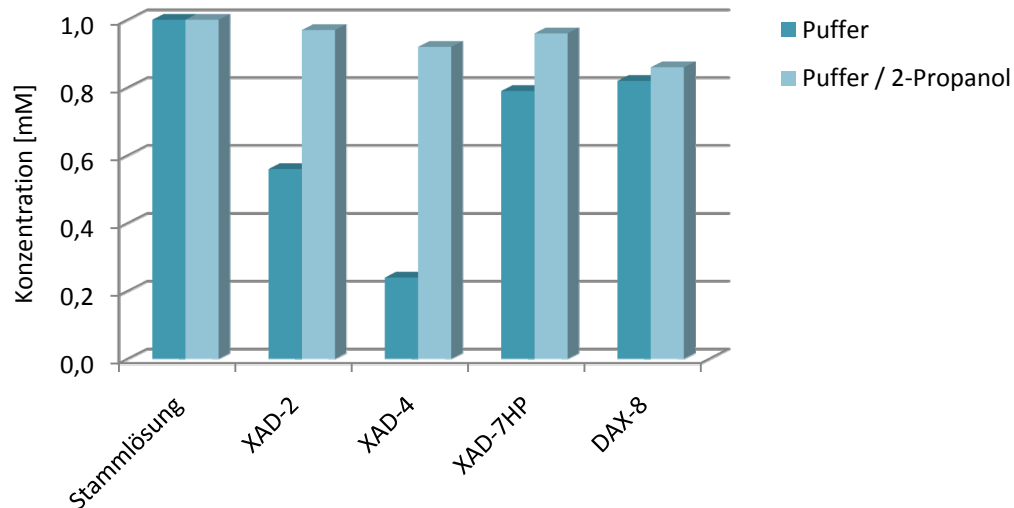


Abbildung 4.11: Konzentrationsveränderung durch NADH-Adsorption. 3 g Trägermaterial, 1 mM NADH-Lösung in KP_i -Puffer (100 mM, pH 7.0) bzw. 18 % v v⁻¹ 2-Propanol, KP_i -Puffer (100 mM, pH 7.0), Gesamtvolumen 20 mL.

4.5.6.2. Adsorption des Enzyms

Die Adsorption des Enzyms wird bei zwei verschiedenen Experimenten betrachtet. Zunächst wird eine partiell gereinigte Enzymlösung im Umlauf durch ein Festbett von Amberlite® XAD-7HP Partikeln geleitet und die Abnahme der Aktivität in der Lösung beobachtet. Um festzustellen, ob eventuell auf den Partikeln adsorbiertes Enzym noch Aktivität aufweist, werden mit den Partikeln Umsetzungen durchgeführt.

Adsorption beim Umpumpen durch ein Adsorptionsfestbett

Der Einsatz eines Adsorptionsfestbettes in Kombination mit dem Umpumpen einer Reaktionslösung erfordert bei Abwesenheit einer Katalysatorrückhaltung eine ausreichende Kompatibilität zwischen Adsorptionsmaterial und gelöstem Enzym. Dazu wird eine partiell gereinigte Enzymlösung durch eine mit Amberlite® XAD-7HP Partikeln (12.7 g_{FM}) gefüllte *Pharmacia* Kunststoff-Säule (105 x 16 mm) mit einer Flussrate von 1 mL min⁻¹ umgepumpt und die Aktivität in regelmäßigen Abständen bestimmt. Die Stabilität des Enzyms wird durch den Vorgang des Umpumpens nicht beeinflusst. Die partiell gereinigte Enzymlösung wird vor dem Einsatz filtriert (0.45 µm), um ein Verstopfen der Pumpe bzw. Säule zu verhindern. Die Anfangsaktivität von 4.31 U mL⁻¹ sinkt bereits innerhalb einer Stunde auf 0.99 U mL⁻¹ (23 %) ab. Nach drei und mehr Stunden ist keine Aktivität mehr zu detektieren, d. h. die gesamte Enzymmenge ist in der Säule gebunden. Auch nach Waschen der Partikel mit Kaliumphosphatpuffer (250 mL, 100 mM, pH 7) wird keine Aktivität in der Waschlösung festgestellt.

Um festzustellen, ob die ADH-'A' auf den XAD-7HP Partikeln noch aktiv ist, werden die Partikel mit Wasser gewaschen und in einer Reaktion mit Acetophenon als Substrat eingesetzt. Die Waschlösung zeigt dabei keine Aktivität. Aufgrund der gleichzeitigen Adsorption von Substrat und Produkt an die Partikel ist allerdings keine genaue Bestimmung der Aktivität möglich. Da die Selektivität der Adsorption gegenüber Substrat und Produkt in etwa gleich ist, kann aus dem Verhältnis der Konzentrationen in Lösung der Umsatz abgeschätzt werden. Nach einer Reaktionsdauer von 20 Stunden wird ein Umsatz von 74 % erreicht (2 g Partikel). Die ADH-'A' ist nach der Anbindung weiterhin aktiv, ein Einsatz der Säule zum Abtrennen des Produktes ist aber nur mit gleichzeitiger Rückhaltung des Enzyms möglich.

Umsetzungen mit adsorbierter ADH-'A'

Da die in der Säule adsorbierte ADH-'A' weiterhin Aktivität aufweist, könnte dies ein alternativer Ansatz zur gleichzeitigen Katalysatoradsorption und Produktabtrennung mit nur einer Partikel-sorten darstellen. Für diesen Zweck muss allerdings die Abtrennung des Produktes kompatibel zum gebundenen Enzym sein.

Für die Untersuchung werden Amberlite® XAD-7HP Partikel (3 g) in einer partiell gereinigten Enzymlösung (10 mL) inkubiert. Durch Adsorption des Enzyms sinkt die Aktivität der partiell gereinigten Enzymlösung von 4.5 U mL^{-1} auf 0.3 U mL^{-1} , die Immobilisierungsausbeute beträgt also 93 %. Bei der Umsetzung von Acetophenon (80 mM, 1 mM NADH, $18 \% v v^{-1}$ 2-Propanol) wird mit den Partikeln als Katalysator nach 60 Minuten Reaktionszeit ein Umsatz von 83 % erreicht. Zur Desorption des gebildeten (S)-1-Phenylethanol werden die Partikel nach der Umsetzung mit 2-Propanol gewaschen. Die Summe der Konzentrationen aus dem Überstand und der Desorptionslösung entspricht in etwa der Massenbilanz. Nach der Spülung werden die Partikel noch zweimal eingesetzt, dabei werden nach 60 Minuten nur noch Umsätze von 23 % bzw. 5 % erreicht. Das adsorbierte Enzym zeigt auch nach den Spülungen mit 2-Propanol noch Aktivität, diese ist allerdings gegenüber den unbehandelten Partikeln deutlich erniedrigt. Auch eine schonendere Desorption des Produktes mit $50 \% v v^{-1}$ 2-Propanol zeigt keine besseren Ergebnisse.

4.5.7. Adsorption aus Essigsäureethylester

Die Adsorption der verwendeten Ketone und sekundären Alkohole aus Puffer / 2-Propanol ist nur mit geringer Effektivität möglich. Selbst bei der höchsten Adsorptionsleistung, d.h. von Acetophenon durch Amberlite® XAD-4, werden 250 g Adsorbens für die vollständige Entfernung von 100 mM Acetophenon aus 1 L Lösung benötigt.

Als Alternative zu einer *in-situ* Abtrennung aus dem wässrigen Reaktionsmedium wird die selektive Adsorption aus einer Essigsäureethylester-Lösung getestet. Die Extraktion mit Essigsäureethylester stellt den ersten Schritt einer potentiellen Aufarbeitung dar und könnte auch in einem kontinuierlichen Modus implementiert werden. Zum Einsatz für diese Untersuchungen kommen die Träger Alumosilicat (EX M 1985) und γ -Aluminiumoxid (EX M 1986). Die Adsorption von Acetophenon, Phenylethanol, Hexandion und Hexandiol wird durch Zugabe der unbehandelten, trockenen Träger untersucht.

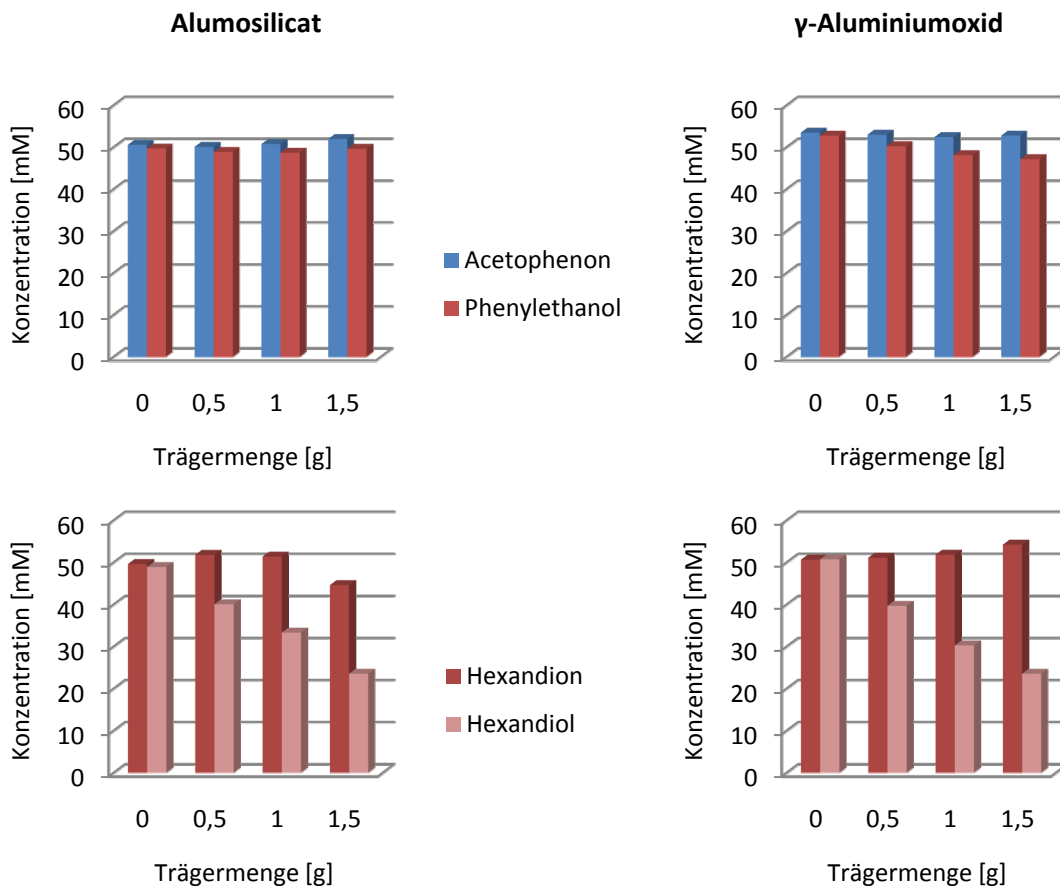


Abbildung 4.12: Adsorptionsversuche aus Essigsäureethylester. Links: Alumosilicat, rechts: γ -Aluminiumoxid. 3 x 0,5 g Trägermaterial, Acetophenon (50 mM) / *rac*-1-Phenylethanol (50 mM)-Lösung bzw. 2,5-Hexandion (50 mM) / *rac/meso*-2,5-Hexandiol (50 mM)-Lösung in Essigsäureethylester (15 mL).

Die Adsorptionsleistung der Träger für die Abtrennung von Acetophenon und Phenylethanol aus Essigsäureethylester ist sehr gering. Nur γ -Aluminiumoxid zeigt eine leichte Tendenz zur Adsorption von Phenylethanol, die Kapazität ist mit $6,8 \text{ mg g}^{-1}$ aber recht gering.

Beim Einsatz von Hexandion und Hexandiol ist allerdings ein deutlicher Trend zu erkennen. Beide Trägermaterialien zeigen eine eindeutige Selektivität für den Alkohol, die adsorbierte Menge an Hexandion ist dabei zu vernachlässigen. Die erreichten Kapazitäten für Hexandiol betragen $31,0 \text{ mg g}^{-1}$ für Alumosilicat bzw. $33,2 \text{ mg g}^{-1}$ für γ -Aluminiumoxid.

4.6. Coproduktabtrennung

Eine Maximierung des Umsatzes kann neben der Entfernung des Hauptproduktes auch durch das Austragen des Coproduktes Aceton erfolgen. Auch auf diese Weise kann die thermodynamische Limitierung überwunden werden.

4.6.1. ISPR von Aceton

Aceton ist die Verbindung in der Reaktionsmischung mit dem geringsten Siedepunkt, ist also am leichtflüchtigsten. Durch das Eintragen eines Gases wie Stickstoff oder Luft kann das Aceton aus der Lösung entfernt werden [Stillger 2002, Sattler 2001]. Um ein Austragen des Reaktionswassers oder des Cosubstrates 2-Propanol zu verhindern, wird die verwendete Luft vor dem Einleiten mit diesen Komponenten gesättigt. In früheren Arbeiten wurde die Effektivität dieses Verfahrens, also die selektive Austragung von Aceton aus einer Mischung mit wässrigem Puffer, 2-Propanol (15 % v v⁻¹) und Aceton (15 % v v⁻¹), bestätigt [Goldberg 2005, 2006].

Zur Veranschaulichung der Effektivität des ISPR-Verfahrens werden Satzreaktorumsetzungen von Acetophenon mit und ohne Aceton-Abtrennung durchgeführt (Abbildung 4.13).

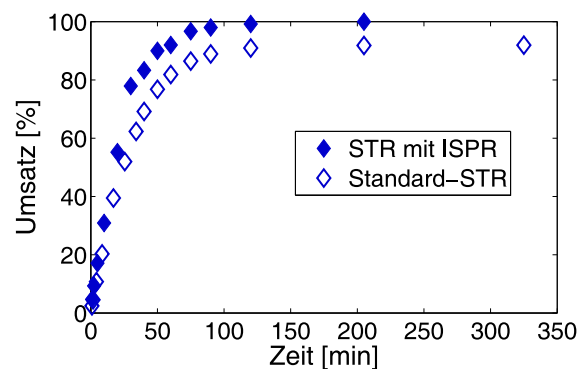


Abbildung 4.13: Satzreaktorversuch mit und ohne ISPR. Umsetzung von Acetophenon (80 mM) in 18 % v v⁻¹ 2-Propanol, KP_i-Puffer (100 mM, pH 7.0), jeweils 88 U ADH-'A', Gesamtvolumen 25 mL.

Der Gleichgewichtsumsatz unter Standardbedingungen (80 mM Acetophenon, 18 % v v⁻¹ 2-Propanol) von 92.3 % kann durch Integration der ISPR auf > 99.9 % gesteigert werden.

Die Auswirkung der integrierten Coproduktabtrennung soll an zwei weiteren Reaktionssystemen untersucht werden. Bei der Umsetzung von 2-Acetylpyridin (80 mM, 18 % v v⁻¹ 2-Propanol, 1 mM NADH) zum entsprechenden chiralen Alkohol wird bereits im Gleichgewicht ein Umsatz von 99 % erreicht, so dass eine verfahrenstechnische Optimierung in diesem Fall nicht sinnvoll ist. Die Reduktion von 2-Acetylfuran (80 mM, 18 % v v⁻¹ 2-Propanol, 1 mM NADH) zu (S)-2-(1-Hydroxyethyl)furan hingegen führt zu einem Gleichgewichtsumsatz von nur 81 %. Die Anwendung der *in-situ* Coproduktabtrennung ermöglicht analog zur Umsetzung von Acetophenon das Erreichen eines vollständigen Umsatzes.

4.6.2. ISPR von 2-Propanol

Im Falle der ADH-'A' katalysierten Reduktionen werden prochirale Ketone in chirale Alkohole umgesetzt. Die entsprechend umgekehrte Reaktion besitzt eine deutlich geringere Relevanz, da in diesem Fall ein Stereozentrum zerstört wird. Ein möglicher Nutzen der Oxidation chiraler Alkohole ist die kinetische Racematspaltung, bei der in der Regel ein maximaler Umsatz von 50 % erreichbar ist. Ein Spezialfall stellt der Einsatz von *meso*-Verbindungen dar. Durch Umsetzung von *meso*-2,5-Hexandiol, also einem symmetrischen Dialkohol mit gegensätzlich konfigurierten chiralen Zentren, mit der ADH-'A' kann selektiv nur ein Stereozentrum oxidiert werden (Abbildung 4.14).



Abbildung 4.14: Schema der stereoselektiven Oxidation von *meso*-2,5-Hexandiol.

Da diese Reaktion erneut eine Gleichgewichtsreaktion darstellt, wird die Eignung der *in-situ* Coproduktabtrennung von 2-Propanol in Gegenwart von Aceton getestet. Die Vorsättigung der Luft wird in diesem Fall mit einer Wasser / Aceton-Mischung erreicht. Allerdings verläuft die Umsetzung von *meso*-2,5-Hexandiol (60 mM, 12.5 % v v⁻¹ Aceton, 1 mM NAD⁺) schon annähernd quantitativ, so dass die integrierte Coproduktabtrennung keine zusätzliche Optimierung der Reaktion möglich macht.

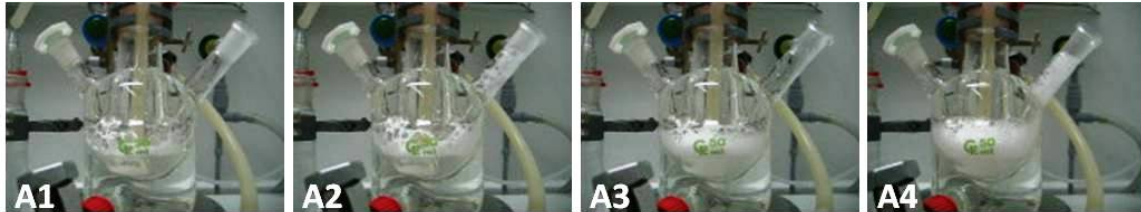
4.6.3. Schaumproblematik

Die Begasung (bio-)chemischer Reaktionen mit Luft führt in Gegenwart grenzflächenaktiver Substanzen, wie z. B. Proteinen, zur Schaumbildung [Chmiel 2006]. Dieses bringt einige Nachteile mit sich, so sind die Reaktionsbedingungen im Schaum anders, als im homogenen Reaktionssystem. Weiterhin wird das nutzbare Reaktorvolumen durch starke Schaumbildung verringert. Eine Verringerung des auftretenden Schaums lässt sich auf chemische, thermische und mechanische Weise erreichen [Pelton 2002]. Die einfachste Alternative ist die chemische Methode, bei der polymere Verbindungen wie Polypropylenglykol oder Silikone der Reaktionsmischung zugesetzt werden. Bei Standardexperimenten mit integrierter Coproduktabtrennung wird dieses Verfahren angewendet. Ein Nachteil bei der Zugabe zusätzlicher Verbindungen in eine Biotransformation ist der erhöhte Aufwand bei der Isolierung des Endproduktes. Eine Alternative kann daher die Verwendung immobilisierter Enzympräparationen sein.

Zur Veranschaulichung der Schaumbildung beim Einleiten von Luft in die verwendete Reaktionslösung werden Videoaufnahmen angefertigt. Verglichen wird dabei die Schaumbildung in einer Umsetzung von Acetophenon zu Phenylethanol mit partiell gereinigtem Zellextrakt bzw. auf TRISOPOR®-amino immobilisierter ADH-'A' als Biokatalysator. Betrachtet wird jeweils der Zustand der Reaktionsmischung vor und nach der Zugabe der Substrat / Cosubstrat-Lösung (Abbildung 4.15).

Die partiell gereinigte ADH-'A'-Lösung zeigt bereits direkt nach Starten der Begasung eine erhöhte Schaumbildung (**A1**), bereits nach 20 Sekunden ist ein erstes Übersäumen zu beobachten (**A2**). Nach der Zugabe der Acetophenon / 2-Propanol-Lösung wird die Schaumbildung verringert, aber nicht vollständig unterdrückt (**A3**). Nach 5 Minuten kommt es zu einem erneuten Übersäumen der Reaktionslösung (**A4**). Der verwendete Reaktionskolben mit einer Füllung von nur 20 % hat kein ausreichendes Volumen, um den Schaum aufzunehmen. Eine Reaktionsführung ist mit dieser Konfiguration nicht möglich.

ADH-'A' in Lösung (partiell gereinigte Enzymlösung)



Immobilisierte ADH-'A' (TRISOPOR®-amino)

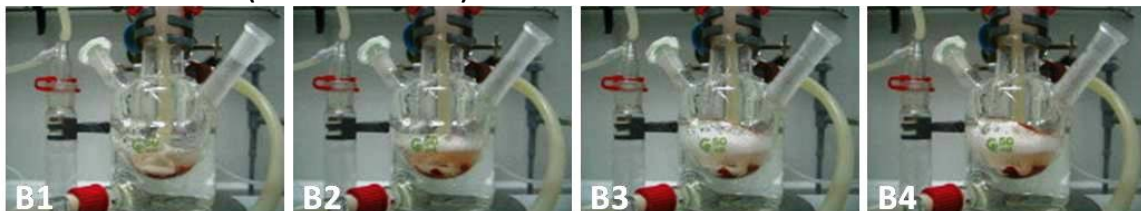


Abbildung 4.15: Begasung der Acetophenon-Reduktion mit verschiedenen Biokatalysatorpräparationen.

Der oben beschriebene Versuch wird mit immobilisierter ADH-'A' (TRISOPOR®-amino) als Biokatalysator wiederholt. Weder vor (**B1**), noch nach der Zugabe (**B2**) der Substrat / Cosubstrat-Lösung ist das Schäumen so stark, dass es zu einem Übersäumen der Lösung kommt. Auch nach verlängerter Begasungsdauer (**B3 / B4**) von bis zu 135 Minuten ist die Schaumbildung stabil.

Die Schaumbildung bei der *in-situ* Coproduktabtrennung durch Ausgasen kann durch Zugabe von Polypropylen glykol oder durch Verwendung eines immobilisierten Biokatalysators unterdrückt werden. Bei der Entwicklung eines Reaktormodells ergeben sich so mehrere Alternativen für die Integration des ISPR-Verfahrens.

4.7. Fazit

Die Anwendung von ISPR-Verfahren für das Coprodukt im gegebenen Reaktionssystem ermöglicht das Überwinden der durch das thermodynamische Gleichgewicht vorgegebenen Limitierung. Auf diese Weise wird die Biokatalysatorauslastung optimiert und eine dem Prozess nachgeschaltete Produktaufarbeitung vereinfacht.

Die Adsorptionsversuche von Reaktionskomponenten aus einer typischen Reaktionsmischung mit Puffer und 2-Propanol zeigen nur geringe Kapazitäten und geringe Selektivitäten für den chiralen Alkohol. Eine direkte Verwendung in Satzreaktorversuchen zur Maximierung des Umsatzes ist aus diesem Grund nicht möglich. Auch der Einsatz in einem Festbett zeigt keine Se-

lektivität. Alternativ können die Adsorptionspartikel eingesetzt werden, um die nutzbare Menge an hydrophoben Komponenten in wässrigen Lösungen zu erhöhen. Substrat und Produkt binden dabei unspezifisch und führen zu einer konstanten Konzentration in der Lösung. Ein industrielles Verfahren dieser Art wird bereits beschrieben [Vicenzi 1997].

Die Adsorption von Hexandiol aus Essigsäureethylester ist mit hoher Selektivität durch Einsatz der Träger Alumosilicat und γ -Aluminiumoxid möglich. Ein Einsatz könnte in einer externen Produktaufarbeitung oder einem kontinuierlichen Extraktionsprozess erfolgen.

Die Entfernung des Coproduktes Aceton durch Ausgasen der Reaktionsmischung mit Luft ermöglicht die Überwindung des vorliegenden thermodynamischen Gleichgewichtes. Eine übermäßige Schaumbildung während des Einleitens der Luft kann durch Zugabe von Polypropylenglykol oder mittels Verwendung immobilisierter Biokatalysatoren unterbunden werden.

5. Analytik¹⁸

Die Entwicklung und das Betreiben chemischer oder biotechnologischer Produktionsprozesse erfordert eine genaue Analyse der Zusammensetzung der Reaktionslösung. Die Bestimmung der wichtigsten Reaktionskomponenten wie Substrate und Produkte erfolgt in der Regel über etablierte chromatographische Verfahren wie Flüssigkeits- oder Gaschromatographie. Weiterhin kann die Konzentration an Cofaktoren in vielen Fällen über spektralphotometrische Verfahren ermittelt werden. Diese Art der Analyse erfordert eine repräsentative Probenentnahme aus der Reaktionslösung und eine mehr oder wenig komplexe Probenaufarbeitung. Diese Methodik birgt einige Nachteile:

- (Hoher) Zeitbedarf
Die manuelle Probenentnahme und Probenaufarbeitung kann je nach Komplexität einen erheblichen Zeitbedarf bedeuten.
- Fehlerhafte Probenaufarbeitung
Je mehr Aufarbeitungs- und Verdünnungsschritte für die Probenentnahme nötig sind, desto höher ist der dabei zu erwartende Fehler.
- Änderung der Probenzusammensetzung
Eine Veränderung der Probenzusammensetzung, verursacht durch z. B. ein weiteres Fortlaufen der Umsetzung, Nebenreaktionen zwischen den zu untersuchenden Komponenten und den bei der Probenaufarbeitung verwendeten Reagenzien oder unvollständige Derivatisierungen, führt zu einem verfälschten Ergebnis.
- Prozesskontrolle
Der Betrieb eines Produktionsprozesses erfordert in vielen Fällen eine Anpassung der Reaktionsparameter in Abhängigkeit von der aktuellen Zusammensetzung des Reaktionsmediums. Durch eine verzögerte Analyse kann auf schnelle oder unvorhergesehene Veränderung nicht schnell genug reagiert werden.

Eine Alternative zu dieser klassischen *offline*-Analytik bietet die *in-situ* Analyse oder *online*-Analytik¹⁹. Sämtliche Nachteile der klassischen *offline*-Analytik werden dadurch vermieden. Zu beachten ist allerdings, dass *in-situ* Messungen einen höheren apparativen Aufwand, eine komplexere Kalibration und dadurch einen erhöhten Kostenfaktor darstellen. Die Wirtschaftlichkeit ist daher vom jeweiligen Fall abhängig.

¹⁸ Teile dieses Kapitels sind publiziert in: (a) Oliveira FRP, Goldberg K, Liese A, Hitzmann B (2008) Chemometric modelling for process analyzers using just a single calibration sample. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 94: 118-122. (b) Neumann M, Goldberg K, Kara S, Müller J, Liese A (2009) Online monitoring of biotransformations in aqueous, organic and solvent-free media by FT-IR spectroscopy and chemometrics. Eingereicht.

¹⁹ In der Literatur werden *online*-, *inline*- und *in-situ*-Analytik gleichermaßen verwendet. Nach Definition können bei der *online*-Analytik zusätzliche Filtrationsschritte oder ähnliches vorliegen, während die *inline*-Analytik die direkte Analyse im Reaktor oder Stoffstrom bezeichnet [Kessler 2006a].

5.1. Wahl der *online*-Methode

Viele der etablierten Methoden zur Analyse von chemischen Reaktionen eignen sich, zum Teil mit einigen Modifikationen, auch für die *online*-Analyse. So werden in der Literatur unter anderem *online*-Verfahren basierend auf folgenden Methoden beschrieben [Kessler 2006b]:

- UV / VIS- und Fluoreszenz-Spektroskopie
- Infrarot- und Raman-Spektroskopie
- NMR-Spektroskopie
- Massen-Spektrometrie
- Gas- und Flüssigkeits-Chromatographie

Die Wahl der geeigneten Methode ist von der Art des vorliegenden Reaktionssystems, sowie der Komplexität und Verfügbarkeit des jeweiligen Verfahrens abhängig. Im vorliegenden Fall der Cofaktor-abhängigen biokatalytischen Reduktion von Ketonen zu den entsprechenden Alkoholen werden drei verschiedene Methoden gewählt.

Die **$^1\text{H-NMR-Spektroskopie}$** gehört zu den Standardverfahren in der organischen Chemie und Biochemie. Sie erlaubt die Untersuchung der elektronischen Umgebung von Atomen und erlaubt dadurch die Aufklärung der Struktur eines Moleküls und des Konzentrationsverhältnisses der einzelnen Verbindungen. Auf diese Weise sind die selektive Detektion einzelner Komponenten, sowie die Identifikation eventueller Nebenprodukte möglich.

Der Cofaktor in Dehydrogenase-katalysierten Reaktionen weist eine hohe Fluoreszenz-Aktivität auf, so dass sich die **Fluoreszenz-Spektroskopie** zum Verfolgen derartiger Reaktionen anbietet. Ob eine Detektion und Untersuchung des Cofaktors während der Reaktion, oder eine Bestimmung des Umsatzes der Reaktion möglich ist wird in entsprechenden Versuchen geklärt.

In den in dieser Arbeit untersuchten Umsetzungen werden Substrate und Produkte mit vielen funktionellen Gruppen, wie Carbonyle oder Alkohole, eingesetzt. Die Detektion derartiger Verbindungen ist ein klassisches Anwendungsgebiet der **Infrarot-Spektroskopie**. Die Aufnahme von FTIR-Spektren ermöglicht eine Identifikation von Verbindungen und / oder Gemischen, sowie eine Quantifizierung von Substraten und Produkten.

5.2. $^1\text{H-NMR-Spektroskopie}$

Das Hauptanwendungsgebiet der NMR-Spektroskopie besteht in der Identifikation und Struktur-aufklärung von Molekülen mit organisch-chemischen Bestandteilen. Insbesondere die Auswertung der chemischen Verschiebung und Aufspaltung von Banden in $^1\text{H-NMR-Spektren}$ enthält Informationen über die elektronische Umgebung der Wasserstoffatome und damit den strukturellen Aufbau der Moleküle. Neben der Bestimmung von Reaktionskomponenten wird weiterhin die Identifikation von Nebenprodukten ermöglicht.

5.2.1. Stand der Forschung

In der Literatur wird eine Vielzahl an Anwendungen der *online* NMR-Spektroskopie in der Biokatalyse beschrieben. Sehr unterschiedliche Bedingungen wie Enzymklasse, Lösungsmittel, heterogene oder homogene Reaktionsführung sind mit dieser Methodik kompatibel [Weber 2000]. In vielen Fällen werden Lipase-katalysierte Umsetzungen verfolgt, etwa die Veresterung von Caprylsäure (Octansäure) und Butanol mit einer Lipase aus *Rhizomucor miehei* [Decagny 1998] oder die Acylierung von 1-Phenylethanol mit einer Lipase aus *Burkholderia cepacia* [Weber 1999]. Weitere Beispiele sind die Rinderserum Aminoxidase-katalysierte Oxidation von primären Aminen zu Aldehyden [Houen 2005] oder die Synthese von Cyanhydrinen mit einer Hydroxynitrillyase aus *Hevea brasiliensis* [Hickel 1996].

Ein problematischer Aspekt in der Verfolgung biokatalytischer Reaktionen ist die Wahl des Lösungsmittels, insbesondere bei der ^1H -NMR-Spektroskopie. Das in der Biokatalyse übliche Lösungsmittel Wasser ist im Überschuss vorhanden und führt so zu einer erheblichen Störung der Datenaufnahme. In der Regel werden daher deuteriertes Wasser (D_2O / $^2\text{H}_2\text{O}$) oder auch andere deuterierte Lösungsmittel eingesetzt. Nachteil dieses Verfahren ist zum einen der erheblich höhere Preis des Lösungsmittels und zum anderen die nicht direkte Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das undeuterierte Lösungsmittel. So werden für H_2O und D_2O etwa veränderte Reaktionsgeschwindigkeiten (kinetischer Effekt) [Spangenberg 1999] oder unterschiedliche Selektivitäten [Pokorny 1999] gefunden. Eine weitere Alternative ist die Unterdrückung des Lösungsmittelsignals durch bestimmte Pulstechniken bei der Aufnahme der einzelnen Spektren [Guéron 1991].

5.2.2. Reduktion von Acetophenon

Die Anwendbarkeit der ^1H -NMR-Spektroskopie für die *online*-Analyse ADH-'A'-katalysierter Redoxreaktionen wird am Beispiel der Reduktion von Acetophenon untersucht. Die Untersuchungen werden mit einem *Varian VXR-300* FT-NMR-Spektrometer durchgeführt. Als Reaktor werden Standard NMR-Probenröhrchen (5 mm \varnothing \times 18 mm) eingesetzt.

Für die Anpassung der Reaktion an NMR-kompatible Bedingungen wird der üblicherweise verwendete Kaliumphosphatpuffer durch deuteriertes Wasser ersetzt. Die Cosubstrat-Konzentration wird auf 10 % herabgesenkt, um eine zu starke Störung des Spektrums durch die 2-Propanol-Signale zu verhindern. Als Katalysator wird gefriergetrocknete, partiell gereinigte Enzymlösung (0.2 U) eingesetzt.

Die Reaktionsmischung wird im NMR-Probenröhrchen vorgelegt und die Messung durch Zugabe des Katalysators gestartet. Von der Zugabe des Katalysators bis zur Aufnahme der ersten Messung werden etwa 2 Minuten benötigt. Um den Verlauf der Reaktion zu verfolgen werden mit Hilfe der Makrosprache *MAGICAL* in regelmäßigen Zeitabständen komplette Spektren aufgenommen. Die große Anzahl von Spektren wird mit *The Mathworks* MATLAB / *matNMR*²⁰ [van Beek 2007] ausgewertet.

²⁰ <http://matnmr.sourceforge.net/>, Version 3.9.59.

Für die Bestimmung des Fortlaufs der Reaktion werden die Methylsignale des Substrates Acetophenon und der Produkte Phenylethanol und Aceton betrachtet.

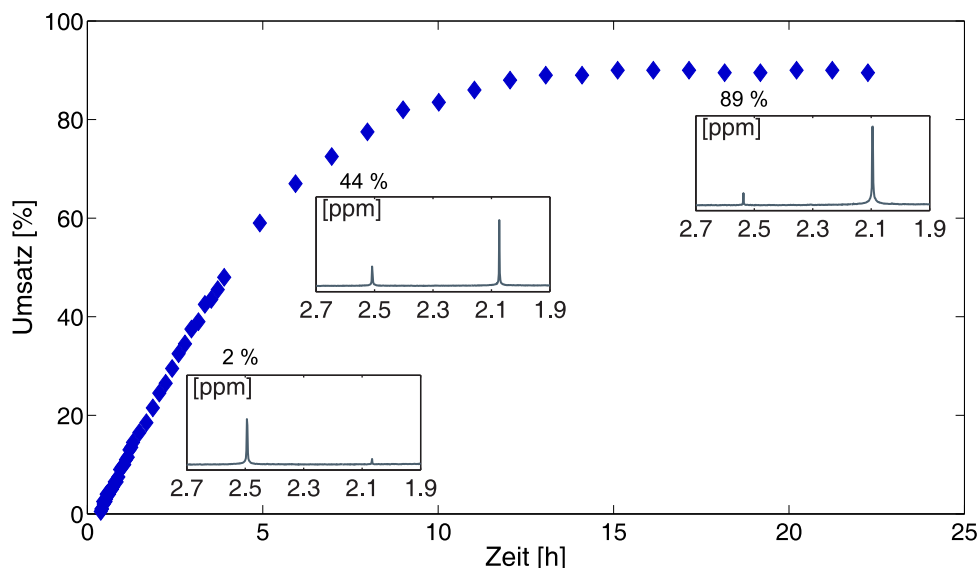


Abbildung 5.1: Umsatz-Zeit-Verlauf der Reduktion von Acetophenon nach $^1\text{H-NMR}$ / $^1\text{H-NMR}$ -Spektren im Bereich von 1.8-2.7 ppm. Bedingungen: 0.2 U ADH-'A', 100 mM Acetophenon, 1 mM NADH, Reaktionsmedium: D_2O , 10 % v v $^{-1}$ 2-Propanol. Gesamtvolumen 0.8 mL, Raumtemperatur.

Ausschnitte der aufgenommenen Spektren (Abbildung 5.1) zeigen deutlich die Abnahme des Acetophenon- CH_3 -Signals bei 2.5 ppm und die Zunahme des Aceton- CH_3 -Signals bei 2.1 ppm.

Der Umsatz der Reaktion kann aus den Verhältnissen der Peakflächen berechnet werden. Für die Erhöhung der Genauigkeit der Bestimmung werden beide Produktsignale (Phenylethanol- CH_3 : 1.34 ppm) verwendet. Da die NMR-Spektroskopie eine etablierte Methode zur Quantifizierung von Verbindungen in Stoffgemischen darstellt, ist eine zusätzliche Kalibrierung der *online*-Analytik nicht erforderlich.

Die Reaktion verläuft unter den gegebenen Bedingungen recht langsam ab. Der Gleichgewichtsumsatz von 90 % wird erst nach einer Zeit von über 12 Stunden erreicht. Es tritt praktisch keine Schwankung des bestimmten Umsatzes auf, der Fehler der Methode ist sehr gering.

5.2.3. Reduktion von Acetylfuran

Die *online*-Verfolgung der ADH-'A'-katalysierten Reduktion von Acetylfuran wird analog untersucht. Der Umsatz wird aus dem Verhältnis der Methylsignale von Acetylfuran und Aceton bestimmt, da diese jeweils als Singulett deutlich und separiert auftreten. Dabei wird sowohl lyophilisierter, partiell gereinigter Zellextrakt, als auch lyophilisierte, ganze *E. coli*-ADH-'A'-Zellen eingesetzt.

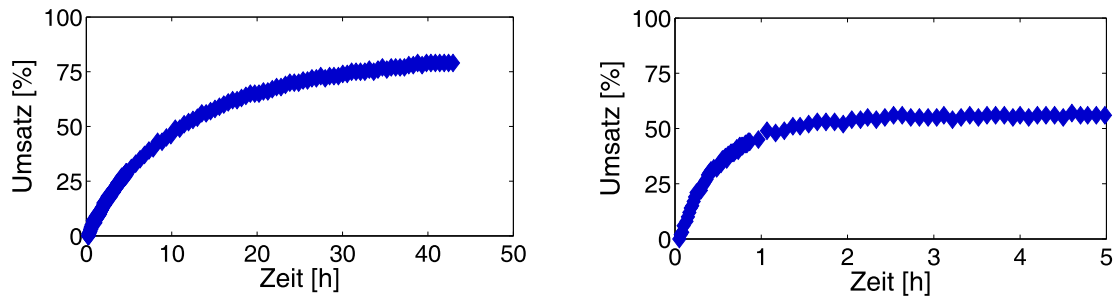


Abbildung 5.2: Umsatz-Zeit-Verlauf der Reduktion von Acetylfuran bestimmt durch $^1\text{H-NMR}$ (links: lyophilisierte, partiell gereinigte Enzymlösung (0.2 U), rechts: lyophilisierte *E. coli*-AHD-'A'-Zellen (8.4 U)). Bedingungen: 100 mM Acetylfuran, 1 mM NADH, Reaktionsmedium: D_2O , 10 % v v $^{-1}$ 2-Propanol. Gesamtvolumen 0.8 mL, Raumtemperatur.

Die durch den lyophilisierten Zellextrakt (0.2 U) katalysierte Reaktion verläuft sehr langsam (Abbildung 5.2, links). Der Umsatz steigt auf 80 % innerhalb von 40 Stunden. Ein weiterer Anstieg zum Gleichgewichtsumsatz der Reaktion von 92 % könnte durch eine verlängerte Reaktionsdauer oder eine Erhöhung der Katalysatormenge erreicht werden.

Die lyophilisierten *E. coli*-ADH-'A'-Zellen (8.4 U) haben keinen störenden Einfluss auf die Aufnahme der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren. Aufgrund der erhöhten Aktivität werden die ersten 25 % des Umsatzes in etwa einem Zehntel der Zeit erreicht (Abbildung 5.2, rechts). Allerdings wird ein maximaler Umsatz von etwa 60 % erreicht, was durch ein Absinken des Katalysators im NMR-Röhrchen verursacht werden kann. Für die Verwendung eines heterogenen Reaktionssystems muss für eine ausreichende Durchmischung gesorgt werden.

5.2.4. Fazit

Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie kann erfolgreich in der Verfolgung biokatalytischer Reaktionen eingesetzt werden. Das Verhältnis der Peakflächen von Substrat und Produkt kann zur Berechnung des Umsatzes verwendet werden. Gleichzeitig können aus den aufgenommenen Spektren eventuelle Nebenprodukte identifiziert werden. Als Katalysator eignen sich gelöste Enzyme sowie ganze Zellen.

Allerdings hat diese Methodik auch Nachteile. So ist die $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie abhängig von einem (teilweise) deuterierten Lösungsmittel und Apparaturen mit starken Magnetfeldern. Desweiteren ist die Verwendung heterogener Systeme problematisch, da eine Suspension während der Reaktion nicht ausreichend durchmischt wird. Zwar werden in der Literatur auch Durchflusszellen beschrieben, eine *online*-Messung im industriellen Maßstab ist jedoch nicht beschrieben. Eine Alternative zeigt die *in-vivo* Analyse von Fermentationen in einem Weithals-NMR-System [Hartbrich 1996]. Die Bestimmung einzelner Metaboliten in der Zelle wird über $^{13}\text{C-NMR}$ bzw. $^{31}\text{P-NMR}$ -Spektroskopie erreicht, so dass deuterierte Lösungsmittel vermieden werden können. Mit der verwendeten Hardware sind diese Techniken nicht realisierbar, so dass die Anwendung der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie als Messmethode nicht weiter verfolgt wird.

5.3. Fluoreszenz-Spektroskopie

Eine etablierte Methode der *online*-Analytik im Biotechnologiebereich ist die Fluoreszenz-Spektroskopie [Stärk 2002]. Klassischerweise ist das Hauptanwendungsgebiet die Bestimmung reduzierter Nicotinamid-Cofaktoren wie NADH und NADPH *in vivo* oder *in vitro*. Diese Methodik lässt sich daher in der Überwachung von Fermentationen verwenden, etwa zur Bestimmung der Biomasse [Beyeler 1981] oder des metabolischen Zustands der fermentierten Zellen [Peck 1990]. Die elektronische Anregung von NAD(P)H wird über Einstrahlung bei 380 nm erreicht und die anschließende Emission bei 450 nm verfolgt. Dies stellt damit aber auch eine Beschränkung auf die Analyse dieser einen Komponente dar. Seit den 1990er Jahren wurden aus diesem Grund vermehrt Multiwellenlängensysteme entwickelt [Li 1991]. Ein Beispiel für ein derartiges System ist der DELTA BioView®-Sensor²¹.

Der BioView®-Sensor ermöglicht die Aufnahme von Fluoreszenz-Spektren mit Anregung im Bereich von 260 bis 560 nm und Aufnahme der Emission von 300 bis 600 nm (Multichannel Fluorescence Detektion, MFD). Dies wird durch eine Xenon-Lampe in Verbindung mit Filterscheiben erreicht, ein komplettes 2D-Spektrum kann so in einer Minute aufgenommen werden. Das Licht wird über optische Faserkabel in den Reaktor übermittelt, dazu ist nur ein entsprechender Port nötig. Auf diese Weise kann das BioView®-System an praktisch jede Reaktorgröße angepasst werden. Weiterhin findet kein direkter Kontakt zwischen Sonde und Medium statt, so dass auch unter extremen Bedingungen eine *online*-Methode Anwendung finden kann [Kara 2009] und das Risiko von Kontaminationen verringert wird.

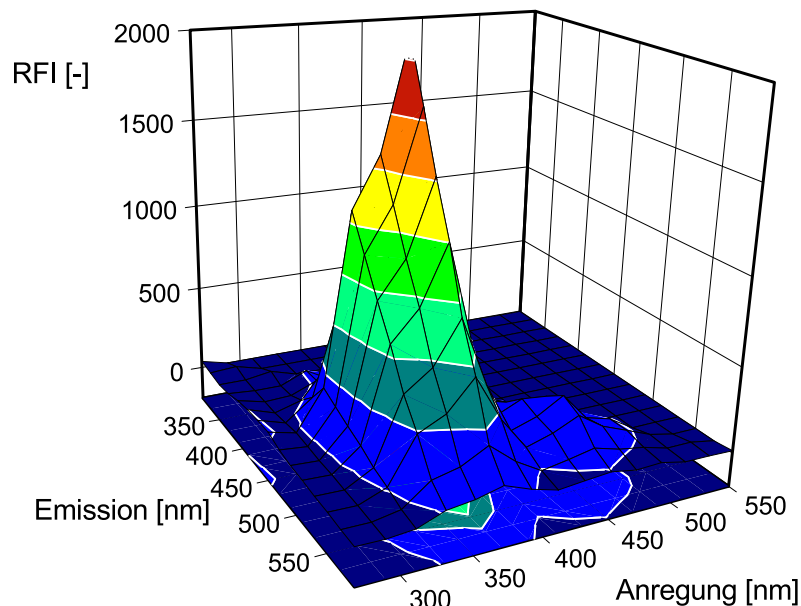


Abbildung 5.3: 2D-Fluoreszenzspektrum während der ADH-'A'-katalysierten Reduktion von Acetophenon.

²¹ DELTA, Hørsholm, Denmark, <http://www.delta.dk/bioview/>

5.3.1. Multivariate Datenanalyse

Die Auswertung der NMR-Spektren erfolgt über die Auswertung einzelner Peaks, die den Substraten und Produkten eindeutig zugeordnet werden können. Mit einer klassischen, univariaten Datenanalyse kann in einer linearen Regression das erhaltene Messsignal in die Konzentration des betrachteten Analyts umgerechnet werden. Diese lineare Abhängigkeit findet sich bei den meisten gängigen Analysemethoden, z. B. Peakflächen in GC- oder HPLC-Chromatogrammen oder alle photometrischen Messungen, die auf einzelnen Wellenlängen beruhen.

In der 2D-Fluoreszenzspektroskopie ist diese Art der Auswertung nicht möglich. Das Spektrum wird zum größten Teil vom Cofaktor NADH bestimmt (Abbildung 5.3), welches aufgrund der Cofaktorregenerierung im Verlauf der Reaktion annähernd konstant bleibt.

Die Substrate und Produkte stellen nur sehr schwache Fluorophore dar, so dass die Änderungen des Spektrums marginal sind. Die Identifikation und Auswertung einzelner Peaks ist nicht möglich oder sehr ungenau. Aus diesem Grund wird auf die Betrachtung des gesamten Spektrums zurückgegriffen [Oliveira 2008].

Für die Auswertung von kompletten 2D-Fluoreszenzspektren wird auf eine alternative Methode zurückgegriffen: die multivariate Datenanalyse mittels Chemometrie. Als interdisziplinäre Methodik zwischen Chemie, Mathematik und Informatik beschreibt die Chemometrie die statistische Analyse größerer Datenmengen [Danzer 2001].

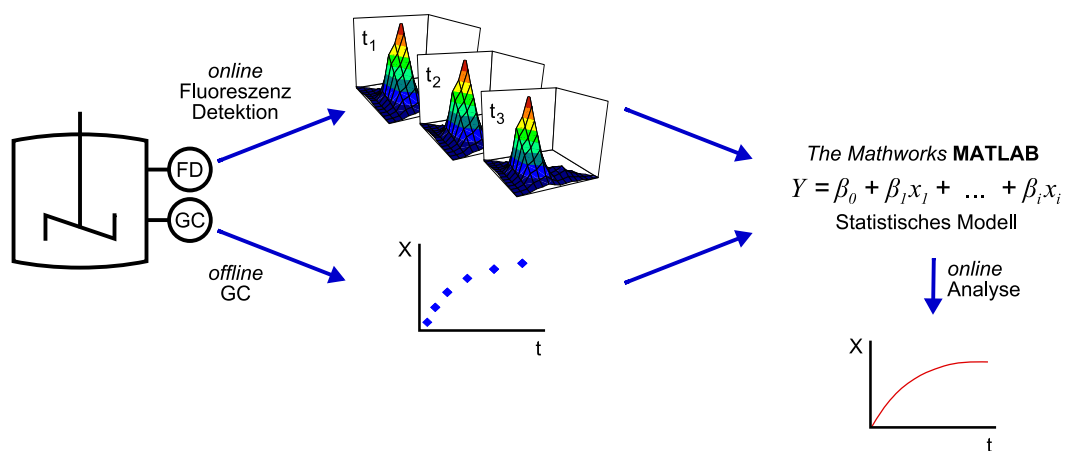


Abbildung 5.4: Schema zur Kalibration eines chemometrischen Modells.

Die statistische Analyse ermöglicht die Korrelation von Konzentrationen oder des aktuellen Umsatzes mit den Fluoreszenzspektren. Dazu wird zunächst analog zur univariaten Analyse eine Kalibration benötigt. Aufgrund der Komplexität der Spektren sind wesentlich mehr Kalibrationskonzentrationen zu vermessen, als bei der klassischen linearen Regression. In der Regel müssen etliche Reaktionsmischungen unter realistischen Bedingungen vermessen werden. Ein alternativer Ansatz für die Kalibration eines chemometrischen Modells ist die parallele Vermessung einer Reaktion mit etablierten Methoden und der betrachteten *online*-Analytik (Abbildung 5.4). Im vorliegenden Beispiel werden die Umsätze der biokatalytischen Reduktion von Acetophenon gaschromatographisch bestimmt und zu den jeweiligen Zeiten 2D-Fluoreszenzspektren aufgenommen. Diese Daten werden zur Kalibration eines statistischen Modells eingesetzt. Dieses

Modell basiert auf einer nicht-linearen multivariaten Regression der Fluoreszenzdaten an die zugehörigen Reaktionsumsätze. Erreicht wird dies mit den am Institut für Technische Biokatalyse, TU Hamburg-Harburg entwickelten *The Mathworks* MATLAB-Skripten basierend auf der N-way toolbox [Andersson 2000].

Bei der univariaten Analyse werden bei der Kalibration Faktoren benötigt, im linearen Fall z. B. y-Achsenabschnitt und Steigung. Analog werden bei der multivariaten Kalibration mehrere Faktoren benötigt, um eine Korrelation zu erreichen. Diese Faktoren bestehen aufgrund der Komplexität der Datensätze nicht aus einzelnen Zahlen, sondern aus Vektoren. Zusammengefasst bilden diese Faktoren das chemometrische Modell. Die Anzahl der für die Kalibration verwendeten Faktoren bestimmt die Genauigkeit des statistischen Modells, eine zu große Zahl an Faktoren führt jedoch zu einem wenig robusten Modell. Dieses Modell kann anschließend zur Berechnung des Umsatzes aus den Spektren eingesetzt werden.

Die analoge Auswertung dieser Daten wurde in Kooperation mit Prof. B. Hitzmann, Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover, durchgeführt [Oliviera 2008].

5.3.2. Reduktion von Acetophenon

Die Reduktion von Acetophenon wird wie beschrieben mit Hilfe der 2D-Fluoreszenz-Spektroskopie verfolgt. Der Umsatz wird parallel gaschromatographisch bestimmt.

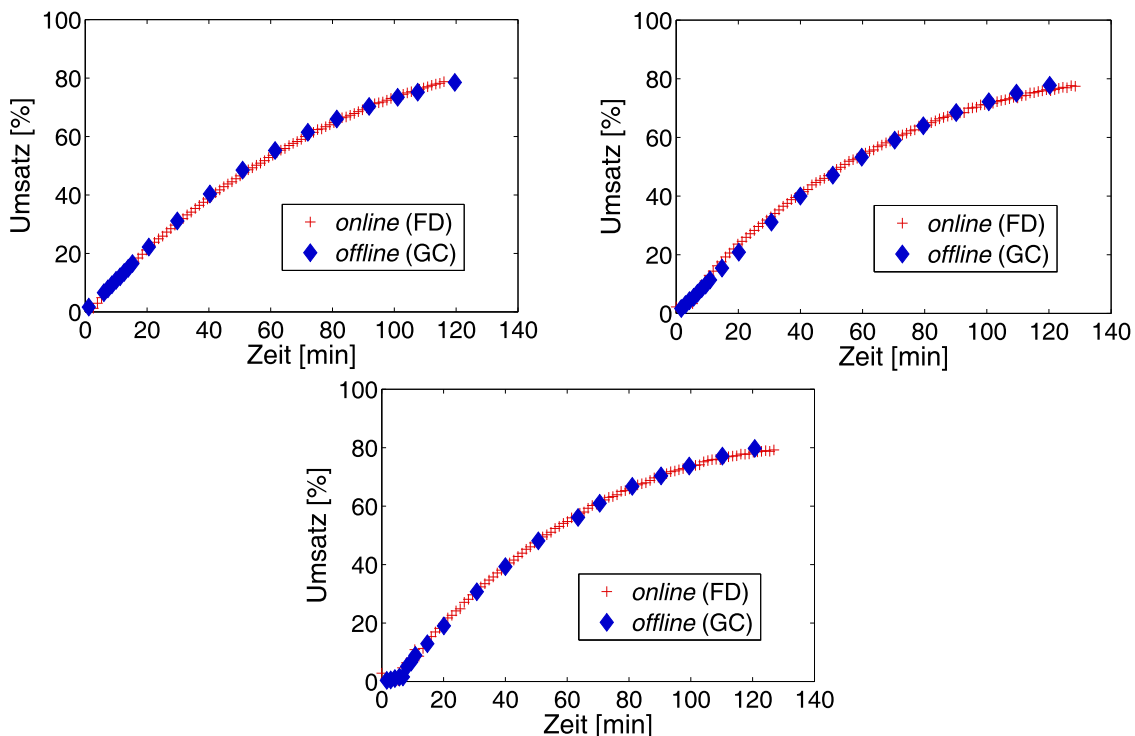


Abbildung 5.5: Umsatz-Zeit-Verläufe der im BioView® durchgeführten Biotransformationen. Bedingungen: 9.3 U ADH-'A', 80 mM Acetophenon, 0.3 mM NADH, Reaktionsmedium: KPi -Puffer (100 mM, pH 7.0, 18 % v v⁻¹ 2-Propanol). Gesamtvolumen 12 mL, Raumtemperatur.

Die Reaktion wird insgesamt dreimal durchgeführt. Der Umsatz erreicht innerhalb der Reaktionszeit von jeweils 120 Minuten einen Wert von etwa 80 %. Die Kalibration des chemometrischen

Modells erfolgt mit den 2D-Fluoreszenz-Spektren, zu denen *offline*-Werte vorliegen. Es zeigt sich eine sehr gute Korrelation zwischen *offline*- und *online*-Analytik, der durchschnittliche Fehler zwischen den beiden Analysemethoden liegt bei 4.9 % des Umsatzes.

5.3.3. Fazit

Die 2D-Fluoreszenz-Spektroskopie kann erfolgreich in der Verfolgung der biokatalytischen Reduktion von Acetophenon eingesetzt werden. Im Vergleich zur NMR-Spektroskopie sind keine speziellen Lösungsmittel oder spezielles Equipment notwendig. Der verwendete BioView®-Sensor kann bei Vorliegen eines Quarzglas- oder Saphirfensters an jeden beliebigen Reaktor angeschlossen werden.

Das Messsignal wird in relativen Fluoreszenzintensitäten aufgezeichnet. Diese ist nicht nur abhängig von den Konzentrationen und Extinktionskoeffizienten fluoreszierender Verbindungen, sondern auch von der Anregungsenergie und der Fluoreszenzausbeute. Daher können apparative Unterschiede in den Messungen auftreten, welche bei der Auswertung beachtet werden müssen.

Die einzige Beschränkung des Verfahrens besteht in der Notwendigkeit des Messfensters und der Abwesenheit von Licht im Reaktor. Aus diesem Grund wird noch eine alternative Methode auf ihre Eignung getestet - die Infrarot-Spektroskopie.

5.4. FTIR-Spektroskopie

Die Fourier-Transformations Mid-Infrarot-Spektroskopie (FT-MIR) ist eine etablierte Methode in der Chemie zur Identifikation und Strukturanalyse organischer Verbindungen. Der Messbereich des MIR liegt zwischen 4000 und 400 cm^{-1} (Wellenzahlen) bzw. 2.5 und 25 μm (Wellenlänge). In wässrigen Systemen wird Infrarotstrahlung sehr stark absorbiert, so dass Messungen nur in sehr geringen Schichtdicken möglich sind. Dies ist insbesondere in der Biotechnologie relevant.

In den letzten Jahrzehnten wurde die ATR-Messtechnik (attenuated total reflectance, Abgeschwächte Totalreflexion) entwickelt, die eine Messung von Feststoffen oder Lösungen an der Oberfläche eines ATR-Kristalls ermöglicht [Fahrenfort 1961]. Die Infrarotstrahlung wird im ATR-Kristall an der Grenzfläche zur Probe reflektiert. Durch diese Reflexion wird eine evaneszente Welle auf der Probenseite des Kristalls erzeugt. Die Abschwächung dieser Wellen durch die Absorption der IR-Strahlung von der Probe wird gemessen und so das IR-Spektrum erhalten. Die Eindringtiefe in die Probe beträgt nur etwa 0.5 bis 5 μm , so dass auch wässrige Lösungen vermessen werden können.

In der Biotechnologie wird die FT-MIR Spektroskopie vor allen für die Identifikation, Unterscheidung und Klassifikation von Mikroorganismen eingesetzt [Mariey 2001]. Dies ist möglich durch den für jede Verbindung, jedes Protein und dadurch auch jeden Mikroorganismus charakteristischen Fingerprint-Bereich im IR-Spektrum (400 – 1000 cm^{-1}).

Für die Verfolgung von biokatalytischen Reaktionen gibt es nur wenige Beispiele in der Literatur. Ganze Zellen von *Rhodococcus rhodochrous* LL100-21 werden in der Hydrolyse von Nitrilen zu Carbonsäureamiden und Carbonsäuren eingesetzt [Dadd 2000]. Durch Verwendung einer FT-MIR

ATR-Sonde mit einem Silizium / ZnSe-Kristall konnte die Reaktion verfolgt werden. Die Bestimmung des Reaktionsfortschrittes erfolgte durch Auswertung der charakteristischen Banden für Substrat und Produkt. Die Veresterung von Butanol und Acetanhydrid mit einem organischen Katalysator wird mit FT-MIR Spektroskopie und multivariater Kalibration beschrieben [Puxty 2008]. Dabei wurde der Reaktionsmechanismus, bzw. die Kinetik der Reaktion in das chemometrische Modell integriert. Der α -Amylase-katalysierte Abbau von Stärke wurde durch Film-analyse einer Substratschicht auf einem ZnSe-ATR-Kristall verfolgt [Schindler 1998, Snabe 2002]. Die statistische Auswertung wurde unter anderem zur Bestimmung der Enzymaktivität eingesetzt. Auch in vielen fermentativen Prozessen konnte die FT-MIR Spektroskopie zur Verfolgung von Substraten, Produkten oder Metaboliten erfolgreich eingesetzt werden [Macauley-Patrick 2003, Roychondhury 2006, Trevisian 2008].

In vielen Fällen wird die Auswertung der FT-MIR Spektren klassisch durchgeführt. Durch Auswertung charakteristischer Wellenzahlen der betrachteten Analyten wird eine einfache Korrelation zwischen Bandenhöhe und Konzentration (Lambert-Beer) erreicht. Allerdings weisen FT-MIR Messungen eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Temperaturschwankungen auf, insbesondere in wässrigen Systemen. Weiterhin kann eine Veränderung der Zusammensetzung der Atmosphäre im Spektrometer, bedingt durch unzureichende Spülung mit trockener Luft oder Stickstoff, zu positiven oder negativen Kohlenstoffdioxid-Banden führen. In vielen Fällen treten daher Verschiebungen der Basislinie (Drift) oder das Auftreten von Störbanden während der Messung auf. Aus diesem Grund wird die statistische Auswertung der FT-MIR Spektren bevorzugt.

5.4.1. Durchführung der Messungen

Die Verfolgung der biokatalytischen Reduktion von Acetophenon wird mit einem *BrukerOptics* Vertex 70 mit einem Flüssigstickstoff-gekühlten MCT-Detektor (Quecksilber Cadmium Telluride) durchgeführt. Dieser MIR-Detektor ist deutlich empfindlicher als die für Routineanalytik üblicherweise verwendeten DTGS-Detektoren (Deuteriertes Triglycinsulfat) und ermöglicht so den Einsatz einer FT-MIR ATR-Fasersonde. Die eingesetzte BrukerOptics IN350-T Fasersonde besteht aus einem MIR-Lichtleiter aus Silberhalogeniden und hat dabei nur einen Infrarot-Durchsatz von ca. 1 %.

Der ATR-Kristall besteht aus Diamant (CVD)²², so dass eine sehr hohe chemische und physikalische Beständigkeit vorliegt. Allerdings kann ein CVD-ATR-Kristall durch die starke Absorption von IR-Strahlung²³ im Bereich von etwa 1850 bis 2200 cm^{-1} nicht für die Bestimmung von Iminen oder Nitrilen eingesetzt werden, da diese in diesem Bereich starke charakteristische Banden aufweisen. Die weiteren Eigenschaften der Fasersonden sind im Weiteren zusammengefasst (Tabelle 3.2).

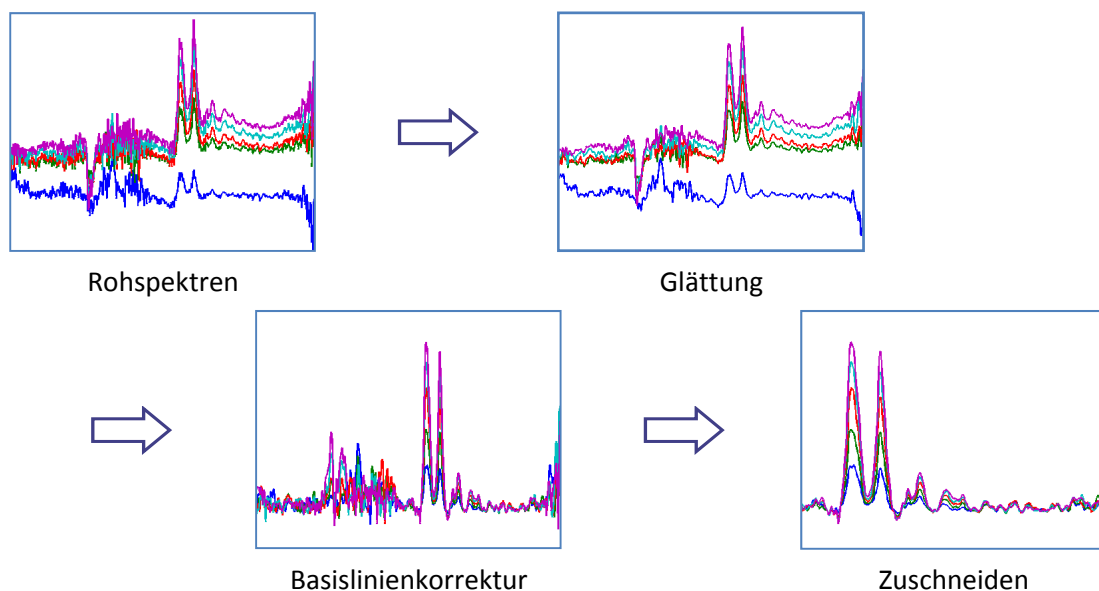
²² Diamant aus chemischer Gasphasen-Abscheidung, CVD.

²³ The CVD diamond booklet, <http://www.diamond-materials.com/downloads/>

Tabelle 5.1: Spezifikationen der FT-MIR ATR-Fasersonde.

ATR-Element	CVD, 2 Reflexionen bei 45°
Lichtleiterkabel	Silberhalogenide (\varnothing 1mm)
Infrarotdurchsatz	1 % im Fingerprintbereich
Druckstabilität	bis 300 bar
Durchmesser des Sondenkopfes	6 mm
Länge des Sondenkopfes	290 mm
Spektralbereich	3500 bis 560 cm^{-1}
Temperaturbereich	-100 bis 180 °C

Wie bereits erläutert ist bei der Aufnahme von FT-MIR Spektren auf eine konstante Temperatur und eine konstante Atmosphäre im Spektrometer zu achten. Aus diesem Grund wird das Spektrometer während der Messungen ATR mit getrockneter Druckluft gespült. Das Reaktionsgefäß wird auf konstant 30 °C thermostatisiert.

**Abbildung 5.6: Bearbeitung der FT-MIR Spektren vor der Auswertung.**

Trotz der Durchführung der Messungen unter konstanten, genau festgelegten Bedingungen müssen die FT-MIR Spektren vor der Auswertung bearbeitet werden (Abbildung 5.6). Die Rohspektren werden in *The Mathworks Matlab* eingeladen und im ersten Schritt nach dem *Savitzky-Golay* Algorithmus geglättet (`mslowess`²⁴, Schrittweite 10 cm^{-1}), um Rauschen und Signalspitzen zu entfernen [Bromba 1981]. Die Basislinienkorrektur (`msbackadj`²⁴, Schrittweite 100 cm^{-1}) entfernt die Drift in den Spektren, so dass die Bandenintensitäten ausgewertet werden können. Zum Schluss werden die Spektren auf den gewünschten Wellenzahlenbereich zugeschnitten.

²⁴ Matlab-Funktionen der Bioinformatics Toolbox zur Bearbeitung von Spektren.
<http://www.mathworks.de/products/bioinfo/>

5.4.2. Reduktion von Acetophenon

Die FT-MIR Spektroskopie wird für die Verfolgung der biokatalytischen Reduktion von Acetophenon eingesetzt [Neumann 2009]. Dabei wurde die Reaktion neben dem üblicherweise verwendeten Puffer auch im vollständig organischen Medium durchgeführt. Dies ist möglich durch die hohe Toleranz des Biokatalysators gegenüber organischen Lösungsmitteln.

5.4.2.1. Organisches Medium

Als Lösungsmittel wird eine mit Puffer (Kaliumphosphat, 100 mM, pH 7.0) gesättigte Toluol / 2-Propanol (10 % v⁻¹) Mischung verwendet (Microaqueous [Yamane 1988]). Lyophilisierte *E. coli*-ADH-'A'-Zellen werden in einer kleinen Menge Puffer rehydratisiert und als Katalysator eingesetzt. Anstelle der standardmäßig eingesetzten Substratkonzentration von 80 mM werden 274 mM bzw. 1.0 M Acetophenon eingesetzt.

Die im Verlauf der Reaktion aufgenommenen FT-MIR Spektren (1.0 M Startkonzentration) zeigen eine Abnahme der Intensität charakteristischer Banden für Acetophenon, z.B. der Carbonyl-Streckschwingungsbande bei 1680 cm⁻¹ und weiterer Banden im Fingerprintbereich. Gleichzeitig kann die Bildung der analogen Bande für Aceton bei 1712 cm⁻¹ beobachtet werden (Abbildung 5.7). Die unvollständige Abnahme der Acetophenon-Signale resultiert aus dem nicht vollständigen Umsatz der Reaktion (s.u.).

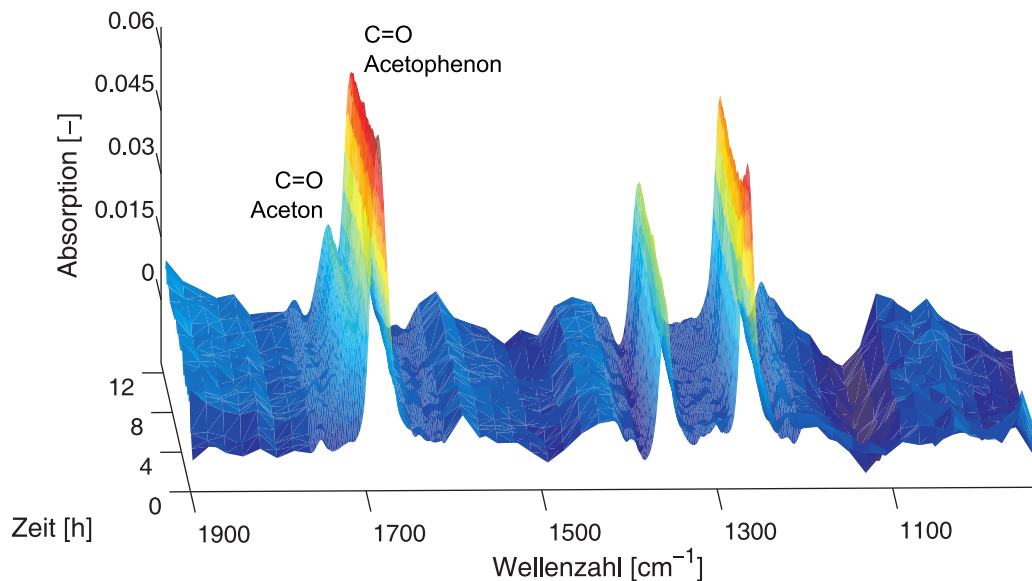


Abbildung 5.7: Zeitlicher Verlauf der FT-MIR Spektren während der Reduktion von Acetophenon.

Wie bereits erläutert führt die einfache Auswertung der Bandenveränderungen zu keinen genauen Ergebnissen. Die Spektren werden nach dem festgelegten Protokoll verarbeitet (Abbildung 5.6) und mit den parallel gaschromatographisch bestimmten Umsatzpunkten in ein chemometrisches Modell mit jeweils 3 Faktoren umgesetzt.

Die Umsetzung mit 1.0 M Acetophenon verläuft relativ langsam, innerhalb von einer Stunde wird ein Umsatz von 10 % erreicht. Der erreichbare Gleichgewichtsumsatz liegt bei etwa 30 %. Dies

lässt sich durch eine langsame Desaktivierung des Enzyms im organischen Lösungsmittel oder eine Produktinhibierung in diesem Konzentrationsbereich erklären.

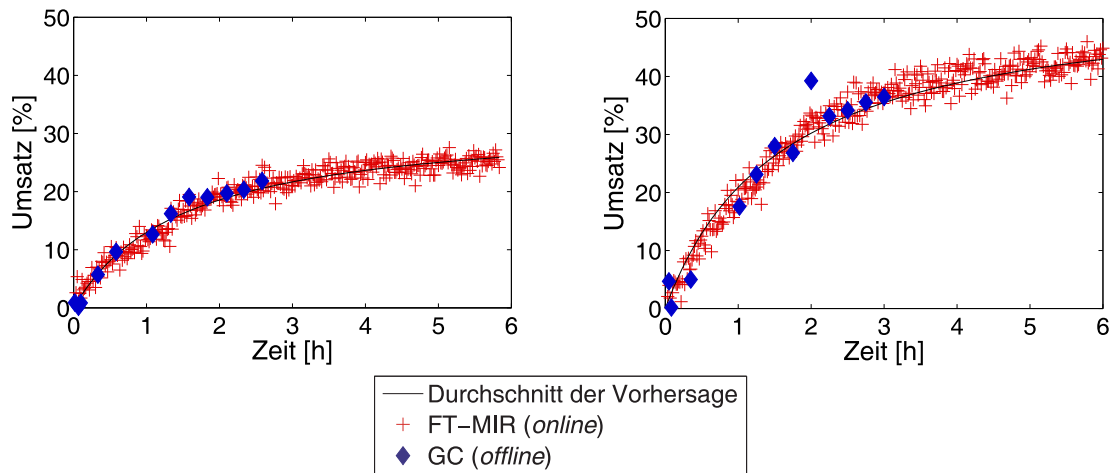


Abbildung 5.8: Vergleich zwischen *offline* und *online* Bestimmung des Umsatzes der Acetophenon Reduktion in Toluol / 2-Propanol. Bedingungen: 400 mg *E. coli*-ADH-'A'-Zellen in 200 μ L KP_i -Puffer (100 mM, pH 7.0, 100 mM NADH) rehydratisiert, 1 M (links) bzw. 274 mM (rechts) Acetophenon, Reaktionsmedium: Toluol, 10 % v v⁻¹ 2-Propanol. Gesamtvolumen 20 mL, Reaktionstemperatur 30 °C.

Die Vorhersage des Umsatzes aus den FT-MIR Spektren zeigt eine sehr gute Übereinstimmung mit den *offline* Werten (Abbildung 5.8, links). Der Mittelwert der Streuung dieser Werte, also der Durchschnitt der Vorhersage wird durch die durchgezogene Linie dargestellt. Der Unterschied zwischen dieser Kurve und den *offline* Daten wird für die Berechnung des RMSE (root mean square error, Wurzel der quadratischen Fehlersumme) verwendet. Dieser liegt in diesem Fall bei 1.0 %. Dabei ist zu beachten, dass dieser Fehler auch die Streuung der *offline* Daten beinhaltet. Bei der Reaktion mit 274 mM Startkonzentration wird ein höherer Umsatz erreicht, das Gleichgewicht liegt bei etwa 50 % (Abbildung 5.8, rechts). Auch in diesem Fall wird eine sehr gute Übereinstimmung zwischen klassischer GC-Analytik und statistischem Modell erreicht. Der RMSE beträgt 2.9 %.

5.4.2.2. Wässriges Medium

Die Umsetzung von Acetophenon zu (*S*)-1-Phenylethanol im wässrigen Puffersystem mit 18 % v v⁻¹ 2-Propanol wird mit der oben beschriebenen Methode gaschromatographisch und mittels FT-MIR Spektroskopie verfolgt. Die Reaktion wird zweimal mit je 80 mM Substrat durchgeführt, um eine Reproduzierbarkeit des Ergebnisses zu gewährleisten.

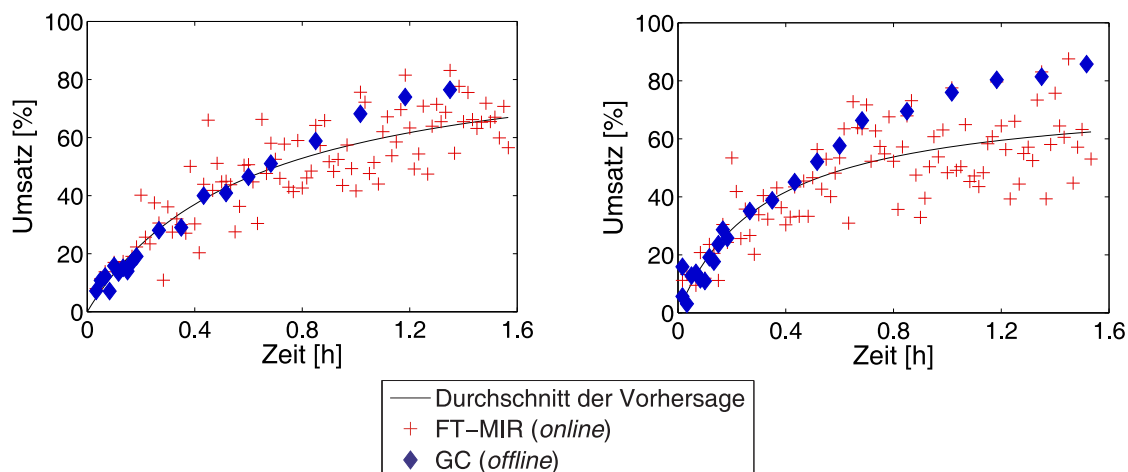


Abbildung 5.9: Vergleich zwischen *offline* und *online* Bestimmung des Umsatzes der Acetophenon Reduktion in Phosphatpuffer / 2-Propanol. Bedingungen: 20 mL partiell gereinigte ADH-'A'-Enzymlösung 3.6 U mL⁻¹ (links) 4.4 U mL⁻¹ (rechts), 80 mM Acetophenon, Reaktionsmedium: KP_i-Puffer (100 mM, pH 7.0, 0.2 mM NADH, 18 % v v⁻¹ 2-Propanol. Gesamtvolumen 50 mL, Reaktionstemperatur 30 °C.

Bei den beiden Umsetzungen ist deutlich die größere Streuung der Vorhersage zu sehen. Dies resultiert aus deutlich kleineren Banden für Substrat und Produkt. Die niedrige Konzentration von 80 mM Acetophenon in einem wässrigen System liegt sehr nah an der Bestimmungsgrenze der FT-MIR Analytik. Insbesondere bei Umsätzen über 50 %, also bei einer Acetophenon-Konzentration unter 40 mM sind die im weiteren Umsatzverlauf aufgenommenen Spektren annähernd gleich, so dass auch die Vorhersage gegen einen maximalen Wert tendiert. Die berechneten RMSE liegen bei 7.2 % bzw. 8.9 %.

5.4.3. Fazit

Die FT-MIR Spektroskopie kann in der Verfolgung der biokatalytischen Reduktion von Acetophenon eingesetzt werden. Dabei sind jedoch einige Einschränkungen in Kauf zu nehmen, insbesondere der hohe Fehler der Umsatzbestimmung bei geringen Substratkonzentrationen im wässrigen Medium. Bei der Verwendung organischer Medien und höherer Konzentrationen der einzelnen Analyte kann die beschriebene Methode nicht nur zur Verfolgung der Reaktion, sondern auch zur Strukturbestimmung entstehender Produkte eingesetzt werden.

Die Betrachtung der drei alternativen Messvarianten zur *online* Analyse der Umsetzung prochiraler Ketone führt zur 2D-Fluoreszenzspektroskopie als passendste Variante. Dies gilt insbesondere in Bezug auf die Kompatibilität zu den üblich verwendeten Puffersystemen, eine einfache technische Anpassung an viele Reaktorformen und die geringen Fehler bei der Umsatzbestimmung.

6. Reaktor

Die Auswahl und Entwicklung eines Reaktors für die (kontinuierliche) Produktion chiraler Alkohole auf Basis einer biokatalytischen Reduktion prochiraler Ketone erfordert eine genaue Kenntnis der Eigenschaften und Kinetik des zu verwendenden Katalysators und der thermodynamischen Gleichgewichtslage des Reaktionssystems. Diese Erkenntnisse werden ausführlich in den vorhergehenden Kapiteln erläutert. Das vorliegende Ziel ist nun einen Modellreaktor für die kontinuierliche Produktion zu entwickeln.

Die Retention des Katalysators (Kapitel 3.3) ist durch Immobilisierung auf verschiedene aminofunktionalisierte Materialien oder durch Membranen möglich. Beide Varianten konnten für die ADH-'A' etabliert werden, wobei die besten Ergebnisse hinsichtlich Aktivität und Stabilität des Katalysators für das freie, gelöste Enzym erreicht werden.

Die Untersuchung der thermodynamischen Eigenschaften der Reaktion (Kapitel 4.6) zeigt einen unvollständigen Umsatz unter Standardbedingungen auf. Die Integration eines *in-situ* Coproduktabtrennungsverfahrens ermöglicht eine Überwindung dieser Limitierung und somit die Maximierung des Umsatzes.

Die Verfolgung des Umsatzes bzw. der Konzentrationen der einzelnen Komponenten der Reaktion ist durch *offline*- oder *online*-Analytik möglich (Kapitel 5). Unter den untersuchten Varianten zur direkten Prozesskontrolle ist die 2D-Fluoreszenzspektroskopie am leistungstärksten.

6.1. Charakterisierung des Reaktors

Für die Entwicklung eines Produktionsreaktors bzw. -prozesses sind entsprechende Kennzahlen nötig, um die Produktivität und Effektivität sowie die Kosten verschiedener Ansätze miteinander vergleichen zu können. Dabei sollten einzelne Parameter nicht isoliert betrachtet werden, sondern immer das Gesamtergebnis.

Der Umsatz entspricht der maximal erreichbaren Produktkonzentration bzw. des maximalen Verhältnisses zwischen Produkt und Substrat. Eine Erhöhung des Umsatzes erhöht also nicht nur die Produktivität eines Prozesses, sondern auch die Ausnutzung des Katalysators. Des Weiteren wird die Produktaufarbeitung vereinfacht, wenn der Substratgehalt in der Produktlösung minimiert wird. Im Idealfall können kostenintensive Aufarbeitungsschritte weggelassen und somit die Gesamtkosten stark reduziert werden.

Die Zykluszahl beschreibt die erhaltene Produktmenge pro verbrauchten Katalysator. Für biokatalytische Prozesse lässt sich die Zykluszahl auf die Enzymmenge oder alternativ auf den Cofaktor beziehen. Da im vorliegenden Fall das Enzym im Reaktor zurückgehalten werden soll und der Cofaktor einen signifikanten Kostenfaktor darstellt, wird die Zykluszahl im Folgenden immer auf den Cofaktor bezogen.

Die Produktivität eines Prozesses wird in Form der Raum-Zeit-Ausbeute, also der erhaltenen Produktmenge pro Zeiteinheit und Reaktorvolumen angegeben (Einheit $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$). Auf diese

Weise ist die *RZA* unabhängig von der Skalierung des Reaktors und kann somit für den Vergleich von Labor- und Produktionsmaßstab verwendet werden.

6.2. Setup des Reaktors

Bei der Entwicklung des Reaktormodells wird eine kontinuierliche Reaktionsführung verbunden mit der Rückhaltung des Biokatalysators sowie einer Maximierung des Umsatzes durch *in-situ* Abtrennung des Coproduktes etabliert.

Die partiell gereinigte Enzymlösung zeigt im Vergleich zu den immobilisierten Varianten die höchste spezifische Aktivität und Stabilität und wird daher als Biokatalysator eingesetzt. Die Retention des gelösten Enzyms kann, wie bereits oben beschrieben (Kapitel 3.4.2), in einem Enzym-Membran-Reaktor erreicht werden. Die Entfernung des Coproduktes durch Ausgasen kann allerdings nicht in den EMR integriert werden, da es sich zum Einen um ein geschlossenes System handelt und zum Anderen keine Luftblasen unter die Membran gelangen dürfen. Aus diesem Grund wird die *in-situ* Abtrennung in ein eigenes Modul, eine Blasensäule, ausgelagert. Zwar erhöht sich auf diese Weise die Komplexität des Gesamtreaktors, es wird jedoch gleichzeitig auch eine höhere Flexibilität erreicht, da ein derartiges Modul leicht entfernt oder getauscht werden kann. Der vom Coprodukt befreite Produktstrom muss erneut durch den EMR geleitet werden, um einen höheren Umsatz zu erreichen.

Das Fließbild des Reaktors (Abbildung 6.1) zeigt den Gesamtaufbau des Systems. Über die Pumpe 2 (P2) wird das Reaktionsgemisch durch Blasensäule und EMR zirkuliert. Die Ansaugung befindet sich in der Blasensäule unterhalb des Lufteintrittes, um ein Ansammeln von Luft im EMR zu verhindern. Die Blasensäule wird mit Wasser und 2-Propanol gesättigter Luft im Gegenstrom betrieben. Die Lösung aus dem EMR wird von oben und die Luft von unten in die Blasensäule geleitet. Die Zuführung des Substrates und die Kontrolle des Auslasses werden über die Pumpen P1 und P3 geregelt. Um eine Veränderung des Gesamtvolumens im Reaktor zu verhindern, müssen diese Pumpen mit möglichst identischem Volumenstrom betrieben werden.

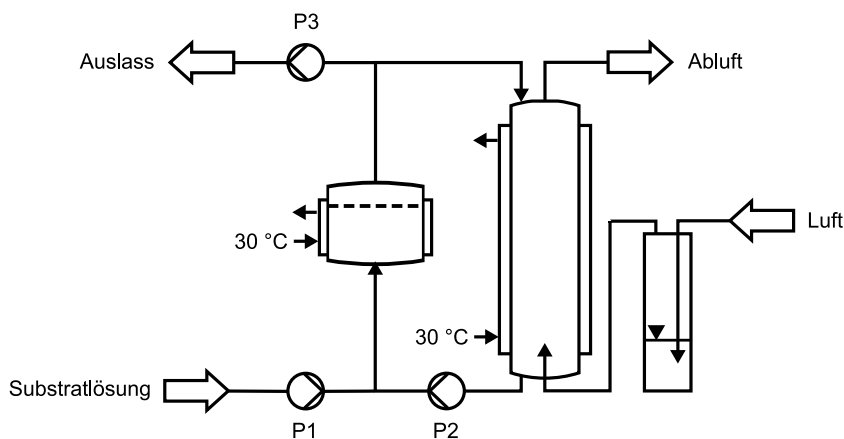


Abbildung 6.1: Fließbild des Reaktoraufbaus.

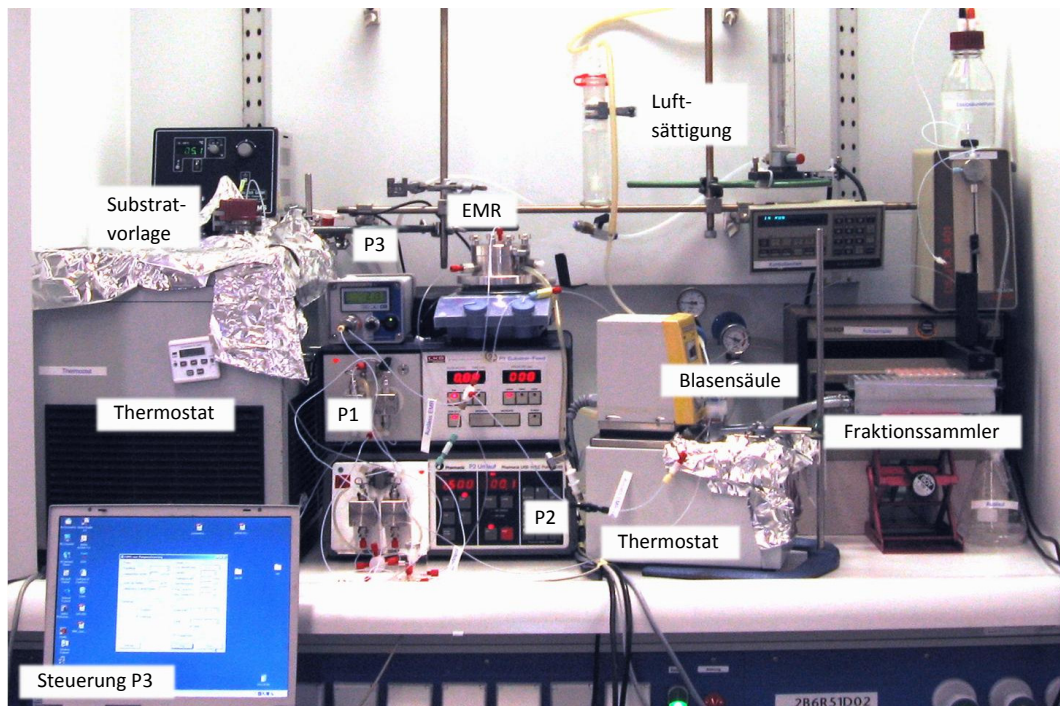


Abbildung 6.2: Foto des Reaktorsystems.

Das Foto des Versuchsaufbaus (Abbildung 6.2) zeigt die Umsetzung des geplanten Reaktors im Labor. Für die Zugabe der Substratlösung und das Umpumpen der Reaktionslösung werden HPLC-Pumpen verwendet (P1, P2). Für den Auslass des Reaktors wird eine Zahnradpumpe eingesetzt, die direkt über einen Rechner gesteuert werden kann. Auf diese Weise ist eine genaue Einstellung der Pumpgeschwindigkeit möglich, so dass die Auslassgeschwindigkeit der Zugabe an Substratlösung angeglichen werden kann. Der Thermostat in der Mitte des Bildes sorgt für die Thermostatisierung der Blasensäule. Diese besteht aus einem Standzylinder (Gesamtvolumen 80 mL, Durchmesser 29 mm), der in dem Wasserbad des Thermostaten temperiert wird. Die Skalierung des Standzylinders ermöglicht eine einfache Kontrolle des Füllstandes der Blasensäule. Oberhalb der Blasensäule ist eine Gaswaschflasche angebracht, die mit einem Wasser / 2-Propanol-Gemisch gefüllt ist und somit für die Vorsättigung der Luft sorgt. Die Substratlösung (links) wird in einem zweiten Thermostaten in der Regel auf 5 °C gekühlt, um eine Zersetzung des Cofaktors zu verhindern. Auf der rechten Seite des Bildes befindet sich der Fraktionssammler zur regelmäßigen Probenentnahme.

6.3. Simulation der kontinuierlichen Produktion

Die Simulation einer einfachen Satzreaktor-Umsetzung kann über die Lösung des Differentialgleichungssystems (Formel 3.5-3.10) der einzelnen zeitabhängigen Konzentrationsänderungen in Abhängigkeit von der Kinetik der Reaktion erreicht werden. Auch die kontinuierliche Reaktionsführung kann simuliert werden, indem die Konzentrationsänderungen durch Substratzugabe und der Verlust an Reaktionslösung am Auslass mit berücksichtigt wird. Für den gegebenen Reaktor ist dies deutlich komplizierter, es werden daher Vereinfachungen angenommen.

Die beiden grundlegenden Reaktormodelle für den kontinuierlichen Betrieb eines Prozesses sind zum einen das Strömungsrohr und zum anderen der kontinuierlich betriebener Satzreaktor. Neben den bereits beschriebenen Charakteristika der beiden Reaktoren (Kapitel 1.2.3) ist die Rückvermischung (R) ein wichtiger Parameter. Für ein ideales Strömungsrohr wird eine Pfropfenströmung ohne Rückvermischung angenommen ($R = 0$), während beim CSTR eine vollständige Vermischung innerhalb des Reaktors erwartet wird ($R = \infty$). Das vorliegende Reaktormodell stellt daher einen Spezialfall dar, mit einer Rückvermischung im Bereich zwischen CSTR und Strömungsrohr. Wenn die Pumprate (\dot{V}) der Rückführung im Verhältnis zur Ausflussrate ausreichend hoch ist, nähert sich der Reaktor dem Verhalten eines klassischen CSTRs an (Formel 6.1) und kann mit den entsprechenden Gleichungen beschrieben werden (Formel 6.2-6.6).

$$6.1 \quad R = \frac{\dot{V}_{P2}}{\dot{V}_{P3}}$$

Neben der Umsetzung des Reaktormodells inklusive des Umpumpens zwischen EMR und Blasen säule muss eine Simulation des Gesamtreaktors auch die Geschwindigkeit der *in-situ* Abtrennung des Coproduktes v_{ISPR} beinhalten (Formel 6.7). Aufgrund fehlender Daten zur Austragung des Acetons aus der Blasen säule wird ein konstanter Wert auf Basis der vorliegenden Umsetzungen abgeschätzt. Auch die Enzymaktivität (EA) verändert sich im Laufe der Zeit und muss daher in die Simulation integriert werden (Formel 6.8).

$$6.2 \quad \frac{d[AP]}{dt} = \frac{[AP]_0 - [AP]}{\tau} + v_3 - v_1$$

$$6.3 \quad \frac{d[PE]}{dt} = \frac{[PE]_0 - [PE]}{\tau} + v_1 - v_3$$

$$6.4 \quad \frac{d[\text{NADH}]}{dt} = \frac{[\text{NADH}]_0 - [\text{NADH}]}{\tau} + v_3 - v_1 + v_2 - v_4$$

$$6.5 \quad \frac{d[\text{NAD}^+]}{dt} = \frac{[\text{NAD}^+]_0 - [\text{NAD}^+]}{\tau} + v_1 - v_3 + v_4 - v_2$$

$$6.6 \quad \frac{d[IP]}{dt} = \frac{[IP]_0 - [IP]}{\tau} + v_4 - v_2$$

$$6.7 \quad \frac{d[AC]}{dt} = \frac{[AC]_0 - [AC]}{\tau} + v_2 - v_4 - v_{ISPR}$$

$$6.8 \quad \frac{d[EA]}{dt} = -\frac{1}{2t_{1/2}}$$

6.4. Kontinuierliche Reduktion von Acetophenon

Die Reaktionsbedingungen der kontinuierlichen Umsetzung von Acetophenon zu (S)-1-Phenyl-ethanol werden zunächst analog zu den Standardbedingungen der Batch-Versuche gewählt. Die Acetophenon-Konzentration muss von 80 mM auf 20 mM gesenkt werden, da die Löslichkeit des Substrates bei der Temperatur des Vorlagebehälters deutlich geringer ist. Eine höhere Temperatur ist nur bedingt möglich, da die Stabilität des Cofaktors sehr stark davon abhängt. Die experimentell bestimmte Halbwertszeit von NADH liegt bei 20 Tagen (4 °C), 17 Tagen (15 °C) bzw. 4.3 Tagen (30 °C). Um sicherzustellen, dass keine Veränderungen in der Substratlösung auftreten und somit das Versuchsergebnis beeinflusst wird, wird die Substratlösung täglich erneuert.

Bedingungen:

- $\tau = 5.2 \text{ h} / 7.2 \text{ h}$
- 1 mM NADH
- 20 mM Acetophenon
- 108 U ADH-'A'
- $R = 20$
- $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$
- Begasung: $12\text{-}18 \text{ L h}^{-1}$

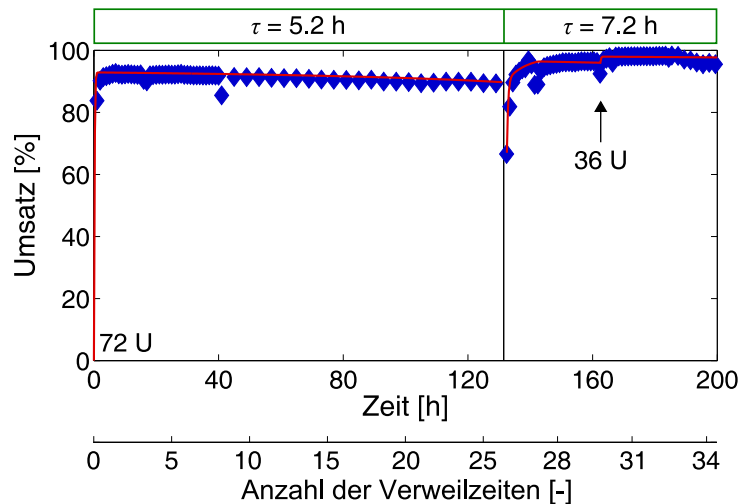


Abbildung 6.3: Kontinuierliche Reduktion von Acetophenon (♦: gaschromatographisch bestimmter Umsatz / —: simulierter Umsatz).

Die Reaktion wird zunächst ohne *in-situ* Coproduktabtrennung aber einschließlich der Blasensäule gestartet, um den zu erreichenden Umsatz zu bestimmen (Abbildung 6.3). Die Enzymbeladung beträgt 72 U (16.4 mL partiell gereinigte Enzymlösung) Nach einer Zeit von etwa 6 h (1.2 Verweilzeiten) wird ein Umsatz von 93 % erreicht. Unter Berücksichtigung der Verweilzeit und des Reaktorvolumens entspricht dies einer Raum-Zeit-Ausbeute von $10 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ mit einer Zykluszahl von 18 bezogen auf den Cofaktor.

Im Laufe von etwa 5 Tagen fällt der Umsatz infolge der Enzymdesaktivierung im Reaktor auf 90 % ab. Die auf der Kinetik basierende Simulation zeigt eine sehr gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten. Obwohl der Reaktor mit einer Rückvermischung von 20 betrieben wird, ist die Genauigkeit des Modells eines kontinuierlich betriebenen Satzreaktors ausreichend. Nach einer Laufzeit von etwa 132 h (26 Verweilzeiten) wird der Umlauf des Reaktors gestoppt und die Blasensäule in Betrieb genommen. Da die ursprünglich verwendete Blasensäule ein kleineres Volumen aufweist und eine zu starke Schaumbildung auftritt, wird zu einer größeren Säule gewechselt. Aus diesem Grund muss ein höheres Gesamtvolumen eingesetzt werden, so dass sich die Verweilzeit bei gleicher Flussrate von 5.2 h auf 7.2 h erhöht.

Die Simulation wird mit den zum Zeitpunkt des Neustarts vorliegenden Konzentrationen und der veränderten Verweilzeit neu gestartet. Erneut stimmt die Simulation sehr gut mit den experimentellen Daten überein. In beiden Fällen werden durch die *in-situ* Coprodukt Abtrennung Umsätze von über 96 % erreicht, was einer Steigerung von 6 % entspricht.

Im Laufe der 160 h Betriebszeit hat das Enzym schon deutlich an Aktivität verloren. Aus diesem Grund werden weitere 36 U (8.2 mL partiell gereinigte Enzymlösung) hinzugefügt. Der erreichte Umsatz wird auf diese Weise bis auf 98 % gesteigert. Die Zykluszahl steigt auf diese Weise von 18 auf 20 an. Die Raum-Zeit-Ausbeute liegt zu diesem Zeitpunkt bei einem Wert von $7.8 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Die Variation des experimentell ermittelten Umsatzes im Verlauf des gesamten Experiments ist hauptsächlich auf Schwankungen des Reaktorvolumens zurückzuführen. Dies ist durch geringe Unterschiede in den Flussraten der Pumpen P1 und P3, sowie durch Verlust an Flüssigkeit beim Austragen des Coproduktes zu erklären. Daher wurde das Volumen in der Blasensäule regel-

mäßig manuell kontrolliert und mit Substratlösung korrigiert. Eine apparative Lösung für dieses Problem wäre die Verwendung von Waagen oder Füllstandssensoren für die Blasensäule.

6.4.1. Optimierung der Reaktionsbedingungen: Teil 1

Unter Verwendung der oben genannten Reaktionsbedingungen werden bereits gute Umsätze bis 98 % erreicht. Auf diese Weise wird die Verwendbarkeit des entwickelten Reaktormodells bewiesen, so dass der nächste Schritt in der Reaktorentwicklung die Optimierung der Reaktionsbedingungen darstellt. Insbesondere die Verringerung des Cofaktor-Einsatzes bzw. Optimierung des Verhältnisses von Cofaktor zu Substrat stellt eine Möglichkeit zur Steigerung der Ökonomie eines wirtschaftlichen Prozesses dar.

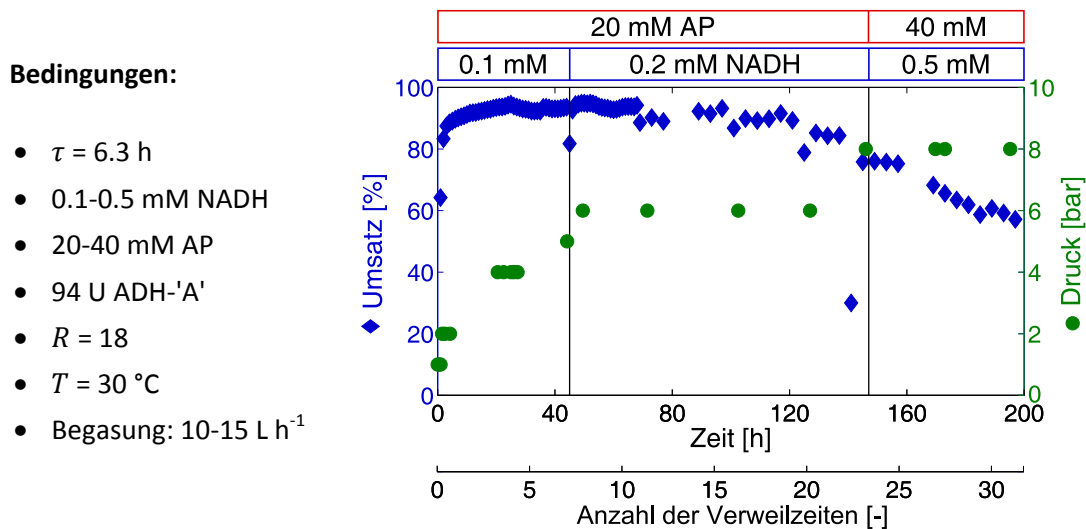


Abbildung 6.4: Kontinuierliche Reduktion von Acetophenon (AP) (◆: gaschromatographisch bestimmter Umsatz / ●: Reaktordruck).

Der K_m -Wert für NADH liegt für die Reduktion von Acetophenon bei $0.037 \pm 0.015 \text{ mM}$ (Kapitel 3.2), so dass eine Verringerung der Prozesskonzentration von 1 mM auf 0.1 mM keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität hat. Aus diesem Grund wird dieser Reaktorlauf mit 0.1 mM NADH und 20 mM Acetophenon gestartet (Abbildung 6.4). Mit integrierter Coproduktabtrennung wird ein Umsatz von bis zu 95 % erreicht ($RZA = 7.6 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Durch die Verringerung der Cofaktorkonzentration wird eine Steigerung der Zykluszahl um den Faktor 10 erreicht ($TTN = 190$). Die im Reaktor vorliegende Rückvermischung liegt in diesem Fall bei $R = 18$. Nach einer Laufzeit von 45 h (7 Verweilzeiten) wird der Cofaktorgehalt in der Substratlösung auf 0.2 mM angehoben. Auf diese Weise wird allerdings keine Erhöhung des Umsatzes erreicht und die Zykluszahl sinkt auf 95. Im Folgenden nimmt der Umsatz stetig ab, so dass von einer Verringerung der Enzymaktivität auszugehen ist.

Für eine weitere Optimierung werden nach 147 h (23 Verweilzeiten) die Konzentrationen von Substrat und Cofaktor erhöht. Es tritt eine weitere Erhöhung des Drucks im Reaktor auf 8 bar auf. Eine Erhöhung des Umsatzes wird nicht beobachtet. Durch die höhere Substratkonzentration im Reaktorzufluss kann jedoch eine erhöhte Raum-Zeit-Ausbeute von $13 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erreicht werden ($TTN = 64$).

Die starke Abnahme des Umsatzes im Verlauf der Umsetzung resultiert in einer deutlich geringeren Halbwertszeit des Biokatalysators. Da davon auszugehen ist, dass die Stabilität des Enzyms unter Prozessbedingungen im Vergleich zum ersten Versuch nicht abgenommen hat, müssen andere Gründe für die Desaktivierung des Enzyms vorliegen. Aus diesem Grund wird auch auf eine detaillierte Simulation des Umsatzverlaufes verzichtet. Eine Erklärung für die starke Abnahme des Umsatzes könnte der beobachtete Druckanstieg im System liefern. Der Druck wurde dabei an der Pumpe P2 abgelesen. Die verwendete Membran (Millipore, regenerierte Zellulose, 10 kDa) ist nach Herstellerangaben für Drücke bis zu 4.7 bar ausgelegt. Eine mögliche Erklärung für den Aktivitätsverlust könnte also eine Anlagerung des Enzyms als Biofilm auf der Membranoberfläche sein.

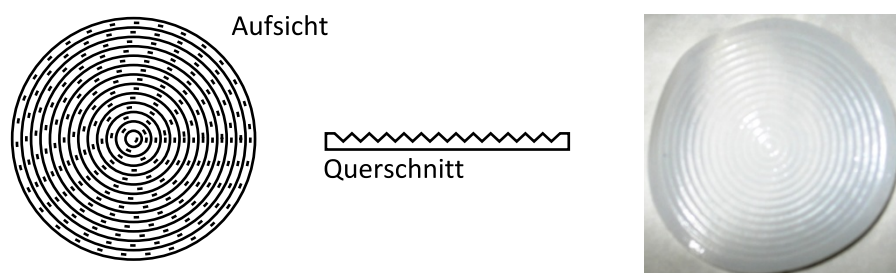


Abbildung 6.5: Schema der verwendeten Sinterplatte (links), Foto der eingedrückten Membran (rechts).

Bei beiden Reaktorläufen wird eine geriffelte Sinterplatte zwischen Membran und Auslass des EMRs eingesetzt (Abbildung 6.5). Durch den erhöhten Druck wird die Membran in diese Vertiefungen gedrückt und auf diese Weise beschädigt. Ein mikroskopischer Vergleich zwischen dieser Membran und einer neuen Membran zeigt stark aufgequollene Fasern und Lücken. Aus diesem Grund ist es sehr wahrscheinlich, dass die Trennleistung nicht mehr gegeben ist.

6.4.2. Optimierung der Reaktionsbedingungen: Teil 2

Auf Basis der ersten beiden Reaktorläufe wird eine weitere Anpassung der Reaktionsbedingungen vorgenommen. Die geriffelte Sinterplatte wird gegen eine Platte aus porösem Teflon getauscht, um die mechanischen Belastung der Membran bei erhöhtem Druck zu minimieren. Des Weiteren wird die kostengünstigere Form des Cofaktors (NAD^+) eingesetzt. Der komplette Reaktionsverlauf wird mit Hilfe der Kinetik simuliert und mit den experimentellen Daten verglichen. Zu Beginn des Versuches wird die Umsetzung ohne integrierte Coproduktabtrennung gestartet, um den Einfluss der ISPR unter den gegebenen Bedingungen zu bestimmen.

Der Reaktor wird anfangs mit einer Substratlösung aus Acetophenon (20 mM) und NAD^+ (0.15 mM) betrieben und mit 72 U ADH-'A' beladen. Der erreichte Umsatz von 89 % liegt unter dem Wert des ersten Reaktorlaufes ohne ISPR (93 %) (Abbildung 6.6). Nach Zuschalten der Coproduktabtrennung kann der erreichte Umsatz um 2 % gesteigert werden. 72 Stunden bzw. 10 Verweilzeiten nach Start der Umsetzung wird die Cofaktorkonzentration auf 0.2 mM gesteigert, um sicherzustellen dass die zudosierte Menge des partiell aufgereinigten Enzymextraktes (22 U) mit einer ausreichenden Menge an Cofaktor versorgt ist. Es wird ein Umsatz von 96 % erreicht, das entspricht einer Zykluszahl von 192 und einer Raum-Zeit-Ausbeute von $7.6 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Die

Verwendung der oxidierten Form des Cofaktors hat also keinen negativen Einfluss auf die Produktivität des Reaktors.

Bedingungen:

- $\tau = 7.2$ h
- 0.15-0.5 mM NAD^+
- 20-80 mM AP
- 94 U ADH-'A'
- $R = 20-24$
- $T = 30$ °C
- Begasung: 18-21 L h^{-1}

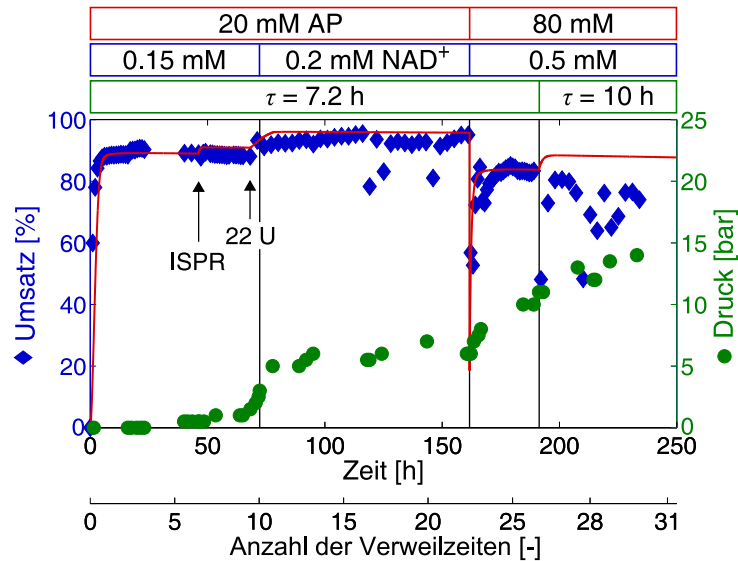


Abbildung 6.6: Kontinuierliche Reduktion von Acetophenon (◆: gaschromatographisch bestimmter Umsatz / ●: Reaktordruck / —: simulierter Umsatz).

Der Einfluss der erhöhten Substratkonzentration von 40 mM im zweiten Reaktorlauf (Abbildung 6.4) kann nur unzureichend bestimmt werden, da der Umsatz aufgrund der Aktivitätsverringering stark einbricht. Aus diesem Grund wird erneut die Acetophenonkonzentration erhöht, im vorliegenden Fall von 20 mM auf 80 mM (bei 0.5 mM NAD^+). Der Umsatz fällt auf 84 %, wobei eine Zykluszahl von 134 und eine Raum-Zeit-Ausbeute von $26.4 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erreicht wird. Dies entspricht etwa einer Verdopplung des Ergebnisses bei 40 mM Acetophenon. Eine weitere Optimierung kann durch Verringerung der Flussrate und der damit erhöhten Verweilzeit von 10 h erreicht werden. Der Umsatz sinkt im Experiment im Verlaufe der nächsten Stunden jedoch ab, was vermutlich durch die stetige Erhöhung des Systemdrucks und der damit verbundenen Enzymdesaktivierung bzw. einem Enzymverlust (s. o.) begründet ist. Unabhängig davon sind mit der verwendeten Sinterplatte prinzipiell höhere Betriebsdrücke realisierbar. Aus der Simulation des Umsatzes ist anzunehmen, dass unter diesen Bedingungen ein Umsatz von 88 % möglich ist ($TTN = 141$) wobei die Raum-Zeit-Ausbeute aufgrund der höheren Verweilzeit auf $20.5 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ sinkt.

6.5. Fazit

Das entwickelte Reaktormodel vereint die Membran-gestützte Enzymrückhaltung mit der *in-situ* Coproduktabtrennung. Die durchgeführten Reaktorläufe zeigen den erfolgreichen Einsatz des Konzeptes in der kontinuierlichen Produktion chiraler Alkohole.

Durch Variation der Reaktionsbedingungen kann dabei der erreichbare Umsatz und die Produktivität des Verfahrens optimiert werden. Die Wahl, welcher Parameter maximiert werden soll, ist vom verwendeten Substrat bzw. Produkt abhängig. Ist die Produktaufarbeitung und insbeson-

dere die Abtrennung des überschüssigen Substrates aufwändig, so ist ein möglichst hoher Umsatz wichtig. Im Experiment kann dieser dabei bis zu 98 % gesteigert werden. Eine Maximierung der Produktivität ist bis zu einem Wert von $26.4 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ möglich, wobei der erzielte Umsatz 84 % beträgt.

Die Zykluszahl gibt die Effektivität der Cofaktorausnutzung wieder. Hohe Zykluszahlen werden durch möglichst geringe Cofaktorkonzentrationen erreicht, das Maximum liegt hier bei 141. Eine weitere Minimierung der Produktionskosten kann durch den Einsatz der oxidierten Form des Cofaktors erreicht werden, da die Anschaffungskosten um den Faktor 1.9^{25} geringer sind.

Die Simulation der Umsetzung ist auf Grundlage der kinetischen Parameter und der Prozessparameter möglich. Auf diese Weise kann eine Feinabstimmung der Parameter zur Optimierung des Prozesses erfolgen.

²⁵ Preisabfrage online-Katalog Carl-Roth GmbH & Co KG, 11/2009.

7. Diskussion

Die Ergebnisse der einzelnen Kapitel werden jeweils in diesen diskutiert. An dieser Stelle soll eine übergreifende Diskussion neue Ansätze und einen Ausblick auf weitere Arbeiten bieten. Dabei werden insbesondere die Möglichkeiten einer technischen Umsetzung erläutert und die dazu nötigen Schritte und auftretenden Kosten erläutert.

7.1. Leistung

Der in der vorliegenden Arbeit entwickelte Prozess wurde mit dem Ziel der maximalen Produktivität und Cofaktorausnutzung in mehreren Schritten optimiert. Das Resultat ist ein Reaktormodell, das eine Produktion chiraler Alkohole im vorliegenden Labormaßstab ermöglicht. Eine Übertragung dieses Konzeptes auf den Pilot- oder Produktionsmaßstab soll durch einen Vergleich der ermittelten Leistungsparameter mit bereits bestehenden industriellen Prozessen erfolgen.

Biotechnologische Prozesse in der Industrie werden unter verschiedensten Bedingungen ausgeführt. Die genauen Daten sind in der Regel nicht außerhalb der jeweiligen Firmen verfügbar, so dass nur die verfügbaren Prozessparameter für einen Vergleich verwendet werden können. Es liegen Daten von insgesamt 150 biotechnologischen Prozessen mit einer Kapazität von über 100 t a^{-1} vor [Straathof 2002, Liese 2006].

Der in dieser Arbeit entwickelte Prozess erreicht eine Produktivität von $26.4 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, dabei sind die möglichen Produkte in der Gruppe der Spezialchemikalien und Vorstufen für Wirkstoffe einzuordnen. Prozesse zur Synthese derartiger Alkohole werden mit Produktivitäten im Bereich von 2.4 bis $180 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ beschrieben [Straathof 2002]. Höhere Werte bis zu $72\,000 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ werden nur bei Bulkchemikalien wie L-Aspartat erreicht [Liese 2006]. Also liegt der vorliegende Prozess eindeutig in einem industriell relevanten Bereich.

Auch die erreichte Ausbeute eines Produktionsschrittes, bzw. der erreichte Umsatz eines Prozesses sollte für eine Anwendung in der Industrie in einem bestimmten Rahmen liegen. Als Richtwerte sollten 98 bis 99 % bei Bulkchemikalien und 90 bis 95 % bei Feinchemikalien erreicht werden [Bommarius 2004]. Niedrigere Ausbeuten bzw. Umsätze werden in der Regel nur bei sehr hochpreisigen Verbindungen akzeptiert. Bei der oben genannten Produktivität liegt nur ein Umsatz von 84 % vor, allerdings sind innerhalb der Reaktoroptimierung Werte bis $> 99 \%$ möglich.

7.2. Optimierung

Die Kennzahlen des entwickelten Prozesses liegen zwar schon im industriell relevanten Bereich, jedoch ist eine weitere Optimierung vor einer technischen Umsetzung des Modells sinnvoll. Dazu werden zunächst die aktuellen Leistungsdaten und die Limitierungen des Systems analysiert in Verbesserungsvorschläge umgesetzt.

Die erreichte Leistung des Reaktormodells wird anhand des letzten Reaktorlaufes aufgeführt (Tabelle 7.1).

Tabelle 7.1: Erreichte Leistungsparameter des entwickelten Reaktors.

Parameter	Wert
Umsatz	84 %
Raum-Zeit-Ausbeute (<i>RZA</i>)	26.4 g L ⁻¹ d ⁻¹
Zykluszahl bzgl. Cofaktor (<i>TTN_{NADH}</i>)	134
Zykluszahl bzgl. Enzym (<i>TTN_{ADH}</i>)	281 000

Im kontinuierlich betriebenen Prozess ist der erreichte **Umsatz** bei vorliegender *in-situ* Coproduktabtrennung direkt abhängig von der eingesetzten Katalysatormenge und der Verweilzeit. Es konnte gezeigt werden, dass Werte von 98 % theoretisch und experimentell erreichbar sind. Eine Erhöhung der Verweilzeit zur Maximierung des Umsatzes erniedrigt direkt die Produktivität des Reaktors, während eine Erhöhung des Katalysatoreinsatzes in der Verringerung der Enzymausnutzung resultiert. Es ist dabei vom jeweiligen Reaktionssystem abhängig, welche der beiden Alternativen wirtschaftlicher ist und zu einem stabilen Prozess führt. Insbesondere die Aufarbeitung muss in diesem Fall betrachtet werden, da ein niedriger Umsatz mit einem höheren Aufwand zur Trennung von Substrat und Produkt verbunden ist.

Die Auslastung des Cofaktors, ausgedrückt durch die entsprechende **Zykluszahl**, kann bei gegebenen Bedingungen nur noch gering gesteigert werden. Der K_m -Wert bzgl. des Cofaktors liegt bei der Produktionsreaktion bei 0.04 mM bzw. bei der Regenerierungsreaktion bei 0.05 mM, so dass die minimale Konzentration im Prozess diesen Wert nicht unterschreiten sollte. Aufgrund der Zersetzung des Cofaktors unter Prozessbedingungen ist sogar eine noch höhere Konzentration empfehlenswert. Eine weitere Steigerung ist nur durch höhere Substratkonzentrationen (s.u.) oder durch eine Coimmobilisierung des Cofaktors möglich.

Die Coimmobilisierung des Cofaktors kann zu einer deutlich höheren Ausnutzung führen [Bückmann 1989]. Ein Verfahren dieser Art ist bereits industriell etabliert worden (Abbildung 7.1). Bei der *Degussa AG* (heute *Evonik Degussa GmbH*) ist eine Methode zur Produktion von *L-tert*-Leucin basierend auf einer Leucin Dehydrogenase (LDH) mit Enzym-gekoppelter Cofaktoregenerierung über eine Formiat Dehydrogenase entwickelt worden [Wöltinger 2005]. Der Cofaktor kann dabei kovalent an das wasserlösliche Polymer Polyethylenglycol (PEG) gebunden werden, so dass das gesamte Reaktionssystem homogen gelöst vorliegt. Die Rückhaltung von Enzym und PEG-Cofaktor erfolgt dabei über Ultrafiltrationsmembranen. Im vorliegenden Fall ist die Zykluszahl des freien Cofaktors jedoch so hoch (125000), dass die Kosten des Cofaktors im Gesamtprozess nur einen vernachlässigbaren Anteil haben und somit auf eine Cofaktorrückhaltung verzichtet wird.

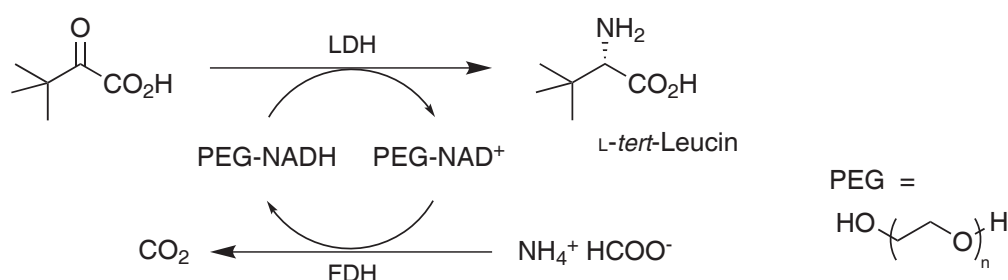


Abbildung 7.1: Produktion von L-*tert*-Leucin mit immobilisiertem Cofaktor.

Im vorliegenden System (Abbildung 6.6) wird eine Zykluszahl bzgl. des Enzyms von 281 000 erreicht. Diese setzt sich zusammen aus der durchschnittlich produzierten Produktmenge über 250 h Prozesslaufzeit pro eingesetzte Enzymeinheit. Der maximal erreichbare Wert ist dabei abhängig von der Produktivität des Prozesses und der Stabilität des Enzyms. Wie sich die Stabilität des Enzyms bei erhöhter Produktivität verhält ist allerdings unbekannt, so dass auch die maximale Zykluszahl nicht direkt abschätzbar ist.

Die **Produktivität** des Prozesses steht im direkten Zusammenhang mit der Konzentration des Substrates, dem erreichten Umsatz und der Verweilzeit des Systems. Eine Erhöhung der Substratkonzentration ist nur innerhalb der Löslichkeitsgrenzen möglich. Für Acetophenon liegt die Löslichkeit in wässriger Lösung bei 5.5 g L^{-1} (46 mM)²⁶, im Puffersystem mit 18 % v⁻¹ 2-Propanol entsprechend höher. Dies gilt für eine Vielzahl hydrophober, prochiraler Ketone, die in diesem System als Substrat eingesetzt werden können. Eine Erhöhung der Löslichkeit kann durch die Erhöhung des 2-Propanol-Gehaltes erreicht werden. Da die ADH-'A' eine sehr hohe Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln besitzt, sind auf diese Weise auch hohe Substratkonzentrationen möglich (siehe auch Kapitel 5.4.2.1). Eine Alternative ist weiterhin die Verwendung von 2-Phasen-Systemen, dabei bildet in der Regel ein Substrat / Produkt-Gemisch die zweite Phase. Ein Nachteil ist allerdings die resultierende heterogene Reaktionsführung, die z. B. zu Transportlimitierungen führen kann. Des Weiteren sind viele Enzyme in der Gegenwart von Phasengrenzflächen weniger stabil [Briechle 2006].

Die Ergebnisse der verschiedenen Reaktorläufe zeigen deutlich, dass mit den ermittelten kinetischen Daten der Verlauf des Umsatzes modellierbar ist. Die Unterschiede zwischen simulierten und experimentellen Daten sind minimal. Aus diesem Grund kann eine Optimierung der Produktion chiraler Alkohole auch zunächst *in-silico* erfolgen, so dass aus einer Vielzahl von Reaktionsbedingungen in kürzester Zeit die optimalen Parameter bestimmbar sind.

Für die Produktion von (S)-1-Phenylethanol werden die Substrat- und Cofaktorkonzentration, sowie Katalysatoreinsatz und Verweilzeit systematisch variiert, eine Umsetzung modelliert und die entsprechend erreichbaren Umsätze und Raum-Zeit-Ausbeuten bestimmt. Dazu wird für jeden Satz an Bedingungen ein Reaktorlauf simuliert und die im Gleichgewicht erreichten Um-

²⁶ Merck Chemicals, <http://www.merck-chemicals.de/>

sätze zur Berechnung der Produktivität verwendet. Die Desaktivierung des Enzyms wird bei der Optimierung vernachlässigt.

Bei der Variation von Substrat, Cofaktor und Katalysatoreinsatz werden jeweils vier verschiedene Verweilzeiten ($\tau = 1, 5, 10, 20$ h) angenommen, ein Pfeil zeigt dabei in den verschiedenen Abbildungen einen steigenden Wert an (Abbildung 7.2). Als Standardbedingungen werden 80 mM Acetophenon, 0.5 mM NAD^+ und 220 U ADH-'A' verwendet. In allen Fällen ist deutlich zu erkennen, dass ein vollständiger oder fast vollständiger Umsatz im Rahmen der untersuchten Konzentrationsbereiche nur mit ausreichend hohen Verweilzeiten erreichbar ist. Die Erhöhung der Verweilzeit von 5 h auf 10 oder 20 h führt hingegen kaum zu einer Verbesserung des Umsatzes. Dieser Trend ist bei Betrachtung der Raum-Zeit-Ausbeute gegenläufig, da eine geringe Verweilzeit auch einen hohen Produktfluss aus dem Reaktor bedeutet.

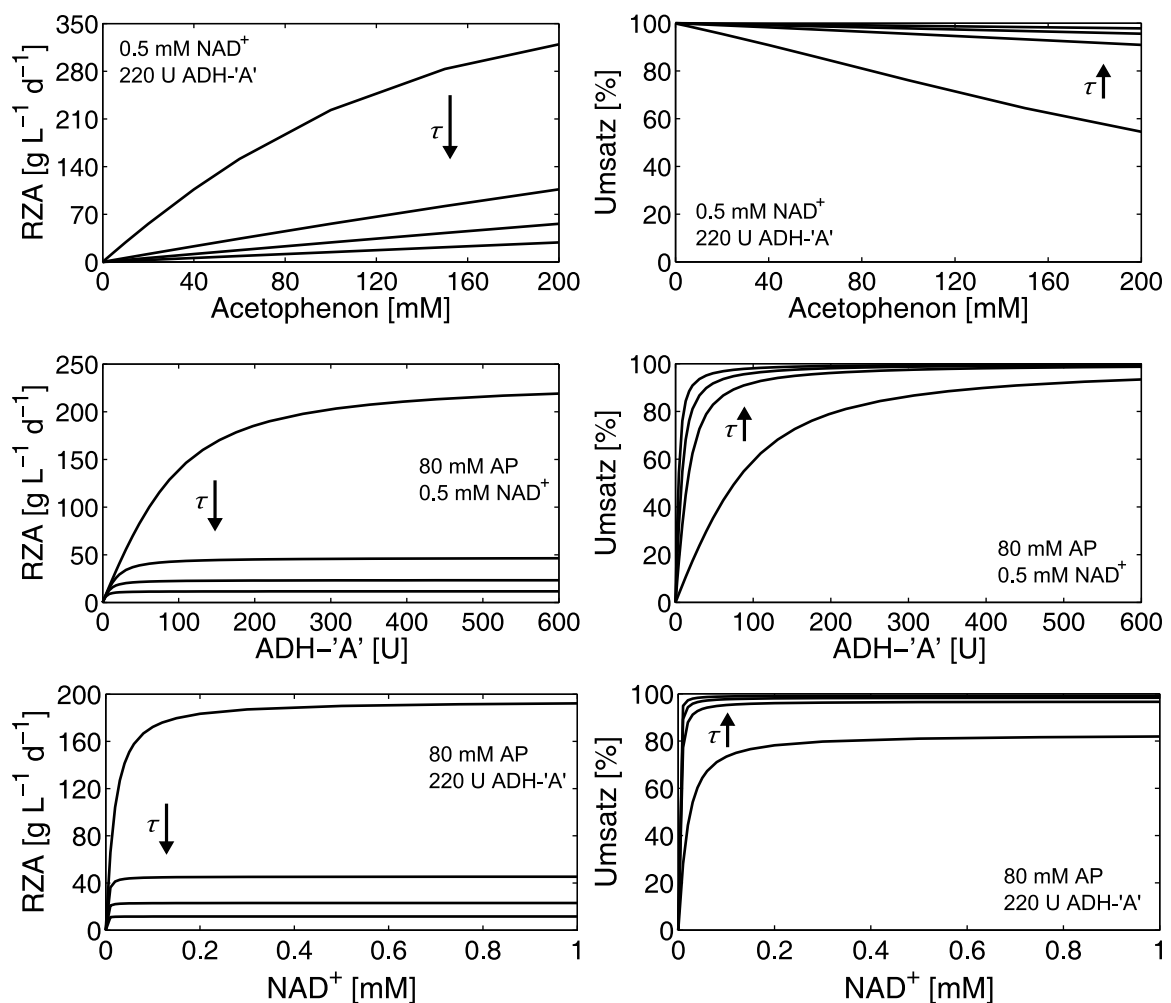


Abbildung 7.2: Optimierung der (S)-1-Phenylethanol-Produktion. Der Pfeil zeigt jeweils in Richtung steigender Verweilzeit ($\tau = 1, 5, 10, 20$ h).

Die Variation von Cosubstrat und Katalysatormenge hat nur einen geringen Einfluss auf Produktivität und Umsatz. Ab einem Cofaktorkonzentration von 0.25 mM NAD^+ bzw. Enzymmenge von 250 U ADH-'A' aufwärts verhalten sich Produktivität und Umsatz annähernd konstant. Eine höhere Acetophenon-Konzentration hingegen führt grundsätzlich zu einer höheren Raum-Zeit-

Ausbeute, sie ist jedoch durch die Löslichkeit im vorliegenden 2-Propanol (18 % v v⁻¹) / Puffer-System beschränkt²⁷.

Die Langzeitstabilität eines solchen optimierten Prozesses ist von der Stabilität des Biokatalysators abhängig. Aufgrund der in dieser Arbeit entwickelten Methoden zur *online* Prozessanalytik kann der Verlust an Aktivität und der damit verbundene sinkende Umsatz im Produktstrom zeitnah verfolgt werden. Für einen längeren Dauerbetrieb ist weiterhin eine gezielte, automatische Nachdosierung des Enzyms auf Basis der *online*-Daten denkbar.

7.3. Maßstabsvergrößerung

Das entwickelte Reaktormodell kann für die kontinuierliche Produktion von chiralen Alkoholen eingesetzt werden, allerdings liegt das Reaktorvolumen im vorliegenden System bei unter 50 mL, so dass die Produktion einer größeren Menge an Produkt nicht möglich ist. Die absolute

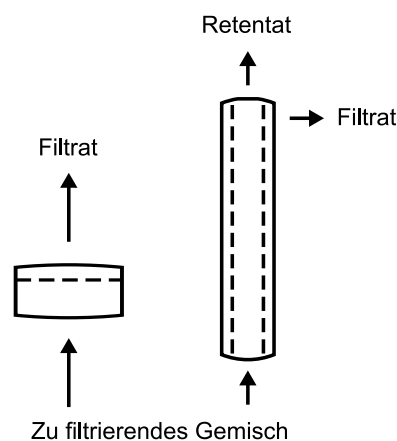


Abbildung 7.3: Vergleich von Dead-End und Crossflow-Filtration.

Produktmenge (Abbildung 6.6) liegt bei nur 4.7 g (*S*)-1-Phenylethanol in etwa 250 Stunden. Eine effektivere Produktion ist erst nach einer Maßstabsvergrößerung möglich. Die Eignung muss für die einzelnen Prozesselemente getrennt betrachtet werden.

Der Enzym-Membran-Reaktor besteht aus einer Ultrafiltrationseinheit, die Reaktionslösung wird dabei mit erhöhtem Druck durch die Membran geleitet, so dass die Enzymmoleküle von der Membran zurückgehalten werden. Dieser Betriebsmodus nennt sich Dead-End-Filtration (Abbildung 7.3, links) und hat, wie auch die Reaktorläufe zeigen, einige Nachteile. Feinste Partikel wie z. B. ausgefallenes Protein oder Staubkörner können sich an der Membran anlagern

und so über die Zeit zu einem Druckanstieg des Systems führen. Dadurch ist die Standzeit eines solchen Systems begrenzt und in vielen Fällen für den technischen Maßstab nicht geeignet. Eine Alternative bietet in diesem Fall die Crossflow-Filtration (Abbildung 7.3, rechts) [Briechle 2006]. Das zu filtrierende Gemisch wird mit einer hohen Geschwindigkeit tangential an der Membran vorbeigeleitet und verhindert so die Ablagerung fester Partikel. Durch ein Ventil wird ein Gegendruck beim Verlassen des Filtermoduls aufgebaut und ein Teil der Lösung wird als Filtrat durch die Membran gedrückt. In der Regel wird daher das Gemisch im Kreislauf durch das Modul gepumpt. Solche Membranmodule sind kommerziell auch in größeren Maßstab verfügbar und können für eine weitere Kapazitätserhöhung parallel geschaltet betrieben werden.

Die *in-situ* Abtrennung des Coproduktes wird im Labormaßstab über eine Blasensäule erreicht. Im technischen Maßstab treten beim Betrieb einer derartigen Blasensäule einige Nachteile auf. Zum einen ist mit einer starken Schaumbildung in der begasten Lösung zu rechnen, so dass Antischaummittel oder eine mechanische Schaumzerstörung verwendet werden müssen. Im Falle

²⁷ Die maximale Löslichkeit von Acetophenon in Wasser mit einem Anteil von 18 Volumenprozent 2-Propanol liegt bei 83 mM (bestimmt bei 22 °C).

der Zugabe von Antischaummitteln, in der Regel organische Polymere, müssen diese in der Produktaufarbeitung wieder entfernt werden. Zum anderen ist das Ausgasen mit einem hohen Verlust an Wasser und 2-Propanol verbunden, so dass ein erhöhter Aufwand zur Rückgewinnung dieser Komponenten aus der Abluft betrieben werden muss.

Eine im technischen Maßstab etablierte Variante stellt die Pervaporation dar [Lipnizki 1999]. Über selektive Membranen werden Verbindungen in Pervaporationsmodulen abgetrennt. Dabei handelt es sich nicht um Größenausschlussmembranen, sondern Löslichkeitsmembranen. Die Trennungseigenschaften sind nur von der Selektivität der Membran gegenüber den Komponenten des Reaktionsmediums abhängig. Gleichzeitig zum Stofftransport durch die Membran tritt ein Übergang des abgetrennten Stoffes von flüssig zu gasförmig auf. Eine Steigerung der Trennleistung wird durch Anlegen eines Vakuums auf der Rückseite der Membran erreicht. Großtechnisch wird solch eine Anlage u. a. bei der Entwässerung von Ethanol eingesetzt [Mulder 1983]. Die Bauweise eines Permeabilisierungs-Moduls entspricht üblichen Mikro- oder Ultrafiltrationsmodulen, so dass auch hier die Crossflow-Variante eingesetzt werden kann.

Der Einsatz derartiger Pervaporationssysteme zur Entfernung von Aceton aus ADH-katalysierten Reaktionen wurde bereits beschrieben [Stillger 2002, Schroer 2007]. In beiden Fällen wird eine deutliche Umsatzerhöhung erreicht.

Die Integration der Tangentialfiltermodule führt zu einem veränderten Reaktoraufbau (Abbildung 7.4). Der Enzym-Membran-Reaktor und die Blasensäule werden durch ein Ultrafiltrations(UF)-Modul bzw. ein Pervaporations(PV)-Modul ersetzt. Die benötigte hohe Fließgeschwindigkeit wird über die Pumpe P2 für beide Module sichergestellt. Der Zufluss an frischer Substratlösung muss über die Auslassgeschwindigkeit und den Verlust des PV-Moduls geregelt werden, um ein konstantes Volumen im Reaktor zu gewährleisten. Dabei kann die Auslassgeschwindigkeit über den Druckaufbau im UF-Modul mit dem Reduzierventil V1 eingestellt werden. Das Aceton wird über die Vakuumpumpe P3 aus dem Reaktor entfernt, wobei Aceton und eventuell Wasser oder 2-Propanol durch den Wärmetauscher W1 kondensiert werden.

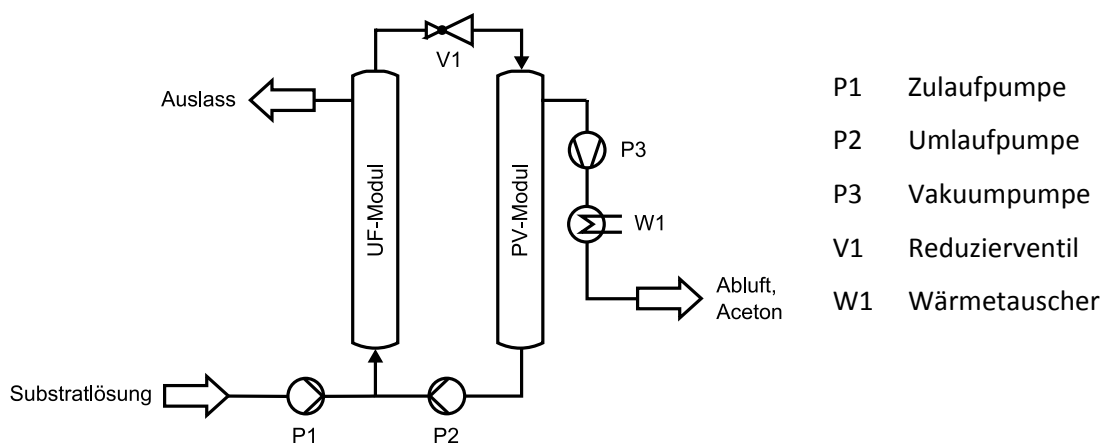


Abbildung 7.4: Fließbild des Reaktors im technischen Maßstab.

7.4. Produktaufarbeitung

Ein elementarer Punkt bei der biokatalytischen Produktion chiraler Alkohole ist die Isolierung des Endproduktes. Dabei muss zwischen Labormaßstab und technischem Maßstab unterschieden werden.

Im Labormaßstab kann die Aufreinigung der produzierten Alkohole über Extraktion aus dem Reaktionspuffer mit einem geeigneten organischen Lösungsmittel wie Essigsäureethylester und anschließender chromatographischer Auftrennung an Kieselgel erreicht werden. Dieses Verfahren ist im technischen Maßstab nicht vorteilhaft, da die Chromatographie in der Regel ein sehr kostenintensives Verfahren darstellt. Neben dem hohen Verbrauch an Eluenten kann insbesondere Kieselgel als feste Phase meist nicht wiederverwendet werden, da sich anorganische Substanzen wie z. B. Puffersalze absetzen und die Säule blockieren.

Großtechnisch sind mehrere Aufarbeitungsvarianten denkbar. Auf Grundlage dieser Arbeit können Adsorbentien eingesetzt werden, um das Produkt aufzureinigen (Abbildung 7.5, **A**). Dazu ist erst die Extraktion in ein geeignetes Lösungsmittel notwendig. Die Produktlösung wird dann mit dem Adsorbens behandelt, etwa in einer gepackten Säule, so dass der Zielalkohol selektiv gebunden wird. Nach dieser Behandlung muss das Produkt nur noch desorbiert werden und liegt aufgereinigt in Lösung vor. Das Endprodukt wird nach Verdampfung des Lösungsmittels erhalten.

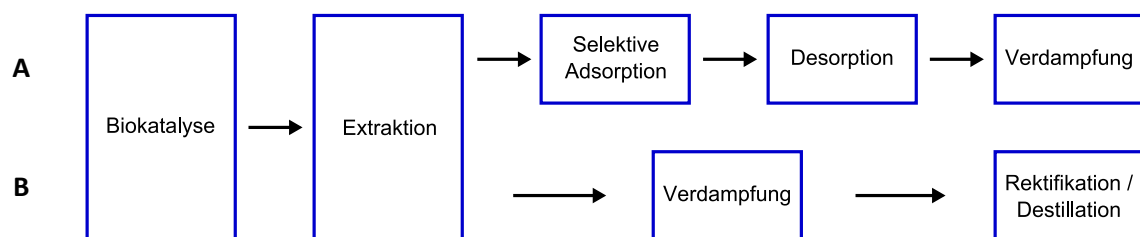


Abbildung 7.5: Ansätze zur technischen Produktaufarbeitung chiraler Alkohole

Eine Alternative bietet die klassische Destillation oder Rektifikation (Abbildung 7.5, **B**) [Christen 2009]. Die Produktlösung kann nach Extraktion in ein organisches Lösungsmittel oder direkt aus der wässrigen Lösung destilliert werden, je nach Lage der Siedepunkte der einzelnen Komponenten.

7.5. Wirtschaftlichkeit

Die Leistung eines biotechnologischen Prozesses ist nicht der einzige Faktor, der für eine Nutzbarkeit in der industriellen Produktion in Betracht gezogen werden muss. Entscheidend ist insbesondere die Wirtschaftlichkeit, die für den Aufbau eines neuen Verfahrens vorliegen muss. Dazu muss für die Einführung eines neuen Produktes zunächst eine Analyse des Marktes erfolgen, um einen für potentielle Kunden akzeptablen Preis zu erreichen. Bei bereits etablierten Produkten kann die Kostenanalyse ausgehend vom vorliegenden Marktpreis erfolgen.

An dieser Stelle soll die Wirtschaftlichkeit des vorliegenden Prozesses für die Herstellung von (S)-1-Phenylethanol analysiert werden. Der aktuelle Preis für diesen chiralen Alkohol liegt bei 7324 € kg⁻¹ (Sigma-Aldrich Corp.) im 25 g-Maßstab. Für die Berechnungsgrundlage werden die

Ausgaben für die fermentative Herstellung des Biokatalysators und für die Biokatalyse zur Herstellung von 1 kg Produkt errechnet. Die Aufarbeitung des Produktes, sowie auftretende Kosten für Energie und Wasser werden hier vernachlässigt

Die Fermentation der ADH-'A' in *E. coli* BL21(DE3) wird in einem komplexen Medium im Schüttelkolben durchgeführt [Edegger 2006b]. Die Kosten werden anhand der Ausbeute und der im Medium verwendeten Bestandteile abgeschätzt. Die benötigten Medienbestandteile werden aus gängigen Chemikalienkatalogen zusammengestellt. Zugrunde gelegt wird dabei eine Kapazität von $2.5 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ mit einer Aktivität von $1.4 \text{ U mg}_{\text{BTM}}^{-1}$. Die Biokatalysatekosten werden analog zur Fermentation abgeschätzt.

Die Kalkulation erfolgt ausgehend vom vorliegenden, optimierten Reaktorlauf. Dabei wird jeweils von der Substratlösung mit 20 mM Acetophenon (I) bzw. 80 mM Acetophenon (II) ausgegangen und die Kosten für die Herstellung von 1 kg Produkt abgeschätzt (Abbildung 7.6). Deutlich ist festzustellen, dass trotz des höheren Umsatzes von 96 % bei der niedrigeren Substratkonzentration deutlich höhere Kosten verursacht werden. Die Analyse der Zusammensetzung der Kosten zeigt, dass das Cosubstrat 2-Propanol den größten Teil einnimmt, was durch das hohe benötigte Volumen an Substratlösung zu erklären ist. Ein weiterer großer Teil der Kosten ist durch den Cofaktor gegeben. In beiden Fällen ist der Kostenanteil des Katalysators mit 9 % bzw. 14 % eher gering.

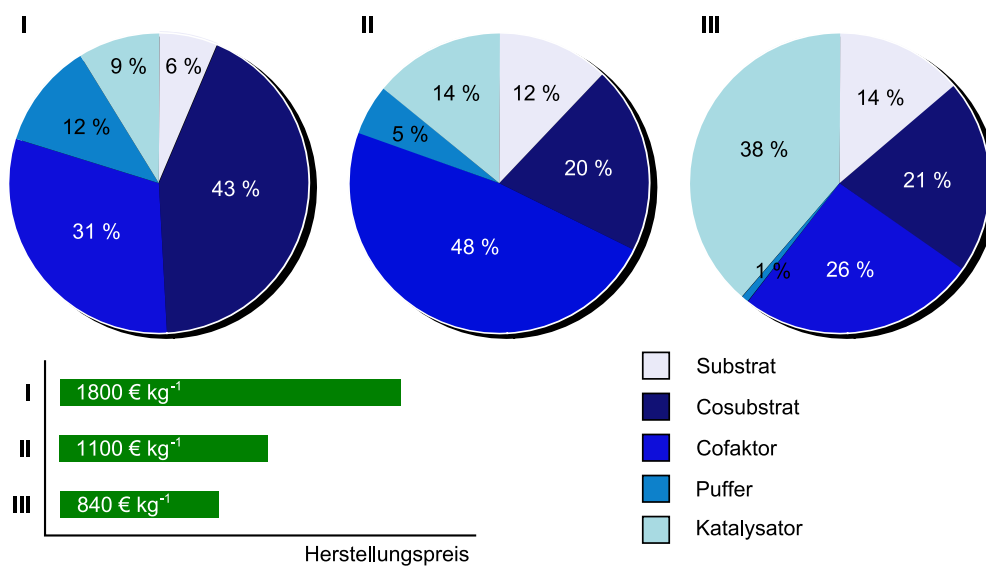


Abbildung 7.6: Kostenabschätzung der (S)-1-Phenylethanol-Produktion.

Die *in-silico* (III) Optimierung zeigt unter welchen Reaktionsbedingungen der Prozess effektiver ausgeführt werden kann. Gewählt wurde die Kombination aus erhöhter Substratkonzentration und erhöhtem Katalysatoreinsatz mit gleichzeitig verringerter Verweilzeit²⁸. Desweiteren wird die Pufferkonzentration stark herabgesetzt, da im vorliegenden Reaktionssystem keine pH-Änderung zu erwarten ist. Es ergibt sich auf diese Weise ein Umsatz von 97 % mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von $68.3 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Die Kosten der Produktion verringern sich dabei weiter auf

²⁸ 120 mM AP, 0.35 mM NAD⁺, 25 % v v⁻¹ 2-Propanol, 20 mM Puffer, 200 U ADH-'A', 5 h Verweilzeit.

840 € kg⁻¹. Der Katalysator verursacht in diesem Fall die höchsten Ausgaben. Eine weitere Steigerung des Umsatzes auf > 99 %, etwa um die Produktaufarbeitung zu vereinfachen, kann durch Steigerung des Katalysatoreinsatzes auf 500 U und der Verweilzeit auf 10 h erreicht werden. allerdings steigen auf diese Weise die Kosten auf über 1300 € kg⁻¹ und die Produktivität verringert sich auf 34.5 g L⁻¹ d⁻¹.

In allen Fällen liegen die Herstellkosten (Fermentation + Biokatalyse) deutlich unter dem Marktpreis von (S)-1-Phenylethanol, obwohl die Berechnung ausgehend von Katalogpreisen ausgeführt wird. Bei einer industriellen Fertigung sind die Einkaufspreise deutlich geringer. Obwohl bei der Kalkulation die Produktaufarbeitung, sowie Energie, Wasser oder Personal vernachlässigt wird, kann davon ausgegangen werden, dass der entwickelte Prozess, insbesondere für die Herstellung von Spezialchemikalien, wirtschaftlich ist.

7.6. Fazit

Das in der vorliegenden Arbeit entwickelte Reaktorsystem ist für die effektive Produktion chiraler Alkohole mit biotechnologischen Methoden geeignet. Eine Analyse der Leistung am Beispiel der Reduktion von Acetophenon zeigt die industrielle Relevanz des Verfahrens. Die detailliert ausgearbeitete Kinetik der Umsetzung kann zur Simulation von kontinuierlichen Prozessen verwendet werden und ermöglicht auf diese Weise die *in-silico* Optimierung. Die dabei gewünschten Leistungsdaten sind abhängig vom erzielten Produkt und der geplanten Produktaufarbeitung. Eine Vergrößerung des Maßstabs zur Erzielung höher Produktmengen ist mit etablierten Methoden möglich. Die Analyse der Herstellkosten belegt die Konkurrenzfähigkeit des Verfahrens.

8. Zusammenfassung

Die biokatalytische Reduktion prochiraler Ketone ermöglicht eine umweltfreundliche und effektive Produktion von chiralen Alkoholen für die chemische, pharmazeutische und Agrar-Industrie. In der vorliegenden Arbeit wurde die Entwicklung eines solchen Verfahrens auf der Basis von Oxidoreduktasen beschrieben. Die Erarbeitung des Prozesses gliederte sich dabei in vier Teile: die Charakterisierung des Biokatalysators zur Identifikation der optimalen Reaktionsparameter, die Untersuchung der Reaktion bezüglich der thermodynamischen Gleichgewichtslage, die *on-line*-Analyse der Reaktionslösung und die Entwicklung eines geeigneten Reaktorkonzeptes.

Die Umsetzung der prochiralen Ketone zu den entsprechenden Alkoholen wurde mit der Alkohol Dehydrogenase ADH-'A' aus *Rhodococcus ruber* DSM 44541 erreicht. Der Biokatalysator stand rekombinant in Form lyophilisierter *Escherichia coli*-Zellen zur Verfügung. Der für die Reaktion benötigte Cofaktor NADH wurde über einen Substrat-gekoppelten Ansatz über die Oxidation des Cosubstrates 2-Propanol zu Aceton regeneriert.

Die kinetischen Eigenschaften der ADH-'A' wurden für sämtliche katalysierte Teilreaktionen bestimmt: die Reduktion des Substrates, die Oxidation des Cosubstrates und die entsprechenden Rückreaktionen. Mit Hilfe der kinetischen Modelle der Teilreaktionen und der ermittelten Parameter konnten Reaktionen simuliert und auf diese Weise die Bedingungen *in silico* optimiert werden.

Die Wirtschaftlichkeit eines biokatalytischen Verfahrens ist in der Regel direkt abhängig von der Wiederverwendung des Katalysators. Aus diesem Grund wurden verschiedene Ansätze zur Rückhaltung der ADH-'A' verglichen und die Immobilisierungs- und Aktivitätsausbeuten, sowie die Stabilität ermittelt. Das freie, gelöste Enzym konnte über Membranen zurückgehalten werden, die Aktivität wurde dabei nicht beeinträchtigt. Die Halbwertszeit unter Prozessbedingungen betrug 11.1 Tage. Parallel wurde die Immobilisierung auf amino- und epoxy-funktionalisierte Trägermaterialien durchgeführt. Die Eigenschaften der untersuchten Partikel sind dabei sehr unterschiedlich - es wurden poröse Gläser (*Vitrabio* TRISOPERL® und TRISOPOR®: 100-200 µm), magnetische Partikel (*ATG: biosynthetics*: 1 µm) und Nanodiamanten (406 nm) eingesetzt. Die auf TRISOPOR®-Amino immobilisierte ADH-'A' zeigt eine ähnliche Stabilität wie das freie Enzym, wohingegen die anderen Enzymimmobilisate eine signifikant geringere Aktivität aufwiesen.

Aufgrund der Substrat-gekoppelten Cofaktorregenerierung liegt ein Gleichgewicht zwischen den vier Reaktionskomponenten, also Substrat, Produkt, Cosubstrat und Coprodukt, vor. Wie bei einer einfachen Gleichgewichtsreaktion kann das Massenwirkungsgesetz aufgestellt werden. Der maximal erreichbare Umsatz ist demzufolge abhängig von der Gleichgewichtskonstante und somit limitiert. Eine Maximierung des Umsatzes führt zu höheren Produktivitäten und einer vereinfachten Produktaufarbeitung. Eine Möglichkeit zur Überwindung dieser thermodynamischen Limitierung ist die *in-situ* Abtrennung des Produktes oder Coproduktes.

Die selektive Adsorption an geeigneten Trägern ist eine Option zur Abtrennung des Produktes. Verschiedene Materialien basierend auf kommerziell verfügbaren Harzen aus Polystyrol oder Polyacryl und durch den Kooperationspartner *Süd-Chemie AG* zur Verfügung gestellten smek-tischen Schichtsilikaten, Alumosilicaten und γ -Aluminiumoxiden wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Die eingesetzten Harze und Schichtsilikate zeigten nur eine geringe Selektivität und Kapazität gegenüber dem untersuchten Alkohol / Keton-Systemen in wässriger Reaktionslösung. Weiterhin wurde das Enzym ebenfalls teilweise von den Partikeln adsorbiert. Die Adsorption von 2,5-Hexandiol aus Essigsäureethylester zeigte hingegen unter Einsatz eines Alumosilicats, bzw. γ -Aluminiumoxids eine hohe Selektivität im Vergleich zu dem entsprechenden Diketon. Dieses Ergebnis konnte allerdings nicht für die *in-situ* Abtrennung unter den gegebenen wässrigen Reaktionsbedingungen verwendet werden.

Die *in-situ* Entfernung flüchtiger Komponenten durch Einleiten von Gasen, Anlegen von Vakuum oder Anwendung einer organophilen Pervaporation stellt die in der Literatur am häufigsten beschriebene Methode in diesem Bereich dar. Für die Abtrennung des Coproduktes Aceton aus dem vorhandenen Reaktionssystem wurde mit Wasser und Cosubstrat-gesättigte Luft in die Reaktionsmischung eingeleitet. Der Umsatz konnte mit dieser Methode von 81 % (Substrat: 2-Acetylpyridin) bzw. 92 % (Substrat: Acetophenon) auf >99.9 % (Enantiomerenüberschuss > 99.9 %) gesteigert werden.

Die Analyse der Reaktionslösung in biokatalytischen Prozessen erfolgt in der Regel durch chromatographische Verfahren wie Gas- oder Flüssigkeitschromatographie. Eine *online*- oder *in-situ*-Analyse der Reaktionsmischung führt im Vergleich zur *offline*-Analyse zu einem geringeren Fehlerrisiko und ermöglicht eine schnelle Reaktion auf Veränderungen.

Drei verschiedene Methoden zur Bestimmung der Konzentrationen der einzelnen Komponenten wurden untersucht und verglichen. Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie ermöglichte die direkte Analyse der Reaktionszusammensetzung, erforderte aber starke Magnetfelder und deuterierte Lösungsmittel. Mit der 2D-Fluoreszenz-Spektroskopie wurden Spektren mit einem breiten Extinktions- und Emissions-Wellenbereich erhalten. Aus der multivariaten Analyse der Spektren konnten die Umsätze im Vergleich zur gaschromatographischen Methode mit einem durchschnittlichen Fehler von 4.9 % erhalten werden. Aufgrund des kompakten Aufbaus und der einfachen Integration des Messsystems in einen Reaktor ist diese Methode gut für die Prozessüberwachung geeignet. Auch die Infrarot-Spektroskopie konnte in der *online*-Analyse biokatalytischer Prozesse verwendet werden. Der Fehler der Bestimmung war aber insbesondere bei geringeren Konzentrationen und in wässrigen Lösungen deutlich höher.

Bei der Entwicklung des eigentlichen Reaktors wurden die Ergebnisse aus allen Teilen zusammengeführt. Aufgrund der hohen Aktivität und Stabilität wurde die ADH-'A' in gelöster Form eingesetzt und in einem Enzym-Membran-Reaktor zurückgehalten. Die Integration einer *in-situ* Coproduktabtrennung durch Ausgasen wurde in Form einer Blasensäule erreicht. Der Enzym-Membran-Reaktor und die Blasensäule wurden im Kreislauf betrieben. Durch eine kontinuierliche Zuführung von Substratlösung in den Kreislauf und entsprechendes Ableiten der Pro-

duktlösung wurde die Charakteristik eines kontinuierlich betriebenen Rührreaktors angenommen. Eine Simulation des zu erreichenden Umsatzes war auf Basis der Kinetik, der Verweilzeit und der Geschwindigkeit der Coproduktabtrennung möglich.

Ausgehend von einer Substratlösung mit 20 mM Acetophenon als Substrat und 1 mM Cofaktor konnten im kontinuierlichen Betrieb Umsätze bis zu 98 % (Enantiomerenüberschuss > 99.9 %) erreicht werden. Dies entspricht einer Zykluszahl bezogen auf den Cofaktor von 20 und einer Raum-Zeit-Ausbeute von $10 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Durch Optimierungen in der Reaktionsführung wurde eine Steigerung der Zykluszahl auf 136 und der Raum-Zeit-Ausbeute auf $19 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Enantiomerenüberschuss > 99.9 %) erreicht.

Das in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Reaktormodell ist geeignet für die selektive Synthese chiraler Alkohole mit hohen Umsätzen und Raum-Zeit-Ausbeuten. Die Pilotproduktion wird mit dem Substrat Acetophenon durchgeführt, eine Übertragung auf andere Substrate ist aber jederzeit möglich. Der Reaktoraufbau ist dabei insbesondere für die Produktion kleinerer Mengen von Spezialchemikalien geeignet. Eine Maßstabsvergrößerung, sowie eine Optimierung des vorliegenden Prozesses wurden ausführlich diskutiert.

9. Material und Methoden

9.1. Biokatalysatoren, Chemikalien und Partikel

Acetophenon	<i>Fluka Chemie GmbH</i> , Buchs, Schweiz
2-Acetylpyridin	<i>Sigma-Aldrich Corporation</i> , St. Louis, MO, USA
Alkoholdehydrogenase ADH-'A' aus <i>Rhodococcus ruber</i> DSM 44541 überexpre- miert in <i>E. coli</i> Tuner (DE3), pET22b+	<i>Wolfgang Kroutil</i> , Institut für Chemie, Organische und Bioorganische Chemie, Graz, Österreich
Alumosilicat	<i>Süd-Chemie AG</i> , München, Deutschland
γ -Aluminiumoxid	<i>Süd-Chemie AG</i> , München, Deutschland
Amberlite® XAD-2, 20-60 mesh, 90 Å	<i>Supelco</i> , Bellefonte, PA, USA
Amberlite® XAD-4, 20-60 mesh, 40 Å	<i>Supelco</i> , Bellefonte, PA, USA
Amberlite® XAD-7HP, 20-60 mesh, 90 Å	<i>Sigma-Aldrich Corporation</i> , St. Louis, MO, USA
Aminopropyltriethoxysilan	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG</i> , Karlsruhe, Deutschland
Disintex™ 75	<i>International Specialty Products, Inc (ISP)</i> , Wayne, NJ, USA
2-Acetylfuran	<i>Fluka Chemie GmbH</i> , Buchs, Schweiz
<i>rac</i> -1-(2-Furyl)ethanol	<i>Fluka Chemie GmbH</i> , Buchs, Schweiz
(<i>S</i>)-1-(2-Furyl)ethanol	<i>Acros Organics</i> , Geel, Belgien
Glutardialdehyd, 25 %ig in Wasser	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG</i> , Karlsruhe, Deutschland
<i>rac/meso</i> -2,5-Hexandiol	<i>Fluka Chemie GmbH</i> , Buchs, Schweiz
(<i>S,S</i>)-2,5-Hexandiol	<i>Codexis</i> , Redwood City, CA, USA
2,5-Hexandion	<i>Merck Schuchardt OHG</i> , Hohenbrunn, Deutschland
(<i>R</i>)-5-Hydroxyhexan-2-on	<i>Fluka Chemie GmbH</i> , Buchs, Schweiz
(<i>S</i>)-5-Hydroxyhexan-2-on	<i>Codexis</i> , Redwood City, CA, USA
(<i>R</i>)-2-(1-Hydroxy)ethylpyridin	<i>Acros Organics</i> , Geel, Belgien
Magnetpartikel, amino-funktionalisiert, 1 μ m	<i>ATG:biosynthetics GmbH</i> , Merzhausen, Deutschland
β -NAD, freie Säure	<i>Codexis</i> , Redwood City, CA, USA
β -NADH	<i>Codexis</i> , Redwood City, CA, USA
β -NADH	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG</i> , Karlsruhe, Deutschland
Nanodiamantpartikel, amino-funktionalisiert	<i>Anke Krüger</i> , Otto-Diels-Institut für Organische Chemie, Kiel, Deutschland
(<i>R</i>)-1-Phenylethanol	<i>Fluka Chemie GmbH</i> , Buchs, Schweiz
<i>rac</i> -1-Phenylethanol	<i>Sigma-Aldrich Corporation</i> , St. Louis, MO, USA
(<i>S</i>)-1-Phenylethanol	<i>Fluka Chemie GmbH</i> , Buchs, Schweiz
Polypropylenglycol MW 2000	<i>Acros Organics</i> , Geel, Belgien

Poraver®-Träger	<i>Dennert Poraver GmbH</i> , Schlüsselfeld, Deutschland
Protein Marker Precision Plus Protein dual color standard	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH</i> , München, Deutschland
Smektische Schichtsilikate	<i>Süd-Chemie AG</i> , München, Deutschland
Supelite™ DAX-8, 40-60 mesh Porengröße 225 Å	<i>Supelco</i> , Bellefonte, PA, USA
TRISOPERL®-Amino, 100- 200 µm, Porengröße 100.46 nm	<i>VitraBio GmbH</i> , Steinach, Deutschland
TRISOPERL®-Epoxy, 100- 200 µm, Porengröße 99.8 nm	<i>VitraBio GmbH</i> , Steinach, Deutschland
TRISOPOR®-Amino, 100- 200 µm, Porengröße 49.8 nm	<i>VitraBio GmbH</i> , Steinach, Deutschland

Lösungsmittel, Salze und andere Standardchemikalien wurden von *Carl Roth GmbH* (Karlsruhe, Deutschland), *Fluka Chemie AG* (Buchs, Schweiz), *Merck KGaA* (Darmstadt, Deutschland) oder *Sigma-Aldrich, Inc.* (Steinheim, Deutschland) bezogen.

9.2. Geräte

Autosampler - Probeninjektor 231 - Dilutor 401	<i>Gilson</i> , Villers-le-Bel, Frankreich
BioView	<i>Delta Light & Optics</i> , Lyngby, Dänemark
Brutschrank 2737	<i>Köttermann GmbH & Co KG</i> , Uetze / Hänigsen, Deutschland
ChemStation Software A.10.01	<i>Agilent Technologies GmbH</i> , Waldbronn, Deutschland
ChemStation Software B.01.01	<i>Agilent Technologies GmbH</i> , Waldbronn, Deutschland
Dampfsterilisator Varioklav Typ 500	<i>H+P Labortechnik GmbH</i> , München, Deutschland
Dampfsterilisator Varioklav Typ 250 T	<i>H+P Labortechnik GmbH</i> , München, Deutschland
Durchflussmesser EL Flow digital	<i>Bronkhorst Mättig GmbH</i> , Unna, Deutschland
Durchflussmesser Rotameter®	<i>Rota</i> , Oeflingen, Deutschland
Elektrophorese-Spannungsversorgung Phero-stab.500	<i>Biotec-Fischer GmbH</i> , Reiskirchen, Deutschland
Enzym-Membran-Reaktor	<i>Werkstätten des Forschungszentrums Jülich GmbH</i> , Jülich, Deutschland
Eppendorf-Mischer 5432	<i>Eppendorf Gerätebau Netheler + Hinz GmbH</i> , Oldenburg, Deutschland
Fasersonde IN350-T	<i>Bruker Optik GmbH</i> , Ettlingen, Deutschland
Fish-Clip®	<i>Bürkle</i> , Bad Bellingen, Deutschland
Fraktionssammler LKB Redi Frac	<i>Pharmacia / LKB</i> , Uppsala, Schweden

FT-IR-Spektrometer Vertex 70	<i>Bruker Optik GmbH</i> , Ettlingen, Deutschland
FT-NMR-Spektrometer ARX 300	<i>Bruker</i> , Billerica, MA, USA
FT-NMR-Spektrometer VXR-300	<i>Varian</i> , Palo Alto, CA, USA
Gaschromatograph Agilent 6890 Series	<i>Agilent Technologies GmbH</i> , Waldbronn, Deutschland
Gaschromatographie-Säulen:	<i>CS-Chromatographie Service GmbH</i> , Langerwehe, Deutschland
- Säulentyp FS-Cyclodex β – I/P, 50 m x 0.46 mm AD x 0.32 mm ID, Säulenummer CS 32368-1	
- Säulentyp FS-Cyclodex β – I/P, 50 m x 0.44 mm AD x 0.32 mm ID, Säulenummer CS 32411-1	
Gelelektrophoresekammer Horizon® 58	<i>Life Technologies, Inc.</i> , Gaithersburg, MD, USA
HPLC-Pumpe LKB 2248	<i>Pharmacia / LKB</i> , Uppsala, Schweden
HPLC-Pumpe LKB-Bromma 2150	<i>LKB</i> , Bromma, Schweden
Chirale HPLC-Säule: Daicel CHIRALCEL® OD-H	<i>Daicel Chemical Industries, Ltd.</i> , Osaka, Japan
HPLC-System	
- HPLC-Pumpe S 1100	<i>Sykam GmbH</i> , Eresing, Deutschland
- HPLC-Controller S 2000	
- Säulenthermoregler S 4010	
- Probennahmegerät Intelligent Sampler Jasco 851-AS	<i>Jasco GmbH</i> , Gross-Umstadt, Deutschland
-UV-Detektor UVIS 200	
Kolbenpumpe LKB P-500	<i>Linear Instruments</i> , San Jose, CA, USA
Kühlthermostat RC6	<i>Pharmacia / LKB</i> , Uppsala, Schweden
	<i>Lauda GmbH</i> , Lauda-Königshofen, Deutschland
Kühlthermostat RM20	<i>Lauda GmbH</i> , Lauda-Königshofen, Deutschland
Laborwaage PC 440	<i>Mettler GmbH</i> , Gießen, Deutschland
Magnetrührer RCT basic	<i>IKA GmbH</i> , Staufen, Deutschland
Matlab	<i>The Mathworks, Inc.</i> , Natick, MA, USA
Mikroplattenreader Power Wavex 340	<i>BioTek Instruments, Inc.</i> , Winooski, VT, USA
Mikrozahnringpumpe mrz-2900 mit Steuerungsmodul mrz-S05	<i>HNP Mikrosysteme GmbH</i> , Parchim, Deutschland
Ölpumpe TRIVAC	<i>Leybold</i> , Köln, Deutschland
Peristaltik-Pumpe Gilson Minipuls II	<i>ABIMED GmbH</i> , Düsseldorf, Deutschland
pH-Elektrode	<i>Metrohm</i> , Herisau, Schweiz
pH-Meter 692	<i>Metrohm</i> , Herisau, Schweiz
Pipetten Eppendorf Research	<i>Eppendorf AG</i> , Hamburg, Deutschland
Präzisionswaage CP224S	<i>Sartorius AG</i> , Göttingen, Deutschland
Rotationsverdampfer Büchi Rotavapor	<i>Büchi Labortechnik GmbH</i> , Flawil, Schweiz
Rundschüttler Certomat R	<i>VITARIS AG</i> , Baar, Deutschland
Sterilbank TC48	<i>Gelaire Flow Laboratories</i> , Opera, Italien
Spektralphotometer UVIKON _{XL}	<i>BioTek Instruments, Inc.</i> , Winooski, VT, USA

Spektralphotometer UVIKON 930
Überkopfschüttler

Ultrafiltrationsmembran 10 kDa, 100 kDa
Ultraschallbad Sonorex Super RK1028

Ultraschall-Desintegrator Sonifier II
W-250/W-450 „Classic“

Universalschüttler KL2

Vakuumpumpe Büchi Vac V-513

Vortexer Minishaker MS2

Wärmeschrank

Wasserbadschüttler Gyrotory

Wasserbadschüttler Aquatron

Zentrifuge Avanti J-25

Zentrifuge 5415 D

Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0 R

Kontron Instruments, Schlieren, Schweiz
GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH,
Burgwedel, Deutschland

Millipore Corporation, Billerica, MA, USA

Bandelin electronic, Berlin, Deutschland

Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA

Edmund Bühler GmbH, Hechingen,
Deutschland

Büchi Labortechnik GmbH, Flawil, Schweiz

IKA, Wilmington, NC, USA

Memmert, Schwabach, Deutschland

New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ,
USA

Infors HT, Bottmingen, Schweiz

Beckmann-Coulter, Fullerton, CA, USA

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

9.3. Synthese von Referenzverbindungen und Substraten²⁹

9.3.1. Synthese heteroaromatischer Alkohole

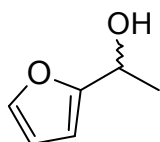
Allgemeine Arbeitsvorschrift

Das heteroaromatische Keton (20.5 mmol) wird in 20 mL Methanol gelöst. Natriumborhydrid (26.0 mmol, 1.27 eq., 0.99 g) wird vorsichtig unter Rühren und Eiskühlung hinzu gegeben. Das Gemisch wird für vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt, anschließend in 40 mL Wasser gegeben und mit Essigsäureethylester (3 x 30 mL) extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt.

9.3.1.1. *rac*-2-(1-Hydroxyethyl)furan

Das Produkt wird ausgehend von 2-Acetylfuran (20.5 mmol, 2.26 g) in Form eines hellgelben Öls erhalten.

[C₆H₈O₂, M = 112.13]

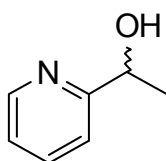


Ausbeute: 1.77 g (15.8 mmol, 77 %)
 Retentionszeiten (GC): 16.83 min (*rac*)
 17.19 min (*S*), 17.28 min (*R*), (derivatisiert³⁰)

9.3.1.2. *rac*-2-(1-Hydroxyethyl)pyridin

Das Produkt wird ausgehend von 2-Acetylpyridin (41.0 mmol, 4.97 g) nach Kristallisation bei -20 °C in Form weißer Kristalle erhalten.

[C₇H₉NO, M = 123.15]



Ausbeute: 3.16 g (25.7 mmol, 63 %)
 Retentionszeiten (GC): 16.26 min (*rac*)
 Retentionszeiten (HPLC³¹): 22.16 min (*R*), 25.28 min (*S*)

²⁹ Eine Aufzählung der verschiedenen GC- und HPLC-Methoden, sowie Beispielchromatogramme finden sich in Anhang A ab Seite 119.

³⁰ Eine Probe von *rac*-2-(1-Hydroxyethyl)pyridin in Essigsäureethylester (80 µL) wird mit Pyridin (16 µL) und Essigsäureanhydrid (16 µL) vermischt und für 16 Stunden inkubiert. Das Gemisch wird gaschromatographisch analysiert.

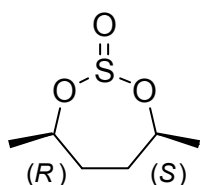
³¹ Bedingungen der Messung: Laufmittel Isohexan:2-Propanol (98:2), 10 °C, 0.75 mL min⁻¹, 254 nm.

9.3.2. Synthese von *meso*-2,5-Hexandiol

9.3.2.1. Cyclisches *meso*-Sulfit

Rac/meso-2,5-Hexandiol (50.5 mmol, 6.00 g) werden in wasserfreiem Chloroform (120 mL) gelöst. Unter ständigem Rühren wird langsam Thionylchlorid (53.3 mmol, 1.05 eq., 3.34 g, 3.89 mL) hinzugegeben. Das Gemisch wird anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt, wobei sich eine gelbliche Färbung einstellt. Um überschüssige Salzsäure und Schwefeldioxid zu entfernen, wird für 30 Minuten unter Rühren Luft in die Lösung geleitet (0.5 L min^{-1}). Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Diastereomere werden über Säulenchromatographie voneinander getrennt (Säule 20 x 1 cm, Laufmittel Pentan:Diethylether (10:1), Dünnschichtchromatographie: Anfärbung mit einem Gemisch aus Vanilin (0.5 g), konz. Schwefelsäure (5 mL) und Ethanol (40 mL)).

[$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_3\text{S}$, $M = 164.22$]

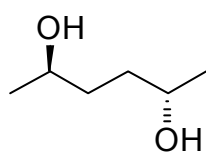


Ausbeute: 1.11 g (6.8 mmol, 27 %)
 R_f -Werte: 0.16 (*meso*)
 0.11 (*rac*)

9.3.2.2. *meso*-2,5-Hexandiol

Das Sulfit (1.11 g, 6.8 mmol) wird für eine Stunde in 2 M Natriumhydroxidlösung (26 mL) unter Rückfluss erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Lösung wird mit Natriumchlorid gesättigt und mit Essigsäureethylester (5 x 20 mL) ausgeschüttelt. Die Produktlösung wird im Vakuum eingeeengt. Das Produkt wird nach Kristallisation bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ weiß, kristallin erhalten.

[$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_2$, $M = 118.17$]



Ausbeute: 0.81 g (6.8 mmol, 27 %)
 Retentionszeit (GC): 14.86 min
 $^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, d_6 -Aceton, 298 K):
 $\delta = 3.70$ (m, 2H, 2-H), 3.55 (br s, 1H, OH), 1.51, 1.42 (je m, je 2H, 3-H), 1.09 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.2 \text{ Hz}$, 6H, 1-H).
 $^{13}\text{C-NMR}$ (400.1 MHz, d_6 -Aceton, 298 K):
 $\delta = 67.8$ (C-2), 36.5 (C-3), 24.1 (C-1).

Vergleich *rac/meso*-2,5-Hexandiol:

$^1\text{H-NMR}$ (400.1 MHz, d_6 -Aceton, 298 K):
 $\delta = 3.69$ (m, 2H, 2-H), 3.56 (br s, 1H, OH), 1.56-1.38 (m, 4H, 3-H),
 1.10 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.2 \text{ Hz}$, 6H, 1-H).
 $^{13}\text{C-NMR}$ (400.1 MHz, d_6 -Aceton, 298 K):
 $\delta = 67.8, 67.8$ (C-2), 36.7, 36.5 (C-3), 24.2, 24.1 (C-1).

9.4. Partielle Reinigung und Charakterisierung der Alkohol Dehydrogenase

9.4.1. Zellaufschluss und partielle Reinigung

Typische Arbeitsvorschrift

Gefriergetrocknete *E. coli* Tuner (DE3)/pET22b+-ADH-'A'-Zellen, bereitgestellt von Prof. Dr. Wolfgang Kroutil (Institut für Chemie, Graz, Österreich) werden in Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 100 mM) oder in Tris-HCl-Puffer (pH 7.5, 50 mM) für 40 Minuten bei 130 rpm und 30 °C suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgt bei 4 °C durch Ultraschallbehandlung (3 x 3 min, Duty Cycle 50 %, Output 5, 18 mm Spitze). Die aufgeschlossenen Zellen werden bei 10000 rpm ($17.7 \cdot 10^3$ rcf) und 4 °C für 35 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird nach der Zentrifugation bei 130 rpm und 65 °C für 25 Minuten inkubiert. Thermisch ausgefällte Fremdbestandteile werden erneut bei 10000 rpm ($17.7 \cdot 10^3$ rcf) und 4 °C für 45 Minuten zentrifugiert. Die auf diese Weise erhaltene partiell gereinigte Enzymlösung wird in 5-50 mL Aliquots bei -20 °C gelagert.

9.4.2. Proteingehaltsbestimmung nach Bradford

Für die Proteingehaltsbestimmung nach Bradford [Bradford 1976] wird eine *Bio-Rad* Protein Assay-Lösung verwendet. Die Assays werden sowohl im Mikrotiterplattenmaßstab als auch im Millilitermaßstab ausgeführt. Im Mikroplattenreader bzw. im Spektralphotometer wird der gebildete Coomassie® Brilliant Blue G-250 Farbstoff-Protein-Komplex bei 595 nm vermessen.

Mikrotiterplattenmaßstab (linearer Absorptionsbereich 0.01 mg mL^{-1} - 0.1 mg mL^{-1})

Die partiell gereinigte Enzymlösung in Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 100 mM) wird entsprechend der Bestimmungsgrenzen mehrfach verdünnt. 50 µL der jeweiligen Verdünnungsstufen werden mit 200 µL einer mit Wasser verdünnten (1:5) *Bio-Rad* Protein Assay-Lösung mit Hilfe einer Multipipette vermischt. Parallel werden bekannte Konzentrationen von BSA in Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 100 mM) auf derselben Mikrotiterplatte vermessen. Die Inkubationszeit beträgt 10 min.

Millilitermaßstab (linearer Absorptionsbereich 0.4 mg mL^{-1} - 1.8 mg mL^{-1})

Im Millilitermaßstab werden 50 µL der entsprechend verdünnten Lösungen von BSA bzw. der partiell gereinigten Enzymlösung mit 950 µL einer mit Wasser verdünnten (1:5) *Bio-Rad* Protein Assay-Lösung vermengt. Nach einer Inkubationszeit von 3 Minuten wird der gebildete Farbstoff-Protein-Komplex im Spektralphotometer bei 595 nm und 30 °C vermessen.

9.4.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine in der partiell gereinigten Enzymlösung wird mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach *Laemmli* durchgeführt [Laemmli 1970]. Als Marker wird ein *Precision Plus Protein dual color standard* Marker der Firma *Bio-Rad* verwendet.

9.4.4. Standardaktivitätsassays

9.4.4.1. Photometrischer Assay

Substrat, Cosubstrat, Cofaktor und gegebenenfalls Produkt bzw. Cofaktorprodukt werden in Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 100 mM) gelöst und vermischt. Das Gesamtvolumen des Assays beträgt in allen Fällen 1 mL. Die Reaktion wird durch Zugabe von $4.4 \cdot 10^{-2}$ U ADH-'A' in 10 μ L Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 100 mM) gestartet. Die NADH-Bildung bzw. der NADH-Verbrauch wird bei 340 nm und 30 °C spektralphotometrisch für eine Minute verfolgt. Aus der Absorptionsänderung und dem molaren Extinktionskoeffizienten für NADH ($\epsilon = 6.22 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kann mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes die Aktivität berechnet werden.

Die Konzentrationsbereiche bzw. die Standardkonzentrationen der verschiedenen Komponenten in den Aktivitätsassays für die kinetischen Untersuchungen sind der folgenden Tabelle zu entnehmen (Tabelle 9.1).

Tabelle 9.1: Konzentrationen der einzelnen Komponenten in den Aktivitätstests.

Komponente	Konzentrationsbereich (Standardkonzentration) [mM]			
	Reaktion I	Reaktion II	Reaktion III	Reaktion IV
Acetophenon	0.05-35 (5)	0.05-15 (-)	0.1-7 (-)	0.05-8 (-)
Phenylethanol	2.5-65 (-)	0.5-70 (-)	0.05-80 (10)	0.01-80 (-)
NADH	0.001-0.35 (0.1)	0.001-0.3 (-)	0.001-0.35 (-)	0.005-1 (0.2)
NAD ⁺	0.005-1 (-)	0.005-1.5 (0.1)	0.001-3.5 (0.1)	0.001-0.5 (-)
2-Propanol	1-3000 (-)	1-3000 (500)	1-3000 (-)	1-3000 (-)
Aceton	1-200 (-)	1-200 (-)	1-200 (-)	1-200 (100)

9.4.4.2. Batch-Assay

Partiell gereinigte Enzymlösung in Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 100 mM) wird mit NADH (1 mM) versetzt. Die Reaktion wird durch Zugabe einer Mischung aus 2-Propanol (18 % v⁻¹) und Acetophenon (80 mM) gestartet. Die Durchmischung erfolgt mit Hilfe eines Fish-Clip®-Rührers oder durch Schütteln bei 130 rpm und 30 °C. Nach bestimmten Zeitintervallen werden dem Reaktionsgemisch Proben von 50-100 μ L entnommen. Jede Probe wird zweifach mit Essigsäureethylester (100 μ L) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden gaschromatographisch untersucht.

Umsetzungen mit gefriergetrockneten *E. coli* Tuner (DE3)/pET22b+-ADH-'A'-Zellen werden wie in der oben genannten Vorschrift ausgeführt. Vor der Zugabe des Cofaktors werden die Zellen für 30 Minuten bei 130 rpm und 30 °C in Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 100 mM) suspendiert.

9.5. Immobilisierung der ADH-'A'

9.5.1. Amino-funktionalisierte Träger

Typische Arbeitsvorschrift

TRISOPERL®-Amino-Partikel (Partikelgröße 100-200 µm, Porengröße 100.46 nm, 200 mg) werden in Glutardialdehyd-Lösung (2.5 %ig, 5 mL) in Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 100 mM) suspendiert. Die Aktivierung der Träger erfolgt im Vakuum (60 mbar) unter Rotation bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Es wird bei Normaldruck (1013 mbar) weitere 50 min bei Raumtemperatur rotiert. Im Verlauf der Aktivierung färbt sich der zuvor weiße TRISOPERL®-Träger tief-rot. Das aktivierte Trägermaterial wird über einer Glasfritte von der Lösung getrennt und mit Wasser (200 mL) gewaschen. Anschließend werden die Partikel für 4 Stunden im Trockenschrank bei 65 °C getrocknet.

Der aktivierte Träger wird in partiell gereinigte Enzymlösung (10 mL, 4 °C) suspendiert. Die Immobilisierung erfolgt die ersten 35 Minuten bei 4 °C im Vakuum (60 mbar) und anschließend bei 4 °C unter Normaldruck (1013 mbar) für 15 Stunden (150 rpm).

Die Träger werden filtriert und mit Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 100 mM, 5 x 10 mL, 4 °C) gewaschen. Die immobilisierten Träger werden anschließend bei 4 °C für 3 Stunden bei 150 rpm mit Glycin-Puffer (pH 7.5, 0.1 M, 10 mL) vermischt. Das immobilisierte Trägermaterial wird filtriert und mit Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 100 mM, 5 x 10 mL, 4 °C) gewaschen. Die Aktivität des Immobilisats, des Überstandes nach der Immobilisierung und der Waschlösung werden im Weiteren getestet. Alle Aktivitäten werden nach dem Standardaktivitätsassay (Abschnitt 9.4.4) mit dem Substrat Acetophenon in einem Gesamtvolumen von 10 mL bestimmt. Für die Aktivitätsbestimmung des Immobilisats wird die gesamte Trägermenge eingesetzt.

Für die wiederholten Satzreaktorversuche werden die Träger durch Filtration von der Reaktionslösung getrennt und mit Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 100 mM, 2 x 10 mL) gewaschen. Die immobilisierten Träger werden anschließend erneut mit frischer Reaktionslösung versetzt.

Die Vorschrift wird ebenfalls bei den Trägern TRISOPOR®-Amino angewandt.

Tabelle 9.2: Bedingungen der Immobilisierung der ADH-'A' auf amino-funktionalisierte Träger.

Partikel	Durchmesser [µm]	Porengröße [nm]	Enzymbeladung [U]	Partikelmenge [mg]	Volumen [mL]
TRISOPERL®	100-200	100.46	26.3	200	10
		40.0	36.9	200	10
TRISOPOR®	100-200	49.8	26.3	200	10
			53.2	400	20
			94.6	400	20 (CSTR)
			136.2	400	20
			87.8	400	20 (Toluol)
Magnetträger	1	-	2.0	14	1.05
			2.9	20	1.05
			6.0	20	10 (CSTR)
Nanodiamantpartikel	0.55	-	n.b.	10	1.025
			n.b.	10	1.025
			28.7	20	10 (CSTR)
			3.8.	20	10 (CSTR)

Die Immobilisierung der ADH-'A' auf amino-funktionalisierte Magnetträger (1 µm) und Nanodiamantpartikel (550 nm) erfolgt analog. Da diese Enzymträger eine nicht poröse Erscheinung aufweisen, werden die Vakuumaktivierung und der Trocknungsschritt ausgelassen.

Die Durchmischung erfolgt in Eppendorf-Gefäßen in einem Überkopfschüttler. Die Abtrennung der Partikel für die verschiedenen Inkubationsschritte und Probenentnahme erfolgt über Zentrifugation (10000-13000 rpm ($9.3 \cdot 10^3$ - $15.7 \cdot 10^3$ rcf), 20-60 Sekunden).

Zudem wird für einige Immobilisierungsexperimente zur weiteren Vernetzung der Enzyme eine zusätzliche Inkubation mit Glutardialdehyd-Lösung (0.2 %ig) durchgeführt.

9.5.1.1. Poraver®-Glaspartikel

Poröse Glaspartikel (Partikelgröße 200-700 µm, 100 g) der Firma *Dennert Poraver GmbH* werden zunächst nach ihrer Dichte aufgetrennt. Dazu werden die Träger in Wasser suspendiert und die Fraktion der Partikel mit geringerer Dichte von der Wasseroberfläche abgetrennt. Um Rückstände aus dem Fertigungsprozess zu entfernen, werden die Glaspartikel zunächst gereinigt. Die Partikel mit höherer Dichte werden für 30 Minuten in einer Methanol / Salzsäure-Mischung (1:1, 400 mL) inkubiert. Über einer Glasfritte werden die Träger mit viel Wasser neutral gewaschen und anschließend für 30 Minuten mit konzentrierter Schwefelsäure behandelt. Die Partikel werden auf Eiswasser (600 mL) gegeben und erneut mit viel Wasser neutral gewaschen. Die Funktionalisierung der Träger erfolgt bei Raumtemperatur durch Inkubation mit einer Aminopropyltriethoxysilan-Lösung in Toluol (5 %ig, 200 mL) für 16 Stunden bei 190 rpm. Das funktionalisierte Trägermaterial wird zunächst mit Ethanol (2 x 350 mL) und anschließend mit Wasser (2 x 500 mL) gewaschen.

Die amino-funktionalisierten *Poraver*[®]-Partikel werden durch eine 2-stündige Behandlung mit Glutardialdehydlösung (7.5 %ig, 200 mL) aktiviert [Shriver-Lake 2002]. Nach einem weiteren Waschschrift mit Wasser werden die Träger in Ethanol bei 4 °C gelagert.

Aktiviert, und erneut gewaschene Träger (300 mg_{FM}) werden mit in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7.5, 1 mL) rehydratisierten *E. coli* Tuner (DE3)/pET22b+-ADH-'A'-Zellen (16 mg) für 16 Stunden bei 4 °C und 250 rpm inkubiert. Um nicht immobilisierte Zellen vom Immobilisat zu entfernen, wird dieses filtriert und mit gekühltem Wasser (5 x 1 mL) gewaschen.

Alle Aktivitäten werden nach dem Standardaktivitätsassay (Abschnitt 9.4.4) in einem Gesamtvolumen von 1 mL bestimmt.

9.5.2. Epoxy-funktionalisierte Träger

9.5.2.1. TRISOPERL[®]-Epoxy-Partikel

TRISOPERL[®]-Epoxy-Partikel (250 mg, Durchmesser 100-200 µm, Porengröße 95-105 nm) werden in partiell gereinigte Enzymlösung (Kaliumphosphatpuffer 500 mM, pH 7, 23.4 U, 10 mL) suspendiert und bei Raumtemperatur für 24 Stunden inkubiert. Die zuvor weißen Träger färben sich im Verlauf der Immobilisierung hellblau. Das Immobilisat wird anschließend über eine Glasfritte von der Lösung getrennt und mit Kaliumphosphatpuffer (500 mM, pH 7, 10 mL) gewaschen. Zur Stabilisierung der Bindung werden die immobilisierten Träger weitere 120 Stunden bei Raumtemperatur und 200 rpm in Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 9, 10 mL) inkubiert. Im Anschluss werden die abfiltrierten Träger mit Glycinpuffer (gesättigte Lösung, pH 8.5, 10 mL) versetzt und für 22 Stunden bei 200 rpm bei Raumtemperatur inkubiert.

Es werden alle Überstände der verschiedenen Inkubationsschritte und die Träger selbst auf ihre Aktivität hin überprüft. Alle Aktivitäten werden nach dem Standardaktivitätsassay (Abschnitt 9.4.4) mit dem Substrat Acetophenon in einem Gesamtvolumen von 10 mL bestimmt.

Vor Einsatz des Trägermaterials im Aktivitätsassay werden die Partikel mit Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7, 2 x 10 mL) gewaschen.

Die Immobilisierung mit TRISOPERL[®]-Epoxy-Partikeln wurde ebenfalls in Puffer mit geringerer Ionenstärke analog durchgeführt (Kaliumphosphatpuffer 100 mM, pH 7, 26.3 U, 10 mL, 250 mg Träger).

9.5.3. Adsorptive Immobilisierung

9.5.3.1. Adsorptionsverhalten von Amberlite XAD-7HP gegenüber der ADH-'A' in einem Festbett

Amberlite[®] XAD-7HP wird zweifach mit Wasser gewaschen. Die gewaschenen Partikel werden mit Kaliumphosphatpuffer (pH 7.0, 100 mM) / 2-Propanol (18 % v⁻¹) in eine *Pharmacia* Kunststoff-Säule (Füllhöhe 105 x 16 mm, 12.7 g_{FM}) eingeschlämmt. Partiiell gereinigte Enzymlösung (172.4 U, 40 mL) in Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 100 mM) wird für 6.5 h unter Umlaufbedingungen (1 mL min⁻¹) mit Hilfe einer Zahnradpumpe durch das Bett gepumpt. Die partiiell gereinigte Enzymlösung wird in regelmäßigen Zeitabständen auf Aktivität nach dem Standardaktivitätsassay (Abschnitt 9.4.4) untersucht.

Die Partikel werden nach 6.5 h Umlaufzeit mit Wasser aus der *Pharmacia*-Säule geschlämmt und mit Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7, 250 mL) gewaschen. Sowohl die Partikel (2 g) als auch die Waschlösung werden auf Aktivität nach dem Standardaktivitätsassay (Abschnitt 9.4.4) überprüft.

9.5.3.2. *Adsorptions- und Desorptionsverhalten von Amberlite XAD-7HP gegenüber der ADH-'A' in wiederholten Satzreaktorversuchen*

Amberlite® XAD-7HP (Partikelgröße 20-60 mesh, 3 g) werden bei Raumtemperatur mit partiell gereinigter Enzymlösung (Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0, 100 mM, 44.8 U bzw. 32.4 U, 10 mL) für 45 min bei 130 rpm inkubiert. Sowohl die Partikel als auch die überstehende Lösung werden auf Aktivität nach dem Standardaktivitätsassay (Abschnitt 9.4.4) überprüft.

Für wiederholte Satzreaktorversuche (2 x) werden die Träger durch Filtration von der Reaktionslösung getrennt und für 20 Minuten unter Schütteln bei 130 rpm mit 2-Propanol bzw. mit 2-Propanol 50 % v v⁻¹ in Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 100 mM) behandelt, um adsorbierte Reaktionskomponenten zu desorbieren. Nach Abtrennung der 2-Propanol-Phase werden die immobilisierten Träger erneut mit frischer Reaktionslösung versetzt.

9.6. Adsorptive *in-situ* Produktabtrennung

9.6.1. Amberlite® XAD-2, XAD-4, XAD-7HP, Supelite™ DAX-8

9.6.1.1. *Adsorptionsverhalten gegenüber Acetophenon, rac-1-Phenylethanol, Aceton und 2-Propanol*

Amberlite® XAD-2, XAD-4, XAD-7HP bzw. Supelite™ DAX-8 werden jeweils mit Methanol (40 mL) und anschließend mit Wasser (2 x 100 mL) gewaschen. Die gewaschenen Träger werden in Aliquots (100-400 mg) zu einer Lösung (20 mL) aus Acetophenon (80 mM), *rac*-1-Phenylethanol (80 mM) bzw. Aceton (80 mM) in Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 100 mM), 2-Propanol (18 % v v⁻¹) gegeben. Die Gesamtzugabemenge an Trägern beträgt für jeden Ansatz 3.2 g. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur inkubiert (170 rpm). Nach jeder Aliquotzugabe wird für 5 Minuten inkubiert und dem Überstand eine Probe (100 µL) entnommen. Jede Probe wird zweifach mit Essigsäureethylester (100 µL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden gaschromatographisch untersucht.

9.6.1.2. *Adsorptionsverhalten gegenüber Acetophenon, rac-1-Phenylethanol in einem XAD-7HP Festbett*

Amberlite® XAD-7HP wird zweifach mit Wasser gewaschen. Die gewaschenen Partikel werden mit Kaliumphosphatpuffer (pH 7.0, 100 mM) / 2-Propanol (18 % v v⁻¹) in eine *Pharmacia* Kunststoff-Säule (Füllhöhe 105 x 16 mm, 12.7 g_{FVM}) eingeschlämmt. Eine Lösung (100 mL) aus Acetophenon (40 mM) und *rac*-1-Phenylethanol (40 mM) in Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 100 mM), 2-Propanol (18 % v v⁻¹) wird unter Umlaufbedingungen (1 mL min⁻¹) mit Hilfe einer Zahnradschleuse

durch das Bett gepumpt. Der Lösung im Vorlagebehälter werden nach bestimmten Zeitintervallen Proben (100 μL) entnommen. Jede Probe wird zweifach mit Essigsäureethylester (100 μL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden gaschromatographisch untersucht.

9.6.1.3. *Desorption von Acetophenon und rac-1-Phenylethanol von Amberlite® XAD-7HP-Partikeln*

Amberlite® XAD-7HP (5 g) werden zweifach mit Wasser (30 mL) gewaschen. Die gewaschenen Träger werden mit einer Lösung (20 mL) aus Acetophenon (40 mM) und *rac*-1-Phenylethanol (40 mM) in Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 100 mM), 2-Propanol (18 % v v⁻¹) inkubiert (105 min, 260 rpm). Der Überstand wird von den Partikeln getrennt und gaschromatographisch untersucht. Die Partikel werden anschließend mit den verschiedenen Lösungsmitteln extrahiert (3 x 20 mL). Die einzelnen Extrakte werden ebenfalls gaschromatographisch untersucht. Verwendete Lösungsmittel: Aceton, Essigsäureethylester, 2-Propanol, 2-Propanol (65 % v v⁻¹) in Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 100 mM) und 2-Propanol (50 % v v⁻¹) in Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 100 mM).

9.6.1.4. *Adsorptionsverhalten gegenüber 2-Acetylfuran und rac-2-(1-Hydroxyethyl)furan*

Amberlite® XAD-2, XAD-4 und XAD-7HP (je 3 g) werden jeweils mit Wasser (2 x 40 mL) und anschließend mit Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 50 mM) / 2-Propanol (18 % v v⁻¹) (40 mL) gewaschen. Die gewaschenen Träger werden zu einer Lösung (20 mL) aus 2-Acetylfuran (40 mM) und *rac*-2-(1-Hydroxyethyl)furan (40 mM) in Kaliumphosphatpuffer (pH 7.5, 50 mM), 2-Propanol (18 % v v⁻¹) gegeben. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur inkubiert (19.5 h, 230 rpm). Nach bestimmten Zeitintervallen werden dem Überstand Proben (100 μL) entnommen. Jede Probe wird zweifach mit Essigsäureethylester (100 μL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden gaschromatographisch untersucht.

9.6.1.5. *Adsorptionsverhalten gegenüber NADH*

Amberlite® XAD-2, XAD-4, XAD-7HP bzw. Supelite™ DAX-8 werden jeweils mit Methanol (40 mL) und anschließend mit Wasser (2 x 100 mL) gewaschen. Die gewaschenen Träger (3 g) werden in Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 100 mM, 1 mM NADH) bzw. in einem Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 100 mM, 1 mM NADH) / 2-Propanol-Gemisch (18 % v v⁻¹) (20 mL) inkubiert (Raumtemperatur, 170 rpm). Nach bestimmten Zeitintervallen werden dem Überstand Proben (100 μL) entnommen. Die Proben werden mit Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 100 mM) bzw. mit einem Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 100 mM) / 2-Propanol (18 % v v⁻¹)-Gemisch verdünnt (1:10) und spektrophotometrisch bei 340 nm vermessen.

9.6.2. Disintex™ 75

Der Träger Disintex™ 75 (1 g) wird für 30 Minuten mit Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 100 mM, 20 mL) bei Raumtemperatur equilibriert. Die Mischung wird anschließend für 10 Minuten bei $6.0 \cdot 10^3$ rcf und 10 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Träger werden mit einer Mischung aus Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 100 mM), 2-Propanol (18 % v v⁻¹), Acetophenon (40 mM) und *rac*-1-Phenylethanol (40 mM) versetzt (20 mL). Die Suspension wird für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wird für 10 min bei $6.0 \cdot 10^3$ rcf und 10 °C zentrifugiert. Dem Überstand wird eine Probe (100 µL) entnommen, zweifach mit Essigsäureethylester (100 µL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden gaschromatographisch untersucht.

Die abzentrifugierten Träger werden mit 2-Propanol (20 mL) bzw. Essigsäureethylester (20 mL) extrahiert und die 2-Propanol- bzw. Essigsäureethylesterphase werden ebenfalls gaschromatographisch untersucht. Der Überstand wird erneut auf frisch equilibrierte Träger (1 g) gegeben und der gesamte Ablauf vierfach wiederholt

9.6.3. Smektische Schichtsilikate

Typische Arbeitsvorschrift

Der Träger EX M 1607 der Firma *Süd-Chemie AG* (500 mg) wird für 30 Minuten in Kaliumphosphatpuffer (pH 7.5, 50 mM, 20 mL) bei Raumtemperatur equilibriert. Die Mischung wird anschließend für 15 Minuten bei $6.0 \cdot 10^3$ rcf und 10 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Träger werden mit einer Mischung aus Kaliumphosphatpuffer (pH 7.5, 50 mM), 2-Propanol (18 % v v⁻¹), 2,5-Hexandion (50 mM) und *rac/meso*-2,5-Hexandiol (50 mM) versetzt (20 mL). Die Suspension wird für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wird für 2 Minuten bei $6.0 \cdot 10^3$ rcf und 10 °C zentrifugiert. Dem Überstand wird eine Probe (100 µL) entnommen, zweifach mit Essigsäureethylester (100 µL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden gaschromatographisch untersucht.

Die abzentrifugierten Träger werden mit Essigsäureethylester (20 mL) extrahiert und die Essigsäureethylesterphase wird ebenfalls gaschromatographisch untersucht. Der Überstand wird erneut auf frisch equilibrierte Träger (500 mg) gegeben und der gesamte Ablauf dreifach wiederholt.

Die Träger EX M 1753, EX M 1833 und EX M 1878 werden analog getestet. Bei den Trägern EX M 1753 und EX M 1878 wird 2 Minuten bei $2.5 \cdot 10^3$ rcf und 10 °C zentrifugiert, da das bei höheren Umdrehungen entstehende Partikelpellet zu fest ist und sich nicht mehr suspendieren lässt.

9.6.4. γ -Aluminiumoxid und Alumosilicat

Die Träger EX M 1985 (Alumosilicat mit 60 % w w⁻¹ Al₂O₃ und 40 % w w⁻¹ SiO₂) und EX M 1986 (γ -Aluminiumoxid) werden sowohl mit dem System Acetophenon / *rac*-1-Phenylethanol als auch mit dem System 2,5-Hexandion / *rac/meso*-2,5-Hexandiol getestet. 500 mg des entsprechenden Trägers werden mit einer Acetophenon (50 mM) / *rac*-1-Phenylethanol (50 mM)-Lösung in Essig-

säureethylester (15 mL) bzw. einer 2,5-Hexandion (50 mM) / *rac*/meso-2,5-Hexandiol (50 mM)-Lösung in Essigsäureethylester (15 mL) inkubiert (Raumtemperatur, 150 rpm). Nach 30 Minuten wird eine Probe entnommen. Die Probe wird bei 13000 rpm ($15.7 \cdot 10^3$ rcf) für 1.5 Minuten zentrifugiert und der Überstand gaschromatographisch untersucht. Anschließend wird dem Gemisch weiteres Trägermaterial (500 mg) beigemischt. Nach weiteren 30 Minuten Inkubationszeit wird erneut eine Probe entnommen. Die Probenaufarbeitung erfolgt analog. Der Zyklus wird ein weiteres Mal wiederholt. Die Gesamtzugabemenge an Träger beträgt in jedem Versuch 1.5 g.

9.7. Stabilität von NADH

Die Stabilität von NADH (1 mM) in Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7) wird bei verschiedenen Temperaturen (4 °C, 15 °C, 30 °C) untersucht. Für die Probenmessung wird eine Probe (100 µL) der unterschiedlichen NADH-Lösungen mit Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7, 900 µL) verdünnt und spektralphotometrisch bei 340 nm vermessen.

9.8. Umsetzungen im Satzreaktor

Allgemeine Arbeitsvorschrift

Satzreaktorversuche mit partiell gereinigter Enzymlösung bzw. mit gefriergetrockneten *E. coli* Tuner (DE3)/pET22b+-ADH-'A'-Zellen werden entsprechend der in Abschnitt 9.4.4.2 beschriebenen Vorschrift ausgeführt. Bei einigen Substraten wird die Reduktionsrichtung betrachtet und bei anderen die Oxidationsrichtung. Bei der Oxidation von Substraten wird mit Aceton als Cosubstrat und NAD^+ als Cofaktor gearbeitet.

Im Speziellen wird die Reduktion der Substrate 2-Acetylfuran und 2-Acetylpyridin sowie die Oxidation der Substrate *meso*-2,5-Hexandiol und (*S*)-1-Phenylethanol betrachtet.

9.8.1. Satzreaktorversuche mit *in-situ* Coproduktabtrennung

Satzreaktorversuche mit partiell gereinigter Enzymlösung bzw. mit gefriergetrockneten *E. coli* Tuner (DE3)/pET22b+-ADH-'A'-Zellen werden entsprechend der in Abschnitt 9.4.4.2 beschriebenen Vorschrift ausgeführt. Zusätzlich wird für die *in-situ* Abtrennung des Coproduktes über eine poröse Glasfritte (D4) die Reaktionslösung direkt mit Druckluft begast (Luftstrom 500 mL min^{-1}). Um den Verlust an 2-Propanol und Wasser durch das Ausgasen möglichst gering zu halten, wird die einzuleitende Luft zuvor mit diesen beiden Komponenten vorgesättigt. Dies erfolgt durch Einleitung der Luft in ein 1:1 Gemisch von Wasser und 2-Propanol in einer Gaswaschflasche. Zur Verminderung der Schaumbildung wird Polypropylenglycol (0.1 % v v⁻¹) dem Reaktionsgemisch beigemischt.

Weiterhin wird die Reduktion von 2-Acetylfuran bzw. 2-Acetylpyridin und die Oxidation des Substrates *meso*-2,5-Hexandiol betrachtet.

Bei Betrachtung der Oxidationsrichtung (vergleiche Abschnitt 9.8) erfolgt die Vorsättigung der Luft mit einem Aceton / Wasser-Gemisch, als Cofaktor dient NAD^+ und als Cosubstrat Aceton.

Für Versuche mit immobilisiertem Enzym werden TRISOPOR®-Amino-Glasträger (Partikelgröße 100-200 μm , Porengröße 49.8 nm, 400 mg) mit partiell gereinigter Enzymlösung (53.2 U, 16.22 mL bzw. 136.2 U, 20 mL) nach dem Standardimmobilisierungsprotokoll (Abschnitt 9.5.1) immobilisiert. Der Einsatz von immobilisierter ADH-'A' erfordert keine zusätzliche Beimischung von Polypropylenglycol.

9.8.2. Satzreaktorversuche mit integrierter *online* Analytik

9.8.2.1. Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Umsetzung von Acetophenon / 2-Acetylfuran mit partiell gereinigter Enzymlösung

Deuteriertes Wasser und Acetophenon (100 mM), vorgelöst in 2-Propanol (10 % v v⁻¹) werden vermischt. Das Gesamtvolumen (800 μL) enthält 1 mM NADH. Die Reaktion wird durch Zugabe partiell gereinigter Enzymlösung (5 μL , 0.2 U) gestartet. Vor Einbringen des NMR-Röhrchens in das NMR-Spektrometer wird die Probe zur besseren Durchmischung kurz geschüttelt. Der Verlauf der Reaktion wird *online* im Spektrometer verfolgt. Mit Hilfe der Makrosprache MAGICAL (Varian) wird die automatisierte Aufnahme von Spektren nach definierten Zeitabständen realisiert. Das Messintervall variiert zwischen 1-60 Minuten.

Die Umsetzung von 2-Acetylfuran erfolgt analog.

Umsetzung von 2-Acetylfuran mit E. coli Tuner (DE3)/pET22b+-ADH-'A'-Zellen

Gefriergetrocknete *E. coli* Tuner (DE3)/pET22b+-ADH-'A'-Zellen (7 mg, 1.2 U mg⁻¹) werden in deuteriertem Wasser (720 μL) rehydratisiert (30 Minuten, 30 °C, 130 rpm). Das Gesamtvolumen (800 μL) enthält 1 mM NADH. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2-Acetylfuran (9.8 mg, 0.09 mmol, 110 mM), vorgelöst in 2-Propanol (10 % v v⁻¹) gestartet. Die weitere Ausführung des Experiments wird analog der oben beschriebenen Vorschrift ausgeführt. Das Messintervall variiert zwischen 1-30 Minuten.

9.8.2.2. Infrarot-Spektroskopie (FTIR)

Wässriges Medium

Partiell gereinigte Enzymlösung (3.6 U mL⁻¹ bzw. 4.4 U mL⁻¹, 20 mL) wird mit Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7, 20.03 mL) und einer Mischung aus 2-Propanol und Acetophenon (Endkonzentrationen: 18 % v v⁻¹ Cosubstrat, 80 mM Substrat) vermischt. Die Umsetzung wird durch Zugabe des Cofaktors NADH in Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7, 0.5 mL, NADH Endkonzentration: 0.2 mM) gestartet. Das Gesamtvolumen der Reaktion beträgt 50 mL. Die Durchmischung erfolgt mit Hilfe eines Magnetrührstäbchens bei 30 °C. Der Verlauf der Reaktion wird *online* über eine FTIR-Fasersonde beobachtet. Zusätzlich werden dem Gemisch Proben für *offline* Messungen (Gaschromatographie) in verschiedenen Zeitabständen entnommen. Die Probenaufarbeitung wird gemäß Abschnitt 9.4.4.2 durchgeführt.

Organisches Medium

Gefriergetrocknete *E. coli* Tuner (DE3)/pET22b+-ADH-'A'-Zellen (400 mg, 1.2 U mg^{-1}) werden mit Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7, 200 μL , 100 mM NADH) vermischt. Die Reaktionsmischung wird mit 2-Propanol (10 % v v⁻¹) und mit Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7) gesättigtem Toluol auf ein Endvolumen von 20 mL aufgefüllt. Die Umsetzung wird durch Zugabe von Acetophenon (1 M oder 274 mM) gestartet. Die Durchmischung erfolgt mit Hilfe eines Fish-Clip®-Rührers bzw. eines Magnetrührstäbchens bei 30 °C. Der Verlauf der Reaktion wird *online* über eine FTIR-Fasersonde beobachtet. Zusätzlich werden dem Gemisch Proben für *offline* Messungen in verschiedenen Zeitabständen entnommen. Für die Probenaufarbeitung wird die Probe (50 μL) zunächst mit Toluol (250 μL) verdünnt. Nach Abtrennung der Zellen durch Zentrifugation bei 13000 rpm ($15.7 \cdot 10^3 \text{ rcf}$, 2 min) wird der Überstand gaschromatographisch untersucht.

9.8.2.3. 2D Fluoreszenz-Spektroskopie

Satzreaktorversuche mit partiell gereinigter Enzymlösung bzw. mit gefriergetrockneten *E. coli* Tuner (DE3)/pET22b+-ADH-'A'-Zellen werden in einem geschlossenen Stahlreaktor durchgeführt. Die Experimente werden entsprechend der in Abschnitt 9.4.4.2 beschriebenen Vorschrift ausgeführt, wobei die Konzentration an Cofaktor variiert wird (NADH oder NAD⁺, 0-1 mM). Ebenso wird die Zell- und Enzymmenge in veränderlichen Mengen eingesetzt. Während der Reaktion werden *online* kontinuierlich 2D Fluoreszenzspektren mit dem BioView®-Gerät über einen Lichtwellenleiter aufgenommen. Dieser ist durch eine Quarzscheibe direkt mit dem Reaktor verbunden. Zusätzlich werden dem Reaktionsgemisch Proben für *offline* Messungen in verschiedenen Zeitabständen entnommen. Die Probenaufarbeitung wird gemäß Abschnitt 9.4.4.2 durchgeführt. Die Entnahme der Proben für die *offline* Messungen kann nur in der Zeit erfolgen, in der gerade keine 2D Fluoreszenzspektren aufgenommen werden, da das einfallende Licht bei der Probenentnahme eine Veränderung der *online* gemessenen Spektren bewirkt. Die Durchmischung während der Umsetzung erfolgt mit Hilfe eines Magnetrührstäbchens.

9.8.3. Satzreaktorversuche in Toluol mit immobilisierter ADH-'A'

TRISOPOR®-Amino-Glasträger (Partikelgröße 100-200 μm , Porengröße 49.8 nm, 400 mg) werden mit partiell gereinigter Enzymlösung (136.2 U, 20 mL) nach dem Standardimmobilisierungsprotokoll (Abschnitt 9.5.1) immobilisiert. Die Träger werden mit Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7, 200 μL , 100 mM NADH) vermischt. Die Reaktionsmischung wird mit 2-Propanol (11 % v v⁻¹) und mit Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7) gesättigtem Toluol auf ein Endvolumen von 20 mL aufgefüllt. Die Umsetzung wird durch Zugabe von Acetophenon (250 mM) gestartet. Die Reaktionsmischung wird bei Raumtemperatur geschüttelt (250 rpm). Für die Probenaufarbeitung werden die Proben (50 μL) mit Toluol (250 μL) verdünnt und anschließend gaschromatographisch untersucht.

9.9. Kontinuierliche Reaktionsführung

9.9.1. Umsetzung im kontinuierlich betriebenen Satzreaktor (CSTR)

TRISOPOR®-Amino-Glasträger (Partikelgröße 100-200 μm , Porengröße 49.8 nm, 400 mg) werden mit partiell gereinigter Enzymlösung (94.6 U, 20 mL) nach dem Standardimmobilisierungsprotokoll (Abschnitt 9.5.1) immobilisiert.

Ein thermostatisierbarer Dreihalsrundkolben wird mit den immobilisierten Trägern (400 mg) und Substratlösung (20 mM Acetophenon, 18 % v v⁻¹ 2-Propanol, 1 mM NADH in Kaliumphosphatpuffer 100 mM, pH 7) beladen. Eine Schlauchpumpe mit zwei Schläuchen fördert kontinuierlich mit einer Flussrate von 10 mL h⁻¹ Substratlösung aus einem bei 5 °C gekühltem Reservoir in den Satzreaktor bzw. mit der gleichen Flussrate aus dem Satzreaktor in einen Auffangbehälter. Die Durchmischung der Reaktionsmischung wird mit Hilfe eines Fish-Clip®-Rührers sichergestellt. Die Reaktion wird bei 30 °C ausgeführt. Um beim Abpumpen der Reaktionslösung ein Verlust an Glaspartikeln vorzubeugen, wird dem Schlauch ein Filter aus Polypropylen (2 μm) vorgeschaltet. Mit Hilfe eines Autosamplers wird dem Auslaufstrom stündlich eine Probe (500 μL) entnommen. Um ein Abstoppen der Reaktion durch möglicherweise abgelöste ADH-'A' zu gewährleisten, wird Essigsäureethylester in geschlossenen Vials vorgelegt. Jede Probe wird zweifach mit Essigsäureethylester (500 μL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden gaschromatographisch untersucht.

9.9.2. Umsetzung im Enzym-Membran-Reaktor (EMR)

9.9.2.1. Partiiell gereinigte ADH-'A'-Enzymlösung

Der Enzym-Membran-Reaktor (10 mL) wird für 16 Stunden mit gekühlter (5 °C) Substratlösung (20 mM Acetophenon, 18 % v v⁻¹ 2-Propanol, 1 mM NADH in Kaliumphosphatpuffer 100 mM, pH 7) mit einer Flussrate von 5 mL h⁻¹ mit Hilfe einer Kolbenpumpe gespült. Das Enzym wird durch eine Ultrafiltrationsmembran aus regenerierter Cellulose (10 kDa, Durchmesser 63.5 mm) retentiert. Die Membran wird vor dem Einsatz im Reaktor für 30 Minuten in Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7) equilibriert. Die Flussrate wird auf 10 mL h⁻¹ erhöht und der Reaktor mit filtrierter (0.45 μm Spritzenfilter), partiell gereinigter Enzymlösung (25.8 U, 10 mL) über die dem Reaktor vorgeschaltete Blasenfalle mit einer 10 mL Spritze innerhalb von 10 Minuten beladen. Die Flussrate variiert zwischen 2-10 mL h⁻¹. Die Permeatlösung wird über einen Fraktionssammler aufgefangen. Den verschiedenen Fraktionen werden Proben entnommen und standardmäßig (Abschnitt 9.4.4) aufgearbeitet.

9.9.2.2. Amino-funktionalisierte Nanodiamantpartikel

Typische Arbeitsvorschrift

Nanodiamantpartikel (20 mg) werden mit partiell gereinigter Enzymlösung (6.0 U, 2 mL) nach dem Standardimmobilisierungsprotokoll (Abschnitt 9.5.1) immobilisiert. Der Enzym-Membran-Reaktor wird entsprechend der Vorschrift in Abschnitt 9.9.2.1 vorbereitet. Die immobilisierten Partikel werden über die Blasenfalle innerhalb von 15 Minuten mit einer 10 mL Spritze in den

Reaktor eingebracht und im Reaktor durch eine Ultrafiltrationsmembran aus regenerierter Cellulose (100 kDa, Durchmesser 63.5 mm) zurückgehalten. Die Flussrate beträgt während der Betriebszeit 10 mL h^{-1} . Die Permeatlösung wird mit einem Fraktionssammler bzw. einem Autosampler aufgefangen. Den mit dem Fraktionssammler aufgefangenen Fraktionen werden Proben entnommen und standardmäßig (Abschnitt 9.4.4) aufgearbeitet. Die mit Hilfe des Autosamplers aufgefangenen Proben werden gemäß Abschnitt 9.9.1 aufgearbeitet.

Weitere Umsetzungen mit amino-funktionalisierten Nanodiamantpartikeln im Enzym-Membran-Reaktor erfolgen nach dem oben erläuterten Prinzip. Die exakten Bedingungen sind im Folgenden (Tabelle 9.3) zusammengefasst.

Tabelle 9.3: Bedingungen der Umsetzungen im Enzym-Membran-Reaktor mit auf Nanodiamantpartikel immobilisierter ADH-'A'.

Partikelmenge [mg]	Enzymbeladung [U]	Porengröße der Membran [kDa]	Flussrate [mL h^{-1}]
20	6.0	100	10
20 ³²	28.7	100	5
20	4.5	10	5

³² Zur weiteren Vernetzung der Enzyme auf dem Trägermaterial wird das nach dem Standard-immobilisierungsprotokoll (Abschnitt 9.5.1) aufbereitete Immobilisat einer zusätzlichen Behandlung mit Glutardialdehyd-Lösung (0.2 %ig, 2 mL, 4 °C, 30 min) unterzogen. Das Immobilisat wird vor Einsatz im EMR mit Kaliumphosphatpuffer (5 x 2 mL) gewaschen.

9.9.2.3. Integration der *in-situ* Coproduktabtrennung

Typische Arbeitsvorschrift

Der Enzym-Membran-Reaktor (10 mL) und das Umlaufsystem mit der Blasensäule werden mit 18 % v v⁻¹ 2-Propanol in Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7) gespült. Ein Setup aus drei Pumpen gewährleistet Zu- und Ablauf des Rektors und die Umwälzung im Umlaufsystem. Die Zuführung der Substratlösung und die Umwälzung im Umlaufsystem werden mit Hilfe von HPLC-Pumpen ausgeführt. Um eine kontinuierliche Reaktionsführung zu gewährleisten, wird dem Umlauf am Ablauf des Rektors Reaktionslösung mit Hilfe einer Zahnrادpumpe entzogen. Die Menge der abgeführten Lösung soll dabei der Menge der zugeführten Substratlösung entsprechen. Das Enzym wird durch eine Ultrafiltrationsmembran aus regenerierter Cellulose (10 kDa, Durchmesser 63.5 mm) retentiert. Als Blasensäule wird ein zylindrisches Glasgefäß mit einem Fassungsvermögen von 80 mL verwendet. Über die dem Reaktor vorgeschaltete Blasenfalle wird filtrierte (0.45 µm Spritzenfilter), partiell gereinigte Enzymlösung (72.0 U, 16.4 mL in 3.6 mL 2-Propanol) in das System eingebracht.

Die Abstimmung der Pumpen für den Zu- und Ablauf erfolgt nach Einspeisung des Enzyms in den Reaktor. Für die Zeit der Begasung der Blasensäule wird Luft mit einem Volumenstrom von 200-300 mL min⁻¹ über eine Metallfritte in die Blasensäule eingetragen. Die Luft wird ab einem Drittel des Flüssigkeitsspiegels in die Blasensäule eingetragen. Das Absaugen der Lösung für den Umlauf erfolgt unterhalb der Begasungsebene, um ein Umpumpen von Luftblasen zu vermeiden. Die Blasensäule wird nach dem Gegenstromprinzip betrieben. Die Lösung mit hohem Aceton- und Produktanteil, die aus dem EMR austritt, wird von oben in die Blasensäule hineingetropfert. Um den Verlust an 2-Propanol und Wasser durch das Ausgasen möglichst gering zu halten, wird die in die Blasensäule geleitete Luft zuvor mit diesen beiden Komponenten vorgesättigt, indem die Luft zunächst durch ein 1:1 Gemisch von Wasser und 2-Propanol in einer Gaswaschflasche geleitet wird. Im kontinuierlichen Betrieb wird die Vorlage in der Gaswaschflasche täglich gewechselt. Die Volumenströme der Pumpen werden am Ende des Experiments bestimmt. Es ergeben sich folgende Flussraten: Substratzulauf (P1) 5.8 mL h⁻¹, Umlauf (P2) 85.9 mL h⁻¹, Auslass (P3) 4.32 mL h⁻¹. Das Volumen in der Blasensäule variiert zwischen 15 und 35 mL. Mehrmals täglich wird das Volumen in der Blasensäule kontrolliert und bei Bedarf verringert oder durch Substratlösung aus dem Vorlagebehälter ersetzt.

Die Blasensäule und der Enzym-Membran-Reaktor werden bei 30 °C und der Substratvorlagebehälter (20 mM Acetophenon, 1 mM NADH, 18 % v v⁻¹ 2-Propanol in Kaliumphosphatpuffer 100 mM, pH 7) bei 5 °C temperiert. Aufgrund der Instabilität des Cofaktors wird die Lösung im Substratvorlagebehälter in einem Abstand von 2 Tagen gewechselt.

Die Permeatlösung wird über einen Autosampler aufgefangen. Die Proben werden gemäß Abschnitt 9.9.1 aufgearbeitet.

Weitere Umsetzungen mit partiell gereinigter Enzymlösung im Enzym-Membran-Reaktor und integrierter *in-situ* Coproduktabtrennung erfolgen nach dem oben erläuterten Prinzip. Die exakten Bedingungen sind im Folgenden (Tabelle 9.4) zusammengefasst.

Tabelle 9.4: Bedingungen der Umsetzungen im Enzym-Membran-Reaktor mit partiell gereinigter Enzym-lösung und integrierter *in-situ* Coproduktabtrennung

Enzymbelastung [U]	Cofaktor [mM]	Substrat [mM]	Flussrate [mL h ⁻¹]			Volumenstrom [mL min ⁻¹]
			P1	P2	P3	
72.0 + 36.0	1 (NADH)	20	5.8	85.9	4.3	0/200-300
94.4	0.1/0.2/0.5 (NADH)	20/40	4.5	88.7	4.9	160-250
72.0 + 22.0 ³³	0.15/0.2/0.5 (NAD ⁺)	20/80	1.95- 3.2	73.9- 84.6	3.1- 4.3	0/300-350

Detaillierte Reaktionsbedingungen sind den jeweiligen Abbildungsunterschriften zu entnehmen.

³³ Um der Beschädigung der Membran durch eine Sinterplatte mit Rillen vorzubeugen, wurde in diesem Experiment mit einem porösen Teflonmaterial mit glatter Oberfläche gearbeitet, welches in eine Lochsinterplatte eingelegt wird.

A Chromatogramme

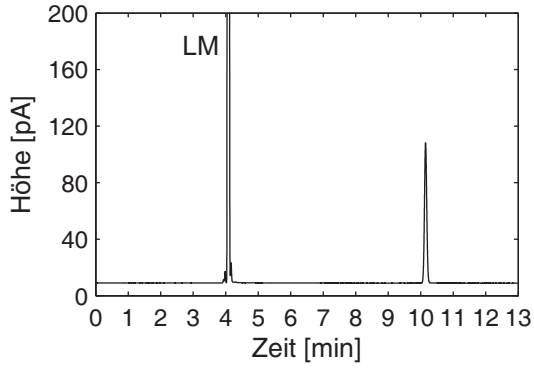
A.1 Gaschromatographie

Die abgebildeten GC-Chromatogramme zeigen die Auftrennung der in dieser Arbeit verwendeten Verbindungen. Die Bedingungen werden tabellarisch aufgeführt (Tabelle 9.5).

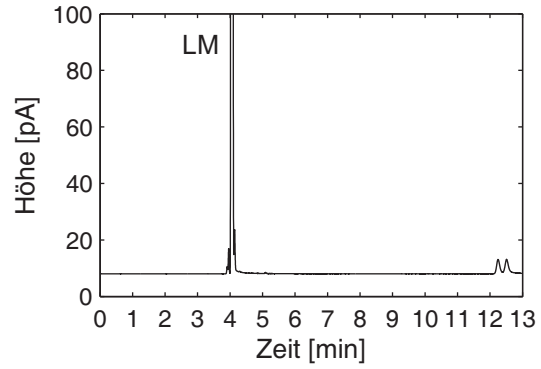
Tabelle 9.5: Verwendete Methoden für die GC-Analytik.

Methode	I	II	III	IV	V
Temperaturprogramm	140 °C / 14 min	80 °C / 10 min - 10 °C/min - 140 °C / 20 min	70 °C / 7 min - 10 °C / min - 120 °C - 10 °C / min - 200 °C / 4 min	60 °C / 8 min - 15 °C / min - 160 °C / 4min - 20 °C / min - 200 °C	60 °C / 10 min - 25 °C / min - 160 °C / 8min
Detektortemperatur [°C]	250	250	250	250	250
Trägergasfluss [ml min ⁻¹]	40	40	40	40	40
Make-Up (He) [ml min ⁻¹]	45	45	45	45	45
Luftfluss [mL min ⁻¹]	350	350	350	350	350
Injektortemperatur [°C]	220	220	220	220	220
Splitverhältnis	30 : 1	30 : 1	30 : 1	12 : 1	100 : 1
Splitfluss [ml min ⁻¹]	90	90	89.9	36	721
Säulenvordruck [bar]	1.0	0.81	0.78	0.75	1.49
Säulenfluss [mL min ⁻¹]	3	3	3	3	7.2

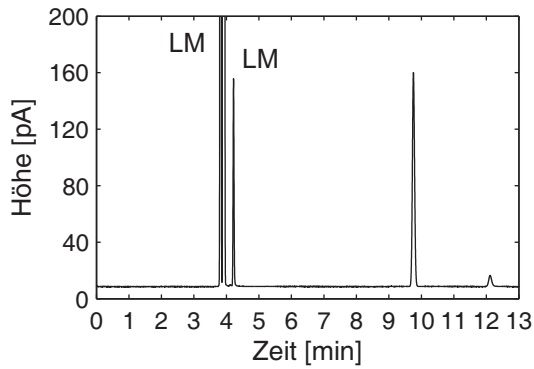
Die Messungen wurden an einem Agilent 6890 Series Gaschromatographen durchgeführt. Es wurde eine chirale Säule der Firma CS-Chromatographie Service GmbH, Säulentyp FS-Cyclodex β -I/P, 50 m x 0.46 mm AD x 0.32 mm ID, Säulenummer CS 32368-1 verwendet. Als Trägergas wurde Wasserstoff eingesetzt.



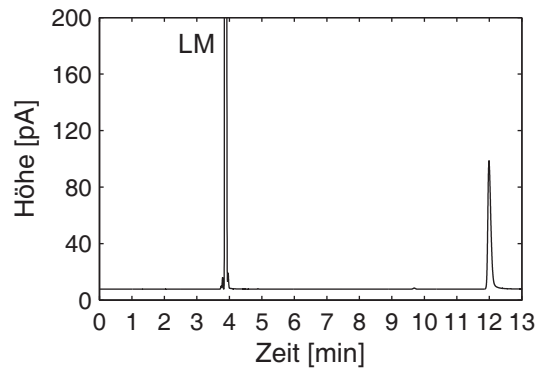
Methode I: Acetophenon (9.86 min)



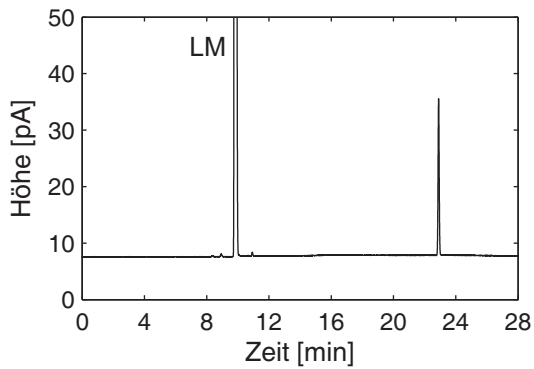
Methode I: *rac*-Phenylethanol (12.25 und 12.51 min)



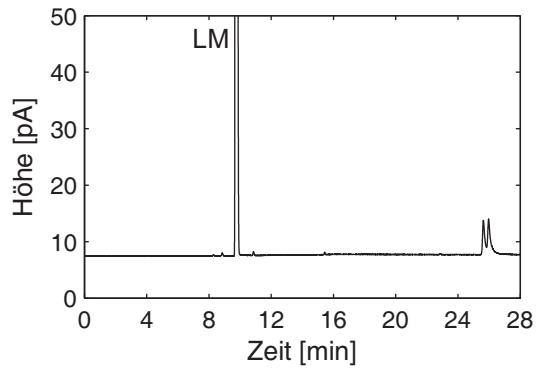
Methode I: Umsetzung Acetophenon zu (S)-Phenylethanol



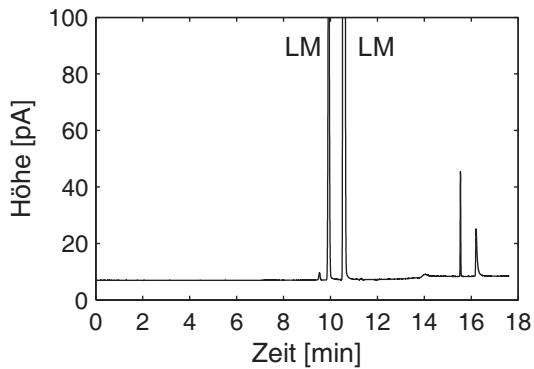
Methode I: (S)-Phenylethanol (11.99 min)



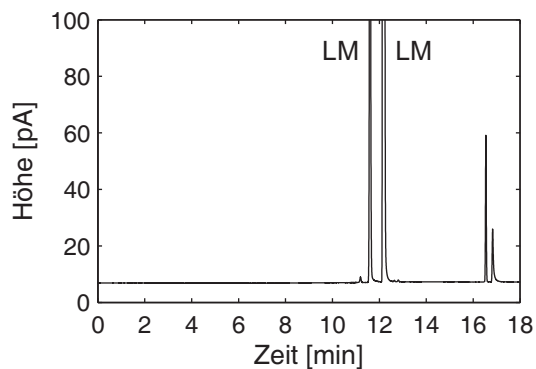
Methode II: Acetophenon (22.9 min)



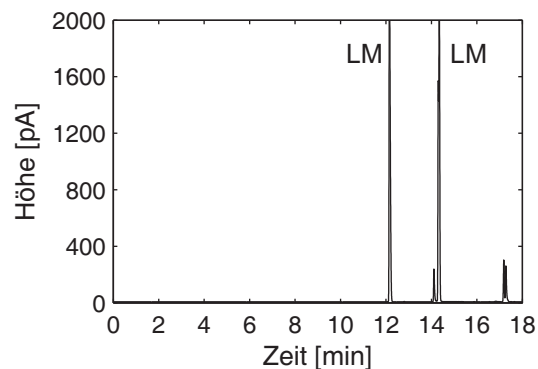
Methode II: *rac*-Phenylethanol (25.63 und 25.96 min)



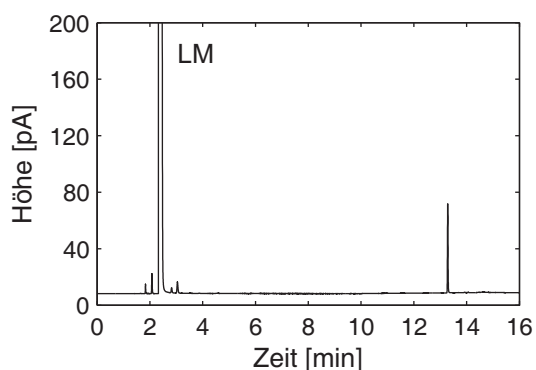
Methode III: Umsetzung 2-Acetylpyridin (15.53 min) zu (S)-2-(1-Hydroxy)ethylpyridin (16.26 min)



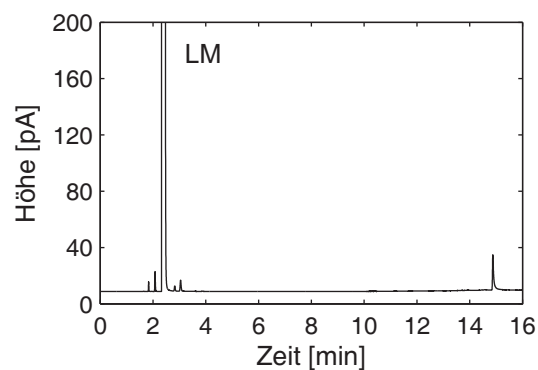
Methode IV: Umsetzung 2-Acetylfuran (16.54 min zu (S)-1-(2-Furyl)ethanol (16.83 min)



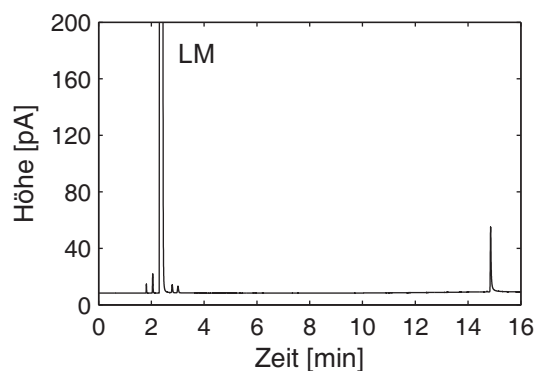
Methode IV: *rac*-1-(2-Furyl)ethanol (17.19 min (S), 17.28 min (R))



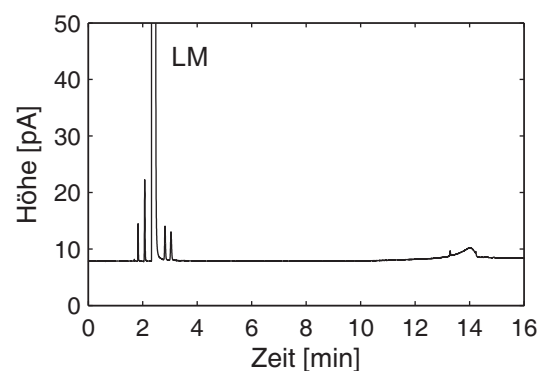
Methode V: 2,5-Hexandion (13.28 min)



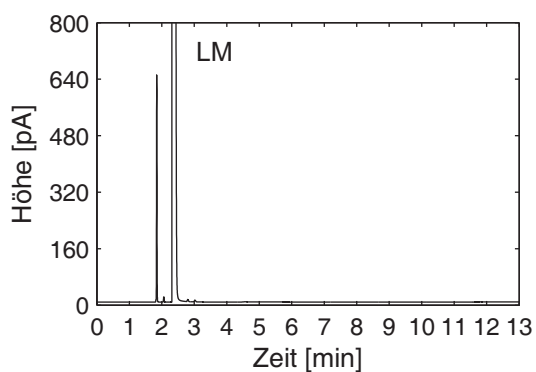
Methode V: *rac/meso*-2,5-Hexandiol (14.88 min)



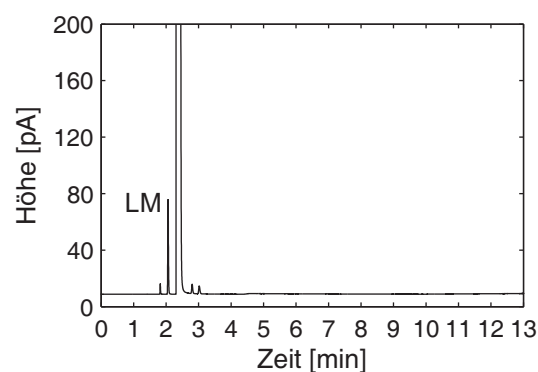
Methode V: *meso*-2,5-Hexandiol (14.86 min)



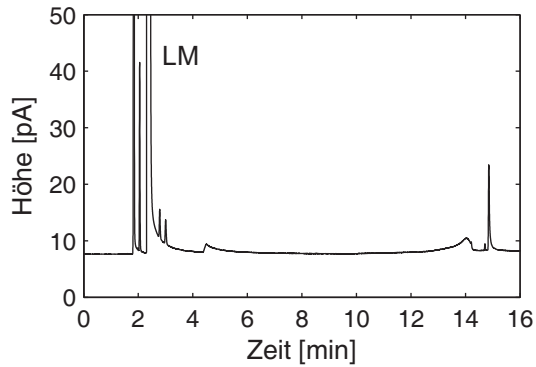
Methode V: (R)-5-Hydroxyhexan-2-on (13.29-14.29 min), isoliertes Material



Methode V: Aceton (1.84 min)



Methode V: 2-Propanol (2.06 min)



Methode V: Umsetzung *meso*-2,5-Hexandiol zu (*R*)-5-Hydroxyhexan-2-on

A.2 Flüssigkeitschromatographie

Die Auftrennung der 2-(1-Hydroxy)ethylpyridin-Enantiomere erfolgt mittels chiraler HPLC an einer *Sykam* HPLC-Anlage mit einer chiralen *Daicel* CHIRALCEL® OD-H Säule.

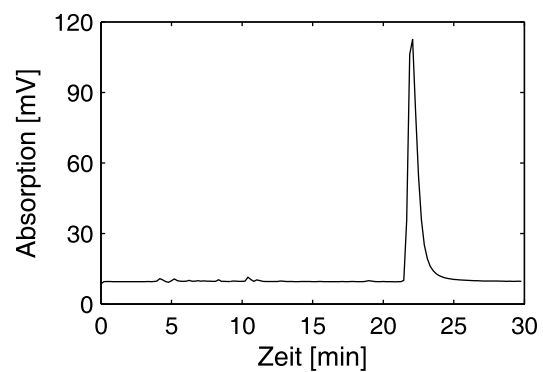
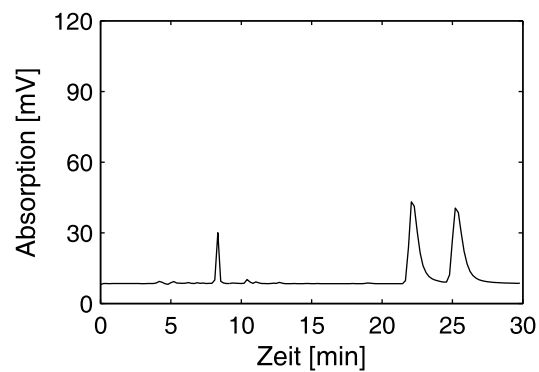
Methode:

Eluent: 98 % Isohexan / 2 % 2-Propanol

Flussrate: 0.75 mL min⁻¹

Temperatur: 10 °C

Detektion: UV, 254 nm



rac-2-(1-Hydroxy)ethylpyridin (22.16 min (*R*), (*R*)-2-(1-Hydroxy)ethylpyridin (22.06 min)
25.28 min (*S*))

B Stabilität Katalysatorformulierungen

Tabelle 9.6: Übersicht über die durchgeführten Stabilitätsmessungen.

Art der Stabilitätsstudie	ADH-'A' bei 30 °C	Prozess mit gelöster ADH-'A', 10 kDa Membran	TRISOPOR®-Amino-Immobilisat	Nanodiamanten, Standard, 100 kDa Membran	Nanodiamanten, optimiert, 100 kDa Membran	Nanodiamanten, Standard, 10 kDa Membran
Desaktivierungsrate [h ⁻¹]	0.037	0.003	0.002	0.017	0.011	0.027
Halbwertszeit [d]	7.7	11.1	11.2	1.2	4.0	1.1
normierte Halbwertszeit [d U ⁻¹]	-	0.43	0.19	0.41	0.29	0.50
Aktivität [U]	95.4	25.8	94.6	6.0	28.7	4.5
Immobilisierungsausbeute [%]	-	-	99.6	100	99.5	100
Aktivitätsausbeute [%]	-	-	62	49	49 ³⁴	49
Reaktoraktivität [U]	-	25.8	58.4	2.96	14.0	2.2
Träger [mg]	-	-	400	20	20	20
Volumen [mL]	20	10	20 ³⁵	10	10	10

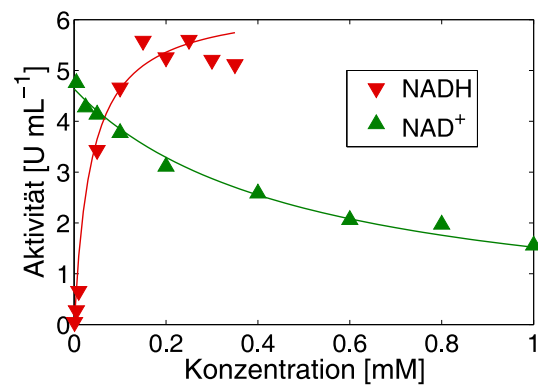
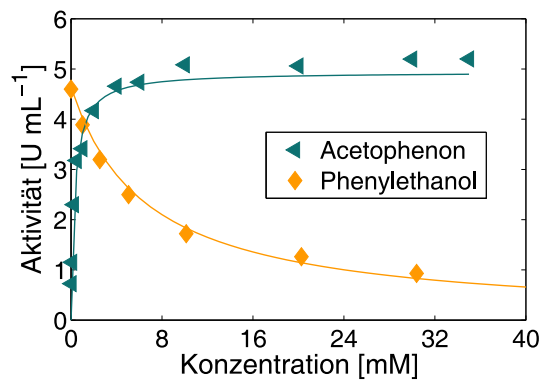
³⁴ Für die Berechnung der Gesamtaktivität wurde die allgemeine Aktivitätsausbeute von 49 %, die sich bei dem Standardimmobilisierungsprotokoll für die Nanodiamantpartikel ergibt, angenommen.

³⁵ Volumen verringert sich mit der Zeit.

C Übersicht der Gesamtkinetik³⁶

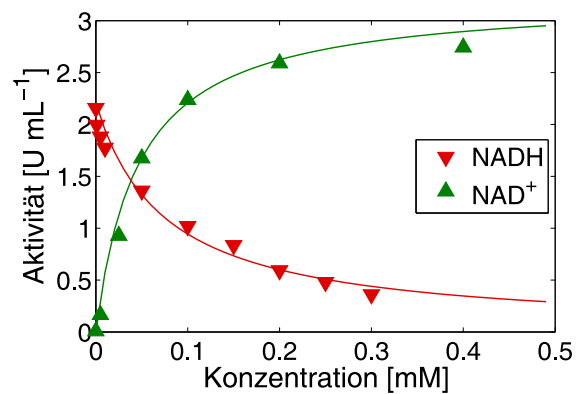
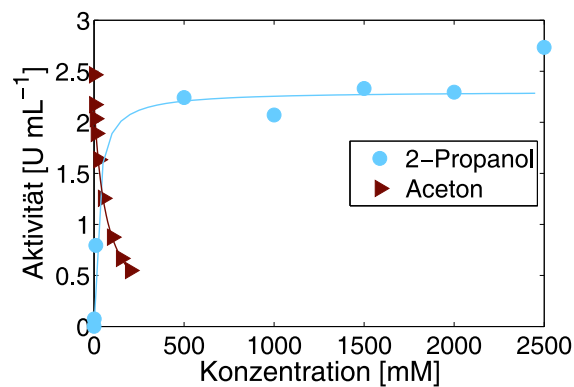
Teilreaktion 1 - Reduktion von Acetophenon

$$v_1 = \frac{v_{max,1}[AP][NADH]}{\left(K_{m,AP} \left(1 + \frac{[PE]}{K_{i,PE}}\right) + [AP]\right) \left(K_{m,NADH} \left(1 + \frac{[NAD^+]}{K_{i,NAD^+}}\right) + [NADH]\right)}$$



Teilreaktion 2 - Oxidation von 2-Propanol

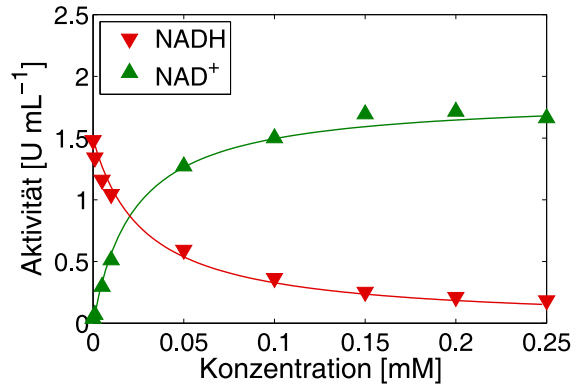
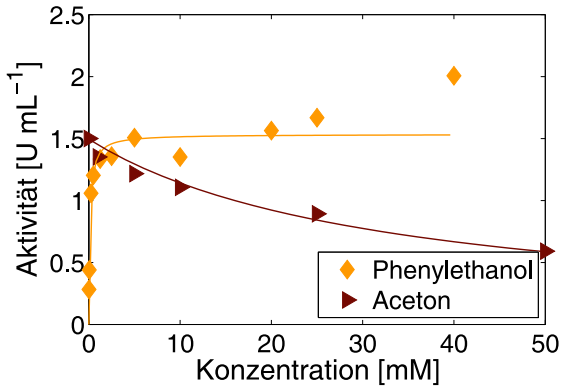
$$v_2 = \frac{v_{max,2}[IP][NAD^+]}{\left(K_{m,IP} \left(1 + \frac{[AC]}{K_{i,AC}}\right) + [IP]\right) \left(K_{m,NAD^+} \left(1 + \frac{[NADH]}{K_{i,NADH}}\right) + [NAD^+]\right)}$$



³⁶ Reaktionen jeweils in KP_i-Puffer (100 mM, pH 7.0), Reaktionstemperatur 30 °C, 4.4 · 10⁻² U ADH-'A'. Die variierten und konstanten Konzentrationen sind Tabelle 9.1 zu entnehmen.

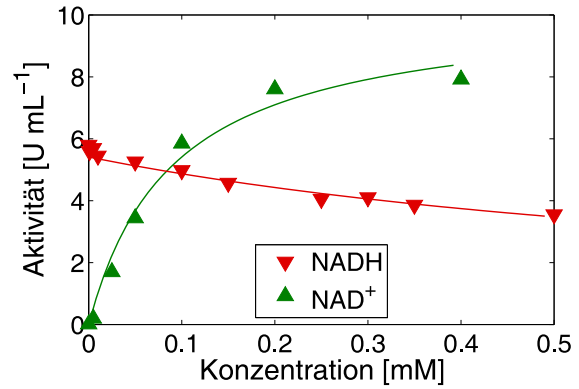
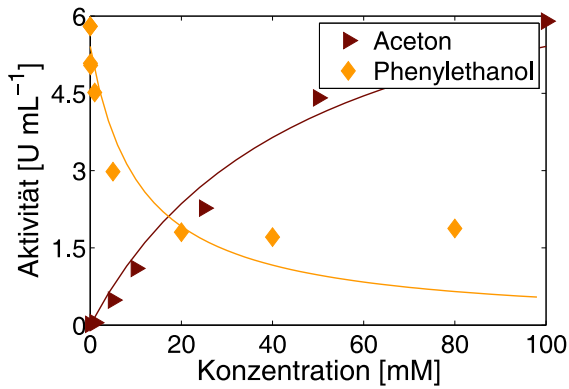
Teilreaktion 3 - Oxidation von Phenylethanol

$$v_3 = \frac{v_{max,3} [PE] [NAD^+]}{\left(K_{m,PE} \left(1 + \frac{[AC]}{K_{i,AC}} \right) + [PE] \right) \left(K_{m,NAD^+} \left(1 + \frac{[NADH]}{K_{i,NADH}} \right) + [NAD^+] \right)}$$



Teilreaktion 4 - Reduktion von Aceton

$$v_4 = \frac{v_{max,4} [AC] [NADH]}{\left(K_{m,AC} \left(1 + \frac{[PE]}{K_{i,PE}} \right) + [AC] \right) \left(K_{m,NADH} \left(1 + \frac{[NAD^+]}{K_{i,NAD^+}} \right) + [NADH] \right)}$$



D Definition der Kennzahlen

Umsatz

Der Umsatz (X) ist der Quotient aus der Konzentration des umgesetztem Substrat und der Ausgangssubstratkonzentration.

$$X = \frac{[S]_0 - [S]}{[S]_0} \quad [-]$$

X	Umsatz
$[S]$	Substratkonzentration
$[S]_0$	Anfangssubstratkonzentration

Zykluszahl

Die Zykluszahl (TTN) ist ein Maß für die Katalysatorausnutzung bzw. Cofaktorausnutzung in einem Produktionsprozess. Sie ist definiert als Quotient aus gebildetem Produkt und verbrauchtem Katalysator.

$$TTN = \frac{n_P}{n_{Kat}} \quad \left[\frac{\text{mol}}{\text{mol}} \right]$$

TTN	Zykluszahl
n_P	Stoffmenge Produkt
n_{Kat}	Stoffmenge Katalysator bzw. Cofaktor

Raum-Zeit-Ausbeute

Die Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) gibt die Produktivität eines Prozesses wieder. Sie ist definiert als Produktmenge pro Zeit und Reaktorvolumen und somit unabhängig vom Maßstab des Reaktors.

$$RZA = \frac{m_P}{tV} \quad \left[\frac{\text{g}}{\text{L d}} \right]$$

RZA	Raum-Zeit-Ausbeute
m_P	Masse des gebildeten Produktes
t	Benötigte Zeit
V	Reaktorvolumen

Enantiomerenüberschuss

Der Enantiomerenüberschuss (ee) beschreibt den Überschuss der Stoffmenge des einen Enantiomers über der Stoffmenge des anderen Enantiomers.

$$ee = \frac{|n_S - n_R|}{n_S + n_R} \quad [-]$$

ee	Enantiomerenüberschuss
n_S	Stoffmenge des <i>S</i> -Enantiomers
n_R	Stoffmenge des <i>R</i> -Enantiomers

E MATLAB-Skripte

Für die Arbeit relevante MATLAB-Skripte werden in gekürzter Form dargestellt.

E.1 Bestimmung kinetischer Parameter

Die experimentellen Daten werden aus einer Excel-Tabelle ausgelesen und das kinetische Modell bzw. die entsprechende Formel an diese Daten gefittet. Das Skript besteht dabei jeweils aus zwei Dateien. Das Beispielskript wird für die Bestimmung der kinetischen Parameter der ersten Teilreaktion, der Reduktion von Acetophenon, eingesetzt.

Kinetisches Modell:

$$v_1 = \frac{v_{max,1}[AP][NADH]}{\left(K_{m,AP} \left(1 + \frac{[PE]}{K_{i,PE}}\right) + [AP]\right) \left(K_{m,NADH} \left(1 + \frac{[NAD^+]}{K_{i,NAD^+}}\right) + [NADH]\right)}$$

Datei 1: Kinetik_Reaktion_I.m

```

1  % Einlesen von Aktivitäten und Konzentrationen
2
3  file = 'Daten_Kinetik_Reaktion_I.xls';
4  rate = xlsread(file, 'Reaktion_I', 'K10:K72');
5  conc = xlsread(file, 'Reaktion_I', 'E10:E72');
6
7  % Startwerte für die Parameterbestimmung
8
9  vmax    = 6;
10 km_AP   = 1;
11 km_NADH = 0.05;
12 ki_PE   = 1;
13 ki_NAD  = 0.1;
14
15 parameter_0 = [vmax; km_AP; km_NADH; ki_PE; ki_NAD];
16
17 % Non-linear least square data fitting
18
19 [parameter residual jacobian sigma MSE] =
20     nlinfit(conc, rate, @Formel_Reaktion_I, parameter_0);
21
22 % Berechnung der Abweichungen
23
24 variation = nlparci(parameter, residual, 'covar', sigma);
25 variation = abs((variation(:,1)-variation(:,2))/2);
26
27 % Speichern der Parameter
28
29 save('Parameter_Reaktion_I.mat', 'parameter');
```

Datei 2: Formel_Reaktion_I.m

```

1  function F = Formel_Reaktion_I(parameter_0, data)
2
3  AP   = data(:,1);
4  NADH = data(:,2);
5  PE   = data(:,3);
6  NAD  = data(:,4);
7
8  vmax   = parameter_0(1);
9  km_AP  = parameter_0(2);
10 km_NADH = parameter_0(3);
11 ki_PE  = parameter_0(4);
12 ki_NAD = parameter_0(5);
13
14 F = vmax*AP.*NADH./
15     ((km_AP*(1+(PE./ki_PE))+AP).*(km_NADH*(1+(NAD./ki_NAD))+NADH));
16
17 end

```

E.2 Simulation von Umsetzungen

Für die Simulation von Umsetzungen werden zunächst die Parameter aller Teilreaktionen geladen und das aufgestellte Gleichungssystem gelöst. Das Skript besteht aus zwei Dateien.

Datei 1: Simulation_Batch.m

```

1  % Einlesen der Parameter
2
3  pI   = load('Parameter_Reaktion_I.mat');
4  pII  = load('Parameter_Reaktion_II.mat');
5  pIII = load('Parameter_Reaktion_III.mat');
6  pIV  = load('Parameter_Reaktion_IV.mat');
7
8  parameter = [pI.parameter pII.parameter pIII.parameter pIV.parameter];
9
10 % Definition der Startparameter
11 % Reihenfolge: [AP NADH PE NAD IP AC]
12
13 c_0 = [20 1 0 0 2355 0];
14 time = 0:1:360;
15
16 % Simulation
17
18 [tn yn] = ode45(@Simulation_Batch_Model, time, c_0, [], parameter);

```

Datei 2: Simulation_Batch_Model.m

```

1  function dy = Simulation_Batch_Model(time, c_0, parameter)
2
3  AP    = c_0(1);
4  NADH  = c_0(2);
5  PE    = c_0(3);
6  NAD   = c_0(4);
7  IP    = c_0(5);
8  AC    = c_0(6);
9
10 v_max = parameter(1,:);
11 k_ma  = parameter(2,:);
12 k_mb  = parameter(3,:);
13 k_ip  = parameter(4,:);
14 k_iq  = parameter(5,:);
15
16 % Umsetzung AP --> PE
17 v_1 = v_max(1)*AP.*NADH./
18      ((k_ma(1)*(1+(PE./k_ip(1)))+AP).*(k_mb(1)*(1+(NAD./k_iq(1)))+NADH));
19 % Umsetzung IP --> AC
20 v_2 = v_max(2)*IP.*NAD./
21      ((k_ma(2)*(1+(AC./k_ip(2)))+IP).*(k_mb(2)*(1+(NADH./k_iq(2)))+NAD));
22 % Umsetzung PE --> AP
23 v_3 = v_max(3)*PE.*NAD./
24      ((k_ma(3)*(1+(AC./k_ip(3)))+PE).*(k_mb(3)*(1+(NADH./k_iq(3)))+NAD));
25 % Umsetzung AC --> IP
26 v_4 = v_max(4)*AC.*NADH./
27      ((k_ma(4)*(1+(PE./k_ip(4)))+AC).*(k_mb(4)*(1+(NAD./k_iq(4)))+NADH));
28
29 dy(1) = v_3 - v_1;
30 dy(2) = v_3 - v_1 + v_2 - v_4;
31 dy(3) = v_1 - v_3;
32 dy(4) = v_4 - v_3 + v_1 - v_2;
33 dy(5) = v_4 - v_2;
34 dy(6) = v_2 - v_4;
35
36 dy=dy';
37
38 end

```

Die Skripte der Simulation eines kontinuierlich betriebenen Reaktors stimmen zum größten Teil mit den Skripten für Satzreaktoren überein. Analog zu den berücksichtigten Konzentrationsänderungen wird der Verlust an Enzymaktivität in die Berechnungen integriert.

E.3 Chemometrische Auswertung

Die chemometrische Auswertung spektraler Daten ist unabhängig von der Art der Spektren. Die Korrelation der Spektren mit Konzentrations- oder Umsatzdaten, sowie die Berechnung von Umsätzen aus einem Spektrum mit Hilfe des chemometrischen Modells sind die Grundoperationen.

Datei 1: Beispiel_Chemometrie.m

```
1 % Einlesen der Fluoreszenzdaten und offline bestimmten Umsätze
2
3 Data1 = xlsread('Fluoreszenz_Messung1.xls', 1, 'E2:EH90');
4 X_offline = xlsread('Umsätze_GC.xls', 1, 'A1:A20');
5
6 % Erstellung des Modells mit 3 Faktoren
7
8 [XFac, YFac, Core, B] = npls(Data1, X_offline, 3);
9
10 % Einlesen der Fluoreszenzdaten aus einer anderen Umsetzung
11
12 Data2 = xlsread('Fluoreszenz_Messung2.xls', 1, 'E2:EH90');
13
14 % Vorhersage der Umsätze aus den neuen Fluoreszenzdaten
15
16 X_predicted = npred(Data2, 3, XFac, YFac, Core, B);
```

F Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström (10^{-10} m)
AC	Aceton
AD	Außendurchmesser
ADH	Alkoholdehydrogenase
AP	Acetophenon
ATR	Abgeschwächte Totalreflexion (attenuated total reflectance)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
BTM	Biotrockenmasse
<i>c</i>	Konzentration
CaLB	<i>Candida antarctica</i> Lipase B
CLEA	cross-linked enzyme aggregate
CSTR	kontinuierlich betriebener Satzreaktor (continuous stirred tank reactor)
CVD	chemische Gasphasen-Abscheidung (chemical vapour deposition)
$\Delta_R G$	Reaktionsenthalpie
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DTGS	deutერიertes Triglycinsulfat
DSP	Produktaufarbeitung (down-stream-processing)
E	Enzym
EA	Enzymaktivität
EC	Enzymklassifikation (enzyme commission)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>ee</i>	Enantiomerenüberschuss
EMR	Enzym-Membran-Reaktor
eq.	Equivalent
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FD	Fluoreszenz-Detektion
FDH	Formiat Dehydrogenase
FM	Feuchtmasse
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarot
FT-NMR	Fourier-Transformations-Kernspinresonanz
FT-MIR	Fourier-Transformations Mid-Infrarot
GC	Gaschromatographie
GDH	Glukose Dehydrogenase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
ID	Innendurchmesser
IP	2-Propanol
ISPR	<i>in-situ</i> Produkt Abtrennung (<i>in-situ</i> product removal)
<i>k</i>	Geschwindigkeitskonstante
<i>K</i>	Massenwirkungskonstante
<i>k_d</i>	Desaktivierungsrate
<i>K_i</i>	Inhibierungskonstante
<i>K_m</i>	<i>Michaelis</i> -Konstante
<i>K_S</i>	Sorptionskoeffizient
KP _i	Kaliumphosphat

LDH	Lactat Dehydrogenase Leucin Dehydrogenase
LM	Lösungsmittel
M	Molare Masse [g mol^{-1}]
MCT	Quecksilber Cadmium Telluride (mercury cadmium tellurid)
MW	Molekulargewicht
MWCO	Trennschärfe nach Molekulargewicht (molecular weight cut off)
NADH	β -1,4-Nicotinamidadeninucleotid
NADPH	β -1,4-Nicotinamidadeninucleotidphosphat
NMR	Kernspinresonanz (nuclear magnetic resonance)
P	Produkt
PE	Phenylethanol
PEG	Polyethylenglycol
PFR	Strömungsrohr (plug flow reactor)
PQQ	Pyrrlochinolinchinon
PV	Pervaporation
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
q	Beladung
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute) [min^{-1}]
rcf	relative Zentrifugalkraft (relative centrifugal force) [g]
r	Radius
R	Rückvermischung
RMSE	Wurzel der quadratischen Fehlersumme (root mean square error)
RZA	Raum-Zeit Ausbeute
RT	Raumtemperatur
S	Substrat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
STR	gerührter Satzreaktor (stirred tank reactor)
τ	Verweilzeit
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
T	Temperatur
Tris	<i>Tris</i> (hydroxymethyl)aminomethan
ThDP	Thiamindiphosphat
TM	Trockenmasse
TTN	Zykluszahl (total turnover number)
U	Units [$\mu\text{mol min}^{-1}$]
UF	Ultrafiltration
v	Reaktionsrate
v_{max}	maximale Reaktionsrate
v_{ISPR}	Rate der Coproduktabtrennung
\dot{V}	Pumprate
$\% v v^{-1}$	Volumenprozent
X	Umsatz

G Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Anteil der Alkohole in der Produktgruppe chirale <i>Building Blocks</i> bei <i>Sigma-Aldrich Co.</i>	2
Abbildung 1.2: Retrosynthetische Analyse chiraler Alkohole.	3
Abbildung 1.3: Schema der (dynamisch) kinetischen Racematspaltung sekundärer Alkohole mit Lipasen.	5
Abbildung 1.4: Lyase-katalysierte C-C Knüpfungsreaktion von Aldehyden.	5
Abbildung 1.5: Monooxygenase-katalysierte Hydroxylierung von D-Campher.	6
Abbildung 1.6: Anwendung von <i>N. crassa</i> in der Synthese von Trusopt®.	7
Abbildung 1.7: Schema der Verfahrensentwicklung biokatalytischer Prozesse.	8
Abbildung 1.8: Substrat-gekoppelte (links) und Enzym-gekoppelte (rechts) Cofaktorregenerierung.	10
Abbildung 1.9: Graphische Darstellung der <i>Michaelis-Menten</i> Gleichung und ihrer Parameter. .	11
Abbildung 1.10: Methoden zur Immobilisierung von Enzymen.	13
Abbildung 1.11: Grundlegende ideale Reaktortypen (A Satzreaktor, B Strömungsrohr und C kontinuierlich betriebener Satzreaktor) und ihr Verhalten	16
Abbildung 3.1: Schematische Übersicht über das aktive Zentrum der Pferdeleber ADH [Eklund 1989].	22
Abbildung 3.2: Auswahl aus dem Substratspektrum der ADH-'A'.	22
Abbildung 3.3: SDS-PAGE der partiell gereinigten ADH-'A'-Lösung.	23
Abbildung 3.4: Kinetische Abhängigkeiten für die Reduktion von Acetophenon. Die durchgezogenen Linien entsprechen dem kinetischen Modell. Bedingungen links: 0.05-35 mM Acetophenon und 0.1 mM NADH bzw. 5 mM Acetophenon, 0-30 mM <i>rac</i> -1-Phenylethanol und 0.1 mM NADH. Bedingungen rechts: 5 mM Acetophenon und 0.001-0.35 mM NADH bzw. 5 mM Acetophenon, 0.005-1 mM NAD ⁺ und 0.1 mM NADH. Jeweils in KP _i -Puffer (100 mM, pH 7.0), Reaktionstemperatur 30 °C, $4.4 \cdot 10^{-2}$ U ADH-'A'.	25
Abbildung 3.5: Umsetzungen von Acetophenon mit der ADH-'A'. Die durchgezogene Linie entspricht der Simulation. Oben: 40 mM Acetophenon, 18 % v v ⁻¹ 2-Propanol, 0.3 mM NAD ⁺ in KP _i -Puffer (100 mM, pH 7.0), 66 U. Unten: 80 mM Acetophenon, 18 % v v ⁻¹ 2-Propanol, 1.0 mM NADH in KP _i -Puffer (100 mM, pH 7.0), 52 U. Batchvolumen 25 mL, 30 °C.	27
Abbildung 3.6: Mechanismus der Aminofunktionalisierung von Glaspartikeln (Teil I) und der kovalenten Immobilisierung eines Biokatalysators mit Glutaraldehyd (Teil II).	28
Abbildung 3.7: Poröse Glaspartikel der Firma <i>Dennert Poraver GmbH</i> , Durchmesser 200-700 µm.	29
Abbildung 3.8: Umsetzungen von Acetophenon mit auf porösen Glasträgern immobilisierten ADH-'A'- <i>E. coli</i> -Zellen (300 mg _{FM} Träger immobilisiert mit 16 mg ADH-'A'- <i>E. coli</i> -Zellen / 0.89 U mg _{Zellen} ⁻¹), Bedingungen: 80 mM Acetophenon, 18 % v v ⁻¹ 2-Propanol, 1.0 mM NADH in KP _i -Puffer (50 mM, pH 7.5), Batchvolumen 1 mL, 30 °C.	29

Abbildung 3.9: Umsetzungen von Acetophenon mit auf porösen Glasträgern – oben TRISOPERL [®] , unten TRISOPOR [®] – immobilisierter ADH-'A' (200 mg _{TM} Träger immobilisiert mit ADH-'A' (11.6 U für TRISOPERL [®] und 16.1 U für TRISOPOR [®]), Bedingungen: 80 mM Acetophenon, 18 % v v ⁻¹ 2-Propanol, 1.0 mM NADH in KP _i -Puffer (100 mM, pH 7.0), Batchvolumen 10 mL, Raumtemperatur.	30
Abbildung 3.10: links TRISOPERL [®] , rechts TRISOPOR [®]	31
Abbildung 3.11: Umsetzungen von Acetophenon mit auf Magnetpartikel bzw. Nanodiamantpartikel immobilisierter ADH-'A' (14 mg Magnetpartikel immobilisiert mit ADH-'A' (0.7 U), 20 mg Nanodiamantpartikel immobilisiert mit ADH-'A' (1.4 U), Bedingungen: 80 mM Acetophenon, 18 % v v ⁻¹ 2-Propanol, 1.0 mM NADH in KP _i -Puffer (100 mM, pH 7.0), Batchvolumen 1.05 mL, RT.	32
Abbildung 3.12: Größenverteilung der amino-funktionalisierten Nanopartikel.	32
Abbildung 3.13: Aktivitäts- und Immobilisierungsausbeuten für Glas-, Magnet- und Nanodiamantpartikel.	33
Abbildung 3.14: Aktivitätsabnahme der ADH-'A' bei 30 °C.	35
Abbildung 3.15: Fließbild des Enzym-Membran-Reaktors.	35
Abbildung 3.16: Umsetzung von Acetophenon im EMR mit partiell gereinigter ADH-'A' (◆: gaschromatographisch bestimmter Umsatz / – –: Flussrate / —: Desaktivierung) Bedingungen: 20 mM Acetophenon, 18 % v v ⁻¹ 2-Propanol, 1.0 mM NADH bzw. 1 mM NAD ⁺ (ab 32.5 h) in KP _i -Puffer (100 mM, pH 7.0), Reaktionstemperatur 30 °C, Substratvorlage 5 °C, Flussrate: 2 mL h ⁻¹ - 10 mL h ⁻¹ , Enzymbeladung 25.8 U. Die Halbwertszeit wird für die Flussrate 10 mL h ⁻¹ bestimmt. Das Enzym wird über eine Membran (MWCO 10 kDa) zurückgehalten.	36
Abbildung 3.17: Stabilitätsbestimmung der Nanodiamanten-Immobilisate. Umsetzung von Acetophenon im EMR (MWCO 100 kDa) mit auf Nanopartikeln immobilisierter ADH-'A'. Bedingungen: 20 mM Acetophenon, 18 % v v ⁻¹ 2-Propanol, 1.0 mM NADH in KP _i -Puffer (100 mM, pH 7.0), Reaktionstemperatur 30 °C, Substratvorlage 5 °C, Enzymbeladung und Flussrate: A) Standardimmobilisierung: 3.0 U / 20 mg Partikel, 10 mL h ⁻¹ B) zusätzliche Verlinkung: 14.0 U / 20 mg Partikel, 5 mL h ⁻¹	38
Abbildung 3.18: Umsetzung von Acetophenon im EMR (MWCO 10 kDa) mit auf Nanopartikeln immobilisierter ADH-'A'. Bedingungen: 20 mM Acetophenon, 18 % v v ⁻¹ 2-Propanol, 1.0 mM NADH in KP _i -Puffer (100 mM, pH 7.0), Reaktionstemperatur 30 °C, Substratvorlage 5 °C, Enzymbeladung und Flussrate: 2.2 U / 20 mg Partikel, 5 mL h ⁻¹	39
Abbildung 4.1: Allgemeines Reaktionsschema der Substrat-gekoppelten asymmetrischen Keton-Reduktion.	41
Abbildung 4.2: Synthese von Referenzverbindungen.	42
Abbildung 4.3: In der Literatur beschriebene ISPR-Prozesse im Zeitraum 1977-1997.	44
Abbildung 4.4: Verbreitete Isothermen zur Beschreibung von Adsorptionsvorgängen.	46
Abbildung 4.5: Konzentrationsabnahme von Acetophenon (80 mM) und <i>rac</i> -1-Phenyethanol (80 mM) in 18 % v v ⁻¹ 2-Propanol, KP _i -Puffer (100 mM, pH 7.0) durch Adsorption an	

Amberlite® XAD-4 (links), Trägeraliquots (100-400 mg), entsprechende Normierung der Ergebnisse auf 1 g Adsorbens (rechts).....	47
Abbildung 4.6: Adsorptionsleistung gegenüber Acetophenon und <i>rac</i> -1-Phenylethanol. 3.2 g Trägermaterial, Acetophenon (80 mM) bzw. <i>rac</i> -1-Phenylethanol (80 mM) in 18 % v v ⁻¹ 2-Propanol, KP _i -Puffer (100 mM, pH 7). Disintex™ 75: 4 g Trägermaterial (4-fache Extraktion mit je 1 g), Acetophenon (40 mM) / <i>rac</i> -1-Phenylethanol (40 mM) in 18 % v v ⁻¹ 2-Propanol, KP _i -Puffer (100 mM, pH 7).	48
Abbildung 4.7: Adsorptionleistung gegenüber 2-Acetylfuran und 2-(1-Hydroxyethyl)furan. 3 g Trägermaterial, 2-Acetylfuran (40 mM) / 2-(1-Hydroxyethyl)furan (40 mM) in 18 % v v ⁻¹ 2-Propanol, KP _i -Puffer (50 mM, pH 7.5).....	49
Abbildung 4.8: Adsorptionsleistung für Hexandion und Hexandiol. 3 x 0.5 g Trägermaterial, 2,5-Hexandion (50 mM) und <i>rac/meso</i> -2,5-Hexandiol (50 mM) in 18 % v v ⁻¹ 2-Propanol, KP _i -Puffer (50 mM, pH 7.5) (20 mL).	49
Abbildung 4.9: Konzentrationsabnahme von Acetophenon (40 mM) / <i>rac</i> -1-Phenylethanol (40 mM) in 18 % v v ⁻¹ 2-Propanol, KP _i -Puffer (100 mM, pH 7.0), Gesamtvolumen 100 mL, in einem Festbett aus Amberlite® XAD-7-HP Partikel (Flussrate 1 mL min ⁻¹).	50
Abbildung 4.10: Desorption von Acetophenon und <i>rac</i> -1-Phenylethanol mit verschiedenen Lösungsmitteln. 5 g Trägermaterial, Acetophenon (40 mM) / <i>rac</i> -1-Phenylethanol (40 mM)-Lösung (20 mL) in 18 % v v ⁻¹ 2-Propanol, KP _i -Puffer (100 mM, pH 7.0). Dreifache Extraktion mit jeweils 20 mL des jeweiligen Lösungsmittels.	51
Abbildung 4.11: Konzentrationsveränderung durch NADH-Adsorption. 3 g Trägermaterial, 1 mM NADH-Lösung in KP _i -Puffer (100 mM, pH 7.0) bzw. 18 % v v ⁻¹ 2-Propanol, KP _i -Puffer (100 mM, pH 7.0), Gesamtvolumen 20 mL.	52
Abbildung 4.12: Adsorptionsversuche aus Essigsäureethylester. Links: Alumosilicat, rechts: γ -Aluminiumoxid. 3 x 0.5 g Trägermaterial, Acetophenon (50 mM) / <i>rac</i> -1-Phenylethanol (50 mM)-Lösung bzw. 2,5-Hexandion (50 mM) / <i>rac/meso</i> -2,5-Hexandiol (50 mM)-Lösung in Essigsäureethylester (15 mL).	54
Abbildung 4.13: Satzreaktorversuch mit und ohne ISPR. Umsetzung von Acetophenon (80 mM) in 18 % v v ⁻¹ 2-Propanol, KP _i -Puffer (100 mM, pH 7.0), jeweils 88 U ADH-'A', Gesamtvolumen 25 mL.	55
Abbildung 4.14: Schema der stereoselektiven Oxidation von <i>meso</i> -2,5-Hexandiol.	56
Abbildung 4.15: Begasung der Acetophenon-Reduktion mit verschiedenen Biokatalysatorpräparationen.	57
Abbildung 5.1: Umsatz-Zeit-Verlauf der Reduktion von Acetophenon nach ¹ H-NMR / ¹ H-NMR-Spektren im Bereich von 1.8-2.7 ppm. Bedingungen: 0.2 U ADH-'A', 100 mM Acetophenon, 1 mM NADH, Reaktionsmedium: D ₂ O, 10 % v v ⁻¹ 2-Propanol. Gesamtvolumen 0.8 mL, Raumtemperatur.....	62
Abbildung 5.2: Umsatz-Zeit-Verlauf der Reduktion von Acetylfuran bestimmt durch ¹ H-NMR (links: lyophilisierte, partiell gereinigte Enzymlösung (0.2 U), rechts: lyophilisierte <i>E. coli</i> -AHD-'A'-Zellen (8.4 U)). Bedingungen: 100 mM Acetylfuran, 1 mM NADH,	

Reaktionsmedium: D ₂ O, 10 % v v ⁻¹ 2-Propanol. Gesamtvolumen 0.8 mL, Raumtemperatur.	63
Abbildung 5.3: 2D-Fluoreszenzspektrum während der ADH-'A'-katalysierten Reduktion von Acetophenon.	64
Abbildung 5.4: Schema zur Kalibration eines chemometrischen Modells.	65
Abbildung 5.5: Umsatz-Zeit-Verläufe der im BioView® durchgeführten Biotransformationen. Bedingungen: 9.3 U ADH-'A', 80 mM Acetophenon, 0.3 mM NADH, Reaktionsmedium: KP _i -Puffer (100 mM, pH 7.0, 18 % v v ⁻¹ 2-Propanol). Gesamtvolumen 12 mL, Raumtemperatur.	66
Abbildung 5.6: Bearbeitung der FT-MIR Spektren vor der Auswertung.	69
Abbildung 5.7: Zeitlicher Verlauf der FT-MIR Spektren während der Reduktion von Acetophenon.	70
Abbildung 5.8: Vergleich zwischen <i>offline</i> und <i>online</i> Bestimmung des Umsatzes der Acetophenon Reduktion in Toluol / 2-Propanol. Bedingungen: 400 mg <i>E. coli</i> -ADH-'A'-Zellen in 200 µL KP _i -Puffer (100 mM, pH 7.0, 100 mM NADH) rehydratisiert, 1 M (links) bzw. 274 mM (rechts) Acetophenon, Reaktionsmedium: Toluol, 10 % v v ⁻¹ 2-Propanol. Gesamtvolumen 20 mL, Reaktionstemperatur 30 °C.	71
Abbildung 5.9: Vergleich zwischen <i>offline</i> und <i>online</i> Bestimmung des Umsatzes der Acetophenon Reduktion in Phosphatpuffer / 2-Propanol. Bedingungen: 20 mL partiell gereinigte ADH-'A'-Enzymlösung 3.6 U mL ⁻¹ (links) 4.4 U mL ⁻¹ (rechts), 80 mM Acetophenon, Reaktionsmedium: KP _i -Puffer (100 mM, pH 7.0, 0.2 mM NADH, 18 % v v ⁻¹ 2-Propanol. Gesamtvolumen 50 mL, Reaktionstemperatur 30 °C.	72
Abbildung 6.1: Fließbild des Reaktoraufbaus.	74
Abbildung 6.2: Foto des Reaktorsystems.	75
Abbildung 6.3: Kontinuierliche Reduktion von Acetophenon (◆: gaschromatographisch bestimmter Umsatz / —: simulierter Umsatz).	77
Abbildung 6.4: Kontinuierliche Reduktion von Acetophenon (AP) (◆: gaschromatographisch bestimmter Umsatz / ●: Reaktordruck).	78
Abbildung 6.5: Schema der verwendeten Sinterplatte (links), Foto der eingedrückten Membran (rechts).	79
Abbildung 6.6: Kontinuierliche Reduktion von Acetophenon (◆: gaschromatographisch bestimmter Umsatz / ●: Reaktordruck / —: simulierter Umsatz).	80
Abbildung 7.1: Produktion von L- <i>tert</i> -Leucin mit immobilisiertem Cofaktor.	85
Abbildung 7.2: Optimierung der (S)-1-Phenylethanol-Produktion. Der Pfeil zeigt jeweils in Richtung steigender Verweilzeit ($\tau = 1, 5, 10, 20$ h).	86
Abbildung 7.3: Vergleich von Dead-End und Crossflow-Filtration.	87
Abbildung 7.4: Fließbild des Reaktors im technischen Maßstab.	88
Abbildung 7.5: Ansätze zur technischen Produktaufarbeitung chiraler Alkohole.	89
Abbildung 7.6: Kostenabschätzung der (S)-1-Phenylethanol-Produktion.	90

H Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Varianten der Proteindenaturierung.	12
Tabelle 3.1: Teilreaktionen der Substrat-gekoppelten Reduktion von Acetophenon.	24
Tabelle 3.2: Ermittelte kinetische Parameter.	26
Tabelle 3.3: Übersicht über die durchgeführten Stabilitätsmessungen.	40
Tabelle 4.1: Methoden der <i>in-situ</i> Produktabtrennung.	44
Tabelle 4.2: Verwendete Adsorbentien.	45
Tabelle 5.1: Spezifikationen der FT-MIR ATR-Fasersonde.	69
Tabelle 7.1: Erreichte Leistungsparameter des entwickelten Reaktors.	84
Tabelle 9.1: Konzentrationen der einzelnen Komponenten in den Aktivitätstests.	104
Tabelle 9.2: Bedingungen der Immobilisierung der ADH-'A' auf amino-funktionalisierte Träger.	106
Tabelle 9.3: Bedingungen der Umsetzungen im Enzym-Membran-Reaktor mit auf Nanodiamantpartikel immobilisierter ADH-'A'.	115
Tabelle 9.4: Bedingungen der Umsetzungen im Enzym-Membran-Reaktor mit partiell gereinigter Enzymlösung und integrierter <i>in-situ</i> Coproduktabtrennung.	117
Tabelle 9.5: Verwendete Methoden für die GC-Analytik.	119
Tabelle 9.6: Übersicht über die durchgeführten Stabilitätsmessungen.	123

I Literaturverzeichnis

Abril 1982

Abril O, Whitesides GM (1982) *Hybrid organometallic/enzymatic catalyst systems: regeneration of NADH using dihydrogen*. Journal of the American Chemical Society 104: 1552-1554.

Andersson 1982

Andersson L, Mosbach K (1982) *Alcohol dehydrogenase from horse liver by affinity chromatography*. Methods in Enzymology 89: 435-445.

Andersson 2000

Andersson CA, Bro R (2000) *The N-way toolbox for MATLAB*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 52: 1-4.

Arica 2000

Arica MY, Yavuz H, Patir S, Denizli A (2000) *Immobilization of glucoamylase onto spacer-arm attached magnetic poly(methylmethacrylate) microspheres: characterization and application to a continuous flow reactor*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 11: 127-138.

Bakos 1985

Bakos J, Toth I, Heil B, Marko L (1985) *A facile method for the preparation of 2,4-bis (diphenylphosphino)pentane (BDPP) enantiomers and their application in asymmetric hydrogenation*. Journal of Organometallic Chemistry 279: 23-29.

Bergmeyer 1977

Bergmeyer HU, Gawehn K (1977) *Grundlagen der enzymatischen Analyse*. Verlag Chemie GmbH: New York, Weinheim.

Beyeler 1981

Beyeler W, Einsele A, Fiechter A (1981) *On-line measurements of culture fluorescence: Method and application*. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology 13: 10-14.

Biade 1992

Biade AE, Bourdillon C, Lava JM, Mairesse G, Moiroux J (1992) *Complete conversion of L-lactate into D-lactate. A generic approach involving enzymatic catalysis, electrochemical oxidation of NADH, and electrochemical reduction of pyruvate*. Journal of the American Chemical Society 114: 893-897.

Biselli 2002

Biselli M, Kragl U, Wandrey C (2002) *Reaction engineering for enzyme-catalyzed biotransformations* in: Drauz K, Waldmann H (Hrsg.) Enzyme catalysis in organic synthesis Volume I, 2. Auflage. VCH-Wiley: Weinheim.

Blacklock 1993

Blacklock TJ, Sohar P, Butcher JW, Lamanec T, Grabowski EJJ (1993) *An enantioselective synthesis of the topically-active carbonic anhydrase inhibitor MK-0507: 5,6-dihydro-(S)-4-(ethylamino)-(S)-6-methyl-4H-thieno[2,3-b]thiopyran-2-sulfonamide-7,7-dioxide hydrochloride*. The Journal of Organic Chemistry 58: 1672-1679.

Bommarius 1995

Bommarius AS, Schwarm M, Stingl K, Kottenhahn M, Huthmacher K, Drauz K (1995) *Synthesis and use of enantiomerically pure tert-leucine*. *Tetrahedron Asymmetry* 6: 2851-2888.

Bommarius 2004

Bommarius AS, Riebel BR (2004) *Biocatalysis - fundamentals and applications*. VCH-Wiley: Weinheim.

Bornscheuer 2003

Bornscheuer UT (2003) *Enzymimmobilisierung: ein Weg zu verbesserten Biokatalysatoren*. *Angewandte Chemie* 115: 3458-3459.

Bornscheuer 2006

Bornscheuer UT, Kazlauskas RJ (2006) *Hydrolases in organic synthesis*, 2. Auflage. VCH-Wiley: Weinheim.

Bradford 1976

Bradford, MM (1976) *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Analytical Biochemistry* 72, 1-2: 248-254.

Brändén 1980

Brändén CI, Eklund H (1980) *Structure and mechanism of liver alcohol dehydrogenase, lactate dehydrogenase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. *Experientia* 36: 40-84.

Breuer 2004

Breuer M, Ditrich K, Habicher T, Hauer B, Keßeler M, Stürmer R, Zelinski T (2004) *Industrielle Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven Zwischenprodukten*. *Angewandte Chemie* 116: 806-843.

Briechle 2006

Briechle S, Howaldt M, Röthig T, Liese A (2006) *Enzymatische Prozesse* in: Chmiel H (Hrsg.) *Bioprozesstechnik*, 2. Auflage. Elsevier GmbH: München.

Bromba 1981

Bromba MUA, Ziegler H (1981) *Application hints for Savitzky-Golay digital smoothing filters*. *Analytical Chemistry* 53: 1583-1586.

Brown 1902

Brown AJ (1902) *Enzyme action*. *Journal of the Chemical Society, Transactions* 81: 373-388.

Bruhn 1995

Bruhn H, Pohl M, Grötzinger J, Kula MR (1995) *The replacement of Trp392 by alanine influences the decarboxylase/carboligase activity and stability of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis**. *European Journal of Biochemistry* 234: 650-655.

Brunauer 1938

Brunauer S, Emmett PH, Teller E (1938) *Adsorption of gases in multimolecular layers*. *Journal of the American Chemical Society* 60: 309-319.

Bückmann 1989

Bückmann AF, Carrea G (1989) *Synthesis and application of water-soluble macromolecular derivatives of the redox coenzymes NAD(H), NADP(H) and FAD* in: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 39: 97-152. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg.

Buque-Taboada 2006

Buque-Taboada EM, Straathof AJJ, Heijnen JJ, van der Wielen LAM (2006) *In situ product recovery (ISPR) by crystallization: basic principles, design, and potential applications in whole-cell biocatalysis*. *Applied Microbiology Biotechnology* 71: 1-12.

Burk 1991

Burk MJ (1991) *C₂-symmetric bis(phospholanes) and their use in highly enantioselective hydrogenation reactions*. *Journal of the American Chemical Society* 113: 8518-8519.

Burk 1993

Burk MJ, Feaster JL, Nugent WA, Harlow RL (1993) *Preparation and use of C₂-symmetric bis(phospholanes): production of α -amino acid derivatives via highly enantioselective hydrogenation reactions*. *Journal of the American Chemical Society* 115: 10125-10138.

Burk 1995

Burk MJ, Gross MF, Martinez JP (1995) *Asymmetric catalytic synthesis of β -branched amino acids via highly enantioselective hydrogenation reactions*. *Journal of the American Chemical Society* 117: 9375-9376.

Cao 2001

Cao L, Langen LM, Janssen MHA, Sheldon RA (2001) *Crosslinked enzyme aggregates*. EP 1 008 887 A1.

Cao 2005

Cao L (2005) *Immobilised enzymes: science or art?* *Current Opinion in Chemical Biology* 9: 217-226.

Chang 2008

Chang A, Scheer M, Grote A, Schomburg I, Schomburg D (2008) *BRENDA, AMENDA and FRENDA the enzyme information system: new content and tools in 2009*. *Nucleic Acids Research* 37: D588-D592.

Chartrain 1999

Chartrain M, Roberge C, Chung J, McNamara J, Zhao D, Olewinski R, Hunt G, Salmon P, Roush D, Yamazaki S, Wang T, Grabowski E, Buckland B, Greasham R (1999) *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* MY 1833*. *Enzyme and Microbial Technology* 25: 489-496.

Chartrain 2001

Chartrain M, Greasham R, Moore J, Reider P, Robinson D, Buckland B. (2001) *Asymmetric bioreductions: application to the synthesis of pharmaceuticals*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11: 503-512.

Cheetham 1994

Cheetham PSJ (1994) *Case studies in applied biocatalysis – from ideas to products* in: Cabral JMS, Best D, Boross L, Tramper J (Hrsg.) *Applied biocatalysis*: 47-108. Harwood Academic Publishers GmbH: Chur.

Chenault 1986

Chenault HK, Whitesides GM (1986) *Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 14: 147-197.

Cheng 2002

Cheng Y-X, Zhou J, Deng S-M, Tan N-H (2002). *New norsesquiterpenoides from Cucubalus baccifer*. *Planta Medica* 68: 91-94.

Chmiel 2006

Chmiel H (2006) *Bioreaktoren* in: Chmiel H (Hrsg.) *Bioprozesstechnik*, 2. Auflage. Elsevier GmbH: München.

Christen 2009

Christen DS (2009) *Praxiswissen der chemischen Verfahrenstechnik: Handbuch für Chemiker und Verfahreningenieure*, 2. Auflage. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg.

Corey 1987

Corey EJ, Bakshi RK, Shibata S, Chen CP, Singh VK (1987) *A stable and easily prepared catalyst for the enantioselective reduction of ketones. Applications to multistep syntheses*. *Journal of the American Chemical Society* 109: 7925-7926.

Cornish-Bowden 2004

Cornish-Bowden A (2004) *Fundamentals of enzyme kinetics*, 3. Auflage. Portland Press Ltd.: London.

Dadd 2000

Dadd MR, Sharp DCA, Pettman AJ, Knowles CJJ (2000) *Real-time monitoring of nitrile bio-transformations by mid-infrared spectroscopy*. *Journal of Microbiological Methods* 41: 69-75.

Danzer 2001

Danzer K, Hobert H, Fischbacher C, Jagemann K-U (2001) *Chemometrik: Grundlagen und Anwendungen*. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg.

Daußmann 2006

Daußmann T, Hennemann HG, Rosen TC (2006) *Enzymatische Technologien zur Synthese chiraler Alkohol-Derivate*. *Chemie Ingenieur Technik* 78: 249-255.

Decagny 1998

Decagny B, Roblot C, Ergon F, Sarazin C, Barbotin J-N, Séguin J-P (1998) *¹H-NMR on line monitoring of water activity during lipase catalysed esterification*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1387: 129-135.

Degenring 2004

Degenring D, Schröder I, Wandrey C, Liese A, Greiner L (2004) *Resolution of 1,2-diols by enzyme-catalyzed oxidation with anodic, mediated cofactor regeneration in the extractive membrane reactor: gaining insight by adaptive simulation*. *Organic Process Research & Development* 8: 213-218.

de Gonzalo 2007a

de Gonzalo G, Lavandera I, Faber K, Kroutil W (2007) *Enzymatic reduction of ketones in "micro-aqueous" media catalyzed by ADH-A from Rhodococcus ruber*. *Organic Letters* 9: 2163-2166.

de Gonzalo 2007b

de Gonzalo G, Lavandera I, Durchschein K, Wurm D, Faber K, Kroutil W (2007) *Asymmetric biocatalytic reduction of ketones using hydroxyfunctionalised water-miscible ionic liquids as solvents*. *Tetrahedron: Asymmetry* 18: 2541-2546.

del Busto-Ramos 2008

del Busto-Ramos M, Budzik M, Corvalan C, Morgan M, Turco R, Nivens D, Applegate B (2008) *Development of an online biosensor for in situ monitoring of chlorine dioxide gas disinfection efficacy*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78: 573-580.

Demir 1999

Demir AS, Dünwald T, Iding H, Pohl M, Müller M (1999) *Asymmetric benzoin reaction catalyzed by benzoylformate decarboxylase*. *Tetrahedron: Asymmetry* 10: 4769-4774.

Doering 1950

Doering WE, Young RW (1950) *Partially asymmetric Meerwein-Ponndorf-Verley reductions*. *Journal of the American Chemical Society* 72: 631.

Drewke 1988

Drewke C, Ciriacy M (1988) *Overexpression, purification and properties of alcohol dehydrogenase IV from Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta* 950: 54-60.

Edegger 2006a

Edegger K, Gruber CC, Poessl TM, Wallner SR, Lavandera I, Faber K, Niehaus F, Eck J, Oehrlin R, Hafner A, Kroutil W (2006) *Biocatalytic deuterium- and hydrogen-transfer using over-expressed ADH-'A': enhanced stereoselectivity and ²H-labeled chiral alcohols*. *Chemical Communications*: 2402-2404.

Edegger 2006b

Edegger K, Gruber CC, Faber K, Hafner A, Kroutil W (2006) *Optimization of reaction parameters and cultivation conditions for biocatalytic hydrogen transfer employing overexpressed ADH-'A' from Rhodococcus ruber DSM 44541 in Escherichia coli*. *Engineering in Life Sciences* 6: 149-154.

Eklund 1976

Eklund H, Nordström B, Zeppezauer E, Söderlund G, Ohlsson I, Boiwe T, Sönderberg B-O, Tapia O, Brändén CI (1976) *Three-dimensional structure of horse liver alcohol dehydrogenase at 2.4 Å resolution*. *Journal of Molecular Biology* 102: 27-59.

Eklund 1984

Eklund H, Samama J-P, Jones TA (1984) *Crystallographic investigations of nicotinamide adenine dinucleotide binding to horse liver alcohol dehydrogenase*. *Biochemistry* 23: 5982-5996.

Eklund 1989

Eklund H (1989) *Coenzyme binding in alcohol dehydrogenase*. *Biochemical Society Transactions* 17: 293-296

Faber 2004

Faber K (2004) *Biotransformations in organic chemistry*, 5. Auflage. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg.

Fahrenfort 1961

Fahrenfort J (1961) *Attenuated total reflection : A new principle for the production of useful infra-red reflection spectra of organic compounds*. *Spectrochimica Acta* 17: 698-709.

Filho 2003

Filho MV, Stillger T, Müller M, Liese A, Wandrey C (2003) *Is logP a convenient criterion to guide the choice of solvents for biphasic enzymatic reactions?* *Angewandte Chemie* 115: 3101-3104.

Flitsch 2002

Flitsch S (2002) *Oxidation reactions* in: Drauz K, Waldmann H (Hrsg.) *Enzyme catalysis in organic synthesis Volume III*, 2. Auflage. VCH-Wiley: Weinheim.

Freeman 1993

Freeman A, Woodley JM, Lilly MD (1993) *In situ product removal as a tool for bioprocessing*. *Nature Biotechnology* 11: 1007-1012.

Freundlich 1907

Freundlich H (1907) *Über die Adsorption in Lösungen*. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 57: 385-470.

Friemel 1968

Friemel H, Peseke H, Kleist H, Brock J, Bienengraber V, Mücke D (1968) *Proteine aus Neurospora crassa*. *European Journal of Biochemistry* 6: 352-357.

Funabashi 2003

Funabashi K, Jachmann M, Kanai M, Shibasaki M (2003) *Multicenter strategy for the development of catalytic enantioselective nucleophilic alkylation of ketones: Me₂Zn addition to α -Ketoesters*. *Angewandte Chemie* 115: 5647-5650.

Ghazi 2005

Ghazi I, Gómez De Segura A, Fernández-Arrojo L, Alcalde M, Yates M, Rojas-Cervantes ML, Plou FJ, Ballesteros A (2005) *Immobilisation of fructosyltransferase from Aspergillus aculeatus on epoxy-activated Sepabeads EC for the synthesis of fructo-oligosaccharides*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 35: 19-27.

Gnas 2006

Gnas Y, Glorius F (2006) *Chiral auxiliaries – principles and recent Applications*. *Synthesis* 12: 1899-1930.

Goldberg 2005

Goldberg K (2005) Diplomarbeit: *Reaktionstechnische Untersuchungen enzymatisch katalysierter Transferhydrierungen*. Westfälische Wilhelms-Universität Münster.

Goldberg 2006

Goldberg K, Edegger K, Kroutil W, Liese A (2006) *Overcoming the thermodynamic limitation in asymmetric hydrogen transfer reactions catalyzed by whole cells*. *Biotechnology and Bioengineering* 95: 192-198.

Goldberg 2007a

Goldberg K, Schroer K, Lütz S, Liese A (2007) *Biocatalytic ketone reduction—a powerful tool for the production of chiral alcohols—part I: processes with isolated enzymes*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76: 237-248.

Goldberg 2007b

Goldberg K, Schroer K, Lütz S, Liese A (2007) *Biocatalytic ketone reduction—a powerful tool for the production of chiral alcohols—part II: whole-cell reductions*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76: 249-255.

Goldberg 2008

Goldberg K, Krueger A, Meinhardt T, Kroutil W, Mautner B, Liese A (2008) *Novel immobilization routes for the covalent binding of an alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus ruber* DSM 44541*. *Tetrahedron: Asymmetry* 19: 1171-1173.

González 1989

González B, Vicuna R (1989) *Benzaldehyde lyase, a novel thiamine PP_i-requiring enzyme, from *Pseudomonas fluorescens* Biovar I*. *Journal of Bacteriology* 171: 2401-2405.

Graebner 2001

Graebner H (2001) Dissertation: *Kalorimetrische Bestimmung der katalytischen Aktivität immobilisierter Enzyme*. Technische Universität Bergakademie Freiberg.

Gray 1988

Gray CJ (1988) *Additives and enzyme stability*. *Biocatalysis and Biotransformation* 1: 187-196.

Greiner 2003

Greiner L, Müller DH, van den Ban ECD, Wöltlinger J, Wandrey C, Liese A (2003) *Membrane aerated hydrogenation: enzymatic and chemical homogeneous catalysis*. *Advanced Synthesis & Catalysis* 345: 679-683.

Guéron 1991

Guéron N, Plateau P, Decorps M (1991) *Solvent signal suppression in NMR*. *Progress in NMR Spectroscopy* 23: 135-209.

Haberland 2002a

Haberland J, Hummel W, Daußmann T, Liese A (2002) *New continuous production process for enantiopure (2R,5R)-hexanediol*. *Organic Process Research & Development* 6: 458-462.

Haberland 2002b

Haberland J, Kriegesmann A, Wolfram E, Hummel W, Liese A (2002) *Diastereoselective synthesis of optically active (2R,5R)-hexanediol*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58: 595-599.

Halling 1980

Halling PJ, Dunnill P (1980) *Magnetic supports for immobilized enzymes and bioaffinity adsorbents*. Enzyme and Microbial Technology 2: 2-10.

Harborn 1997

Harborn U, Xie B, Venkatesh R, Danielsson B (1997) *Evaluation of a miniaturized thermal biosensor for the determination of glucose in whole blood*. Clinica Chimica Acta 267: 225-237.

Hartbrich 1996

Hartbrich A, Schmitz G, Weuster-Botz D, de Graaf AA, Wandrey C (1996) *Development and application of a membrane cyclone reactor for in vivo NMR spectroscopy with high microbial cell densities*. Biotechnology and Bioengineering 51: 624-635.

Henri 1902

Henri V (1902). *Lois generales de l'action des diastases*. Academy of Sciences Paris 135: 916-919.

Hickel 1996

Hickel A, Gradnig G, Griengl H, Schall M, Sterk H (1996) *Determination of the time course of an enzymatic reaction by ^1H NMR spectroscopy: hydroxynitrile lyase catalysed transhydrocyanation*. Spectrochimica Acta Part A 52: 93-96.

Hilt 1997

Hilt G, Jarbawi T, Heineman WR, Steckhan E (1997) *An analytical study of the redox behavior of 1,10-phenanthroline-5,6-dione, its transition-metal complexes, and its N-monomethylated derivative with regard to their efficiency as mediators of NAD(P)^+ regeneration*. Chemistry-A European Journal 3: 79-88.

Hilterhaus 2006

Liese A, Hilterhaus L, Howaldt M, Chmiel H (2006) *Enzymkinetik* in: Chmiel H (Hrsg.) Bioproszesstechnik, 2. Auflage. Elsevier GmbH: München.

Hilterhaus 2007

Hilterhaus L, Liese A (2007) *Building blocks* in: Ulber R, Sell D (Hrsg.) White biotechnology 105: 133-173. Elsevier GmbH: München.

Hilterhaus 2008

Hilterhaus L, Minow B, Müller J, Berheide M, Quitmann H, Katzer M, Thum O, Antranikian G, Zeng AP, Liese A (2008) *Application of sepabeads in different reactor setups on preparative scale*. Journal of Bioprocess and Biosystems Engineering 31: 163-171.

Hollmann 2004

Hollmann F, Schmid A (2004) *Electrochemical regeneration of oxidoreductases for cell-free biocatalytic redox reactions*. Biocatalysis and Biotransformation 22: 63-88.

Hollmann 2006

Hollmann F, Kleeb A, Otto K, Schmid A (2006) *Corrigendum to "coupled chemoenzymatic transfer hydrogenation catalysis for enantioselective reduction and oxidation reactions"*. Tetrahedron Asymmetry 17: 867-868.

Holt 1996a

Holt RA (1996) *Microbial asymmetric reduction in the synthesis of a drug intermediate*. *Chimica oggi* 14: 17-20.

Holt 1996b

Holt RA, Stuart RR (1996) *Process for microbial reduction producing 4(S)-hydroxy-6(S)-methyl-thienopyran derivatives*. US 5,580,764.

Houen 2005

Houen G, Struve C, Søndergaard R, Friis T, Anthoni U, Nielsen PH, Christophersen C, Petersen BO, Duus JØ (2005) *Substrate specificity of the bovine serum amine oxidase and in situ characterisation of aminoaldehydes by NMR spectroscopy*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13: 3783-3796.

Hummel 1989

Hummel W, Kula MR (1989) *Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds*. *European Journal of Biochemistry* 184: 1-13.

Hummel 1999

Hummel W, Riebel B (1999) *Alcohol dehydrogenase and its use for the enzymatic production of chiral hydroxy compounds*. US 6,225,099 B1.

Hummel 2000

Hummel W, Liese A, Wandrey C (2000) *Process for reducing keto-group containing compounds*. EP 1 067 195 A2.

Hummel 2003

Hummel W, Abokitse K, Drauz K, Rollmann C, Gröger H (2003) *Towards a large-scale asymmetric reduction process with isolated enzymes: expression of an (S)-alcohol dehydrogenase in E. coli and studies on the synthetic potential of this biocatalyst*. *Advanced Synthesis & Catalysis* 345: 153-159.

Iding 2000

Iding H, Dünwald T, Greiner L, Liese A, Müller M, Siegert P, Grötzinger J, Demir AS, Pohl M (2000) *Benzoylformate decarboxylase from Pseudomonas putida as stable catalyst for the synthesis of chiral 2-hydroxy ketones*. *Chemistry-A European Journal* 6: 1483-1495.

Ikariya 2007

Ikariya T, Blacker J *Asymmetric Transfer (2007) Hydrogenation of ketones with bifunctional transition metal-based molecular catalysts*. *Accounts of Chemical Research* 40: 1300-1308.

Jaeger 2002

Jaeger K-E, Eggert T (2002) *Lipases for biotechnology*. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 390-397.

Johannes 2007

Johannes TW, Woodyer RD, Zhao H (2007) *Efficient regeneration of NADPH using an engineered phosphite dehydrogenase*. *Biotechnology and Bioengineering* 96: 18-26.

Jones 1972

Jones JB, Sneddon DW, Higgins W, Lewis A (1972) *Preparative-scale reductions of cyclic ketone and aldehyde substrates of horse liver alcohol dehydrogenase with in situ sodium dithionite recycling of catalytic amounts of NAD*. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications: 856-857.

Julliard 2004

Julliard M, Le Petit J, Ritz P (2004) *Regeneration of NAD⁺ cofactor by photosensitized electron transfer in an immobilized alcohol dehydrogenase system*. Biotechnology and Bioengineering 28: 1774-1779.

Kagan 1988

Kagan H, Fiaud J (1988) *Kinetic Resolution* in: Eliel EL, Wilen SH (Hrsg.) Topics in stereochemistry 18: 249-330. John Wiley & Sons, Inc.: New York.

Kandelbauer 2008

Kandelbauer A, Kessler W, Kessler RW (2008) *Online UV-visible spectroscopy and multivariate curve resolution as powerful tool for model-free investigation of laccase-catalysed oxidation*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 390: 1303-1315.

Kara 2009

Kara S, Anton F, Solle D, Neumann M, Scheper T, Liese A (2009) *Fluorescence spectroscopy as a novel method for on-line analysis of biocatalytic C-C bond formations*. Journal of Molecular Biocatalysis B: Enzymatic, submitted.

Karos 2001

Karos M, Althöfer H, Kröger B, Revuelta Doval JL (2001) *New polynucleotide sequences from Ashbya gossypii, useful for increasing resistance to stress in A. gossypii, particularly for improving production of Vitamin B2*. DE 101 33 372 A1.

Kessler 2006a

Kessler RW (2006) *Strategien für wissensbasierte Produkte und Verfahren* in: Kessler RW (Hrsg.) Prozessanalytik: Strategien und Fallbeispiele aus der industriellen Praxis. VCH-Wiley: Weinheim.

Kessler 2006b

Kessler RW (2006) *Grundlagen wichtiger Prozessanalytischer Methoden* in: Kessler RW (Hrsg.) Prozessanalytik: Strategien und Fallbeispiele aus der industriellen Praxis. VCH-Wiley: Weinheim.

Kim 1988

Kim MJ, Whitesides GM (1988) *L-Lactate dehydrogenase: substrate specificity and use as a catalyst in the synthesis of homochiral 2-hydroxy acids*. Journal of the American Chemical Society 110: 2959-2964.

Kitamura 1988

Kitamura M, Ohkuma T, Takaya H, Noyori R (1988) *A practical asymmetric synthesis of carnitine*. Tetrahedron Letters 29: 1555-1556.

Kirk 2002

Kirk O, Christensen MW (2002) *Lipases from candida antarctica: unique biocatalysts from a unique origin*. Organic Process Research & Development 6: 446-451.

Kizaki 2001

Kizaki N, Yasohara Y, Hasegawa J, Wada M, Kataoka M, Shimizu S (2001) *Synthesis of optically pure ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate by Escherichia coli transformant cells coexpressing the carbonyl reductase and glucose dehydrogenase genes*. Applied Microbiology and Biotechnology 55: 590-595.

Klibanov 1980

Klibanov AM, Puglisi AV (1980) *The regeneration of coenzymes using immobilized hydrogenase*. Biotechnology Letters 2: 445-450.

Kluger 2008

Kluger R, Tittmann K (2008) *Thiamin diphosphate catalysis: enzymic and nonenzymic covalent intermediates*. Chemical Reviews 108: 1797-1833.

Knowles 2002

Knowles WS (2002) *Asymmetrische Hydrierungen (Nobel-Vortrag)*. Angewandte Chemie 114, 2096-2107.

Kobayashi 2001

Kobayashi Y, Kumar GB, Kurachi T, Acharya HP, Yamazaki T, Kitazume T (2001) *Furan ring oxidation strategy for the synthesis of macrosphelides A and B*. The Journal of Organic Chemistry 66: 2011-2018.

Koneracká 1999

Koneracká M, Kopčanský P, Antalík M, Timko M, Ramchand CN, Lobo D, Mehta RV, Upadhyay RV (1999) *Immobilization of proteins and enzymes to fine magnetic particles*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials 201: 427-430.

Kosjek 2004

Kosjek B, Stampfer W, Pogorevc M, Goessler W, Faber K, Kroutil W (2004) *Purification and characterization of a chemotolerant alcohol dehydrogenase applicable to coupled redox reactions*. Biotechnology and Bioengineering 86: 55-62.

Kragl 1992

Kragl U, Vasic-Racki D, Wandrey C (1992) *Kontinuierliche Reaktionsführung mit löslichen Enzymen*. Chemie Ingenieur Technik 64: 499-509.

Kragl 1996

Kragl U, Vasic-Racki D, Wandrey C (1996) *Continuous production of L-tert-leucine in series of two enzyme membrane reactors*. Bioprocess and Biosystems Engineering 14: 291-297.

Kragl 1999

Kragl U, Liese A (1999) *Biotransformations, engineering aspects* in: Flickinger MC, Drew SW (Hrsg.) The encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis & bioseparation. John Wiley & Sons: New York.

Krüger 2006a

Krüger A (2006) *Hard and soft: biofunctionalized diamond*. Angewandte Chemie International Edition 45: 6426-6427.

Krüger 2006b

Krüger A, Liang Y, Jarre G, Stegk J (2006) *Surface functionalisation of detonation diamond suitable for biological applications*. Journal of Materials Chemistry 16: 2322-2328.

Kruse 1996

Kruse W, Kragl U, Wandrey C (1996) *Verfahren zur kontinuierlichen enzymkatalytischen Gewinnung hydrophober Produkte*. DE 44 36 149 A1.

Kula 2000

Kula MR, Kragl U (2000) *Dehydrogenases in the synthesis of chiral compounds* in: Patel RN (Hrsg.) Stereoselective biocatalysis: 839-866. Marcel Dekker: New York-Basel.

Kurlemann 2004

Kurlemann N, Liese A (2004) *Immobilization of benzaldehyde lyase and its application as a heterogeneous catalyst in the continuous synthesis of a chiral 2-hydroxy ketone*. Tetrahedron Asymmetry 15: 2955-2958.

Laemmli 1970

Laemmli, UK (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 227: 680-685.

Lagaly 2006

Lagaly G, Ogawa M, Dékány I (2006) *Clay mineral organic interactions* in: Bergaya F, Theng BKG, Lagaly G (Hrsg.) Handbook of clay sciences, Developments in Clay Science 1: 309-377. Elsevier Ltd.: Oxford, Amsterdam.

Langmuir 1933

Langmuir I (1933) *Oberflächenchemie (Nobel-Vortrag)*. Angewandte Chemie 46: 719-733.

Larrow 2003

Larrow JF, Hemberger KE, Jasmin S, Kabir H, Morel P (2003) *Commercialization of the hydrolytic kinetic resolution of racemic epoxides: toward the economical large-scale production of enantiopure epichlorohydrin*. Tetrahedron: Asymmetry 14: 3589-3592.

Lee 1985

Lee LG, Whitesides GM (1985) *Enzyme-catalyzed organic synthesis: a comparison of strategies for in situ regeneration of NAD from NADH*. Journal of the American Chemical Society 107: 6999-7008.

Leskovac 2002

Leskovac V, Trivić S, Peričin D (2002) *The three zinc-containing alcohol dehydrogenases from baker's yeast, Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Research 2: 481-494.

Li 1991

Li J-K, Asali EC, Humphrey AE, Horvath JJ (1991) *Monitoring cell concentration and activity by multiple excitation fluorometry*. Biotechnology Progress 7: 21-27.

Liese 1998

Liese A, Zelinski T, Kula MR, Kierkels H, Karutz M, Kragl U, Wandrey C (1998) *A novel reactor concept for the enzymatic reduction of poorly soluble ketones*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 4: 91-99.

Liese 2004

Liese A, Lütz S (2004) *Nonimmobilized biocatalysts in industrial fine chemical synthesis* in: Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken.

Liese 2006

Liese A, Seelbach C, Wandrey C (2006) *Industrial biotransformations*, 2. Auflage. VCH-Wiley: Weinheim.

Lillo 2007

Lillo V, Fernández E, Segarra AM (2007) *Catalytic asymmetric hydroboration of heterofunctional allylic substrates: an efficient heterogenized version*. Tetrahedron: Asymmetry 18: 911-914.

Lineweaver 1934

Lineweaver H, Burk D (1934) *The determination of enzyme dissociation constants*. Journal of the American Chemical Society 56: 658-666.

Liu 2007

Liu W, Wang P (2007) *Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis*. Biotechnology Advances 25: 369-384.

Lipnizki 1999

Lipnizki F, Field RW, Ten P-K (1999) *Pervaporation-based hybrid process: a review of process design, applications and economics*. Journal of Membrane Science 153: 183-210.

Lütz 2006

Lütz S (2006) *Transition metal catalyzed regeneration of nicotineamide cofactors* in: de Vries JG, Elsevier CJ (Hrsg.) *The handbook of homogeneous hydrogenation 3*: 1471-1482. VCH-Wiley: Weinheim.

Lye 1999

Lye GJ, Woodley JM (1999) *Application of in situ product-removal techniques to biocatalytic processes*. Trends in Biotechnology 17: 395-402.

Macauley-Patrick 2003

Macauley-Patrick S, Arnold SA, McCarthy B, Harvey LM, McNeil B (2003) *Attenuated total reflectance fourier transform mid-infrared spectroscopic quantification of sorbitol and sorbose during a Gluconobacter biotransformation process*. Biotechnology Letters 25: 257-260.

Maret 1979

Maret W, Anderson I, Dietrich H, Schneider-Bernlöhr H, Einarsson R, Zeppezauer M (1979) *Site-specific substituted cobalt(II) horse liver alcohol dehydrogenases*. European Journal of Biochemistry 98: 501-512.

Mariey 2001

Mariey L, Signolle JP, Amiel C, Travert J (2001) *Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics*. *Vibrational Spectroscopy* 26: 151-159.

Mateo 2000

Mateo C, Abian O, Fernández-Lafuente R, Guisan JM (2000) *Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment*. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 509-515.

Mateo 2002

Mateo C, Abian O, Fernández-Lorente G, Pedroche J, Fernández-Lafuente R, Guisan JM (2002) *Epoxy sepabeads: a novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment*. *Biotechnology Progress* 18: 629-634.

McWhirter 1990

McWhirter RB, Klapper MH (1980) *Semiquinone radicals of methylamine dehydrogenase, methoxatin, and related o-quinones: a pulse radiolysis study*. *Biochemistry* 29: 6919-6926.

Meerwein 1925

Meerwein H, Schmidt R (1925) *Ein neues Verfahren zur Reduktion von Aldehyden und Ketonen*. *Justus Liebig's Annalen der Chemie*. 444: 221-238.

Mertens 2003

Mertens R, Greiner L, van den Ban ECD, Haaker HBCM, Liese A (2003) *Practical applications of hydrogenase I from Pyrococcus furiosus for NADPH generation and regeneration*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 24-25: 39-52.

Mertens 2004

Mertens R, Liese A (2004) *Biotechnological application of hydrogenases*. *Current Opinion in Biotechnology* 15: 343-348.

Menzel 2004

Menzel A, Werner H, Altenbuchner J, Gröger H (2004) *From enzymes to "designer bugs" in reductive amination: a new process for the synthesis of L-tert-leucine using a whole cell-catalyst*. *Engineering in Life Sciences* 4: 573-576.

Michaelis 1913

Michaelis L, Menten ML (1913). *The kinetics of the inversion effect*. *Biochemische Zeitschrift*, 49, 333-369.

Miller 1983

Miller AW, Robyt JF (1983) *Sodium cyanoborohydride in the immobilization of proteins to glutaraldehyde-activated aminoalkyl silica*. *Biotechnology and Bioengineering* 25: 2795-2800.

Moteki 2006

Moteki SA, Wu D, Chandra KL, Reddy DS, Takacs JM (2006) *TADDOL-derived phosphites and phosphoramidites for efficient rhodium-catalyzed asymmetric hydroboration*. *Organic Letters* 8: 3097-3100.

Mozhaev 1990

Mozhaev VV, Melik-nubarov NS, Šikšnis V, Martinek K (1990) *Strategy for stabilizing enzymes part two: increasing enzyme stability by selective chemical modification*. Biocatalysis and Bio-transformation 3: 189-196.

Mulder 1983

Mulder MHV, Oude Hendrikman J, Hegeman H, Smolders CA (1983) *Ethanol-water separation by pervaporation*. Journal of Membrane Science 16: 269-284.

Naumann 1991

Naumann D, Helm D, Labischinski H (1991) *Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy*. Nature 351: 81-82.

Neuhauser 1998

Neuhauser W, Steininger M, Haltrich D, Kulbe KD, Nidetzky B (1998) *A pH-controlled fed-batch process can overcome inhibition by formate in NADH-dependent enzymatic reductions using formate dehydrogenase-catalyzed coenzyme regeneration*. Biotechnology and Bioengineering 60: 278-282.

Neumann 2009

Neumann M, Goldberg K, Kara S, Müller J, Liese A (2009) *Online monitoring of biotransformations in aqueous, organic and solvent-free media by FT-IR spectroscopy and chemometrics*. Eingereicht.

Nidetzky 1996

Nidetzky B, Neuhauser W, Haltrich D, Kulbe KD (1996) *Continuous enzymatic production of xylitol with simultaneous coenzyme regeneration in a charged membrane reactor*. Biotechnology and Bioengineering 52: 387-396.

Northrup 2002

Northrup AB, MacMillan DWC (2002) *The first direct and enantioselective cross-aldol reaction of aldehydes*. Journal of the American Chemical Society 124: 6798-6799.

Oliveira 2008

Oliveira FRP, Goldberg K, Liese A, Hitzmann B (2008) *Chemometric modelling for process analyzers using just a single calibration sample*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 94: 118-122.

Ozawa 2007

Ozawa M, Inaguma M, Takahashi M, Kataoka F, Krueger A, Osawa E (2007) *Preparation and behavior of brownish, clear nanodiamond colloids*. Advanced Materials 19: 1201-1206.

Patel 1992

Patel RN, McNamee CM, Szarka LJ (1992) *Enantioselective enzymatic acetylation of racemic [4-[4 α , 6 β (E)]]-6-[4,4-bis(4-fluorophenyl)-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)-1,3-butadienyl]-tetrahydro-4-hydroxy-2H-pyran-2-one*. Applied Microbiology and Biotechnology 38: 56-60.

Patel 1993a

Patel RN, McNamee CG, Banerjee A, Szarka LJ (1993) *Stereoselective microbial or enzymatic reduction of 3,5-dioxo esters to 3-hydroxy-5-oxo, 3-oxo-5-hydroxy, and 3,5-dihydroxy esters*. EP 0 569 998 A2.

Patel 1993b

Patel RN, Banerjee A, McNamee CG, Brzozowski D, Hanson RL, Szarka LJ (1993) *Enantioselective microbial reduction of 3,5-dioxo-6-(benzyloxy) hexanoic acid, ethyl ester*. *Enzyme and Microbial Technology* 15: 1014-1021.

Patel 1994

Patel RN, Banerjee A, Ko RY, Howell JM, Li WS, Comezoglu FT, Partyka RA, Szarka FT (1994) *Enzymic preparation of (3R-cis)-3-(acetyloxy)-4-phenyl-2-azetidinone: a taxol side-chain synthon*. *Biotechnology Applied Biochemistry* 20: 23-33.

Peck 1990

Peck MW, Chynoweth DP (1990) *On-line monitoring of the methanogenic fermentation by measurement of culture fluorescence*. *Biotechnology Letters* 12: 17-22.

Pelton 2002

Pelton R (2002) *A review of antifoam mechanisms in fermentation*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 29: 149-154.

Pedersen 1993

Pedersen S (1993) *Industrial aspects of immobilized glucose isomerase* in: Tanaka A, Tosa T, Kobayashi T (Hrsg.) *Industrial application of immobilized biocatalysts*. Marcel Dekker, Inc.: New York.

Persson 1994

Persson B, Zigler, Jr. JS, Jörnvall H (1994) *A super-family of medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR). Sub-lines including ζ-crystallin, alcohol and polyol dehydrogenases, quinone oxidoreductases, enoyl reductases, VAT-1 and other proteins*. *European Journal of Biochemistry* 226: 15-22.

Pokorny 1999

Pokorny D, Brecker L, Pogorevc M, Steiner W, Griengl H, Kappe T, Ribbons DW (1999) *Proton-nuclear magnetic resonance analyses of the substrate specificity of a β-ketolase from Pseudomonas putida, acetopyruvate hydrolase*. *Journal of Bacteriology* 181: 5051-5059.

Ponndorf 1926

Ponndorf W (1926) *Der reversible Austausch der Oxydationsstufen zwischen Aldehyden oder Ketonen einerseits und primären oder sekundären Alkoholen andererseits*. *Angewandte Chemie* 39: 138-143.

Přenosil 2002

Přenosil JE, Kut ÖM, Dunn IJ, Heinzle E (2002) *Immobilized biocatalysts* in: *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken.

Puxty 2008

Puxty G, Neuhold Y-M, Jecklin M, Ehly M, Gemperline P, Nordon A, Littlejohn D, Basford JK, De Cecco M, Hungerbühler K (2008) *Multivariate kinetic hard-modelling of spectroscopic data: a comparison of the esterification of butanol by acetic anhydride on different scales and with different instruments*. *Chemical Engineering Science* 63: 4800-4809.

Raunio 1971

Raunio R, Lilius EM (1971) *Effect of dithionite on enzyme activities in vivo*. *Enzymologia* 40: 360-368.

Reichardt 2003

Reichardt C (2003) *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, VCH-Wiley: Weinheim.

Rickus 2002

Rickus JL, Tobin AJ, Zink JI, Dunn B (2002) *Photochemical enzyme co-factor regeneration: towards continuous glutamate monitoring with a sol-gel optical biosensor*. *Materials Research Society Symposium Proceedings* 723: 155-160.

Roychondhury 2006

Roychondhury P, Harvey LM, McNeil B (2006) *At-line monitoring of ammonium, glucose, methyl oleate and biomass in a complex antibiotic fermentation process using attenuated total reflectance-mid-infrared (ATR-MIR) spectroscopy*. *Analytica Chimica Acta* 561: 218-224.

Sattler 2001

Sattler K (2001) *Thermische Trennverfahren: Grundlagen, Auslegung, Apparate*, 3. Auflage. VCH-Wiley: Weinheim.

Schindler 1998

Schindler R, Lendl B, Kellner R (1998) *Simultaneous determination of α -amylase and amyloglucosidase activities using flow injection analysis with fourier transform infrared spectroscopic detection and partial least-squares data treatment*. *Analytica Chimica Acta* 366: 35-43.

Schmid 1979

Schmid RD (1979) *Stabilized soluble enzymes* in: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 12: 41-118. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg.

Schmid 2001

Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B (2001) *Industrial biocatalysis today and tomorrow*. *Nature* 409: 258-268.

Schnepfle 2006

Schnepfle H (2006) *Mess-und Regeltechnik an Bioreaktoren* in: Chmiel H (Hrsg.) *Bioprozesstechnik*, 2. Auflage. Elsevier GmbH: München.

Schröder 2003

Schröder I, Steckhan E, Liese A (2003) *In situ NAD⁺ regeneration using 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) as an electron transfer mediator*. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 541: 109-115.

Schroer 2007

Schroer K, Tacha E, Lütz S (2007) *Process intensification for substrate-coupled whole cell ketone reduction by in situ acetone removal*. *Organic Process Research & Development* 11: 836-841.

Seelbach 1996

Seelbach K, Riebel B, Hummel W, Kula MR, Tishkov VI, Egorov AM, Wandrey C, Kragl U (1996) *A novel, efficient regenerating method of NADPH using a new formate dehydrogenase*. Tetrahedron Letters 31: 1377-1380.

Sheldon 2007

Sheldon RA (2007) *Enzyme immobilization: the quest for optimum performance*. Advanced Synthesis & Catalysis 349: 1289-1307.

Shriver-Lake 2002

Shriver-Lake LC, Gammeter WB, Bang SS, Pazirande M (2002) *Covalent binding of genetically engineered microorganisms to porous glass beads*. Analytica Chimica Acta 470: 71-78.

Simon 1985

Simon H, Bader J, Gunther H, Neumann S, Thanos J (1985) *Chirale Verbindungen durch biokatalytische Reduktionen*. Angewandte Chemie 97: 541-555.

Snabe 2002

Snabe T, Petersen SB (2002) *Application of infrared spectroscopy (attenuated total reflection) for monitoring enzymatic activity on substrate films*. Journal of Biotechnology 95: 145-155.

Spangenberg 1999

Spangenberg P, Chiffolleau-Giraud V, André C, Dion M, Rabiller C (1999) *Probing the transferase activity of glycosidases by means of in situ NMR spectroscopy*. Tetrahedron: Asymmetry 10: 2905-2912.

Spohn 1994

Spohn U, van der Pol J, Eberhardt R, Joksch B, Wandrey C (1994) *An automated system for multichannel flow-injection analysis*. Analytica Chimica Acta 292: 281-295.

Stampfer 2002

Stampfer W, Kosjek B, Moitzi C, Kroutil W, Faber K (2002) *Biocatalytic asymmetric hydrogen transfer*. Angewandte Chemie International Edition 41: 1014-1017.

Stampfer 2003a

Stampfer W, Kosjek B, Faber K, Kroutil W (2003) *Biocatalytic asymmetric hydrogen transfer employing Rhodococcus ruber DSM 44541*. Journal of Organic Chemistry 68: 402-406.

Stampfer 2003b

Stampfer W, Kosjek B, Kroutil W, Faber K (2003) *On the organic solvent and thermostability of the biocatalytic redox system of Rhodococcus ruber DSM 44541*. Biotechnology and Bioengineering 81: 865-869.

Stark 2003

Stark D, von Stockar U (2003) *In situ product removal (ISPR) in whole cell biotechnology during the last twenty years* in: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 80: 149-175. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg.

Stärk 2002

Stärk E, Hitzmann B, Schügerl K, Scheper T, Fuchs C, Köster D, Märkl H (2002) *In-situ-fluorescence-probes: a useful tool for non-invasive bioprocess monitoring* in: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 74: 21-38. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg.

Stillger 2002

Stillger T, Bönitz M, Villela Filho M, Liese A (2002) *Überwindung von thermodynamischen Limitierungen in substratgekoppelten Cofaktorregenerierungsverfahren*. Chemie Ingenieur Technik 74: 1035-1039.

Steckhan 1990

Steckhan E, Herrmann S, Ruppert R, Thömmes J, Wandrey C (1990) *Kontinuierliche Erzeugung von NADH aus NAD⁺ und Formiat mit einem molekulargewichtsvergrößerten Homogenkatalysator in einem Membranreaktor*. Angewandte Chemie 102: 445-447.

Steckhan 1991

Steckhan E, Herrmann S, Ruppert R, Dietz E, Frede M, Spika E (1991) *Analytical study of a series of substituted (2,2'-bipyridyl) (pentamethylcyclopentadienyl)rhodium and -iridium complexes with regard to their effectiveness as redox catalysts for the indirect electrochemical and chemical reduction of NAD(P)⁺*. Organometallics 10: 1568-1577.

Straathof 2002

Straathof AJJ, Panke S, Schmid A (2002) *The production of fine chemicals by biotransformations*. Current Opinion in Biotechnology 13: 548-556.

Štefuca 2006

Štefuca V, Voštiar I, Šefčovičová J, Katrlík J, Mastihuba V, Greifová M, Gemeiner P (2006) *Development of enzyme flow calorimeter system for monitoring of microbial glycerol conversion*. Applied Microbiology and Biotechnology 72: 1170-1175.

Suye 1992

Suye S-I, Kawagoe M, Inuta S (1992) *Enzymatic production of L-alanine from malic acid with malic enzyme and alanine dehydrogenase with coenzyme regeneration*. The Canadian Journal of Chemical Engineering 70: 306-312.

Takors 2004

Takors R (2004) *Ganzzell-ISPR-Prozessentwicklung: Chancen und Risiken*. Chemie Ingenieur Technik 76: 1857-1864.

Tan 2006

Tan AWI, Fischbach M, Huebner H, Buchholz R, Hummel W, Daußmann T, Wandrey C, Liese A (2006) *Synthesis of enantiopure (5R)-hydroxyhexane-2-one with immobilized whole cells of Lactobacillus kefir*. Applied Microbiology Biotechnology 71: 289-293.

Tanford 1961

Tanford C (1961) *Physical chemistry of macromolecules*. John Wiley & Sons, Inc.: New York.

Tao 2002

Tao J, McGee K (2002) *Development of a continuous enzymatic process for the preparation of (R)-3-(4-fluorophenyl)-2-hydroxy propionic acid*. Organic Process Research & Development 6: 520-524.

Theorell 1961

Theorell H, McKinley McKee JS (1961) *Mechanism of action of liver alcohol dehydrogenase*. Nature 192: 47-50.

Thomas 1997

Thomas AV, Patel HH, Reif LA, Chemburkar SR, Sawick DP, Shelat B, Balmer AK, Patel RR (1997) *Fenleuton: development of a manufacturing process*. Organic Process Research & Development 1: 294-299.

Tishkov 1999

Tishkov VI, Galkin AG, Fedorchuk VV, Savitsky PA, Rojkova AM, Gieren H, Kula MR (1999) *Pilot scale production and isolation of recombinant NAD⁺- and NADP⁺-specific formate dehydrogenases*. Biotechnology and Bioengineering 64: 187-193.

Trevisian 2008

Trevisian MG, Poppi RJ (2008) *Direct determination of ephedrine intermediate in a biotransformation reaction using infrared spectroscopy and PLS*. Talanta 75: 1021-1027.

Uenishi 1999

Uenishi J, Takagi T, Ueno T, Hiraoka T, Yonemitsu O, Tsukube H (1999) *Stereospecific displacement of 1-(pyridinyl)ethanols with amines and thiols via methanesulfonate esters; asymmetric synthesis of 1-(pyridinyl)-ethylamines and sulfides*. Synlett 1: 41-44.

Urlacher 2007

Urlacher VB, Bell SG, Wong L-L (2007) *The bacterial cytochrome P450 monooxygenases: P450cam und P450BM-3* in: Schmid RD, Urlacher VB (Hrsg.) Modern biooxidation. VCH-Wiley: Weinheim.

van Beek 2007

van Beek JD (2007) *matNMR: A flexible toolbox for processing, analyzing and visualizing magnetic resonance data in Matlab®*. Journal of Magnetic Resonance 187: Pages 19-26.

van Beilen 2003

van Beilen JB, Duetz WA, Schmid A, Witholt B (2003) *Practical issues in the application of oxygenases*. Trends in Biotechnology 21: 170-177.

van Langen 2002

van Langen LM, Janssen MHA, Oosthoek NHP, Pereira SRM, Švedas VK, van Rantwijk F, Sheldon RA (2002) *Active site titration as a tool for the evaluation of immobilization procedures of penicillin acylase*. Biotechnology and Bioengineering 79: 224-228.

Verley 1925

Verley A (1925) *Sur l'échange de groupements fonctionnels entre deux molécules. Passage des cétones aux alcools et inversement*. Bulletin de la Societe Chimique de France 37: 537- 542.

Vicenzi 1997

Vicenzi JT, Zmijewski MJ, Reinhard MR, Landen BE, Muth WL, Marler PG (1997) *Large-scale stereoselective enzymatic ketone reduction with in situ product removal via polymeric adsorbent resins*. Enzyme and Microbial Technology 20: 494-499.

Vrtis 2002

Vrtis JM, White AK, Metcalf WW, van der Donk WA (2002) *Phosphite dehydrogenase: a versatile cofactor-regeneration enzyme*. Angewandte Chemie 114:3 391-3393.

Vuorilehto 2004

Vuorilehto K, Lütz S, Wandrey C (2004) *Indirect electrochemical reduction of nicotinamide coenzymes*. *Bioelectrochemistry* 65: 1-7.

Wagenknecht 2003

Wagenknecht PS, Penney JM, Hembre RT (2003) *Transition-metalcatalyzed regeneration of nicotinamide coenzymes with hydrogen*. *Organometallics* 22: 1180-1182.

Walsh 1980

Walsh C (1980) *Flavin coenzymes: at the crossroads of biological redox chemistry*. *Accounts of Chemical Research* 13: 148-155.

Watanabe 1994

Watanabe S, Mitsunashi S, Kumobayashi H (1994) *Process for producing optically active gamma-hydroxyketones*. EP 0 592 881 A3.

Weber 1999

Weber HK, Weber H, Kazlauskas RJ (1999) *'Watching' lipase-catalyzed acylations using ¹H NMR: competing hydrolysis of vinyl acetate in dry organic solvents*. *Tetrahedron: Asymmetry* 10: 2635-2638.

Weber 2000

Weber H, Brecker L (2000) *Online NMR for monitoring biocatalysed reactions*. *Current Opinion in Biotechnology* 11: 572-578.

Weckbecker 2005

Weckbecker A, Hummel W (2005) *Glucose dehydrogenase for the regeneration of NADPH and NADH* in: Barredo JL (Hrsg.) *Microbial enzymes and biotransformations*. Humana Press Inc.: New York.

Wheatley 1993

Wheatley JB, Schmidt, Jr. DE (1993) *Salt-induced immobilization of proteins on a high-performance liquid chromatographic epoxide affinity support*. *Journal of Chromatography A* 644: 11-16.

Wichmann 1981

Wichmann R, Wandrey C, Bückmann AF, Kula M-R (1981) *Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD(H) regeneration*. *Biotechnology and Bioengineering* 23: 2789-2802.

Wichmann 2005

Wichmann R, Vasic-Racki D (2005) *Cofactor regeneration at the lab scale* in: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 92: 225-260. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg.

Willner 1990

Willner I, Maidan R, Shapira M (1990) *Thermal and photochemical regeneration of nicotinamide cofactors and a nicotinamide model compound using a water-soluble rhodium phosphine catalyst*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*: 559-564.

Winterhalter 1998

Winterhalter C, Leinfelder W (1998) *Microorganisms and process for the fermentative production of L-cystein, L-cystin, N-acetyl-serin or thiazolidin-derivates*. EP 0 885 962 A1.

Wishka 1998

Wishka DG, Graber DR, Seest EP, Dolak LA, Han F, Watt W, Morris J (1998) *Stereoselective synthesis of furo[2,3-c]pyridine pyrimidine thioethers, a new class of potent HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors*. Journal of Organic Chemistry 63: 7851-7859.

Wöltinger 2005

Wöltinger J, Karau A, Leuchtenberger W, Drauz K (2005) *Membrane reactors at Degussa* in: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 92: 289-316. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg.

Wong 1981

Wong CH, Daniels L, Orme-Johnson WH, Whitesides GM (1981) *Enzyme-catalyzed organic synthesis: NAD(P)H regeneration using dihydrogen and the hydrogenase from Methanobacterium thermoautotrophicum*. Journal of the American Chemical Society 103: 6227-6238.

Workman 1999

Workman, Jr. JJ (1999) *Review of process and non-invasive near-infrared and infrared spectroscopy: 1993-1999*. Applied Spectroscopy Reviews 34: 1-89.

Xu 2005

Xu F (2005) *Applications of oxidoreductases: recent progress*. Industrial Biotechnology. 1: 38-50.

Yamane 1988

Yamane, T (1988) *Importance of moisture content control for enzymatic reactions in organic solvents: a novel concept of 'microaqueous'*. Biocatalysis 2: 1-9.

Yang 2003

Yang RT (2003) *Adsorbents: fundamentals and applications*. John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken.

Yu 1982

Yu Y-T, Chang TMS (1981) *Immobilization of multienzymes and cofactors within lipid-polyamide membrane microcapsules for the multistep conversion of lipophilic and lipophobic substrates*. Enzyme and Microbial Technology 4: 327-331.

Yuan 1997

Yuan R, Watanabe S, Kuwabata S, Yoneyama H (1997) *Asymmetric electroreduction of ketone and aldehyde derivatives to the corresponding alcohols using alcohol dehydrogenase as an electrocatalyst*. Journal of Organic Chemistry 62: 2494-2499.

Zentgraf 1991

Zentgraf B, Ringpfeil M, Martinek K, Mozhaev VV, Ahern TJ (1991) *Practical importance of enzyme stability*. Pure and Applied Chemistry 63: 1527-1540.

Zweifel 1963

Zweifel G, Brown HC (1963) *Hydration of olefins, dienes and acetylenes via hydroboration*. Organic Reactions 13: 1-54.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	<u>Katja</u> Anna Goldberg
Geboren am	10.01.1980 in Rheine
Nationalität	deutsch
Familienstand	verheiratet

Schulausbildung

08/1990 bis 06/1999	Emsland-Gymnasium, Rheine, Abitur am 01.06.1999.
---------------------	--

Hochschulstudium

10/1999 bis 03/2005	Chemiestudium an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, Abschluss mit dem Diplom am 01.03.2005.
---------------------	--

09/2004 bis 03/2005	Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster betreut durch Prof. Dr. A. Liese mit dem Titel <i>Reaktionstechnische Untersuchungen enzymatisch katalysierter Transferhydrierungen</i> .
---------------------	---

04/2005 bis 03/2006	Dissertation am Institut für Biochemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster betreut durch Prof. Dr. A. Liese mit dem Titel: <i>Entwicklung eines biokatalytischen Verfahrens zur asymmetrischen Produktion von Alkoholen</i> .
---------------------	--

04/2006 bis 04/2010	Fortsetzung der Dissertation am Institut für Technische Biokatalyse an der Technischen Universität Hamburg-Harburg betreut durch Prof. Dr. A. Liese.
---------------------	--

04/2010	Disputation, Tag der mündlichen Prüfung: 09.04.2010.
---------	--

