

Projektkennblatt
der
Deutschen Bundesstiftung Umwelt



Az	13040/03	Referat	32	Fördersumme	688.575 DM
Antragstitel	Förderschwerpunkt Biotechnologie: Verbund Industrielle Nutzung von Biokatalysatoren: Entwicklung innovativer biotechnologischer Verfahren zur mikrobiellen Reduktion von Ketoverbindungen				
Stichworte	Schwerpunkt-Biotechnologie , nachwachsende Rohstoffe , Produkt , Verfahren Mikrobiologie , Verfahren				
	Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)	
	3 Jahre	05/00 bzw. 07/01	Mitte 2004 (teilweise)		
	Zwischenberichte	jährlich			
Bewilligungsempfänger	Forschungszentrum Jülich GmbH Institut für Biotechnologie 2			Tel	02461/61-3296
	Postfach			Fax	02461/2118
	52425 Jülich			Projektleitung	Prof. Wandrey
				Bearbeiter	Fr. Menges
Kooperationspartner	Rhein Biotech GmbH, Düsseldorf bzw. Jülich Fine Chemicals (JFC) Technische Universität München, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Institut für Enzymtechnologie				

Zielsetzung und Anlaß des Vorhabens

Am Beispiel der Reduktion prochiraler Ketone sollen Ganzzell-Verfahren entwickelt werden, um die Darstellung enantiomerreiner Alkohole bis in den technischen Maßstab zu erreichen. Dazu sollen die Eigenschaften der Mikroorganismen zur Durchführung der Hydrierreaktion durch gentechnische Methoden verbessert werden (z.B. durch Coexpression von Reduktase und einem geeigneten Coenzym-regenerierendem Enzym). Als Cosubstrate sollen verschiedene gut metabolisierbare Verbindungen wie Glucose oder Formiat vergleichend geprüft werden. Rekombinante Produktionsstämme werden im Schüttelkolbenmaßstab charakterisiert und der mikrobielle Produktionsprozess im Labormaßstab optimiert.

Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Unter Verwendung rekombinanter *E. coli*-Zellen sollen enantioselektive Reduktionen mit ganzen Zellen realisiert werden. Dabei soll neben der gewünschten Reduktase ein System zur Coenzym-Regenerierung in *E. coli* co-exprimiert werden. Nach Entwicklung neuartiger Syntheserouten werden prochirale Ketone für die enantioselektive Reduktion bereitgestellt und die Ganzzell Umsetzung mit einem biologischen System charakterisiert und kinetisch quantifiziert. Es sollen neuartige Methoden und Apparate entwickelt werden, um eine effiziente Kinetikbestimmung zu erreichen. Die Daten der Kinetikbestimmung können als Grundlage für eine anlagen- und prozesstechnische Entwicklung des fermentativen Verfahrens dienen. Unter Verwendung einer dispersen Substratzufuhr soll ein scale-up-fähiger Fermentationsprozess im Labormaßstab entwickelt werden.

x

Entwicklung biotechnologischer Verfahren zur mikrobiellen Reduktion von Ketoverbindungen

Kurztitel: Biohydrierung

Förderkennzeichen: 13040/03

Projektpartner	Institution	Teilprojekte (TP)
Prof. Dr. Ch. Wandrey	Institut für Biotechnologie (2)	Projektleitung
Dr. M. Müller	Forschungszentrum Jülich GmbH	TP 2: Bioorganische Chemie
Dr. R. Takors		TP 3: Makrokinetik
Dipl.-Ing. M. Brik Ternbach		
Prof. Dr. D. Weuster-Botz	Lehrstuhl für	TP 4: Verfahrenstechnik
Dipl.-Ing. M. Amidjojo	Bioverfahrenstechnik Technische Universität München	
PD Dr. W. Hummel	Institut für Enzymtechnologie	TP 1: Biologische Systeme
Dipl.-Chem. A. Weckbecker	Universität Düsseldorf	
Dr. T. Daußmann	Fa. JFC – Jülich Fine Chemicals GmbH, Jülich	TP 5: Neuer Partner anstelle der Fa. Rhein Biotech GmbH

ZUSAMMENFASSUNG

Im Mittelpunkt der 5 Teilprojekte zur *Biohydrierung* steht die Reduktion von 3,5-Dioxyhexansäure-*tert*-butylester (bzw. 4-Cl-Acetophenon als Referenzedukt) zu 5-Hydroxy-3-oxohexansäurederivaten mit Hilfe geeigneter mikrobieller Systeme bis in den technischen Maßstab. Im Rahmen der **Stammkonstruktion** wurde ein Produktionssystem entwickelt, das die Gene der Alkoholdehydrogenase (ADH) aus *Lactobacillus* sp. zusammen mit einer heterolog aus *B. subtilis* stammenden Glucosedehydrogenase (GDH) plasmid-codiert zur ‚künstlichen‘ NADPH-Regenerierung co-exprimiert. Entsprechende Ganzzellsysteme wurden hinsichtlich der Genanordnung auf dem Plasmid optimiert und vergleichend getestet. Ein Ganzzellsystem wurde in wässrig-organischen Lösungsmitteln eingesetzt und quantitativ bewertet. Im Teilprojekt ‚**Bioorganische Chemie**‘ gelang die durch umfangreiche Publikationen belegte regio- und enantioselektive Reduktion von 3,5-Di-ketohexansäureestern zu nunmehr allen vier diastereomeren Diolen bis in den 100 g Maßstab. Daneben wurden entsprechende Analysetechniken (GC-MS, HPLC und NMR) entwickelt und den Projektpartnern zur Verfügung gestellt. Mehrere Methoden zur modellgestützten Fed-Batch Versuchsplanung wurden im Teilprojekt ‚**Makrokinetik**‘ in die MATLAB/SIMULINK Umgebung implementiert und experimentell validiert. Die sequenzielle Überprüfung der Versuchsplanungstechniken konnte erfolgreich anhand eines L-Valin produzierenden *C.*

glutamicum Stamms durchgeführt werden. Dieser Stamm wurde eingesetzt, da zum Zeitpunkt der experimentellen Überprüfung noch kein geeignetes *E. coli*-Biotransformationssystem mit Cofaktorregenerierung einsetzbar war. Im Teilprojekt ‚**Verfahrenstechnik**‘ konnte mit dispersiver Bereitstellung des schlecht wasserlöslichen 6-Cl-3,5-Dioxohexansäure-*tert*-butylester im Rührkesselreaktor mit ruhenden *Lactobacillus kefir* Zellen die Raum-Zeit-Ausbeute um den Faktor 10 auf bis zu $7.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (3*R*,5*S*)-Dihydroxyhexanoat bei einem Enantiomerenüberschuss von über 99 % und einer Ausbeute von 55% gesteigert werden. Für das Referenzedukt 4-Cl-Acetophenon konnte durch Einsatz von Isopropanol und Glukose als Cosubstrat und intermittierender Edukt-Zudosierung die spezifische Produktbildung bei der asymmetrischen Reduktion um den Faktor 2.5 auf $6.3 \text{ mmol g}^{-1} \text{ L. kefir}$ gesteigert werden. Über den Einsatz der 3-dimensionalen optischen Laser-Rückreflexionsmessung (3-D-ORM) zur Bestimmung von Tropfengrößen und -verteilungen in Kombination mit einer *off-line* Bildanalyse konnten mittlere Tropfendurchmesser für beide Edukte bestimmt werden. Die ermittelten Tropfendurchmesser zeigen, dass für die untersuchten Biotransformationen eine ausreichende Stoffaustauschfläche zur Verfügung gestellt werden kann, so dass keine Stofftransportlimitierung auftritt. Bedingt durch eine strikte Umorientierung zukünftiger Geschäftsbereiche bei dem ehemaligen Kooperationspartner Rhein Biotech GmbH, schied die Firma im vergangenen Jahr aus dem laufenden Projekt aus, weshalb im Anschluß die **Firma Jülich Fine Chemicals, JFC**, deren Rechte und Pflichten für die Projektrestlaufzeit übernahm.

Durch die gemeinsame Bearbeitung des Projekts von Seiten der Organischen Chemie (Vorstufen-Synthese), der Mikrobiologie/Genetik (Stammkonstruktion) und der Verfahrenstechnik (Verfahrenstechnische und Makrokinetische Bearbeitung) konnte beispielhaft gezeigt werden, dass es möglich ist, mit einem umwelt- und ressourcenschonenden biologischen Verfahren eine stereo- und regioselektive Reduktionsreaktion (Synthese von 3,5-Dihydroxyhexansäurederivaten) in den technischen Maßstab zu überführen und dabei auf üblicherweise eingesetzte Schwermetall-haltige Katalysatoren zu verzichten.

ANLASS UND ZIELSETZUNG DES PROJEKTES

Am Beispiel der Reduktion prochiraler Ketone sollen mikrobielle Verfahren bis in den technischen Maßstab entwickelt werden (Biohydrierungen), die die Darstellung hoch enantiomerenreiner Alkohole erreichen und dabei auf die bei chemisch-katalysierten

Reduktionen üblicherweise eingesetzten Schwermetall-haltigen Katalysatoren, organischen Lösungsmitteln und drastischen Reaktionsbedingungen (Druck, Temperatur) verzichten können. Die Synthese von 3,5-Dihydroxyhexansäurederivaten steht beispielhaft im Mittelpunkt der Untersuchungen, da sie wichtige Intermediate bei der Produktion synthetischer HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Pharmazeutika zur Senkung des Blutcholesterins-Spiegels) darstellen und z.B. industriell im Pilotmaßstab in Gegenwart eines Schwermetallkatalysators bei 100°C und 4 bar hydriert werden.

METHODEN, ERGEBNISSE UND DISKUSSION

TP 1: Biologische Systeme

Im Teilprojekts „Biologische Systeme zur Biohydrierung“ ist die Bereitstellung von rekombinanten *E. coli*-Stämmen zur Durchführung enantioselektiver Reduktionen mit ganzen Zellen bearbeitet worden. Dabei sollte neben der gewünschten Reduktase ein System zur Coenzym-Regenerierung in *E. coli* coexprimiert werden.

Zielverbindung des Projekts ist 6-Chlor-5-hydroxy-3-oxo-hexansäure-*tert*-butylester, das durch regio- und enantioselektive Reduktion von 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester gebildet werden soll. 5-Hydroxy-3-oxo-hexansäurederivate stellen wichtige chirale Pharmazeutika dar; sie sind Intermediate bei der Produktion synthetischer HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren. Wegen der Verfügbarkeit, der chemischen Stabilität und der besseren Löslichkeit diente für die meisten Reaktionen die Reduktion von Acetophenon als Modellreaktion. Beide Reaktionen, also die des Zielprodukts und die Umsetzung von Acetophenon, werden durch eine (*R*)-spezifische Alkohol-Dehydrogenase (ADH) aus *Lactobacillus kefir* katalysiert. In Vorversuchen konnte nachgewiesen werden, dass die Zielverbindung 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester nur von diesem Enzym in geeigneter Weise reduziert wird, andere Enzyme setzen diese Verbindung gar nicht um oder produzieren das falsche Enantiomere.

Zur Durchführung von Ganzzellbiotransformationen soll zusätzlich zur NADP-abhängigen ADH ein Cofaktor-regenerierendes Enzym coexprimiert werden. Zur NADPH-Regenerierung stehen verschiedene enzymatische Systeme wie Glucose/Glucose-Dehydrogenase, Gluconat/Gluconat-Dehydrogenase, Malat/Malat-Dehydrogenase oder Glucose-6-Phosphat/Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase zur Auswahl [1]. Das für die NADH-Regenerierung verwendete Formiat/Formiat-Dehydrogenase-System ist für die NADPH-

Regenerierung nicht geeignet, da die Wildtyp-FDH kein NADP akzeptiert; ein NADP-abhängiges Mutein, das aus der Literatur bekannt ist, steht leider nicht zur Verfügung.

Das System Glucose/Glucose-Dehydrogenase (GDH) weist einige Vorteile auf: So liegen die spezifischen Aktivitäten von ADH und GDH in der gleichen Größenordnung (jeweils ca. 400 U/mg für die homogenen Enzyme), die Gensequenz der GDH ist Literatur-bekannt, das Enzym ist stabil und das Substrat Glucose ist preiswert und führt, ebenso wie das Oxidationsprodukt Gluconolacton, nicht zu störenden Nebenreaktionen bei Ganzzellbiotransformationen.

Die Gene der ADH aus *L. kefir* sowie der GDH aus *Bacillus subtilis* wurden isoliert und in unterschiedlicher Reihenfolge in einen Expressionsvektor kloniert [2]. Das Konstrukt mit dem Plasmid „pAW-3“ enthält hinter der ribosomalen Bindungsstelle die ADH als erstes Gen und im Anschluss an eine weitere ribosomale Bindungsstelle die GDH, während bei „pAW-4“ die Reihenfolge der beiden Gene umgekehrt wurde. Nach Transformation in verschiedene *E. coli*-Wirtsstämme wurden die rekombinanten Stämme unter Expressionsbedingungen (1 mM IPTG, Induktion: 3 h bei 30°C) angezogen, aufgeschlossen und die Aktivität der ADH und GDH im Rohextrakt bestimmt. Im Konstrukt pAW-3, das die ADH als erstes Gen enthält, weist die ADH eine etwa dreimal so hohe Aktivität auf wie die GDH, während die Verhältnisse im System pAW-4 mit der GDH als erstem Gen umgekehrt sind (Tab. 1.1).

Tab. 1.1: Vergleich der Konstrukte pAW-3 und pAW-4; Aktivitäten und Enzymverhältnis

(Die Enzymaktivitäten (Acetophenon-Reduktion mit NADPH und Glucose-Oxidation mit NADP in Standardassays) wurden in Rohextrakten nach Zellaufschluss gemessen; sie zeigen nur das maximal mögliche intrazelluläre Enzympotential auf).

Expressionsstamm	pAW-3 (ADH-GDH)			pAW-4 (GDH-ADH)		
	Spez. Akt. ADH [U/mg]	Spez. Akt. GDH [U/mg]	GDH ADH [%]	Spez. Akt. ADH [U/mg]	Spez. Akt. GDH [U/mg]	<u>ADH</u> GDH [%]
Tuner(DE3)	40,6	11,2	27,5	9,1	32,9	27,7
BL21(DE3)	41,6	12,9	31,1	13,8	58,0	23,7
Origami(DE3)	37,7	12,4	32,9	5,3	17,3	30,6

Beide Konstrukte wurden für Ganzzell-Umsetzungen eingesetzt (Acetophenon zu (*R*)-Phenylethanol), dabei zeigten sich überraschenenderweise deutlichere Unterschiede in der

Produktbildungsrate als auf Grund der o.a. Enzymaktivitäten zu erwarten war (Abb. 1.1). Nur das Konstrukt p-AW-3 mit der hohen ADH-Aktivität zeigte eine gute, vollständige Umsetzung des Ketons, während das andere Konstrukt nahezu keine Umsetzung ergab. Der Grund für diese schlechte Umsetzung ist zur Zeit nicht klar, möglicherweise wird durch eine sehr leistungsfähige Coenzym-Regenerierung ein hoher Spiegel an NADPH erzeugt; bekannt ist, dass dieser dann die ADH hemmen würde. Diese Hypothese zeigt, dass es für die Anwendung der Ganzzell-Umsetzungen mit Coenzym-abhängigen Enzymen erforderlich ist, Informationen über die intrazellulären Konzentrationen der beteiligten Coenzyme zu gewinnen.

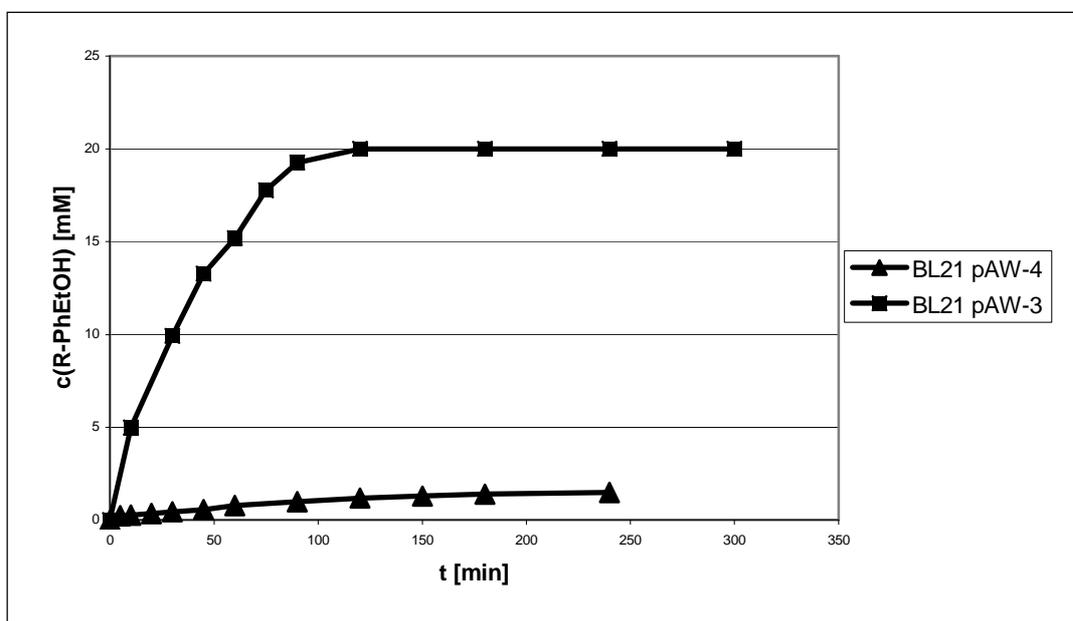


Abb 1.1. Ganzzell-Umsetzung von Acetophenon zu (R)-Phenylethanol mit rekombinanten *E.coli*-Zellen (20 mM Acetophenon und 200 mM Glucose in TEA 50 mM, pH 7.5; Proben wurden mittels Gaschromatographie analysiert).

Eine relativ einfache Möglichkeit, die schlechte Wasserlöslichkeit der Keton-Substrate zu umgehen, stellt die Anwendung eines wässrig-organischen Zweiphasensystems dar. Wir haben am Beispiel der Acetophenon-Reduktion rekombinante *E. coli*-Zellen (pAW-3) in verschiedenen Lösungsmittelsystemen bezüglich ihrer Umsatzrate verglichen (Abb. 1.2).

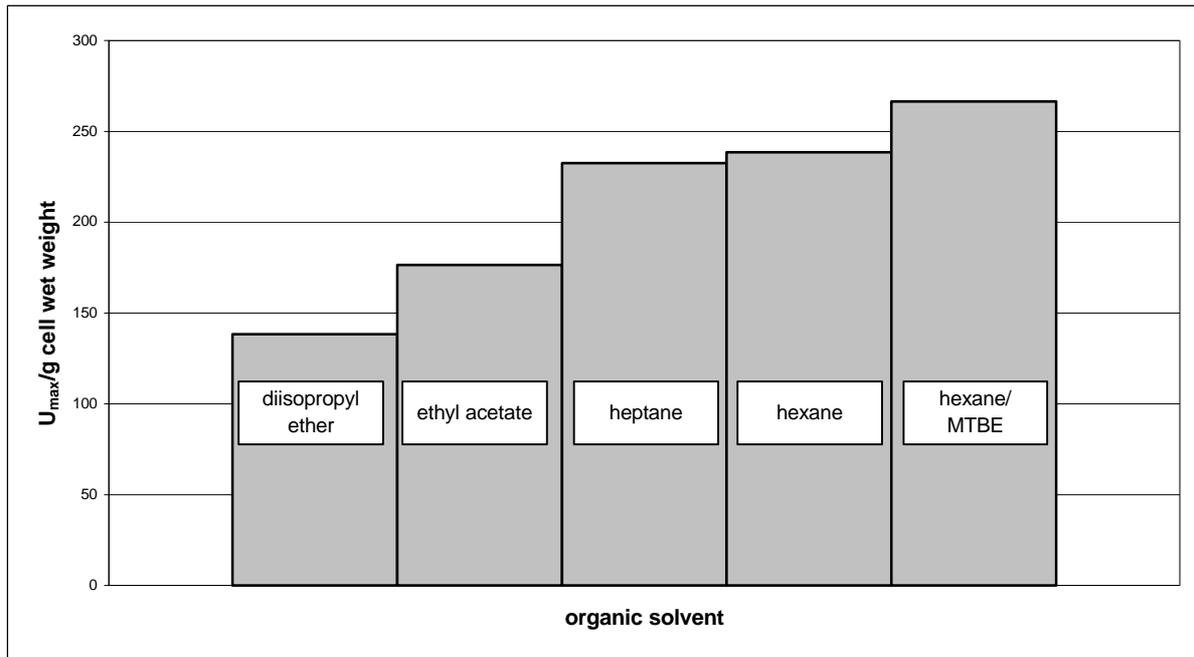


Abb. 1.2: Umsetzungen mit rekombinanten *E.coli*-Zellen (mit pAW-3) in wässrig-organischen Zweiphasensystemen.

(Reaktionsbedingungen: 50 mM Triethanolamin-Puffer (pH 7,5), 1 mM MgCl₂, 500 mM D-Glucose, 20 mM Acetophenon und 0,1 g Zellen (pAW-3; Feuchtmasse) in einem Endvolumen von 100 mL wurden mit 50 mL verschiedener organischer Lösungsmittel (diisopropyl ether, ethyl acetate, heptane, hexane, and hexane/MTBE (methyl-*t*-butyl ether) (1:1)) in einem 500 mL Reaktionsgefäß gemischt; die Proben wurden mittels Gaschromatographie analysiert. Aufgetragen sind auf 1 Gramm Zellfeuchtmasse bezogene Reaktionsgeschwindigkeiten (U_{\max}), die sich aus Kinetikmessungen (GC-Analysen) der einzelnen Systeme ergeben haben (1 U = Bildung von 1 μ Mol Phenylethanol pro min))

Die Abbildung 1.2 zeigt, dass das Lösungsmittelsystem Hexan/MTBE gute Umsatzraten aufweist, man erhält Phenylethanol-Bildungsraten von nahezu 300 μ Mol /min x g Zellen.

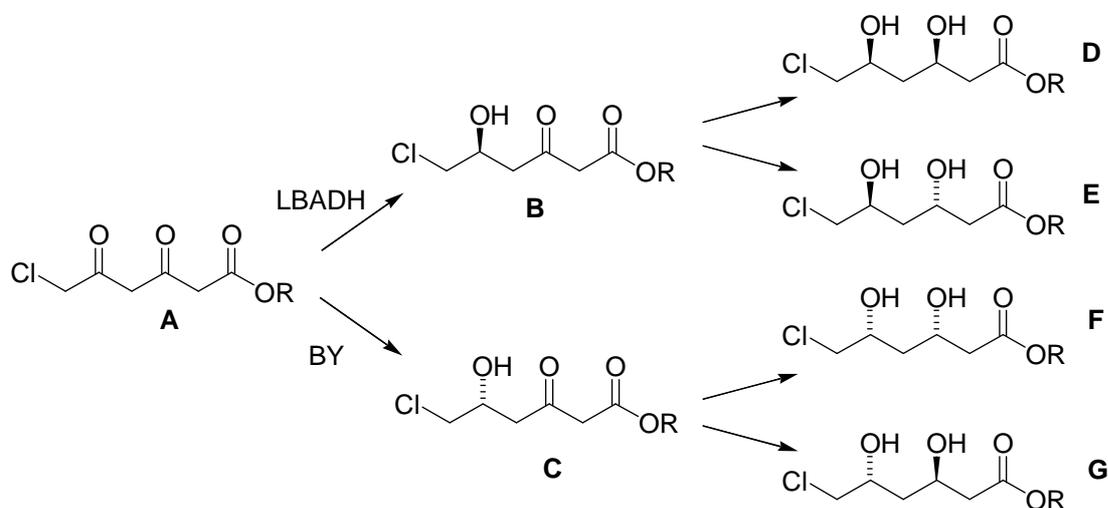
Die Arbeiten werden mit weiteren Konstrukten, die sich bezüglich der Coenzym-Regenerierung unterscheiden, fortgesetzt. Es liegen dazu bereits ein System mit einer Transhydrogenase, durch die NADH nutzbar gemacht werden kann und ein Malat-Dehydrogenase-System vor, die in der vorab beschriebenen Weise vergleichend charakterisiert werden.

TP 2: Bioorganische Chemie

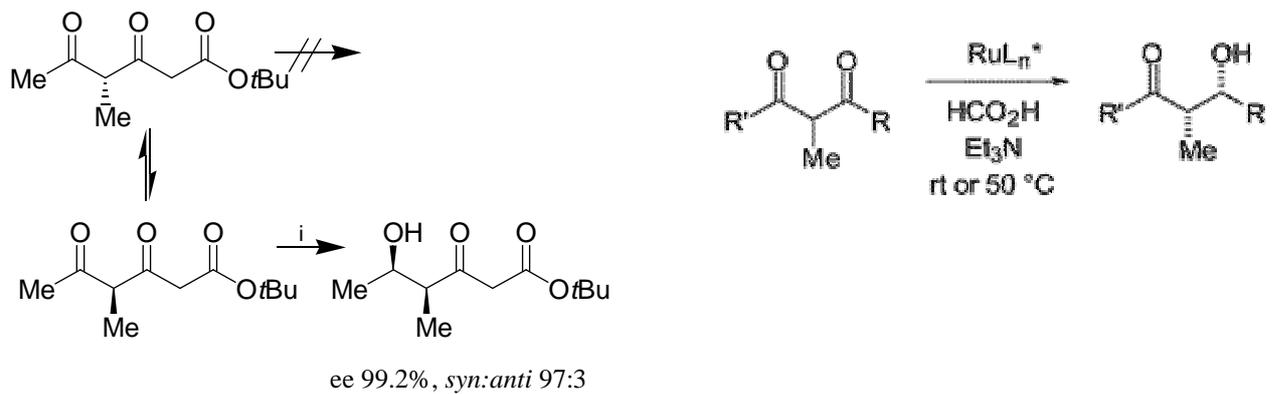
Zielsetzung der Arbeiten im Bereich der Bioorganischen Chemie ist die Entwicklung von Synthesen und die Bereitstellung von prochiralen Ketonen als Substrate für enantioselektive

Reduktionen mit Biokatalysatoren, sowie die Ausarbeitung und Bereitstellung geeigneter analytischer Methoden. Ausreichende Mengen des Diketons (**A**) und das enantiomerenreine Zielprodukt **B** wurden ebenso wie das analytische know-how den Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt [3].

Die von uns entwickelte Methode zur regio- und enantioselektiven Reduktion von 3,5-Diketo-hexansäureestern (**A**) im batch-Verfahren mittels *Lactobacillus brevis* Alkoholdehydrogenase [4] (LBADH) wurde bis in den 75g-Maßstab übertragen (bis zu 80% Ausbeute an enantiomerenreinem **B**, R = *t*Bu) [5]. Dabei konnten ttn für NADP(H) von bis zu 125 erreicht werden. Es wird erwartet, dass dieser Wert durch die Verwendung von Ganzzell-Cofaktor-regenerierungssystemen deutlich erhöht werden kann und somit die Produktivität einen auch produktionstechnisch interessanten Wert erreicht. In Zusammenarbeit mit Prof. Jon Stewart, University of Florida, wird zur Zeit untersucht, welche Oxidoreduktasen aus Bäckerhefe (BY) für die enantioselektive Bildung des (*R*)-Enantiomers von **B** genutzt werden können [6]. Eine Übertragung dieses enzymatischen Schrittes in eine definierte Ganzzellbiotransformation mit einem heterologen Expressionssystem analog den von der Arbeitsgruppe um Dr. Hummel für die zuvor genannte Reduktion wird einen Zugang zu enantiomerenreinem **C** ermöglichen.



Die von uns eingeführte dynamische kinetische Racematspaltung durch regio- und stereoselektive Reduktion von in 2-Position substituierten 1,3-Diketonen [7, 8] am Beispiel eines alkylierten 3,5-Dioxohexanoates wurde inzwischen von anderen Arbeitskreisen auf die Chemokatalyse übertragen [9]. Dieses Beispiel belegt eindrucksvoll, dass die Untersuchung biokatalytischer Verfahren zu neuen Entwicklungen auch in der rein chemischen Synthese Anstoß geben kann.



Der Einsatz der von uns generierten Bausteine in der Naturstoff- und Wirkstoffsynthese wurde durch die in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dieter Enders, RWTH Aachen (Förderung durch den SFB 380) durchgeführten Synthesen zu *S*-(+)-Argentilactone, *S*-(-)-Goniothalamine und zweier Callystatin-Stereoisomeren nachhaltig belegt [10-12]. Insbesondere die erste vollständig auf enantioselektiven Syntheseschritten aufbauende Synthese des Zytotoxikums Callystatin beleuchtet die Vorteile kombinierter chemoenzymatischer Synthesestrategien.

TP 3: Makrokinetik

Ein wichtiger Schritt der verfahrenstechnischen Prozessentwicklung ist die quantitative Beschreibung der mikrobiellen Reaktionskinetik, um darauf aufbauend, z.B. modellgestützt eine Prozessoptimierung durchführen zu können. Hinsichtlich der Vielzahl möglicher Produktionsstämme, sollte die makrokinetische Analyse möglichst effizient erfolgen, was durch die Entwicklung und den Einsatz einer modelldiskriminierenden und/oder optimalen Versuchsplanung für fed-batch Experimente realisiert werden soll. Dabei können z.B. die Konzentration der Kohlenstoffquelle im Feed, die zeitlich variablen Feedraten, die Vorgabe von Probenahmezeitpunkten und vieles mehr als Parameter der Versuchsplanung dienen.

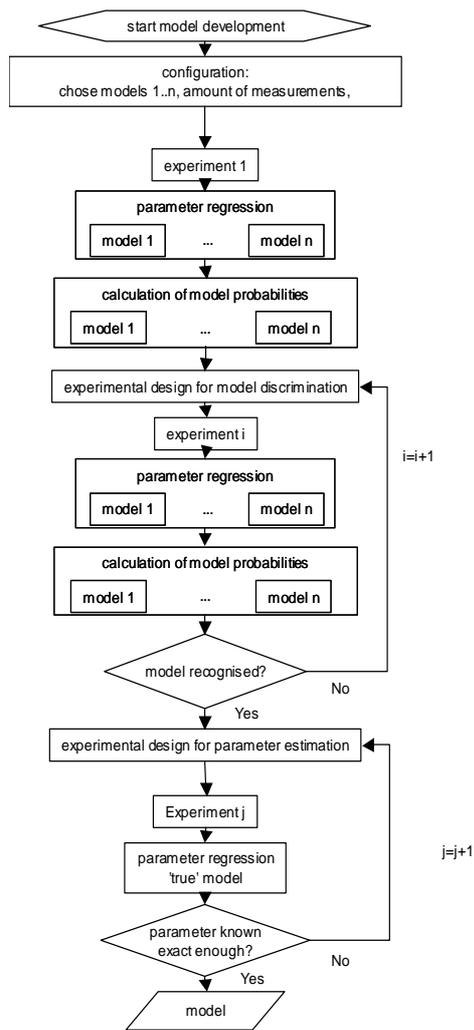


Abbildung 3.1: Schematisches Flussdiagramm der experimentellen Versuchsplanung

Ziel der Versuchsplanung ist die Identifizierung eines geeigneten makrokinetischen Modellierungsansatzes für ein biologisches System innerhalb weniger, sequentieller Experimente. Dabei wird insbesondere die Ausgangssituation berücksichtigt, dass vor Beginn der makrokinetischen Versuchsreihe oftmals nur wenige Informationen – auch über grundlegende Reaktionsmechanismen – in dem ‚neuen‘ Produktionsstamm vorhanden sind. Dies hat die anfängliche Berücksichtigung einer Vielzahl ‚konkurrierender Modellansätze‘ zur Folge, die durch die modelldiskriminierende Versuchsplanung auf das ‚wahre‘ Modell reduziert werden sollen (siehe Abbildung 3.1).

Neben dem zunächst favorisierten modelldiskriminierenden Versuchsplanungsansatz von Box und Hill [13] wurden andere Versuchsplanungsansätze von Hunter und Reiner [14], Buzzi-Ferraris *et al.* [15] und Chen und Asprey [16] in der Entwicklungsumgebung von MATLAB/SIMULINK implementiert und an die experimentellen

Rahmenbedingungen angepasst. Während z.B. der Box und Hill Ansatz die abnehmende Differenz der Modellsystem-Entropie in aufeinander folgenden Experimenten als Kriterium für die modelldiskriminierende Versuchsplanung verwendet, wurde der klassische Hunter und Reiner –Ansatz durch Hinzunahme der zeitlichen Varianz der Probennahme-Zeitpunkte zur Versuchsplanung signifikant erweitert. Die meisten der oben genannten Versuchsplanungskriterien verwenden zusätzlich die Kovarianz der Parameterschätzung in der Fisher-Informationsmatrix als Basis.

Nachdem erste Simulationsrechnungen erfolgreich verliefen, wurde die Versuchsplanungstechnik experimentell getestet. Da zum Zeitpunkt der experimentellen Überprüfung das *E. coli* basierte Produktionssystem mit Co-Faktorregenerierung noch nicht einsatzbereit war, wurde alternativ ein rekombinanter, L-Valin produzierender *C. glutamicum*

Stamm als Testsystem eingesetzt (aus dem Institut für Biotechnologie 1, Forschungszentrum Jülich GmbH). Dieser Stamm war Pantothensäure und L-Isoleucin-auxotroph. .

Ausgehend von dem biologischen Verständnis über die L-Valin-Produktion in *C. glutamicum* wurden vier konkurrierende Modellansätze formuliert, die die Konzentrationen an Biomasse (c_x), Glucose (c_{S1}), dem Co-Substrat 2 (Isoleucin und Pantothensäure) (c_{S2}) und dem Produkt L-Valin (c_P) berücksichtigten. Im einzelnen unterschieden sich die Modelle wie folgt:

- Modell (1): Wachstumslimitierung durch eines der beiden Substrate, Maintenancebedarf basierend auf Glucose, Glucose-abhängige L-Valin Synthese (ohne Einfluss durch Substrat 2)
- Modell (2): analog zu Model (1), jedoch limitiert die Verfügbarkeit von Substrat 2 die Glucoseaufnahme. Hohe Konzentrationen an Substrat 2 können die Produktsynthese inhibieren.
- Modell (3): Inhibierung des Wachstums durch L-Valin, keine Wachstumslimitierung durch Substrat 2, Inhibierung der Produktbildung durch Substrat 2.
- Modell (4): Wachstumsabhängigkeit von beiden Substraten, L-Valin Synthese ist wachstumsgekoppelt, Produktinhibierung durch L-Valin.

Wie in Abb. 3.2 dargestellt, erlauben alle Modelle eine akzeptable Wiedergabe der experimentellen Daten, was durch vergleichsweise geringe χ^2 Werte von 1,1 (Modell 3) bis 2,1 (Modell 1) belegt ist. Da eine eindeutige Modellidentifizierung jedoch noch nicht möglich

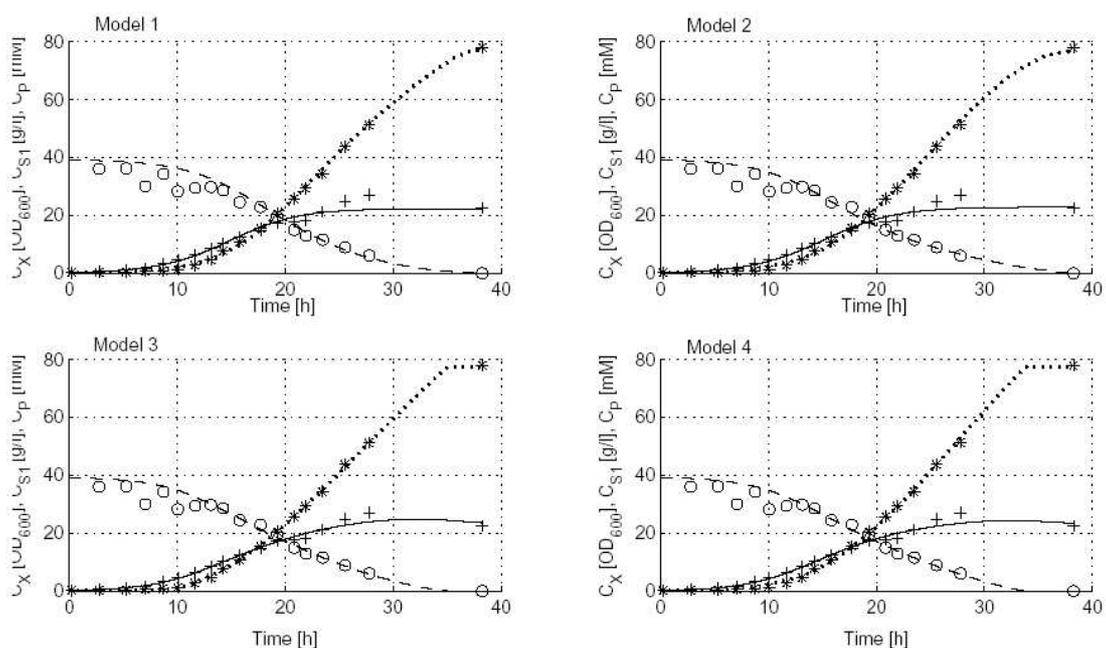


Abbildung 3.2: Das Ergebnis der Modellierung von Fermentationen im Labormaßstab mit dem L-Valin produzierenden Stamm *C. glutamicum* ist dargestellt. Die gemessenen Konzentrationen an Biomasse (C_x , [OD₆₀₀], +), Glucose (C_{S1} , [g/l], o) und Valin (C_P , [mM], *) sind angegeben. Die Modellaussagen werden durch entsprechende Linien (durchgezogen, gestrichelt und gepunktet) gezeigt.

Ein entsprechendes Experiment wurde durchgeführt. Dabei konnten die zuvor berechneten Feedraten weitgehend eingehalten werden. Allerdings zeigte sich auch, dass ein manuelles Eingreifen im Versuchsablauf durch den Experimentator teilweise notwendig war, um z.B. eine zu starke Limitierung des Zellwachstums zu vermeiden. Dieser Fall tritt typischerweise dann auf, wenn aufgrund einer noch ungenauen Modellidentifizierung die Modellaussage für die Substrataufnahme zu geringe Werte prognostizierte. Ausserdem wurde festgestellt, dass die diskriminierend geplanten fed-batch Experimente oftmals neue Systemeigenschaften offenbaren, die in den ursprünglichen Modellansätzen nicht oder nicht ausreichend berücksichtigt werden konnten. In Folge dessen kam es zu Modellerweiterungen und damit verbunden zu weiteren fed-batch Experimenten.

Im folgenden ist das – aufgrund der Güte der Modellaussagegenauigkeit – ‚beste‘, nicht-strukturierte Modell für die Valin-Produktion mit *C. glutamicum* angegeben.

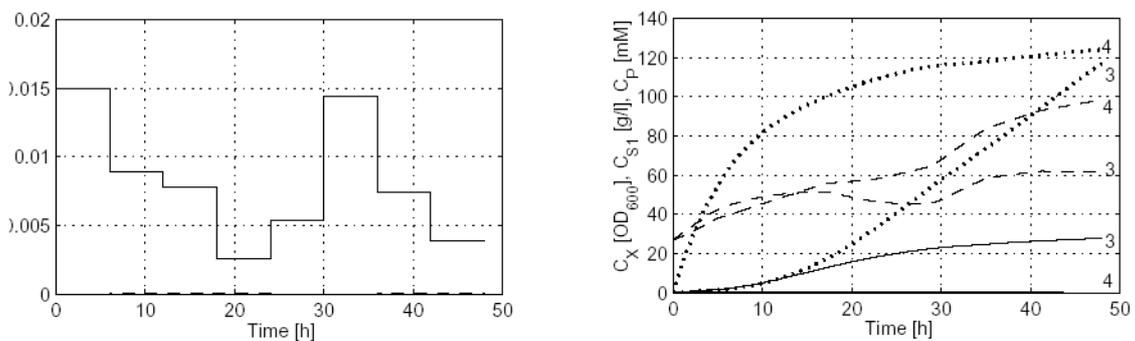


Abbildung 3.3: Ergebnis der Versuchsplanung. Die geplanten (simulierten) Konzentrationen an Glucose und dem zweiten Substrat waren 27 g/L bzw. 0 mM. Das linke Diagramm zeigt die geplanten Feed-Profile von Glucose (500 g/L, durchgezogene Linie) und dem zweiten Substrat (2.9 g/L L-Isoleucin and 4.7 mg/L Panthotensäure, gestrichelte Linie). Auf der rechten Seite sind die Modellvorhersagen für Biomasse (C_X , durchgezogene Linie), Glucose (C_{S1} , gestrichelte Linie) und L-Valin (C_P , gepunktete Linie) dargestellt. Zur Verbesserung der Übersichtlichkeit sind nur die Modelle 3 und 4 dargestellt.

$$r_x = \min \left\{ \begin{array}{l} r_{x,S1} = \frac{\mu_{\max,S1} * X * S1}{K_{m,S1} + S1} \\ r_{x,S2} = r_{x,S2ext} + r_{x,S2int} \\ \quad = \frac{\mu_{\max,S2} * X * S2}{(1 + \frac{P}{K_{i_{rxs2,P}}}) K_{m,S2} + S2} + S2_{int} * k_{rxs2int} \\ r_{x,S3} = r_{x,S3ext} + r_{x,S3int} \\ \quad = \frac{\mu_{\max,S3} * X * S3}{K_{m,S3} + S3} + \frac{X * (\frac{S3_{int}}{X} - S3_{intmin}) * \mu_{\max,S3int}}{K_{m,S3int} + (\frac{S3_{int}}{X} - S3_{intmin})} \end{array} \right.$$

$$r_{S1} = \frac{-r_x}{Y_{XS1}} - m_{S1} * X - \frac{-r_p}{Y_{PS1}}$$

$$r_{S2} = \frac{r_{XS2ext}}{Y_{XS2}}$$

$$r_{S2int} = -r_{S2} - m_{S2int} * S2_{int} * \frac{S3_{int}}{X} * X$$

$$r_{S3} = \frac{(r_{XS3ext} - f_{rS3}(r_{X,S3} - r_x))}{Y_{XS3}}$$

$$r_{S3int} = -r_{S3} - m_{S3int} * (\frac{S3_{int}}{X} - S3_{intmin,rS3int}) * X$$

$$r_p = \min \left\{ \begin{array}{l} r_{pS1} = \frac{Y_{PS1}}{Y_{XS1}} * \left(\left(\frac{\pi_{\max S1} * S1 * X}{S1 + K_{rpS1} (1 + \frac{S2_{int}/X}{K_{i_{rp,S2int}}})} + f_{rPS1} * (r_{XS1} - r_x) \right) \right) \\ r_{pS3} = \frac{Y_{PS1}}{Y_{XS3}} * \frac{\frac{S3_{int}}{X} * \pi_{\max S3int}}{\frac{S3_{int}}{X} + K_{rpS3int}} \end{array} \right.$$

$$r_{S3int} = -r_{S3} - m_{S3int} * (\frac{S3_{int}}{X} - S3_{intmin,rS3int}) * X$$

Größe	Wert	Beschreibung	Einheit
Γ_X		Wachstumsrate	OD/h
$\Gamma_{X,S1}$		S1 limitierte Wachstumsrate	OD/h
$\Gamma_{X,S2}$		S2 limitierte Wachstumsrate	OD/h
$\Gamma_{X,S3}$		S3 limitierte Wachstumsrate	OD/h
Γ_{S1}		S1 Aufnahme rate	g/L.h
Γ_{S2}		S2 Aufnahme rate	mM/h
Γ_{S2int}		$S2_{int}$ Änderungsrate,	mM/h
Γ_{S3}		S3 Aufnahme rate	μ M/h
Γ_{S3int}		$S3_{int}$ Änderungsrate	μ M/h
Γ_P		P Produktionsrate	mM/h
Γ_{PS1}		S1 limitierte Produktionsrate	mM/h
Γ_{PS3}		S3 limitierte Produktionsrate	mM/h
X		Biomassekonzentration	OD ₆₀₀
S1		Glukosekonzentration	g/L
S2		Isoleucinkonzentration	mM
S3		Pantothenatkonzentration	μ M
$S2_{int}$		Intrazelluläre Isoleucine Konzentration bezogen auf das ganze Reaktorvolumen	mM
$S3_{int}$		Intrazelluläre Pantothenatkonzentration bezogen auf das ganze Reaktorvolumen	μ M
P		Valinkonzentration	mM
μ_{maxS1}	0,40	Biomasse-spezifische maximale Wachstumsrate auf S1	OD.L/g.h
K_{mS1}	0,0001	Michaelis-Menten Konstante für Wachstum auf S1	g/L
μ_{maxS2}	0,10	Biomasse-spezifische maximale Wachstumsrate auf S2	OD/mM.h
K_{mS2}	1,7	Michaelis-Menten Konstante für Wachstum auf S2	mM
$K_{i_{rxS2,P}}$	67	Inhibierungskonstante für Inhibierung von Wachstum auf S2 durch P	mM
$k_{rxs2int}$	76	Wachstumskonstante für Wachstum auf $S2_{int}$	OD/mM.h
μ_{maxS3}	2,8	Biomasse-spezifische maximale Wachstumsrate auf S3	OD/ μ M.h
K_{mS3}	12	Michaelis-Menten Konstante für Wachstum auf S3	μ M
$\mu_{maxS3int}$	6,0	Biomasse-spezifische maximale Wachstumsrate auf $S3_{int}$	OD/ μ M.h
$S3_{intmin}$	0,010	minimale intrazelluläre S3 Konzentration für Wachstum	μ M/OD
K_{mS3int}	0,50	Michaelis-Menten Konstante für Wachstum auf intrazelluläres S3	μ M
Y_{XS1}	2,4	Ausbeute von X aus S1	OD.L/g
m_{S1}	0,016	Konstante für den S1 Verbrauch für den Erhaltungsstoffwechsel	g/L.h.OD
Y_{PS1}	3,8	Ausbeute von P aus S1	mmol/g
Y_{XS2}	5,0	Ausbeute von X aus extrazelluläres S2	OD/mmol
m_{S2int}	2,9	Konstante für den $S2_{int}$ Verbrauch	L/ μ mol.h
f_{rS3}	0,057	Fraktion der nicht direkt für Wachstum benötigten S3 Aufnahme	-

		die trotzdem aufgenommen wird	
Y_{XS3}	6,7	Ausbeute von X aus extrazelluläres S3	OD/ μ M
m_{S3int}	0,003	Konstante für den $S3_{int}$ Verbrauch	1/h
π_{maxS1}	0,41	Biomasse spezifische maximale P Produktionsrate auf S1	mM/h
K_{rPS1}	14	S1 Bindungskonstante für P Produktion	g/l
$Ki_{rPS2int}$	0,0011	Inhibierungskonstante für Inhibierung von P Produktion auf S1 durch $S2_{int}$	mM
f_{rPS1}	0,086	Fraktion der nicht direkt für Wachstum benötigte S1 Aufnahme die statt dessen für P Produktion verwendet wird	-
$\pi_{maxS3int}$	0,13	Biomasse spezifische maximale P Produktionsrate auf $S3_{int}$	mM/h
$K_{rPS3int}$	0,050	$S3_{int}$ Bindungskonstante für P Produktion	μ M

Mit Hilfe dieses Modells gelang die sehr genaue Anpassung an verschiedene batch- bzw. fed-batch Experimente wie in der nachfolgenden Abbildung 3.4 dargestellt. Damit konnte erfolgreich die Technik der modelldiskriminierenden Versuchsplanung nicht nur theoretisch erarbeitet, sondern auch software-technisch umgesetzt und experimentell getestet werden.

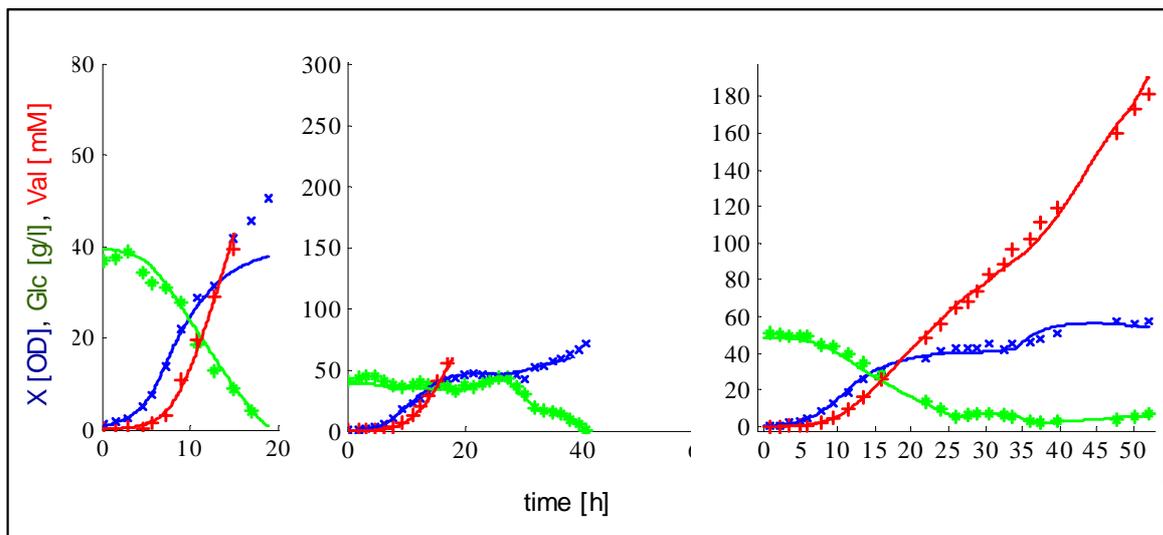


Abbildung 3.4: Modellaussagen des oben skizzierten kinetischen Modells zur L-Valin Produktion mit *C. glutamicum*. x (blau): Biomassekonzentration (OD_{600}); * (grün): Glucose-Konzentration; + (rot): L-Valin-Konzentration.

TP 4: Verfahrenstechnik

Zielsetzung war die Entwicklung einer allgemein nutzbaren Verfahrenstechnik zur Biohydrierung mit ganzen Zellen. Dabei wurde eine mikrodisperse Bereitstellung der schlecht wasserlöslichen Edukte im Biotransformationsreaktor angestrebt, um die Verwendung einer

zweiten organischen Lösungsmittelphase zu vermeiden. Zur Erzeugung einer hohen Stoffaustauschfläche zwischen Eduktphase und wässrigem Reaktionsmedium wurde das in einem gut wasserlöslichem Cosolvenz gelöste Edukt in den Bioreaktor injiziert. Aufgrund der sofortigen Vermischung des Cosolvenz (Isopropanol) in der wässrigen Phase können dadurch sehr feine Edukt-Tropfen *in-situ* erzeugt werden.

Zur Analyse von Edukten und chiralen Produkten wurde eine geeignete GC-Methode etabliert. Zur Erfassung der Aktivität der Bioakatalysatoren wurden die Enzymaktivitäten der Alkoholdehydrogenase und der Cofaktor-Regenerierungsenzyme gemessen. Weitere Informationen über den Prozess konnten über die Bestimmung von Metabolit-Konzentrationen (Cosubstrat und Nebenprodukte) gewonnen werden. Für die verfahrenstechnische Untersuchungen zur mikrodispersiven Eduktbereitstellung wurde zur *in-line* Bestimmung der Edukt-Tropfendurchmesser im Bioreaktor (KLF2000, Bioengineering, Schweiz) erstmals die 3 dimensionale optische Laser-Rückreflexionsmessung (3-D-ORM) etabliert. Damit stehen die aktuelle Tropfengröße der dispersen Phase und Tropfengößenverteilung *on-line* zur Verfügung (siehe Abb. 4.1).

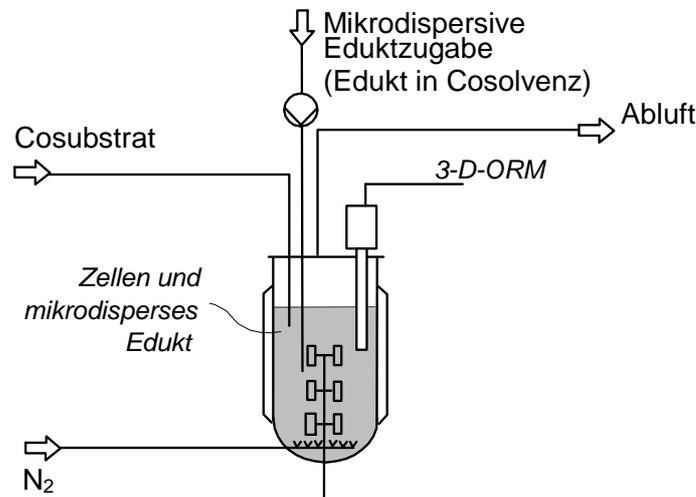


Abbildung 4.1: Prinzipskizze der mikrodispersiven Biohydrierung (Cosubstrat: Glucose; Cosolvenz: Isopropanol; 3-D-ORM: 3-dimensionale optische Laser-Reflexionsmessung).

Mit Hilfe reaktionstechnischer Untersuchungen im Parallelansatz konnten geeignete Reaktionsbedingungen zur asymmetrischen Reduktion von 6-Cl-3,5-Dioxo-Hexansäure-*tert*-Butylester zum 6-Cl-(3*R*,5*S*)-3,5-dihydroxyhexanoate und des Referenzedukts 4-Cl-Acetophenon zu (*R*)-1-(4-Chlorphenyl)-Ethanol mit ruhenden *Lactobacillus kefir*-Zellen ermittelt werden. Als erster Schritt zur Maßstabsvergrößerung in einen 2 L-Rührkesselreaktor

wurden die Biotransformationen in gerührten Systemen mit definiertem Leistungseintrag durchgeführt.

In gerührten Systemen (20–200 mL Reaktionsvolumen) wurden für 6-Cl-3,5-Dioxo-Hexansäure-*tert*-Butylester folgende optimale Umsetzungsbedingungen ermittelt: Temperatur 22°C, Kalium-Phosphat-Puffer pH 6.5 (0.2 M), 0.2 g L⁻¹ MgCl₂, Ausschluss von Sauerstoff, Glukose als Cosubstrat. Durch Einhalten der oben genannten Reaktionsbedingungen und einer geeigneten Edukt-Zudosierungsstrategie kann die Nebenproduktbildung durch Zerfall des Edukts minimiert werden. Mit 50 g L⁻¹ *L. kefir* konnte somit die Raum-Zeit-Ausbeute um den Faktor 10 auf bis zu 7.5 mmol L⁻¹ h⁻¹ (3*R*,5*S*)-Dihydroxyhexanoat gesteigert werden, dieses bei einer Ausbeute von 55% und einem ee > 99%. Zur Zeit erfolgt die weitere Optimierung der Edukt-Zudosierung, um noch höhere Ausbeuten bei gleichbleibend hohem Enantiomerenüberschuss und möglichst vollständigem Umsatz zum gewünschten (3*R*,5*S*)-Dihydroxyhexanoat zu erreichen.

Bei der Reduktion von 4-Cl-Acetophenon mit *L. kefir* konnte eine irreversible Inhibierung bei hohen (*R*)-1-(4-Chlorphenyl)-Ethanol-Konzentrationen festgestellt werden, wenn Glukose als alleiniges Cosubstrat eingesetzt wird. So konnte beispielsweise bei der Umsetzung von 125 mM 4-Cl-Acetophenon mit 50 g L⁻¹ *L. kefir* zwar eine Raum-Zeit-Ausbeute von 62.5 mmol L⁻¹ h⁻¹, jedoch nur ein Umsatz von 50 % nach 1 h erreicht werden (Temperatur 30°C, Kalium-Phosphat-Puffer pH 6.5 (0.2 M), 0.2 g L⁻¹ MgCl₂, Ausschluss von Sauerstoff). Durch den Einsatz von 30% v/v Isopropanol als zweites Cosubstrat in Kombination mit Glukose konnte der Umsatz für die gleiche Zellkonzentration und 150 mM 4-Cl-Acetophenon auf 88 % (nach 4 h) gesteigert werden (spezifische Produktbildung 3 mmol g⁻¹, ee 96.6%). Durch eine intermittierende Zugabe von 4-Cl-Acetophenon und Isopropanol kann die zellspezifische Produktbildung nochmals auf 6.3 mmol g⁻¹ gesteigert werden, jedoch bei Verringerung der Ausbeute auf 70% und des Enantiomerenüberschusses auf 94.5% (Abb. 4.2) [17].

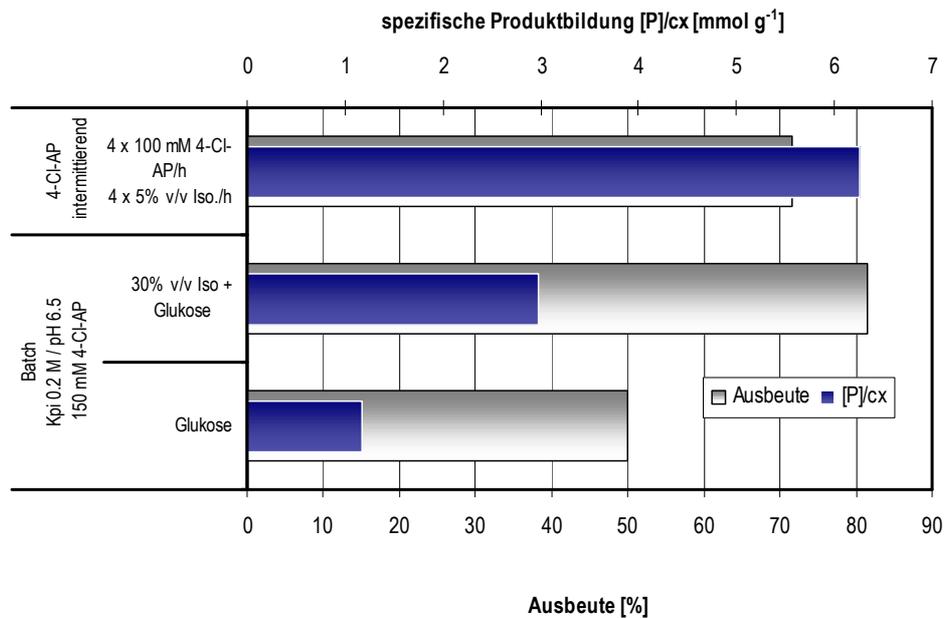


Abbildung 4.2: Reaktionstechnische Untersuchungen zur Biohydrierung von 4-Cl-Acetophenon mit *Lactobacillus kefir*

Mit Hilfe der 3-dimensionalen optischen Laser-Rückreflexionsmessung (3-D-ORM) in Kombination mit einer *off-line* Bildanalyse der Proben konnte bei 5 g L^{-1} *L. kefir* Biotrockenmasse ein mittlerer Tropfendurchmesser $d_{32}=11 \text{ }\mu\text{m}$ für 6-Cl-3,5-Dioxo-Hexansäure-*tert*-Butylester und $d_{32}=14 \text{ }\mu\text{m}$ für 4-Cl-Acetophenon bestimmt werden (Leistungseintrag von 4 kW m^{-3}). Damit ist eine ausreichende Stoffaustauschfläche bei den untersuchten Biotransformationen mit *L. kefir* gewährleistet. In 2-Phasen-Systemen Edukt/Puffer ohne Zellen sind die Tropfen dagegen bei gleichem Leistungseintrag um den Faktor 3.5 größer (d_{32} 4-Cl-Acetophenon = $49 \text{ }\mu\text{m}$). Dieser Wert entspricht in etwa den mit bekannten Korrelationsbeziehungen der Gleichgewichtstropfendurchmesser beim Dispergieren im Rührkesselreaktor kalkulierten Durchmessern von $d_{32} \sim 39 \text{ }\mu\text{m}$ (4-Cl-Acetophenon) und $d_{32} \sim 36 \text{ }\mu\text{m}$ (6-Cl-3,5-Dioxo-Hexansäure-*tert*-Butylester).

Einen Prozessverlauf für einen Ansatz mit intermittierender 6-Cl-3,5-Dioxo-Hexansäure-*tert*-Butylester-Zudosierung im Rührkesselreaktor ist in Abb. 4.3 gezeigt; man erreicht unter diesen Bedingungen ca. 60% Dihydroxy-Produkt bei Bildung von ca. 40% Nebenprodukt (Abb. 43).

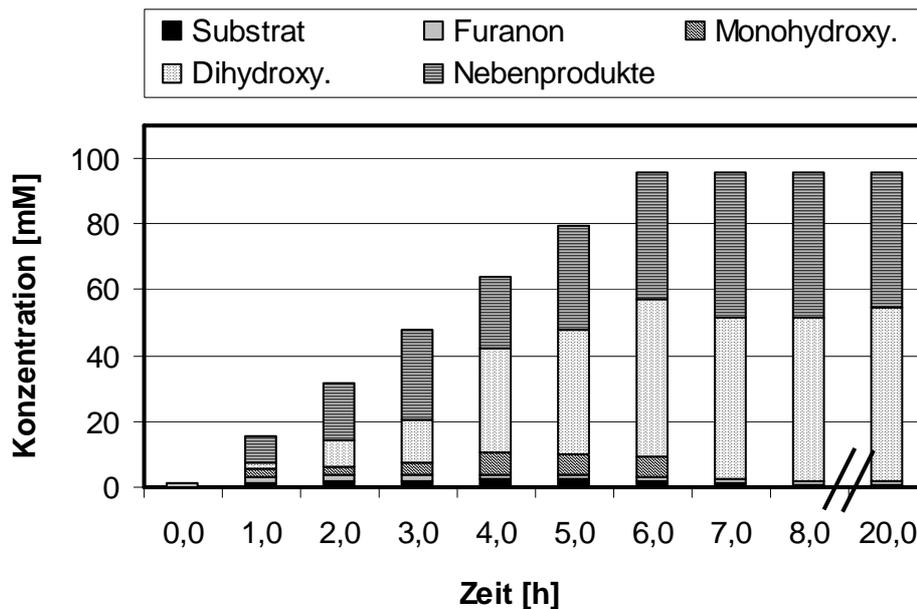


Abbildung 4.3: Prozessverlauf eines Ansatzes mit intermittierender 6-Cl-3,5-Dioxo-Hexansäure-*tert*-Butylester-Zudosierung im Rührkesselreaktor (50 g L⁻¹ *L. kefir*, 0.2 M KPi-Puffer, pH 6.5, 22°C)

TP 5: Jülich Fine Chemicals

Mit Wirkung zum 01.07.2002 hat die Firma JFC – Jülich Fine Chemicals GmbH die Rechte und Pflichten der Fa. Rhein Biotech GmbH in dem oben genannten Projekt übernommen. Zunächst stand zur Einarbeitung in die Themenstellung die Sichtung der Antragsunterlagen, der Aufgabenverteilung zwischen den Partnern und der bisherigen Ergebnisse im Vordergrund. Darüber hinaus wurde die Realisierbarkeit der im Projekt erarbeiteten Techniken mit den technischen Möglichkeiten der Firma gegenübergestellt. Prinzipiell ist JFC in der Lage, Biomasse zur Ganzzellbiotransformation im größeren Maßstab (Kg-Mengen) bereit zu stellen. Speziell beim Down Stream Processing der hergestellten 5-Hydroxy-3-oxo-hexansäurederivate kann JFC aufgrund des vorhandenen Know-hows und entsprechender Gerätetechnologie einen Beitrag leisten. In den Labors der Firma werden derzeit eine Reihe von chiralen Alkoholen aus Biokatalyse-Verfahren extraktiv und destillativ im kg-Maßstab aufgearbeitet. Dabei kommt ein kontinuierlich betriebener Mischabsetzer mit hoher Extraktionseffizienz zum Einsatz.

Die Firma konnte in erster Linie dem Projektpartner an der TU München bei den Arbeiten zu TP 4 beratend zur Seite stehen. Es wurden hier speziell Erfahrungen bei den isolierten Dehydrogenase-Systemen mit den *L. kefir*-Ansätzen verglichen, sowie die bestehenden Techniken zur Ganzzellbiotransformation mit *L. kefir* für die Herstellung chiraler (R,R)-Dirole eingebracht und diskutiert.

SOLL-/ISTVERGLEICH

Soll	Ist
TP 1 <ul style="list-style-type: none"> - Entwicklung eines Ganzzell-Systems mit künstlicher NADPH-Regenerierung durch z.B. Glucose Dehydrogenase (GDH) und anderen Dehydrogenasen; - Coexpression von ADH und einem Regenerierungs-Enzym; - Bewertung neuer Ganzzell-System 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>GDH</i> Gen aus <i>B.subtilis</i> isoliert und kloniert - <i>ADH</i> Gen aus <i>L. kefir</i> isoliert und kloniert - Rekombinantes Ganzzell-System (<i>E. coli</i>) mit exprimierbaren ADH- und GDH-Genen konstruiert - 2 verschiedene Coexpressions-Systeme entwickelt und in Ganzzellbiotransformationen getestet - Ganzzell-Biotransformation in wässrig-organischen Zweiphasen-Systemen durchgeführt und vergleichend quantitativ bewertet - Weitere Gene für die Regenerierung von NADPH isoliert und kloniert
TP 2 <ul style="list-style-type: none"> - Substratsynthese - Produktcharakterisierung 	<ul style="list-style-type: none"> - > 75 g Substrat hergestellt - Syntheserouten zu allen vier diastereomeren Diolen mit entsprechender Analytik entwickelt - Übertragung der Ansätze der regio- und enantioselektiven Reduktion auf andere Arbeitskreise der Chemokatalyse erfolgt
TP 3 <ul style="list-style-type: none"> - Versuchsplanungstechnik für fed-batch 	<ul style="list-style-type: none"> - Versuchsplanungstechnik in MATLAB/SIMULINK realisiert - Modellidentifizierung und -diskriminierung anhand von Fermentationsdaten mit <i>C. glutamicum</i> erfolgt (da <i>E. coli</i> System noch nicht einsetzbar) - experimentelle Überprüfung der Versuchplanung wird aktuell durchgeführt
TP 4 <ul style="list-style-type: none"> - Verfahrenstechnische Untersuchungen zur Biohydrierung mit intermittierender Eduktzugabe (6-Cl-3,5-Dioxohexansäure-<i>tert</i>-butylester und 4-Cl-Acetophenon) - Maßstabsvergrößerung 	<ul style="list-style-type: none"> - Biohydrierung von 6-Cl-3,5-Dioxohexansäure-<i>tert</i>-butylester: Raum-Zeit-Ausbeute im Rührkessel-Reaktor um Faktor 10 gesteigert auf 7.5 mmol L⁻¹ h⁻¹ für (3<i>R</i>, 5<i>S</i>)-Dihydroxyhexanoat (50 g L⁻¹ <i>L. kefir</i>, Ausbeute 55%, de > 99%). - Biohydrierung von 4-Cl-Acetophenon: spezifische Produktbildung um Faktor 2.5 auf 6.3 mmol g⁻¹ für (<i>R</i>)-1-(4-Chlorphenyl)-Ethanol gesteigert (Ausbeute 70%, ee 94.5%), mit Glukose und Isopropanol als Cosubstrat - Vollständige verfahrenstechnische Charakterisierung im 2 L Rührkesselreaktor unter Zuhilfenahme einer <i>in-situ</i> Stoffaustauschflächenbestimmung (3 dimensionale optische Laser-Rückreflexionsmessung 3-D-ORM zur Messung der Tropfengrößen (-verteilung) in Kombination mit einer Bildanalyse).
TP 5 <ul style="list-style-type: none"> - halbtechnische Realisierung 	<ul style="list-style-type: none"> - Fa. JFC ist kurzfristig nach Ausscheiden von Rhein Biotech GmbH in das Projekt aufgenommen worden - technische Möglichkeiten bei JFC werden zur Zeit evaluiert und diskutiert - Produktherstellung durch Ganzzellbiotransformation und Isolierung im kg-Maßstab ist bereits mit alternativen Produkten erfolgreich durchgeführt worden (siehe z.B. (2<i>R</i>,5<i>R</i>)-2,5-Hexandiol)

Die Ergebnisse dieses Projekts sind in mehreren aktuellen Präsentationen (Posterpräsentation BIOCAT 2002 [18], Vortrag [17] und Poster auf der Dechema Jahrestagung 2003 [19], Vortrag „Int. Symp. Math. Modelling“ [20] und TRANSKRIPT-Beitrag [21]) zusammenfassend dargestellt.

References

1. Weckbecker, A., Hummel, W., *Enzyme Microb. Technol.* (submitted), 2004.
2. Weckbecker, A., Hummel, W., *Meth. Biotechnol.*, Humana Press (in press). 2004.
3. Wolberg, M., Hummel, W., Müller, M., *Chem. Eur. J.*, 2001. **7**(21): p. 4562-4571.
4. Wolberg, M., Hummel, W., Wandrey, C., Müller, M., *Angew. Chem.*, 2000. **39** (23): p. 4306.
5. Wolberg, M., Bode, S., Feldmann, R., Müller, M., *Advan. Syn. Catal.* (in Vorber.).
6. Stewart, J., Wolberg, M., Müller, M., unveröffentlicht.
7. Wolberg, M., Ji, A.G., Hummel, W., Müller, M., *Synthesis*, 2001(6): p. 937-942.
8. Ji, A.G., Wolberg, M., Hummel, W., Wandrey, C., Müller, M., *Chem. Comm.*, 2001(01): p. 57-58.
9. Eustache, F., Dalko, P.J., Cossy, J., *Org. Lett.*, 2002. **4**: p. 1263-1265.
10. Enders, D., Vicario, J.L., Job, A., Wolberg, M., Müller, M., *Chem. Eur. J.*, 2002. **8**: p. 4272-4284.
11. Job, A., Wolberg, M., Müller, M., Enders, D., *Synlett* 11, 2001: p. 1796-1798.
12. Vicario, J.L., Job, A., Wolberg, M., Müller, M., Enders, D., *Org. Lett.*, 2002. **4**: p. 1023-1026.
13. Box, G.E.P., Hill, W.J., *Technometrics*, 1967. **9**: p. 57-71.
14. Hunter, W.-G., Reiner, A.M., *Technometrics*, 1965. **7**: p. 307-323.
15. Buzzi-Ferrari, Forzatti, G.P., *Chem. Eng. Sci.*, 1990. **45**: p. 477-481.
16. Chen, B.H., Asprey, R., *Ind. & Eng. Chem. Res.*, 2003. **41**: p. 1379-1390.
17. Amidjojo, M., Lindberg, P., Jones, R., Link, H., Weuster-Botz, D., Poster Dechema Jahrestagung der Biotechnologen 2003, 2.4.2003-4.4.2003, Garching, 2003.
18. Müller, M., Takors, R., Hummel, W., Amidjojo, M., Weuster-Botz, D., Wandrey, C., Poster biocat 2002; 28.7.2002-31.7.2002, Hamburg, 2002.
19. Brik Ternbach, M.A., Wandrey, C., Takors, R., DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Garching, (2.-4.4.2003), 2003.
20. Brik Ternbach, M.A., Wandrey, C., Takors, R., 4th International Symposium on Mathematical Modelling (MATHMOD 4), Wien, (5.-7.2.2003), 2003.

21. Weckbecker, A., Hummel, W., Amidjojo, M., Weuster-Botz, D., Brik Ternbach, M., Takors, R., Müller, M., Wandrey, C., Transkript; Sonderheft Nachhaltige Biokatalyse, 2003, S. 100-104, 2003.

ZUSÄTZLICHE ANGABEN ZUM PROJEKTVERLAUF

(Abgeschlossene) Dissertationen

- 1) M. Amidjojo, ;Verfahrenstechnik der mikrobiellen Biohydrierung' (Arbeitstitel, laufende Dissertation)
- 2) M.A. Brik Ternbach ,Development and Application of a Model-Discriminating Experimental Design Strategy for Microbial Fed-batch Processes' (Arbeitstitel, laufende Dissertation)
- 3) A. Weckbecker "Entwicklung von Ganzzell-Biokatalysatoren zur Reduktion von Ketoverbindungen" (Arbeitstitel, laufende Dissertation)

Angemeldete/Erteilte Patente

-

Begutachtete/ingereichte/geplante Publikationen

M.A. Brik Ternbach, Wandrey, C., Takors, R., 4th International Symposium on Mathematical Modelling (MATHMOD 4), Wien, (5.-7.2.2003), 2003 (Proceedings)

M.A. Brik Ternbach, C. Bollman, C. Wandrey, R. Takors (2004) Application of Model Discriminating Experimental designs for Modeling and Process Development of a Fermentative fed-batch L-Valine Production Process (submitted)

A. Weckbecker, Hummel, W., Enzyme Microb. Technol. (submitted), 2004.

A. Weckbecker, Hummel, W., Meth. Biotechnol., Humana Press (in press). 2004.

A. Weckbecker, Schneider, F. Hummel, W., Appl. Microbiol. Biotechnol. (submitted), 2004

M. Wolberg, Ji, A.G., Hummel, W., Müller, M., Synthesis, 2001(6): p. 937-942.

M. Wolberg, S. Bode, R. Feldmann, M. Müller, M. Vilella, Large scale synthesis of (3*R*,5*S*)-*tert*-butyl 6-chloro-3,5-dihydroxyhexanoate and it's application in the synthesis of a building block of atorvastatin,*Adv. Synth. Catal.* (in Vorbereitung).

M. Wolberg, I. A. Kaluzna, M. Müller, J. Stewart, Bakers yeast reduction of *tert*-butyl 6-chloro-3,5-dihydroxyhexanoate, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, (submitted).

M. Wolberg, Hummel, W., Müller, M., Chem. Eur. J., 2001. **7**(21): p. 4562-4571.

M. Wolberg, Hummel, W. Wandrey, C. Müller, M., Angew. Chem., 2000. **39** (23): p. 4306.

Sonstige Publikationen

M. Amidjojo, Lindberg, P., Jones, R., Link, H., Weuster-Botz, D., Poster - Dechema Jahrestagung der Biotechnologen 2003, 2.4.2003-4.4.2003, Garching, 2003.

M. Amidjojo; Lindberg, P.; Nowak, A.; Mehler, S.;Hummel, W.; Müller, M.; Weuster-Botz, D.; Vortrag - Bioperspectives 2004: Process design for the microbial reduction of hydrophobic keto compounds, 4.-6.5.2004, Wiesbaden 2004.

M. Amidjojo, Nowak, A.; Franco-Lara, E.; Link, H.; Weuster-Botz, D.; Poster – GVC Jahrestagung 2004 (submitted): Process design for the asymmetric synthesis of *tert*-butyl-6-chloro-(3*R*,5*S*)-dihydroxyhexanoate, 12.-14.10.2004, Karlsruhe 2004.

M.A. Brik Ternbach, C. Wandrey, R. Takors (2003) Application of Experimental Designs for Modelling of a Fermentative L-Valine Production Process by *Corynebacterium glutamicum*, 4th International Symposium on Mathematical Modelling (MATHMOD 4), Wien, 05.-07.02.

M.A. Brik Ternbach, C. Wandrey, R. Takors (2003) Model Based Process Development of a Fermentative L-Valine Production Process Using *Corynebacterium glutamicum*, 21 DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Garching, 02.-04.04.

M.A. Brik Ternbach, C. Wandrey, R. Takors (2004) Modelldiskriminierende Versuchsplanung in fed-batch Prozessen – Beispiel: L-Valinproduktion mit *Corynebacterium*

glutamicum, DECHEMA/GVC Vortrags- und Diskussionstagung „Simultane und integrierte Bioprozessentwicklung“, Eisenach 17.-19.05.

M. Müller, *Highly Regioselective and Enantioselective Reduction of 3,5-Dioxocarboxylates*, CHIRAL Europe 2001, London, 11.-12.10.2001 (Vortrag).

M. Müller, Neuere Aspekte biokatalytischer Ketonreduktion, Universität Dortmund, 29.10.2002 (Vortrag).

M. Müller, Takors, R., Hummel, W., Amidjojo, M., Weuster-Botz, D., Wandrey, C., Poster biocat 2002; 28.7.2002-31.7.2002, Hamburg, 2002.

M. Müller, M. Wolberg, T. Schubert, W. Hummel, *Enzyme-catalyzed regio- and enantioselective ketone reductions*, in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Volume Title: Technology Transfer in Biotechnology: From Lab to Industry to Production, Springer Verlag, Heidelberg (in press)

A. Weckbecker, Müller., Hummel, W., Poster biocat 2002; 28. - 31.7.2002; Hamburg, 2002

A. Weckbecker, Hummel, W., Amidjojo, M., Weuster-Botz, D., Brik Ternbach, M., Takors, R., Müller, M., Wandrey, C., Transkript; Sonderheft Nachhaltige Biokatalyse, 2003, S. 100-104, 2003

Wirtschaftliche Verwertung der Projektergebnisse

Die Firma JFC – Jülich Fine Chemicals GmbH hat in der Zwischenzeit die im Institut für Biotechnologie bei Herrn Dr. M. Müller entwickelte Substratsynthese in den >100 g-Maßstab übertragen und insgesamt zweimal erfolgreich durchgeführt, um einen ersten Auftrag über 25 g des *tert*-Butyl (*S*)-6-chlor-5-hydroxy-3-oxohexanoat zu erfüllen. Weitere Produktaufträge in diesem Umfeld werden erwartet.

Weitere potenzielle Nutzer oder Kapitalgeber

Zur Indikation möglicher Produkt-Nutzer ist die nachfolgende Publikationsliste zum Thema „Verwendung des *tert*-Butyl (*S*)-6-chlor-5-hydroxy-3-oxohexanoat (und des entsprechenden (*R*)-Enantiomers) in der Wirkstoff- und Naturstoffsynthese“ angegeben:

A. Job, M. Wolberg, M. Müller, D. Enders, Asymmetric Synthesis of *S*-(+)-Argentilactone and *S*-(-)-Goniothalamine, *Synlett* **2001**, 1796-1798.

J. L. Vicario, A. Job, M. Wolberg, M. Müller, D. Enders, Asymmetric Total Synthesis of (-)-Callystatin A Employing the SAMP/RAMP Hydrazone Alkylation Methodology, *Org. Lett.* **2002**, 4, 1023-1026.

D. Enders, J.L. Vicario, A. Job, M. Wolberg, M. Müller, Asymmetric Total Synthesis of (-)-Callystatin A and (-)-20-*epi*-Callystatin A Employing the SAMP/RAMP Hydrazone Alkylation Methodology, *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 4272-4284.

D. Enders, A. Lenzen, M. Müller, Efficient Asymmetric Syntheses of (+)-Strictifoline, *Synthesis* **2004**, 1486-1488

Weiterführende Entwicklungsmöglichkeiten

Neben den im obigen Abschlussbericht bereits genannten Themen sind folgende Entwicklungsmöglichkeiten zu nennen:

- Die Übertragung der Optimierung der LBADH-katalysierten Reduktion des *tert*-Butyl 6-chlor-3,5-dioxohexanoats kann auch zur des *tert*-Butyl (*R*)-6-chlor-5-hydroxy-3-oxohexanoat mit isolierter ADH aus Bäckerhefe (siehe Publikation mit Jon Stewart) genutzt werden und erlaubt den Zugang zu den vier möglichen stereoisomeren 3,5-dihydroxyestern in enantiomerenreiner Form und in präparativen Mengen. Diese können wiederum in vielfältiger Form in der Synthese von Polyketid-abgeleiteten Natur- und Wirkstoffen genutzt werden.
- Die modelldiskriminierende Versuchsplanungstechnik ist in einer Software Matlab/Simulink verfügbar und steht für entsprechende Anwendungen bereit.

Zusätzliche Projektanträge bei der DBU

Von den einzelnen Projektpartnern wurden innerhalb der ICBio Ausschreibung neue Projektanträge gestellt bzw. sind bereits in Bearbeitung.