

Förderschwerpunkt Biotechnologie:
Innovative enzymatische Gasphasenreaktionen
zur umweltschonenden Herstellung
optisch aktiver Feinchemikalien

Az: 13053/31

Projektbeginn: 01.04.2001
Laufzeit: 3 Jahre + 6 Monate

Schlussbericht

Verfasserin: Dr.-Ing. Antje Spieß, Wissenschaftliche Assistentin,
RWTH Aachen, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

Aachen, Januar 2005

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abbildungsverzeichnis.....	2
Tabellenverzeichnis.....	2
Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole.....	3
Zusammenfassung.....	4
Bericht.....	5
1. Anlass und Zielsetzung des Projekts	5
2. Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden	5
2.1. <i>Expression und Aufreinigung von thermostabilen ADHs</i>	5
2.2. <i>Immobilisierung von ADH aus Thermoanaerobacter sp.</i>	6
2.3. <i>Verbesserung des kontinuierlichen Gasphasenreaktors</i>	6
2.4. <i>Bestimmung von Wasseradsorptionsisothermen</i>	7
2.5. <i>Optimierung der Betriebsbedingungen der Gasphasenreaktion</i>	8
3. Ergebnisse	9
3.1 <i>Expression und Aufreinigung von thermostabilen ADHs</i>	9
3.2. <i>Immobilisierung von ADH aus Thermoanaerobacter sp.</i>	10
3.3. <i>Kinetische Studien der enzymatischen Gasphasenreaktionen</i>	13
3.4. <i>Optimaler Betriebspunkt der enzymatischen Gasphasenreaktion</i>	15
3.5. <i>Ökonomische Bewertung der enzymatischen Gasphasenkatalyse</i>	17
4. Diskussion	19
5. Öffentlichkeitsarbeit	21
6. Fazit	22
Literaturangaben.....	22
Anlagen/Anhang.....	23

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1 Schema des kontinuierlichen enzymatischen Gasphasenreaktors mit getrennter Thermostatisierung für Substratverdampfung und Reaktion.	7
Abb. 2.2: Dynamische Messung der relativen Feuchte während einer Absorptionsmessung. Die schattierte Fläche entspricht dem gesamt absorbierten Wasser. Zum Vergleich die Kurven für den leeren Reaktor bzw. den mit unbeladenen Glasträgern gefüllten Reaktor.	8
Abb. 3.3: Effekt des Saccharosegehalts auf die Immobilisierungseffizienz von (A) rohem und (B) hitzebehandeltem Zellextrakt von ADH T. Schwarze Balken bezeichnen die Restaktivität, die weißen Balken den Proteingehalt. Immobilisierungsbedingungen: 170 Unit Zellextrakt, 500 mg Glasträger; 1 mL Phosphatpuffer. Der Saccharosemenge bezieht sich auf den Proteingehalt (w/w).....	11
Abb. 3.4: Effekt des Immobilisierungspuffers auf die Anfangsreaktionsrate und die Halbwertszeit von ADH T in der Gasphasenreaktion. Quadrate bezeichnen die Anfangsreaktionsrate, schwarze Balken die Halbwertszeit. Immobilisierung von 170 Unit ADH T – Rohextrakt auf 500 mg Glasträger in 1 mL Puffer; Gasphasenreaktion mit 15 mL/min Gasstrom; 150 mg Immobilisat, $a_{AcPh} = 0.15$, Isopropanol/Acetophenon = 45, Temperatur 40 °C, $a_w = 0,5$	12
Abb. 3.5: Effekt der Temperatur auf Anfangsreaktionsrate und Halbwertszeit der immobilisierten LB ADH (A) und ADH T (B). Leere Quadrate bezeichnen die Anfangsreaktionsrate, die gefüllten die Halbwertszeit. Gasphasenreaktion: 35 mL/min Gasstrom, 150 mg Immobilisat, $a_{AcPh} = 0.15$, Iso/AcPh = 60, $a_w = 0,55$. Immobilisierung: 170 Units Enzym je 500 mg Glasträger in 1 mL Phosphatpuffer, pH 7. Verhältnis Cofaktor/Protein (m/m) 1.25 (LB ADH) bzw. 3.55 (ADH T).	13
Abb. 3.6: Anfangsgeschwindigkeit einer kontinuierlichen Gasphasenreaktion bei verschiedenen Wasseraktivitäten im Vergleich zur Adsorptionsisotherme. Reaktionsbedingungen: Temperatur 40 °C, 140 mg Glasträger mit ADH LB und Suchrose, $a_{AcPh} = 0.2$, molares Verhältnis Isopropanol/Acetophenon = 60; volumetrischer Fluss = 46 mL/min.	14
Abb. 3.7: Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit von der Acetophenonaktivität. Reaktionsbedingungen: Temperatur 40 °C, 140 mg Glasträger mit ADH LB und Suchrose, $a_w = 0.65$, molares Verhältnis Isopropanol/Acetophenon = 60; volumetrischer Fluss = 46 mL/min.	14
Abb. 3.8: Abhängigkeit der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit von der Isopropanolaktivität. Reaktionsbedingungen: Temperatur 40 °C, 140 mg Glasträger mit ADH LB und Suchrose, $a_w = 0.65$, $a_{AcPh} = 0.05$, volumetrischer Fluss = 52 mL/min.	15
Abb. 3.9: Veränderung des Umsatzes und der Enzymaktivität mit dem molaren Fluss im kontinuierlichen Reaktor. Temperatur 40 °C, 700 mg Glasträger mit ADH LB und Suchrose, $a_w = 0.65$, $a_{AcPh} = 0.3$; molares Verhältnis Isopropanol/Acetophenon = 60.	16
Abb. 3.10: Veränderung des Umsatzes und der Enzymaktivität mit dem volumetrischen und molaren Fluss im kontinuierlichen Reaktor. Temperatur 40 °C, 300 mg Glasträger mit ADH LB und Suchrose, $a_w = 0.65$, $a_{Oct} = 0.1$; molares Verhältnis Isopropanol/Octanon = 10.	16
Abb. 3.11: Verlauf von Konzentrationen (a), Umsatz und Reaktionsraten (b) während der Langzeit-Biotransformation. Temperatur 40 °C, 4.7 g Glasträger mit ADH LB und Suchrose, $a_w = 0.65$, $a_{AcPh} = 0.3$; molares Verhältnis Isopropanol/Acetophenon = 60, volumetrischer Fluss wie in der Abbildung dargestellt.	17

Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1: Bestimmung des pH Optimums zur Reduktion, gemessen bei 30°C mit 10 mM Aceton als Substrat. ...	9
Tab. 3.2: Exprimierte Aktivität von ADH T bei verschiedenen, zusätzlich ins Hochzell-dichte-Medium gegebenen Zink-Mengen.....	10
Tab. 3.3: Effizienzparameter Turnoverzahl (TTN) und Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) für ausgewählte Reaktionen. Die jeweiligen Reaktionsbedingungen entsprechen den optimierten Reaktionsbedingungen bei den jeweiligen Temperaturen.....	18
Tab. 4.4: Tatsächliche Durchführung der Arbeitspakete des Verlängerungszeitraums.....	20

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

AcPh Acetophenon

ADH Alkoholdehydrogenase

BioVT Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, RWTH Aachen

IET Institut für Enzymtechnologie am FZ Jülich, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Iso Isopropanol (=2-Propanol)

JFC Jülich Fine Chemicals GmbH, Jülich

LB *Lactobacillus brevis*

T *Thermoanaerobacter sp.*

W Wasser

w/w Gewichtsanteil

Y Yeast (= *Saccharomyces cerevisiae*)

a Aktivität [-]

ee Enantiomerenüberschuss [-]

TTN Total Turnover Number [-]

RZA Raum-Zeit-Ausbeute [g/L/d]

F^n molarer Fluss [$\mu\text{mol}/\text{min}$]

V Volumen [mL]

K_m Michalis-Menten-Konstante [mM bzw. -]

V_{max} Enzymaktivität [mM/min]

c_0 Substratstartkonzentration [mM]

X Umsatz [-]

Zusammenfassung

Die heterogene enzymatische Gasphasenkatalyse ist eine der neuesten Anwendungen der Enzymkatalyse. Dabei katalysiert ein quasi-trockenes Enzympräparat die Reaktion gasförmiger Edukte. Zu den Vorteilen dieses Systems gehören eine erhöhte Stabilität des Enzyms, die Vermeidung von Lösemitteln und ein einfaches Verfahren zur Produkttrennung und -aufreinigung. Diese Eigenschaften machen das Konzept aus ökologischen und ökonomischen Gesichtspunkten sehr interessant.

Im dritten und letzten Jahr des Projekts wurden Arbeiten zur Expression und Reinigung von neuen thermostabilen Alkoholdehydrogenasen (ADHs), zur Optimierung des Enzympräparates in Hinblick auf Enzymaktivität und Stabilität auch in der Gasphasenreaktion, und zur Optimierung des Reaktionssystems und Scale-up-Versuche im kontinuierlichen Laborreaktor durchgeführt.

Dabei konnte gezeigt werden, dass unter optimierten Bedingungen die adsorptive Immobilisierung der ADHs auf Glaträgern zu einer Aktivierung der ADH im Vergleich zur Lösung führt. Wesentliche Parameter hierbei sind Saccharose als Stabilisator, ein geeigneter Puffer (50 mM Phosphatpuffer, pH 7). Wider Erwarten zeigte das thermostabile Enzym aus *Thermoanaerobacter sp.* im Vergleich zu ADH aus *Lactobacillus brevis* (LB ADH) bisher keine erhöhte Stabilität in der Gasphasenreaktion.

Mit kinetischen Daten der Umsetzung von Acetophenon zu (R)-1-Phenylethanol, katalysiert durch LB ADH, erfolgte eine Auslegung des Gasphasenreaktors in guter Übereinstimmung zu experimentellen Ergebnissen. Eine Übertragbarkeit der Methodik konnte anhand der Umsetzung von 2-Octanon ebenfalls gezeigt werden. Mit einer halbtechnischen Umsetzung von Acetophenon über 10 Tage konnten 1,7 g (R)-1-Phenylethanol hergestellt werden. Die Produktivität erreichte dabei 107 g/L/d und die Total Turnover Number $7 \cdot 10^6$ bezogen auf den Enzymeinsatz.

Bericht

1. Anlass und Zielsetzung des Projekts

Der größte Anteil der derzeit hergestellten optisch aktiven Feinchemikalien wird noch klassisch mit chemischen Verfahren synthetisiert. Enzymatische Biotransformationen gewinnen aber zunehmend an Bedeutung. Ziel dieses Forschungsvorhabens war die Entwicklung eines kontinuierlichen enzymatischen Gasphasenreaktors zur Herstellung von optisch aktiven Alkoholen.

Dieses Produktionsverfahren soll mit den etablierten Verfahren konkurrieren können bzw. Vorteile aufweisen. Der Einsatz enzymkatalysierter Stoffwandlungsverfahren in der Gasphase ist aus ökologischen und ökonomischen Gesichtspunkten deshalb so interessant, weil Edukte umgesetzt werden können, die in wässrigen Medien nur schlecht löslich sind und sonst den Einsatz organischer Lösungsmittel erfordern würden. Die problematische Entsorgung oder Aufarbeitung der organischen Lösungsmittel entfällt daher. Weiterhin ergeben sich bedeutende Vorteile bei der Aufarbeitung der Produkte und bei deren Abtrennung von eventuell nicht umgesetzten Edukten. Da mit einer fraktionierten Kondensation gearbeitet werden kann, entfällt auch in der Aufarbeitung die Notwendigkeit, organische Lösungsmittel einzusetzen, woraus sich eine zusätzliche Umweltentlastung bei der Produktion ergibt.

2. Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Im dritten Jahr hat sich das Projekt mit der Optimierung der Enzyme, des kontinuierlichen Gasphasenreaktors und der ausgewählten Reaktionen für den erfolgreichen und kompetitiven Einsatz in der heterogenen enzymatischen Gasphasenkatalyse befasst. Dabei hat Jülich Fine Chemicals (JFC) die Expression und Aufreinigung von alternativen ADHs aus einem thermophilen Organismus, *Thermoanaerobacter sp.*, vorangetrieben und Untersuchungen in Flüssigphase durchgeführt. Der Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik (BioVT) hat für diese Enzyme die Immobilisierungsbedingungen untersucht, und sich auf die Feinabstimmung des Gasphasenreaktors, die Bestimmung der Wasseradsorptionsisothermen und die Optimierung der Betriebsparameter für die Modellumsetzung von Acetophenon zu 1-Phenylethanol mit Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (LB ADH) konzentriert. Das Institut für Enzymtechnologie (IET), in Person PD Dr. Hummel, stand dem Projekt substantiell durch Diskussionen und Entscheidungen zur Seite.

2.1. Expression und Aufreinigung von thermostabilen ADHs

Zu Beginn der Arbeiten zur Klonierung und Expression der sekundären ADH aus *Thermoanaerobacter* species wurde eine Datenbanksuche nach entsprechenden Enzymen in verwandten Organismen wie *T. ethanolicus* und *T. Brockii* durchgeführt. Die gefundenen Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms *ClustalW* aligned. Die so aufbereiteten Sequenzdaten ermöglichten das Ableiten von Primern, die von der Firma MWG synthetisiert und bei JFC zur PCR mit genomischer DNA aus *Thermoanaerobacter sp.* eingesetzt wurden.

Genomische DNA wurde mit genomic Tips der Firma QIAGEN nach Herstellervorschrift isoliert. Die PCR wurde mit der High Fidelity Polymerase der Firma Roche auf einem

Gradientencycler der Firma Eppendorf nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Temperaturprogramm wurde um einen Annealinggradienten von 50°C bis 65°C aufgebaut:

4' 94°C //

30'' 94°C / 30'' [50°C-65°C] / 2' 68°C // 15x

30'' 94°C / 30'' [50°C-65°C] / 2'+y'' 68°C // 10x

7'68°C // 4°C //

y war in Cyclus 16 20 Sekunden und wurde mit jedem Cyclus um 20 Sekunden verlängert. Das PCR Produkt wurde mit Hilfe des PCR Clean Up Kits der Firma QIAGEN nach Herstellervorschrift aufgereinigt, in pUC 18 kloniert und von der Firma gac sequenziert.

Zur Expression wurde das identifizierte Gen in den Expressionsvektor pET24a kloniert und in BL21 transformiert. Die Induktion erfolgte nach sechs Stunden Kultivierung bei 30 °C in 250 mL LB-Medium mit 0.5 mM IPTG. Die Zellen wurden weitere 18 Stunden kultiviert und anschließend durch Zentrifugation geerntet. Die Zellmasse wurde in 50 mM Tris/HCl pH 7,0 20 %ig resuspendiert und durch 3 x 5 min Beschallung aufgeschlossen. Der Rohextrakt wurde für 7,5 Minuten auf 70 °C erhitzt und die denaturierten Proteine abzentrifugiert.

Die ADH-Aktivität des Überstandes wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurde die Kinetik der Abnahme von NADH in einem Messansatz aus

50 mM Tris/HCl pH 7,0

10 mM Aceton

0,2 mM NADH

in 1 mL Gesamtvolumen vermessen, die durch Zugabe einer Überstandsprobe in geeigneter Verdünnung gestartet wurde. 1 Unit ist die Enzymmenge, die 1 µmol Substrat in 1 Minute umsetzt.

2.2. Immobilisierung von ADH aus *Thermoanaerobacter* sp.

Die Immobilisierung von LB ADH und ADH T erfolgte durch adsorptive Immobilisierung auf Glaträgern. Im optimierten Prozess wurden Enzymstammlösung bzw. Zellextrakt, teilweise unter Zusatz von Stabilisatoren (Saccharose) in 50 mM Phosphatpuffer, pH 7, mit den Glaträgern für 2 h bei 4°C mit 125 rpm gerührt. Anschließend wurde die Suspension bei 4 °C unter Vakuum (450 kPa) getrocknet, bis frei fließende Glaträger erhalten wurden.

Die Zielparameter der Optimierung, Proteingehalt und Enzymaktivität wurden gemäß Bradford (1976) bestimmt bzw. über die Messung der Reduktion des Cofaktors durch Absorption bei 340 nm.

2.3. Verbesserung des kontinuierlichen Gasphasenreaktors

Bei den Prototypen I und II des kontinuierlichen Gasphasenreaktors [2. Zwischenbericht, August 2003, Abb. 2.2] wird der Trägergasstrom bei der gleichen Temperatur gesättigt, bei der auch die Gasphasenreaktion durchgeführt wird. Die mit Wasser, Substrat und Co-Substrat gesättigten Ströme wurden anschließend gemischt und dem Reaktor zugeführt. Damit war für keine Einzelkomponente im Gemisch eine Sättigung (d.h. Aktivität $a_i = 1$) möglich. Um kinetische Studien durchführen zu können, sollen die Aktivitäten der Substrate unabhängig voneinander und über einen weiten Bereich variiert werden können. Hierzu wurden die

Substratsättigung und der Reaktor in zwei, bei unterschiedlichen Temperaturen thermostatisierbaren Schränken montiert (**Abb. 2.1**). Dies erlaubt die Sättigung der Komponenten bei einer höheren als der Reaktionstemperatur, so dass höhere Aktivitäten der Einzelkomponenten erreicht werden können (siehe hierzu auch die Ergebnisse in Kapitel 3.3).

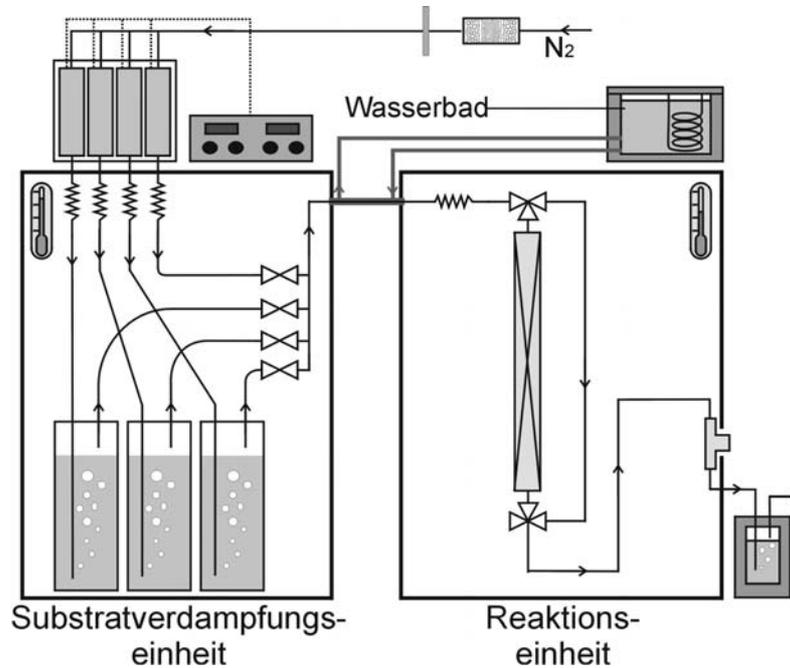


Abb. 2.1 Schema des kontinuierlichen enzymatischen Gasphasenreaktors mit getrennter Thermostatisierung für Substratverdampfung und Reaktion.

2.4. Bestimmung von Wasseradsorptionsisothermen

Um ein Verständnis für den Beladungszustand des Enzymträgers in Abhängigkeit der Wasseraktivität zu erhalten, wurden Wasseradsorptionsisothermen experimentell bestimmt. Diese erlauben eine Aussage über die Bindung des Wassers und das Auftreten freien oder Lösungswassers auf dem Enzymträger.

Zur Quantifizierung des auf der immobilisierten ADH adsorbierten Wassers wurden dynamische Messungen in einem zu **Abb. 2.1** ähnlichen Aufbau (eine Sättigungsflasche für Wasser, Feuchtesensor anstelle Probenahmeport) durchgeführt. Hierbei wurde zunächst eine definierte Menge Enzymimmobilisat im Festbett mit getrocknetem Stickstoff getrocknet. Anschließend wurden definierte Volumenströme getrockneten Stickstoffs mit wassergesättigtem Stickstoff gemischt und durch das Festbett geleitet. Die Fläche unter der resultierenden Feuchtekurve (**Abb. 2.2**) entspricht der auf dem Enzymimmobilisat absorbierten Menge an Wasser.

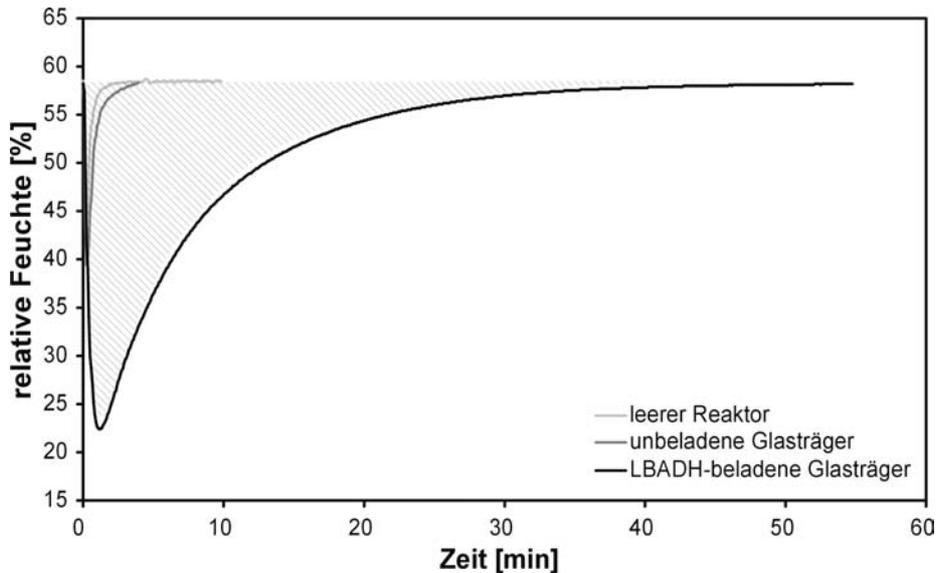


Abb. 2.2: Dynamische Messung der relativen Feuchte während einer Absorptionsmessung. Die schattierte Fläche entspricht dem gesamt absorbierten Wasser. Zum Vergleich die Kurven für den leeren Reaktor bzw. den mit unbeladenen Glasträgern gefüllten Reaktor.

Die vom leeren Reaktor und den unbeladenen Glasträgern absorbierte Menge war klein gegenüber der von den enzymbeladenen Glasträgern absorbierten Menge und wurde daher vernachlässigt.

2.5. Optimierung der Betriebsbedingungen der Gasphasenreaktion

Aufbauend auf der bereits beschriebenen Optimierung der Temperatur in Bezug auf Enzymaktivität und -stabilität wurden die eingestellten Aktivitäten von Wasser, Substrat und Cosubstrat variiert, um einerseits optimale Betriebsbedingungen zu erzielen, andererseits die kinetischen Parameter der Umsetzung gemäß der Michaelis–Menten-Kinetik in der Gasphase abzuschätzen.

Um die Produktivität des Reaktors zu optimieren, wurden basierend auf den kinetischen Daten der erforderliche volumetrische Durchfluss im Verhältnis zum Reaktorvolumen bestimmt (**Glg. 1**) und anschließend experimentell verifiziert.

$$\frac{1}{F^n} = \frac{1}{V} \cdot \left(\frac{K_M}{V_{\max} \cdot c_0} \cdot \ln\left(\frac{1}{1-X}\right) + \frac{1}{V_{\max}} \right) \quad (\text{Glg. 1})$$

mit	F^n	molare Flussrate	$[\mu\text{mol}/\text{min}]$
	V	Reaktorvolumen	$[\text{mL}]$
	K_M	Michaelis-Menten-Konstante	$[\mu\text{mol}/\text{mL}]$
	V_{\max}	Enzymaktivität	$[\mu\text{mol}/\text{mL}/\text{min}]$
	c_0	Substratkonzentration	$[\mu\text{mol}/\text{mL}]$
	X	Umsatz	$[-]$

3. Ergebnisse

3.1 Expression und Aufreinigung von thermostabilen ADHs

Die Existenz einer Alkoholdehydrogenase mit interessantem Substratspektrum und guten katalytischen Eigenschaften zur Umsetzung verschiedener aliphatischer und aromatischer Ketone in *Thermoanaerobacter* species war durch photometrische Aktivitätsmessungen des Rohextraktes aus Wildtyp-Zellen bei JFC bekannt. Es konnte durch gaschromatographische Untersuchungen gezeigt werden, dass Ketone durch den Rohextrakt mit hohen Ausbeuten zu (S)-Alkoholen mit Enantiomerenüberschüssen $e_{e_s} > 99\%$ umgesetzt werden.

Mit Hilfe der aus Nucleotidsequenzen verwandter ADHs abgeleiteten Primer konnte durch PCR eine Sequenz von ca. 1000 Bp aus dem Genom von *Thermoanaerobacter* sp. amplifiziert werden. Diese wurde in pU18 kloniert und von der Firma gatc sequenziert. Eine BLAST-Suche identifizierte die gefundene Sequenz als zinkabhängige medium chain ADH. Auf Grund ihrer Herkunft aus *Thermoanaerobacter* sp. wurde sie ADH T genannt.

Das Gen wurde nun in pET24a kloniert und in BL21 mit 0.5 mM IPTG überexprimiert. Nach 18 Stunden Induktion wurden die Zellen geerntet und aufgeschlossen. Es wurden Aktivitäten von bis zu 5000 U/g Zellfeuchtgewicht gemessen. Die spezifische Aktivität betrug nach Hitzedenaturierung 100 – 150 U/mg (Substrat: Aceton).

Die Lagerstabilität des isolierten Enzyms wurde in verschiedenen Puffersystemen bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht. Dabei ergab sich unter Standardbedingungen (50 mM Tris/HCl pH 7,0; 4 °C) eine Halbwertszeit von ca. 60 Stunden. Die beste Lagerstabilität wurde bei –20 °C in 50 mM Tris/HCl pH 7,0; 50 % Glycerin erreicht. Die Aktivität bleibt hier über mehr als drei Monate stabil.

Das pH Optimum für Reduktionen mit ADH T wurde mit pH 7.0 festgestellt (**Tab. 3.1**).

Tab. 3.1: Bestimmung des pH Optimums zur Reduktion, gemessen bei 30°C mit 10 mM Aceton als Substrat.

pH Wert	5.0	6.5	7.0	7.5	8.0	9.0
relative Aktivität	28 %	66 %	100 %	74 %	76 %	7 %

Zur Gewinnung größerer Enzymmengen wurde versucht, ADH T aus einer Hochzelldichtekultur des Expressionsstammes zu produzieren. Dabei wurden zunächst nur sehr kleine Enzymmengen erhalten. Es zeigte sich, daß das Medium nicht genügend Zink zur aktiven Expression der Alkoholdehydrogenase enthielt. Durch Zusatz von Zinksulfat zum Medium ließen sich die Aktivitätsausbeuten im Parallelversuch dramatisch steigern (**Tab. 3.2**).

Tab. 3.2: Exprimierte Aktivität von ADH T bei verschiedenen, zusätzlich ins Hochzelldichte-Medium gegebenen Zink-Mengen.

Zink-Konzentration	0 mM	0,5 mM	1,0 mM	2,0 mM	3,0 mM
Aktivität	200 U/g	2900 U/g	2000 U/g	1110 U/g	1110 U/g

Die Expressionsleistung des Produktionsstammes in Hochzelldichte-Kulturen blieb dennoch hinter den Ergebnissen aus LB-Schüttelkolben zurück. Dennoch sind aus ca. 2.300 g Zellen mit mehr als 2000 U/g aus 16 L Kulturvolumen recht große Enzymmengen zugänglich, die auch mehrfach produziert wurden.

Eine Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der Expression zeigte, dass die isolierbare Aktivität pro Gramm Zellfeuchtmasse nach 8 Stunden unter Hochzelldichte-Bedingungen für alle gestesteten Zinkkonzentrationen ein Maximum durchläuft. Danach fällt sie schnell ab. (Daten nicht gezeigt).

Mit einer Begrenzung der Expressionsdauer auf 8 Stunden konnte die Expressionsleistung des Produktionsstammes in der nächsten Fermentation auf 3.300 U/g unter nicht zinklimitierten Hochzelldichtebedingungen gesteigert werden.

Leider ist dieser Prozess noch nicht ausreichend reproduzierbar. Trotz optimiertem Protokoll brach die Expressionsleistung in weiteren Fermentationen aus bisher ungeklärter Ursache auf reproduzierbare 1.000 U/g ein. Die ADH T selbst zeigte keinerlei Änderungen in ihren Eigenschaften.

Die weitere Optimierung und das Up-Scaling auf 300 L Fermentationen sind Gegenstand der aktuellen Forschung.

3.2. Immobilisierung von ADH aus *Thermoanaerobacter* sp.

Ein wesentlicher Parameter für die Wirtschaftlichkeit der enzymatischen Gasphasenkatalyse ist die Standzeit des Katalysators. Um diese zu optimieren, wurden die Parameter des Immobilisierungsprozesses variiert, um hohe Proteingehalte, Enzymaktivität und Halbwertzeiten zu erreichen.

Zunächst wurden anhand der Immobilisierungseffizienzparameter Restaktivität und Proteingehalt allgemeine Immobilisierungsbedingungen definiert. Hierbei wurden eine Kontaktzeit von 2 h unter Rühren bei 125 rpm und 4 °C als optimale Parameter für den Adsorptionsschritt gefunden. Kürzere Kontaktzeiten und geringere Drehzahlen führten zu ungleichmäßiger Verteilung des Enzyms auf dem Trägermaterial. Höhere Kontaktzeiten und höhere Drehzahlen, ebenso wie höhere Temperaturen führten zu geringeren Restaktivitäten des Enzyms aufgrund mechanischer Belastung bzw. thermischer Inaktivierung.

Die optimierte Trocknung des Immobilisats wurde in zwei Schritten bei 4 °C durchgeführt: Zunächst 2 h bei 45 kPa, anschließend bis zur vollständigen Trocknung bei 4 kPa. Bei höherem Vakuum zu Beginn erfolgte wiederum eine mechanische Belastung und damit Inaktivierung des Enzyms durch die Bildung von Luftblasen (Trivedi, accepted).

Im folgenden wurden die Stabilisatoren und Puffersysteme variiert. Die Konzentration des Stabilisators Saccharose wurde variiert, um eine optimale Immobilisierungseffizienz zu ermit-

teln (**Abb. 3.3**). Es wurde eine optimale Saccharosemenge in Bezug auf die Restaktivität bei 5-fachem Gehalt (w/w) im Verhältnis zum Proteingehalt gefunden. Auffällig hierbei ist, dass in der flüssigen Phase nach der Immobilisierung höhere Aktivitäten ($> 100\%$) gefunden werden, als aufgrund des gebundenen Proteins erwartet. Der Grund für dieses Phänomen ist noch unklar.

Die Proteinbeladung nimmt mit steigendem Saccharosegehalt leicht ab, da die Saccharose Adsorptionsbindungsstellen auf dem Glasträger besetzt.

Die Aktivität des Enzyms im wässrigen Medium wird kaum durch die Hitzebehandlung beeinflusst. Im gasförmigen Reaktionssystem zeigt sich jedoch, dass der nicht behandelte Rohextrakt höhere Enzymstabilität (höhere Halbwertszeit) aufweist als der hitzebehandelte Zellextrakt (Daten nicht gezeigt). Hierbei wird eine Stabilisierung durch Fremdproteine vermutet.

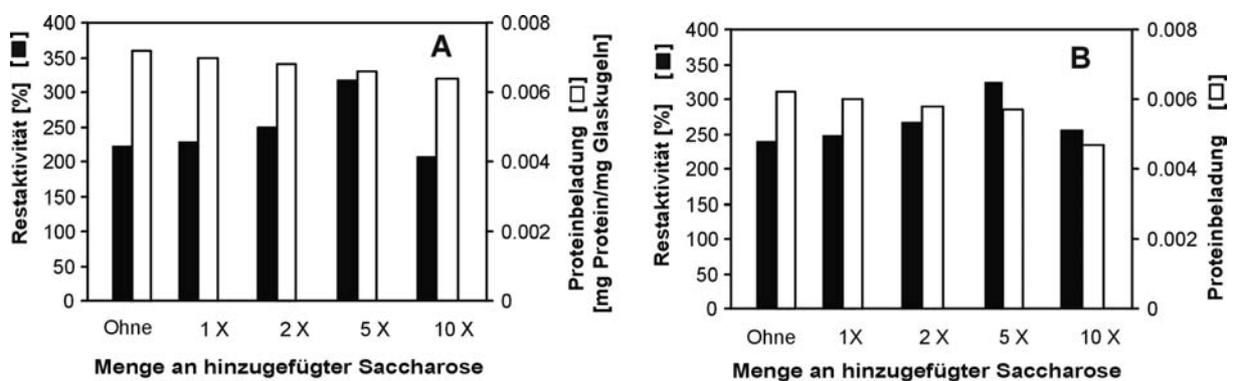


Abb. 3.3: Effekt des Saccharosegehalts auf die Immobilisierungseffizient von (A) rohem und (B) hitzebehandeltem Zellextrakt von ADH T. Schwarze Balken bezeichnen die Restaktivität, die weißen Balken den Proteingehalt. Immobilisierungsbedingungen: 170 Unit Zellextrakt, 500 mg Glasträger; 1 mL Phosphatpuffer. Der Saccharosemenge bezieht sich auf den Proteingehalt (w/w).

Optimale Restaktivitäten im flüssigen und auch im gasförmigen Reaktionssystem wurden für die Immobilisierung mit 50 mM Phosphatpuffer, pH 7 gefunden. pH-Werte abseits des pH-Optimums des Enzyms ergaben ebenso niedrigere Restaktivitäten wie zu niedrige bzw. zu hohe Pufferstärken (Daten nicht gezeigt).

Vom Einsatz von Designerpuffern, wie Tris, MES, TEA ist vollständig abzuraten. Sie zeigen eine wesentlich geringere Halbwertszeit der Enzympräparation (**Abb. 3.4**) in der Gasphasenreaktion. Die Anfangsreaktionsrate des Enzyms ist dabei von der Wahl des Puffer fast nicht beeinflusst.

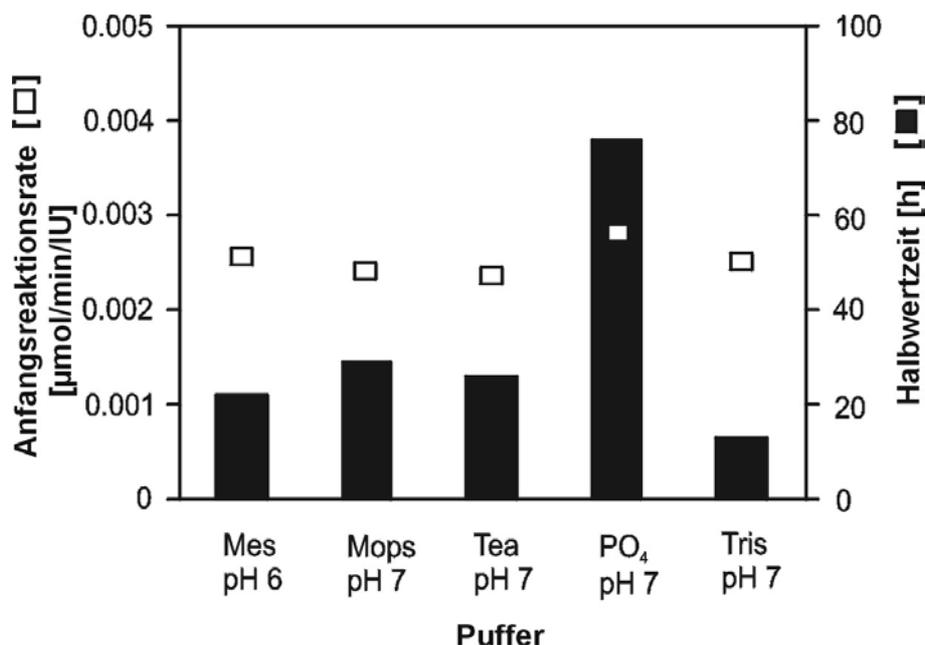


Abb. 3.4: Effekt des Immobilisierungspuffers auf die Anfangsreaktionsrate und die Halbwertszeit von ADH T in der Gasphasenreaktion. Quadrate bezeichnen die Anfangsreaktionsrate, schwarze Balken die Halbwertszeit. Immobilisierung von 170 Unit ADH T – Rohextrakt auf 500 mg Glaträger in 1 mL Puffer; Gasphasenreaktion mit 15 mL/min Gasstrom; 150 mg Immobilisat, $a_{\text{AcPh}} = 0.15$, Isopropanol/Acetophenon = 45, Temperatur 40 °C, $a_w = 0,5$.

Die Begründung hierfür wird in der Kombination mehrerer Faktoren vermutet:

- Bei Temperaturveränderungen (wie z.B. während der Immobilisierung und bei der Gasphasenreaktion) ändert sich der pH-Wert von Designerpuffern (MES; MOPS, Tris, TEA) stärker als der von Phosphatpuffern.
- Sulfonatanionen stabilisieren Proteine weniger gut als Phosphat und Chlorid (Hofmeister-Serie).
- Die Designerpuffer sind hygroskopischer als Phosphat und bedingen dadurch einen höheren Wassergehalt des Immobilisats. Dies führt während der Gasphasenreaktion zu stärkerer thermischer Destabilisierung.

Vergleicht man die Enzymaktivität und Halbwertszeiten der optimierten ADH-Präparationen mit der Temperatur, so fällt auf, dass die ADH T zwar eine höhere Aktivität besitzt, die Thermostabilität im Vergleich zur LB ADH jedoch wesentlich geringer ist (**Abb. 3.5**). Erst bei einer Temperatur von 70 °C ist die Stabilität der ADH aus dem thermophilen Organismus höher als die der ADH aus dem mesophilen Organismus; jedoch nicht in einer anwendungsrelevanten Größenordnung.

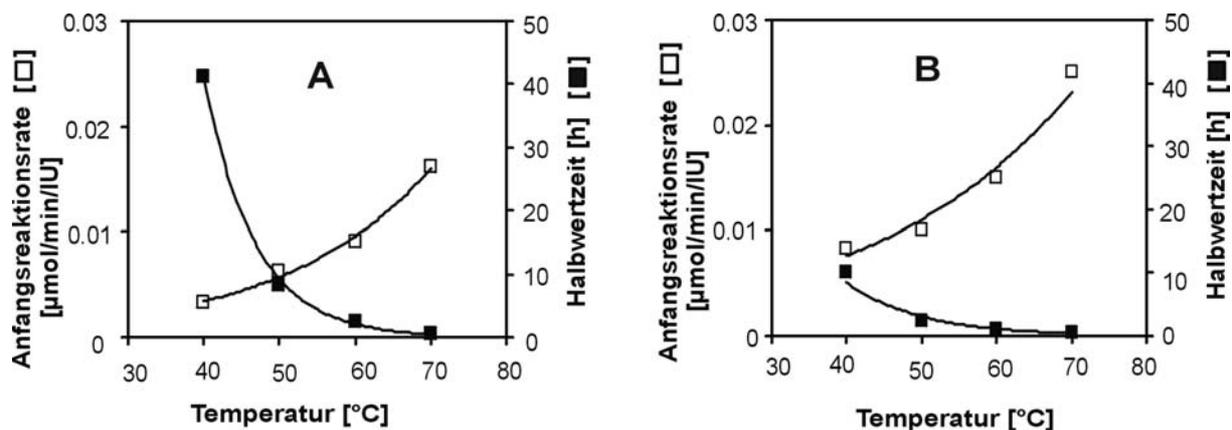


Abb. 3.5: Effekt der Temperatur auf Anfangsreaktionsrate und Halbwertszeit der immobilisierten LB ADH (A) und ADH T (B). Leere Quadrate bezeichnen die Anfangsreaktionsrate, die gefüllten die Halbwertszeit. Gasphasenreaktion: 35 mL/min Gasstrom, 150 mg Immobilisat, $a_{\text{AcPh}} = 0.15$, Iso/AcPh = 60, $a_{\text{W}} = 0.55$. Immobilisierung: 170 Units Enzym je 500 mg Glaträger in 1 mL Phosphatpuffer, pH 7. Verhältnis Cofaktor/Protein (m/m) 1.25 (LB ADH) bzw. 3.55 (ADH T).

Daher wurden alle kinetischen Studien und auch die ökonomische Bewertung der enzymatischen Gasphasenkatalyse im folgenden anhand der LB ADH durchgeführt.

3.3. Kinetische Studien der enzymatischen Gasphasenreaktionen

Um eine reaktionstechnische Optimierung der enzymatischen Gasphasenreaktion zu erreichen, wurden kinetische Studien der wesentlichen Einflussparameter durchgeführt. Dies betraf die Parameter Wasseraktivität (relative Feuchte), Aktivitäten des Substrats und Cosubstrats ebenso wie die Reaktionstemperatur.

Die Wasseraktivität wurde in der Vergangenheit bereits variiert, um ihren Einfluss auf die Stabilität der Enzympräparation zu untersuchen [1. Zwischenbericht, Abb. 3.2]. Dort wurde gezeigt, dass ein Anstieg der Wasseraktivität zur schnelleren Deaktivierung des Enzyms führt. Bei den jetzt durchgeführten kinetischen Untersuchungen sowohl bei 25°C (Daten nicht gezeigt) als auch bei 40°C (Abb. 3.6) konnte nachgewiesen werden, dass ein signifikanter Anstieg der Enzymaktivität erst mit Vervollständigung der monomolekularen Belegung des Enzyms mit Wasser bei etwa 65 % relativer Feuchte erfolgt. Somit liegt die optimale Wasseraktivität (Maximum für Enzymaktivität, Minimum für Deaktivierung) für LB ADH bei $a_{\text{W}} = 0.65$.

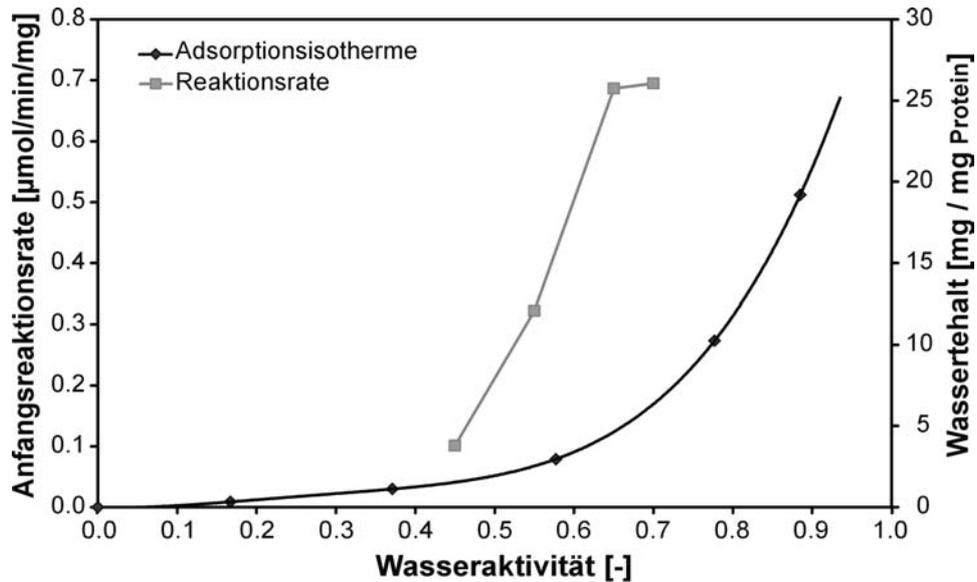


Abb. 3.6: Anfangsgeschwindigkeit einer kontinuierlichen Gasphasenreaktion bei verschiedenen Wasseraktivitäten im Vergleich zur Adsorptionsisotherme. Reaktionsbedingungen: Temperatur 40 °C, 140 mg Glasträger mit ADH LB und Suchrose, $a_{\text{AcPh}} = 0.2$, molares Verhältnis Isopropanol/Acetophenon = 60; volumetrischer Fluss = 46 mL/min.

Auch die Substrat-/Cosubstratkonzentration wurde bereits in der Vergangenheit in Hinblick auf das Reaktionsgleichgewicht hin untersucht. Es wurde gezeigt, dass das molare Verhältnis von Co-Substrat Isopropanol zu Substrat Acetophenon, den maximal erreichbaren Umsatz bestimmt [2. Zwischenbericht, Abb. 3.7].

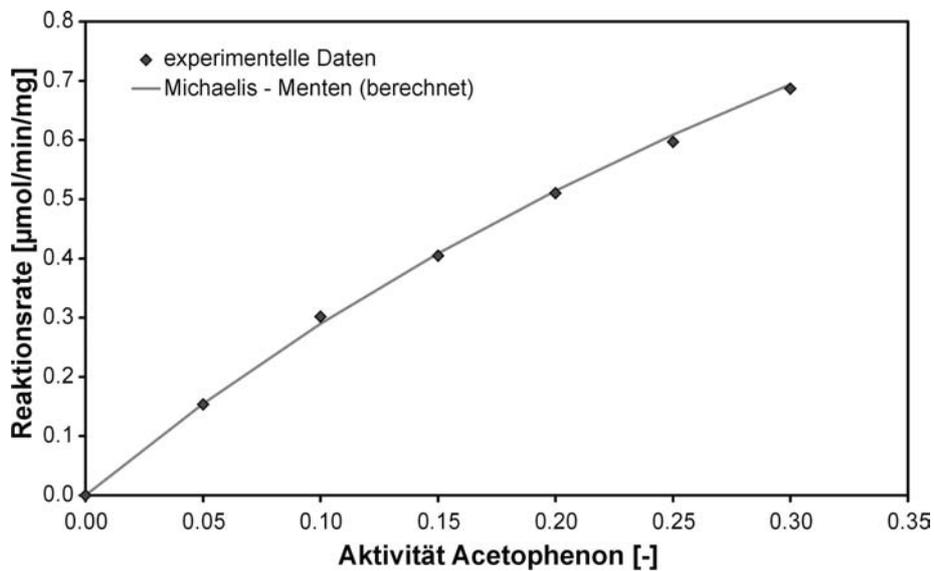


Abb. 3.7: Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit von der Acetophenonaktivität. Reaktionsbedingungen: Temperatur 40 °C, 140 mg Glasträger mit ADH LB und Suchrose, $a_{\text{W}} = 0.65$, molares Verhältnis Isopropanol/Acetophenon = 60; volumetrischer Fluss = 46 mL/min.

Jetzt konnte gezeigt werden, dass die absolute Konzentration bzw. Aktivität an Acetophenon die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit direkt beeinflusst (**Abb. 3.7**). Aufgrund der vorne beschriebenen Trennung der Substratsättigung vom Reaktor konnte die Acetophenon-Aktivität bis auf 0.3 angehoben werden. Somit konnten die Michalis-Menten-Parameter für Acetophenon bestimmt werden: $V_{\max} = 2.3 \text{ U/mg Protein}$, $K_m = 0.69$ bzw. 0.042 mM (ausgedrückt in Aktivitäten bzw. in molaren Konzentrationen der Gasphase).

Bezüglich der Aktivität des Cosubstrats konnte keine analoge Abhängigkeit festgestellt werden. Dies wird auf die hohe Flüchtigkeit von Isopropanol und den hohen Cosubstratüberschuss (zwischen 40 und 110-fach im gemessenen Konzentrationsbereich) zurückgeführt, der mit hoher Wahrscheinlichkeit bereits eine Sättigung des Enzyms bewirkt.

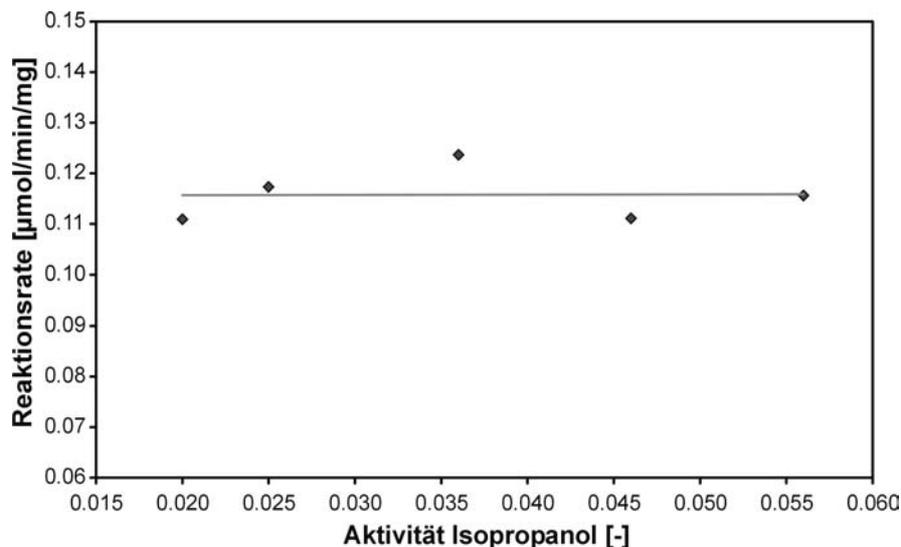


Abb. 3.8: Abhängigkeit der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit von der Isopropanolaktivität. Reaktionsbedingungen: Temperatur $40 \text{ }^\circ\text{C}$, 140 mg Glasträger mit ADH LB und Suchrose, $a_W = 0.65$, $a_{\text{AcPh}} = 0.05$, volumetrischer Fluss = 52 mL/min .

3.4. Optimaler Betriebspunkt der enzymatischen Gasphasenreaktion

Zur Auslegung des enzymatischen Gasphasenreaktors für optimale Produktivität wurden zunächst theoretische Betriebsparameter ermittelt und anschließend experimentell verifiziert.

Mithilfe von **Glg. 1** konnte basierend auf der in Abschnitt 3.3 ermittelten kinetischen Parametern bei 85 \% Umsatz und $0,7 \text{ g}$ Glasträgern (die $2,8 \text{ mg}$ Protein trugen) ein optimaler Fluss von ca. $1,2 \text{ } \mu\text{mol/min}$ Acetophenon berechnet werden.

Das experimentell bestimmte Optimum (maximale Produktivität) findet sich bei einem molaren Fluss von Acetophenon von ca. $1,1 \text{ } \mu\text{mol/min}$ (**Abb. 3.9**). Bei höheren Flussraten sinkt der Umsatz, während die Reaktionsrate konstant bleibt. Damit zeigen Experiment und das sehr einfache Auslegungsmodell eine erstaunlich hohe Übereinstimmung ($< 10 \text{ \%}$ Abweichung).

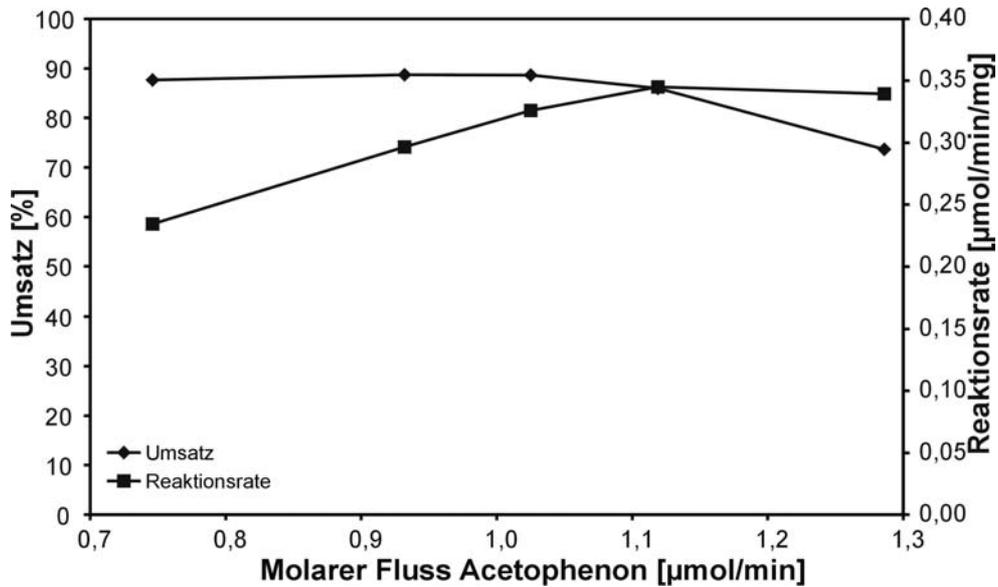


Abb. 3.9: Veränderung des Umsatzes und der Enzymaktivität mit dem molaren Fluss im kontinuierlichen Reaktor. Temperatur 40 °C, 700 mg Glaträger mit ADH LB und Suchrose, $a_W = 0.65$, $a_{AcPh} = 0.3$; molares Verhältnis Isopropanol/Acetophenon = 60.

Ein analoges Verhalten von Reaktionsrate und Umsatz findet sich auch für alternative Substrate, hier 2-Octanon (**Abb. 3.10**). Wiederum steigt die Reaktionsrate mit steigender Substratkonzentration bei konstantem Gleichgewichtsumsatz von ca. 81 % linear an. Über diesen Punkt hinaus bleibt die Reaktionsrate konstant; jedoch bei sinkendem Umsatz.

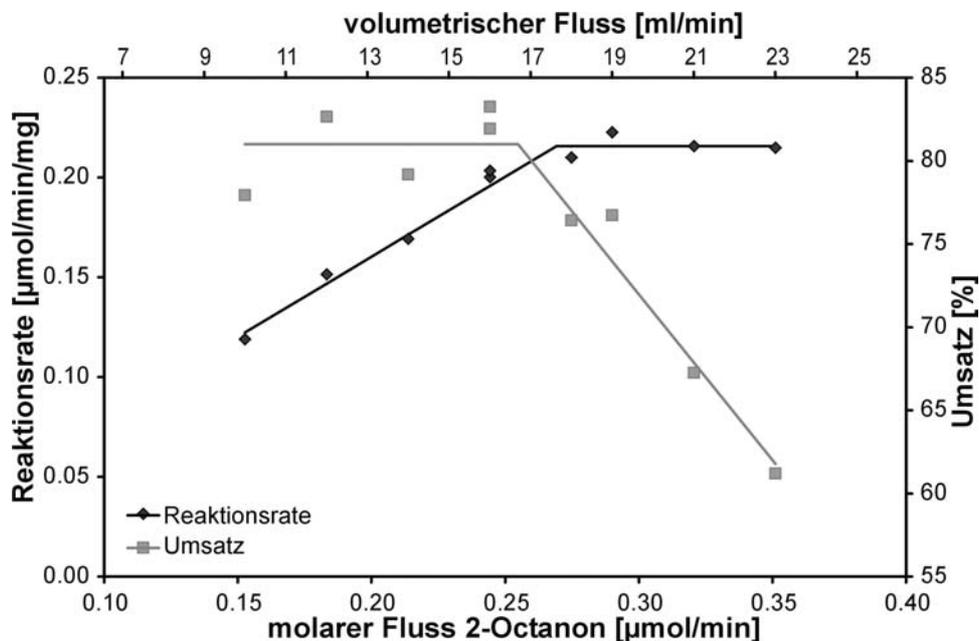


Abb. 3.10: Veränderung des Umsatzes und der Enzymaktivität mit dem volumetrischen und molaren Fluss im kontinuierlichen Reaktor. Temperatur 40 °C, 300 mg Glaträger mit ADH LB und Suchrose, $a_W = 0.65$, $a_{Oct} = 0.1$; molares Verhältnis Isopropanol/Octanon = 10.

3.5. Ökonomische Bewertung der enzymatischen Gasphasenkatalyse

Basierend auf der Auslegung des Gasphasenreaktors wurden Versuche im größeren Maßstab durchgeführt, um die ökonomische Bewertung anhand der Effizienzparameter Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) und Total Turnover Number (TTN) durchzuführen.

Dabei wurde mit den eingestellten Parametern ein Langzeitexperiment (10 Tage) durchgeführt, um die Enzymstandzeit und Reaktorproduktivität nachzuweisen. Der Umsatz verblieb über die Laufzeit von 10 d deutlich über 80 % (Abb. 3.11). Es konnten 1,7 g (R)-1-Phenylethanol dargestellt werden. Mit höheren Durchflüssen und entsprechend größeren Festbetten können demnach kompetitive Stoffmengen produziert werden.

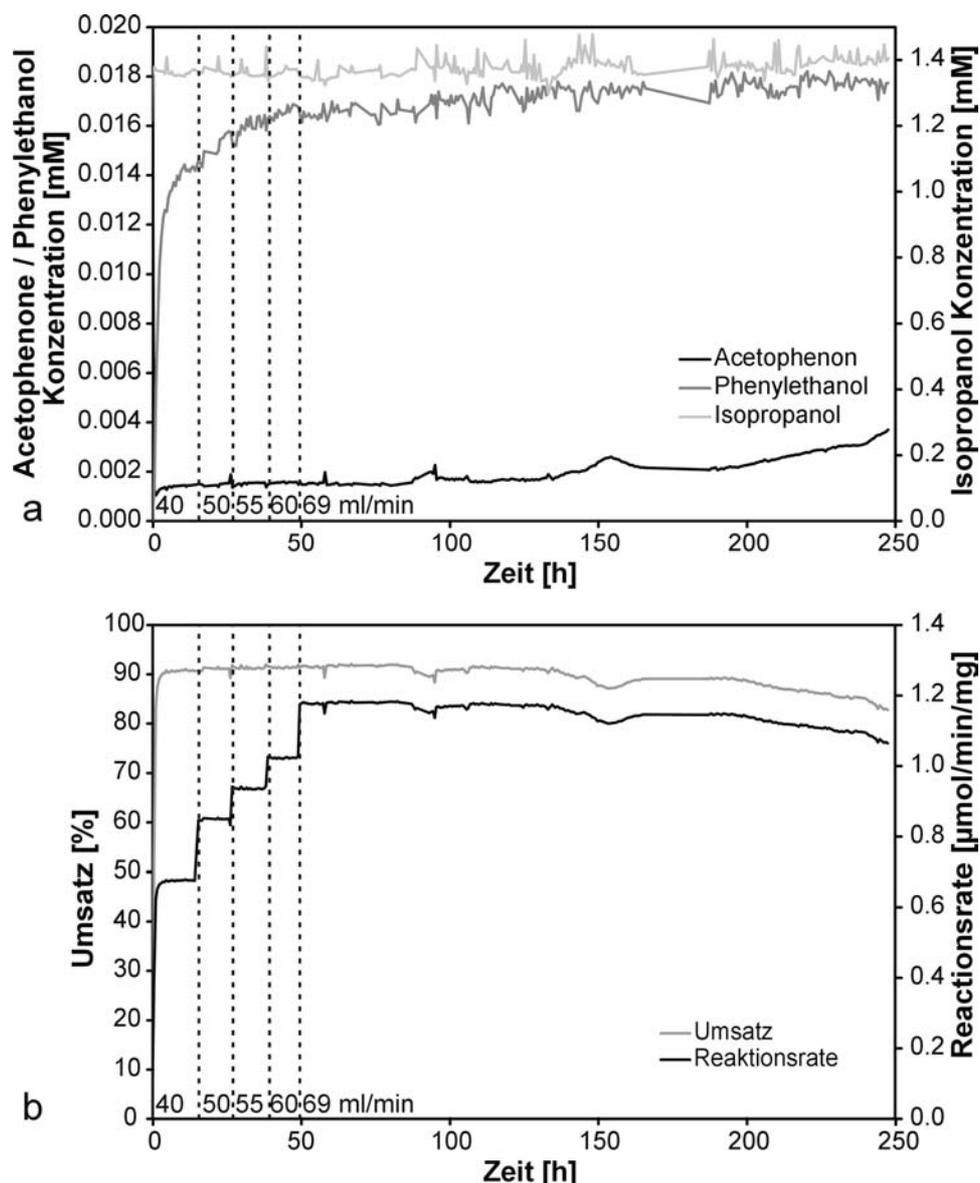


Abb. 3.11: Verlauf von Konzentrationen (a), Umsatz und Reaktionsraten (b) während der Langzeit-Biotransformation. Temperatur 40 °C, 4.7 g Glasträger mit ADH LB und Suchrose, $a_W = 0.65$, $a_{AcPh} = 0.3$; molares Verhältnis Isopropanol/Acetophenon = 60, volumetrischer Fluss wie in der Abbildung dargestellt.

Bei stufenweise steigendem molarem Fluss konnten auch steigende Umsätze von bis zu 83 % erreicht werden. Eine sichtbare Enzymdeaktivierung setzt nach 100 h (4 d) ein. Diese geht

wiederum mit sinkendem Umsatz einher. Dieser Effekt könnte vermieden werden, indem zu Beginn mit Enzymüberschuss gearbeitet würde.

Die dazugehörigen Turnoverzahlen und Raum-Zeit-Ausbeuten für den Umsatz von Acetophenon durch immobilisierte LB ADH sind in **Tab. 3.3** angegeben. Beide Effizienzparameter überschreiten die kritischen Werte von $TTN = 10^4$ und $RZA = 100 \text{ g/L/d}$.

Tab. 3.3: Effizienzparameter Turnoverzahl (TTN) und Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) für ausgewählte Reaktionen. Die jeweiligen Reaktionsbedingungen entsprechen den optimierten Reaktionsbedingungen bei den jeweiligen Temperaturen.

Temperatur [°C]	TTN [-]	RZA [g/L/d]
25	∞	21
40	760000	66
50	210000	107
60	30000	60

Somit konnte gezeigt werden, dass die enzymatische Gasphasenkatalyse für die Reduktion von Alkoholen wirtschaftlich kompetitiv betrieben werden kann.

4. Diskussion

Die Zielsetzung zum Zeitpunkt der Antragstellung konnte in allen Punkten erreicht werden:

- Ein Verfahren zur Herstellung optisch aktiver Feinchemikalien durch enzymatische Gasphasenkatalyse konnte etabliert werden. Anhand der Umsetzung von Acetophenon wurde auch die dazugehörige schrittweise Methodik zur Auslegung des Reaktors exemplarisch etabliert. Durch sukzessive Bestimmung der optimalen Wasseraktivität, Ermittlung der Abhängigkeit der Reaktionsrate von Substrat- und Cosubstratkonzentration kann die Produktivität des Reaktors optimiert werden. Die Übertragbarkeit dieses Ansatzes wurde anhand der Umsetzung von 2-Octanon demonstriert.
- Wie oben gezeigt, war für die erfolgreiche Durchführung ein Screening in speziellen Reaktoren nicht erforderlich, sondern konnte erfolgreich im kontinuierlichen Reaktor mit einer online-Analytik bei hoher Messgenauigkeit und optimaler Übertragbarkeit durchgeführt werden.
- (R)-1-Phenylethanol konnte im halbtechnischen Maßstab hergestellt werden. Dabei wurden kompetitive Raum-Zeit-Ausbeuten und Total Turnover-Zahlen nachgewiesen. Der relativ hohe Siedepunkt des Substrats Acetophenon ($T^S = 203 \text{ }^\circ\text{C}$) diente dabei gleichzeitig als Nachweis, dass mit der enzymatischen Gasphasenkatalyse nicht nur leicht flüchtige Komponenten umgesetzt werden können.

Im Detail waren für den Verlängerungszeitraum die Arbeitspakete gemäß **Tab. 4.1** geplant, die im Folgenden kurz diskutiert werden.

- Paket 1 und 8: Betrifft laufende Tätigkeiten, deren Erfolg durch die Veröffentlichungen und den erfolgreichen Projektabschluss belegt werden.
- Paket 2: Die erforderlichen Enzyme wurden zu jeder Zeit von JFC bereitgestellt. Die geplante Herstellung von ADH aus *Cytophaga sp.* gelang bisher nicht. Da alle weiteren Schritte jedoch problemlos mithilfe von LB ADH und ADH T durchgeführt werden konnten, entstand hierdurch keine Limitierung des Projektes. Im April dieses Jahres wird ein Student zu einem Praktikum nach Japan gehen, um im Institut, an dem die ADH aus *Cytophaga sp.* Gefunden wurde, das erforderliche Material und know-how aufzunehmen.
- Paket 3: Im Vergleich zum geplanten Zeitraum wurden die Experimente hierzu verlängert, da insbesondere in den letzten Monaten wesentliche Durchbrüche bei der Optimierung der Pufferwahl erfolgt sind.
- Paket 4 und 5: Das Screening von Produkten erfolgte anders als geplant nicht im Batch-Reaktor, sondern im kontinuierlichen Reaktor. Der Screeningumfang war weniger durch die Parallelität der Reaktoren als durch die Entwicklung geeigneter GC-Analytik limitiert. Die Arbeiten an und mit den Parallelreaktoren werden jedoch nach Anschluss des DBU-Projektes noch weiter fortgesetzt.
- Paket 6: Wurde gemäß Zeitplan durchgeführt. Siehe Abschnitt 2.3.
- Paket 7: Wurde zeitlich vorgezogen. Ergebnisse hierzu siehe Abschnitte 3.4 und 3.5.

Tab. 4.4: Tatsächliche Durchführung der Arbeitspakete des Verlängerungszeitraums.

		Apr	Mai	Juni	Jul	Aug	Sep	Okt
1	Koordination des Projektes, Versuchsplanung und -auswertung	■	■	■	■	■	■	■
2	Fermentative Herstellung, Aufreinigung und Charakterisierung der Enzyme	■	■	■	■	■	■	■
3	Entwicklung der Herstellung geeigneter Enzympräparationen für LBADH, CSADH, TSADH	■	■	■	■	■	■	■
4	Screening interessanter Produkte in Flüssig- und Gasphase durch den Einsatz von Batch-Gasphasenreaktoren	■	■	■	■	■	■	■
5	Optimierung der Reaktionsbedingungen im kontinuierlichen Reaktor für die gescreenten Produkte und Vergleich der erzielten ee mit den ee in Flüssigphase					■	■	■
6	Modifikation und Optimierung eines Prototyps des kontinuierlichen Gasphasenreaktors	■	■	■				
7	Maximierung der Produktion mit einer der bestehenden kontinuierlichen Anlagen	■	■	■	■	■		
8	Erstellung von Berichten, Publikation und Präsentation der Ergebnisse auf Tagungen	■	■	■	■	■	■	■

Die Durchführung des Projekts war von einer sehr effektiven Zusammenarbeit der beteiligten Projektpartner geprägt. Der Austausch von Materialien und wissenschaftlichen Ergebnissen erfolgte bedarfsorientiert und regelmäßig in Form von Diskussionstreffen. Während der Projektdurchführung wurden zwar Korrekturen an Teilen der Zielsetzung (Arbeitspaket 4: Screening im kontinuierlichen statt Batch-Reaktor) und der Projektstruktur (Übernahme der experimentellen Aufträge des IETs durch JFC) nötig. Die konstruktive Zusammenarbeit ermöglichte jedoch in beiden Fällen, das Projekt vollständig mit Erreichen der Zielsetzung und innerhalb des beantragten Budgets (s. hierzu 7. Abrechnung 04 bis 09.2004) abzuschließen.

5. Öffentlichkeitsarbeit

Im dritten und folgenden Projektjahr wurden die Projektergebnisse sowohl mündlich im Rahmen von Tagungen als auch schriftlich in Fachzeitschriften (siehe Anlagen) und einer Dissertation publiziert:

- C. Ferloni, A. Trivedi, M. Heinemann, W. Hummel, T. Daubmann, J. Büchs: Production of chiral compounds in the gas phase with virtually dry and therefore very stable enzyme. Vortrag, BioPerspectives 2004, Wiesbaden, 4.-6. Mai 2004.
- C. Ferloni, T. Daubmann, W. Hummel, J. Büchs: Continuous Gas-phase Reduction of Acetophenone Catalysed by *Lactobacillus brevis* ADH. Vortrag, biocat 2004, Hamburg, August 29 – September 1, 2004.
- A. Trivedi, S. Sala, T. Daubmann, J. Büchs: Enhancing the Thermostability of Enzyme-Cofactor Complex for Gas-phase Reactions. Poster, biocat 2004, Hamburg, August 29 – September 1, 2004.
- T. Daubmann, H. Hennemann, B. Beckers: New Alcohol Dehydrogenase from *Thermoanaerobacter* spec. for Asymmetric Reduction of Ketones and Diketones. Poster, biocat 2004, Hamburg, August 29 – September 1, 2004.
- C. Ferloni, M. Heinemann, T. Daubmann, J. Büchs: Enzymatische Gasphasenkatalyse zur Produktion chiraler Substanzen. transkript Sonderband 2003, 105-108, 2003.
- C. Ferloni, M. Heinemann, W. Hummel, T. Daubmann, J. Büchs: Optimization of Enzymatic Gas-Phase Reactions by Increasing the Long-Term Stability of the Catalyst. *Biotechnology Progress* 20: 975-978, 2004.

Eine weitere Publikation wurde zur Veröffentlichung akzeptiert:

- A. Trivedi, M. Heinemann, A. Spieß, Th. Daubmann, J. Büchs: Optimization of adsorptive immobilization of alcohol dehydrogenases. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, accepted, 2005.

Zwei weitere Publikation wurden zur Veröffentlichung eingereicht bzw. sind in Vorbereitung:

- C. Ferloni, T. Daubmann, W. Hummel, J. Büchs: Gas-Phase Reduction of Acetophenone to (R)-1-Phenylethanol catalyzed by *Lactobacillus brevis* alcohol dehydrogenase: an optimization strategy. *Biotechnology and Bioengineering*, eingereicht.
- C. Ferloni: Development of a reactor system for the gas-phase reduction of prochiral ketones catalysed by alcohol dehydrogenases. Dissertation, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, RWTH Aachen, 2004.

Das Vorhaben wird aktuell im Rahmen einer Diplomarbeit am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik weitergeführt; dabei wird das vorliegende Reaktionssystem mit weiteren Substraten anhand der Reduktion von 2-Butanon zu 2-Butanol durch die ADHs aus *Lactobacillus brevis* bzw. *Thermoanaerobacter* sp. getestet. Darüber hinaus sollen die begonnenen Arbeiten zur Kultivierung der ADH aus *Cytophaga* sp. direkt in Japan fortgeführt werden, um den Transfer an den Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik zu ermöglichen.

Eher grundlegende weitere Arbeiten sollen im Rahmen eines neu beantragten DFG Graduiertenkollegs "Biokatalyse in unkonventionellen Medien" durchgeführt werden. Dabei sollen weitere Prozessparameter, ebenso wie die Ursachen für die Stabilität von Enzymen in der Gasphasenkatalyse weiter untersucht werden.

6. Fazit

Das Forschungsvorhaben "Innovative Ansätze zur umweltschonenden Herstellung optisch aktiver Feinchemikalien" konnte mit wenigen Änderungen von Projektmethodik und Projektstruktur zum Ziel geführt werden. Es konnte ein wettbewerbsfähiges Verfahren zur Herstellung von (R)-1-Phenylethanol etabliert werden, wobei gleichzeitig gezeigt wurde, dass auch höher siedende Substanzen erfolgreich in der Gasphase umgesetzt werden können.

Aus den während des Projektes gewonnenen Erfahrungen konnten für die Etablierung neuer Reaktionssysteme wesentliche Prinzipien erarbeitet werden. Bei der Immobilisierung von Enzymen werden sich zukünftige Optimierungen auf Stabilisatoren und Puffersysteme beschränken können. Allerdings muß die Aktivität und Stabilität in der Gasphase untersucht werden, da keine Übertragbarkeit dieser Eigenschaften von der Flüssig- auf die Gasphase besteht. Gleichmaßen kann nicht davon ausgegangen werden, dass ein Enzym aus einem thermophilen Organismus zwangsläufig auch in der Gasphase bessere Stabilität als ein Enzym aus einem mesophilen Organismus zeigt.

Zur Optimierung des Reaktionssystems zeigte der kontinuierliche Gasphasenreaktor insbesondere durch die online-Analytik unerwartete positive Eigenschaften. Die kinetischen und Gleichgewichtsuntersuchungen konnten mit einem hohen Grad an Genauigkeit und direkt für die Auslegung genutzt werden.

Literaturangaben

Bradford, M.M.: 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, (1976).

A. Trivedi, M. Heinemann, A. Spieß, Th. Daubmann, J. Büchs: Optimization of adsorptive immobilization of alcohol dehydrogenases. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Accepted, (2005).

Anlagen/Anhang