

Forschungsverbund der Deutschen Bundesstiftung Umwelt

"InnovationsCentrum Biokatalyse"

Gesamtkoordination: Prof. Dr. Dr. h.c. Garabed Antranikian, TU Hamburg-Harburg

Abschlußbericht für das Verbundvorhaben:

Umweltverträgliche Synthese chiraler 2-Oxazolidinone

Verbundpartner:

Institut für Biochemie der TU Dresden
Jülich Chiral Solutions GmbH
(ehem. JFC - Jülich Fine Chemicals GmbH)

Projekttitle: Umweltverträgliche Synthese chiraler 2-Oxazolidinone

Aktenzeichen: 13097/32

Projektpartner: Institut für Biochemie, Technische Universität Dresden, 01062
Dresden (TUD)

JFC-Jülich Fine Chemicals GmbH, Prof.-Rehm-Straße 1, 52428
Jülich (JFC)

Projektbearbeiter: Dr. rer. nat. Martin Bertau, TUD

Dipl.-Ing. (FH) Gerhard Jörg, TUD

Dipl. Biol. K. Leppchen, TUD

Dipl. Biochem. J. Smolinski, TUD

Dipl. Chem. S. Unversucht, TUD

cand. biol. M. Pitsch, TUD

Dr. rer. nat. Thomas Daußmann, JFC

Dr. rer. nat. P. Dünkelmann, JFC

S. Röder, JFC

D. Bayer, JFC

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	7
2. Anlaß und Zielsetzung des Projekts	8
Umweltentlastung und Ressourcenschonung	9
3. Verwendete Methoden	10
1. Downstream-Processing	10
<i>Deemulgierung</i>	10
<i>Produktstabilität in Gegenwart von Hydrolasen</i>	10
<i>Einfluß der biokatalytischen Deemulgierung auf die Stereoisomerenreinheit des Produkts</i>	11
<i>Löslichkeitsstudien</i>	11
2. Versuche zur Identifikation der Bioemulgatoren	11
<i>Bestimmung des Proteingehalts</i>	11
<i>Versuche zur Isolierung von Bioemulgatoren aus dem Kulturmedium</i>	11
<i>Hemmung der Mannoproteinbiosynthese</i>	12
3. Nebenproduktaufklärung	12
4. Oxazolidinonsynthese	12
4. Ergebnisse	12
1. Isolierung und Identifizierung der Bioemulgatoren	13
<i>Strukturmannoprotein der Hefezellwand</i>	13
<i>Invertase</i>	14
<i>Oberflächenspannung</i>	14
2. Biokatalytische Deemulgation	15
<i>Zellfreies Medium</i>	15
<i>Zellsuspensionen</i>	16
<i>Enzympräparationen</i>	16
<i>Bakterielle Biokatalysatoren</i>	17
<i>Mikrobielle Emulsionsspaltung</i>	17
<i>Produktstabilität</i>	18
3. Nebenprodukte	19
4. Ausbeuten und Stereoisomerenreinheiten	19
5. Up-Scaling der Oxazolidinonsynthese	20
6. Einfluß der mikrobiellen Deemulgierung auf die biologische Produktreinheit ...	23
7. Kommerzialisierung	23
5. Soll-/Ist-Vergleich	25
1. TU Dresden	25
2. JFC – Jülich Fine Chemicals GmbH	26
6. Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen	26
Bedeutung der Ergebnisse für die Praxis	26
Kommerzialisierung	28
Bedeutung der Ergebnisse für die Umwelt	28
7. Diskussion	29
Biokatalytische Deemulgation	29
Nebenprodukte	30
Einfluß der mikrobiellen Deemulgierung auf die biologische Produktreinheit	31
Oxazolidinonsynthese	31
8. Kooperation innerhalb des Projekts	32
Kooperationen innerhalb des ICBio-Verbundes	33
Kooperation im Anschluß an die Förderphase	33

9. Fazit.....	34
10. Publikationen	34
Patente.....	34
Veröffentlichungen	34
Vorträge	35
Literatur	35
Anhang	37

1. Zusammenfassung

Chirale β -Hydroxyester sind zentrale Vorstufen eines neuartigen Verfahrens zur Herstellung von 5- und 4,5-funktionalisierten 2-Oxazolidinonen. Diese Substanzklasse ist für die pharmakologische Wirksamkeit moderner, hochpotenter Antibiotika, Psychotherapeutika und Renin-Inhibitoren essentiell.

Für die Oxazolidinonsynthese sind die Einführung der Stereoinformation und die konfigurationserhaltende Folgechemie ausbeutelimierend. Diese Schwierigkeiten werden durch eine hochselektive intramolekulare Curtius-Umlagerung umgangen. Die Herstellung der hierfür erforderlichen β -Hydroxyester erfolgt auf biotechnologischem Weg. Alternative Varianten lassen sich angesichts der geringen Gesamtausbeuten von ca. 5% bei gegenüber der biotechnologischen Route geringerer Stereoisomerenreinheit nicht rechtfertigen.

Die biotechnologische Synthese der chiralen β -Hydroxyester mit *S. cerevisiae* läßt sich im Multikilogramm-Maßstab realisieren. Die extraktive Aufarbeitung litt jedoch erheblich unter der Bildung stabiler Emulsionen, was aufwendige Reinigungsschritte nach sich zog, bei denen partielle Racemisierungen der Stereozentren unvermeidbar sind.

Der im Rahmen dieses Projektes verfolgte, hochinnovative Ansatz behebt die Problematik der Emulsionsbildung bei der Aufarbeitung durch eine leistungsstarke Deemulgierung der wässrigen Phase. Auf diese Weise können teure und verlustbehaftete Reinigungsprozeduren wirkungsvoll umgangen werden. Dadurch und durch das Ausnutzen *bestehender* Ressourcen ist das in diesem Projekt entwickelte Verfahren ein Musterbeispiel für Nachhaltigkeit in der Chemie.

Durch die Optimierung des Aufarbeitungsverfahrens werden erhebliche Kosten eingespart. Dies zeigt sich eindrucksvoll am Beispiel der deutlichen Reduktion der Herstellkosten für β -Hydroxyester um durchschnittlich 50%. Das Up-scaling der Oxazolidinonsynthese im Subkilogramm-Maßstab konnte deutlich optimiert werden und besitzt für Produktionsansätze in den Multikilogramm-Maßstab noch weiteres Optimierungspotential. Ein Vergleich der jüngsten Literaturberichte mit diesem, von der DBU geförderten Projekt zeigt, daß die hier verfolgte Strategie hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit, ihres ökonomischen Potentials und der erreichten Qualität der umweltfreundlichen Synthese- und Aufarbeitungsbedingungen alternativlos ist.

2. Anlaß und Zielsetzung des Projekts

Chirale 5- und 4,5-substituierte 2-Oxazolidinone sind u.a. essentielle Strukturelemente in neuartigen Antibiotika gegen Gram-positive Krankheitserreger wie z.B. Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Lohray et al., 2004; Mai et al., 2002). Darüberhinaus sind sie wichtige Substrukturen in modernen, nebenwirkungsarmen MAO-Inhibitoren sowie in hochpotenten Renin-Inhibitoren (Phillips et al., 2003; Testa et al., 2003; Rabasseda et al., 1999). Die chiralen β -Hydroxyester **1-3** sind die ganz-zell-biokatalytisch erzeugten Schlüsselintermediate für die Synthese der chiralen 2-Oxazolidinone **4-6** (Abbildung 1).

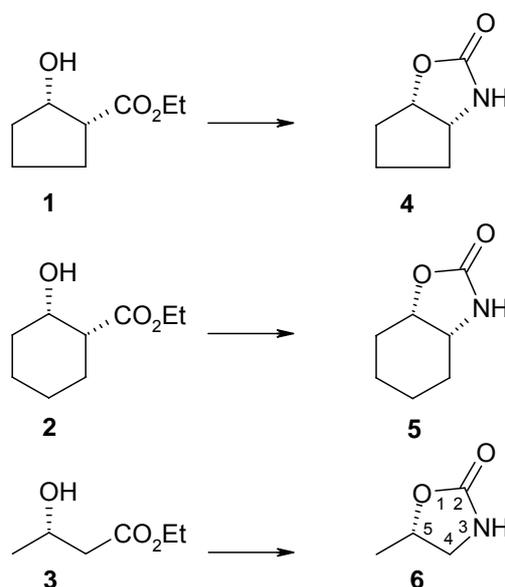


Abbildung 1.

Allerdings ist die Synthese dieser Strukturen sehr aufwendig, und sie benötigt sehr häufig hochaggressive Reagenzien wie z.B. Phosgen. Infolge der zum Teil harschen Reaktionsbedingungen geht wertvolle Stereoinformation während der Synthesesequenz verloren, gleichzeitig steigen Materialaufwand und Abfallmengen. Hierzu trägt insbesondere die nachträgliche Reinigung der Stereoisomeren bei.

Ein brauchbares, umweltverträgliches Synthesekonzept muß daher weitgehend auf umweltgefährdende Chemikalien verzichten und gleichzeitig bei hoher Atomökonomie und hoher Stereoisomerenausbeute die gesuchte Zielverbindung liefern.

Dieser hohe synthetische Anspruch konnte bereits 2001 erfolgreich realisiert werden (Bertau et al.). Ein neues, hochleistungsfähiges Syntheseverfahren wurde entwickelt,

das den oben genannten Anforderungen genügt und durch einen biotechnologischen Schlüsselschritt charakterisiert ist.

Die zentrale Komplikation bei extraktiver Aufarbeitung von Hochzell-dichte-Ganzzellbiotransformation ($\geq 10^{10}$ Zellen/mL), wie sie für die Synthese der β -Hydroxyester **1-3** zum Einsatz kommen, ist die Bildung stabiler Gele und Schleime im Kontakt mit dem organischen Lösungsmittel. Dabei macht der Übertritt von lipidlöslichen Metaboliten in die organische Phase eine nachgeschaltete destillative Reinigung des Rohproduktes unumgänglich. Aufgrund der Thermolabilität von **1** und **2** war ihre Aufarbeitung stark verlustbehaftet (ca. 20%) und mit 75% der Gestehungskosten der kostentreibende Faktor. Demzufolge verhinderten hohe Marktpreise eine großmaßstäbliche Anwendung dieser vielversprechenden Synthesebausteine in der Wirkstoffsynthese. Von einer Optimierung des bestehenden Verfahrens wurden erhebliche Kosteneinsparungen erwartet.

Die emulsionsbedingten Beeinträchtigungen der Syntheseökonomie machten die Entwicklung geeigneter Downstreamtechnologien zwingend erforderlich. Das Hindernis durch Gel- und Schleimbildung sollte durch biokatalytische Behandlung der wässrigen Phase gelöst werden. Um den Anforderungen einer kommerziellen Synthese gerecht zu werden, sind für die biokatalytische Deemulgierung enorm kurze Phasenseparationszeiten von ≤ 1 min zu realisieren, damit die Produktextraktion kontinuierlich in einem sogenannten Mischabsetzer (Mixer-Settler) realisiert werden kann.

Umweltentlastung und Ressourcenschonung

Von dem Verbundvorhaben wurde sowohl für die ganzzell-biokatalytische Einführung der Stereoinformation als auch für die Oxazolidinonsynthese eine substantielle Umweltentlastung erwartet.

Der mikrobiell-biokatalytische Syntheseschritt ist ökonomisch als Reduktion einer Feinchemikalie zu einer Folgechemikalie mit hoher Wertschöpfung hochattraktiv. Er profitiert von dem Vorhaben, indem durch die biokatalytische Aufarbeitung finanzielle Investitionen in teure Alternativtechnologien vermieden werden. Ferner werden der Transport und Energieaufwand für eine externe Filtration vollkommen überflüssig, der Zeitfaktor wird erheblich reduziert, und die für die Stereoisomerenverteilung kritische Zeitspanne der Produktaufarbeitung wird drastisch minimiert. Dadurch

werden deutliche Vorteile hinsichtlich der Rohprodukt- und Stereoisomerenreinheit erreicht.

Die Oxazolidinonsynthese vereinigt mehrere chemische Umlagerungen in einem einzigen Prozeß. Diese, aggressive Reagenzien vermeidende, hochselektive Niedertemperaturkonversion ist mit ihren nahezu quantitativen Ausbeuten und extrem hohen Stereoisomerenreinheiten energetisch unaufwendig bei zu vernachlässigenden Abfallmengen.

Damit ergeben sich insgesamt Umweltentlastungspotentiale wie Einsparung von Substrat, Vermeidung von energieaufwendigen Separationsmethoden, Reduktion der Abfallmengen. Durch den weitgehenden Verzicht auf umweltgefährdende Chemikalien sowie die Verminderung potentiell zu spontaner Zersetzung neigender Nebenprodukte wird das Gefährdungspotential von Mensch und Umwelt nachhaltig reduziert.

3. Verwendete Methoden

1. Downstream-Processing

Für die Rohproduktseparation wurde die enzymkatalysierte Spaltung von gel- und schleimbildenden Bioemulgatoren der Hefe untersucht. Die im Antrag ebenfalls genannte Variante der Zugabe von oberflächenaktiven Substanzen wurde wegen des Erfolgs der enzymkatalysierten Methode und vor dem Hintergrund unerwartet geringer Homogenisierungseffekte nicht weiter untersucht.

Deemulgierung

Zur Quantifizierung der Deemulgationsleistung einer Hydrolase wurde photometrisch die Phasenseparationszeit t_p in einer 1 cm-Küvette bei $\lambda=640$ nm bestimmt. Die Phasentrennung war bei Absorptionskonstanz ($dA/dt=0$) vollständig. Die t_p -Werte wurden dreifach bestimmt.

Die Identifizierung geeigneter mikrobieller Deemulgatoren gelang durch eingehende Screenings. Die optimalen Anzuchts- und Deemulgationsbedingungen wurden ebenfalls in Reihenuntersuchungen ermittelt.

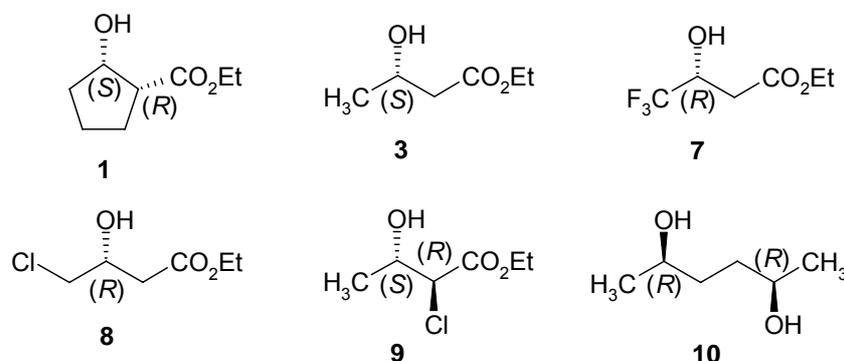
Produktstabilität in Gegenwart von Hydrolasen

Die Hydrolaseanfälligkeit der eingesetzten Ester wurde exemplarisch mit Hilfe der enzymkatalysierten Hydrolyse von 2-Cyclopentanoncarbonsäure-ethylester unter-

sucht. Es wurde ein cyclischer β -Ketoester an Stelle eines β -Hydroxyesters gewählt, weil der racemisch vorliegende chirale Ketoester frei ist von Einflüssen der Stereoconfiguration, und weil durch die spontane Decarboxylierung der Ketosäure zum Cyclopentanon eine zweifelsfreie HPLC-analytische Quantifizierung der konkurrierenden Hydrolyse möglich ist.

Einfluß der biokatalytischen Deemulgierung auf die Stereoisomerenreinheit des Produkts

Durch Inkubation der chiralen Alkohole **1,3,7-10** mit Hydrolasen wurde die biokatalytische Deemulgierung hinsichtlich möglicher Einflüsse auf die Stereoisomerenreinheit der Verbindungen untersucht. Die Quantifizierung der Stereoisomeren erfolgte gaschromatisch.



Löslichkeitsstudien

Der Einfluß der Bioemulgatoren bzw. der Deemulgierung auf Substrat- und Produktlöslichkeiten wurde entsprechend der Methode von Higuchi & Connors (1965) untersucht. Die Konzentrationen in der wäßrigen Phase wurden photometrisch bestimmt.

2. Versuche zur Identifikation der Bioemulgatoren

Bestimmung des Proteingehalts

Der Proteingehalt des Kulturmediums wurde nach der Methode von Bradford bestimmt.

Versuche zur Isolierung von Bioemulgatoren aus dem Kulturmedium

Glycoproteine wurden mit der Methode von Barriga *et al.* (1999) nachgewiesen.

Der Test auf Glycolipide wurde nach Kim *et al.* (2000) durchgeführt. Es wurden keine Glycolipide gefunden.

Lipoproteine wurden mit der Methode von Jamieson *et al.* (2001) nachgewiesen.

Das Mannoprotein der Hefezellwand wurde nach der Methode von Cameron *et al.* (1988) isoliert.

Die sekretierte Hefeinvertase wurde nach der Methode von Böer *et al.* (2004) isoliert.

Hemmung der Mannoproteinbiosynthese

Zur Bestimmung des Einflusses des Strukturmannoproteins der Hefezellwand aus lysiertem Zellmaterial aus zugrundegegangenen Zellen wurde das Emulgationsverhalten von Kulturmedium untersucht, in denen Hefezellen gezüchtet wurden, die durch Inkubation mit Tunicamycin, entsprechend der Methode nach Frevert & Ballou (1984), die Fähigkeit zur Biosynthese des Strukturmannoproteins verloren hatten.

3. Nebenproduktaufklärung

Zur Aufklärung der intrazellulären Konkurrenzprozesse wurden eingehende, z.T. zeitaufgelöste NMR-, GC-, HPLC-, GC/MS-, LC/MS-Analysen sowie photometrische Untersuchungen durchgeführt. Ergänzend wurden Inhibitionsexperimente vorgenommen. Zur Bestimmung von kinetischen Daten wurden beteiligte Enzyme isoliert.

4. Oxazolidinonsynthese

Die Oxazolidinonsynthese ist im Gramm-Maßstab gut untersucht. Für eine Überführung in den Produktionsmaßstab (Multikilogramm-Mengen) wurde zunächst die Optimierung der Syntheseroute im Subkilogramm-Maßstab untersucht. Hinzu kamen exploratorische Experimente im Multikilogramm-Maßstab.

4. Ergebnisse

Das Problem der Gelbildung geht auf Bioemulgatoren zurück, die von Mikroorganismen ins Medium abgegeben werden (Bertau & Scheller, 2003). Ein optimierter Aufarbeitungsprozeß mußte zum Ziel haben, die gelbildenden Bioemulgatoren zuverlässig aus dem Kulturmedium zu entfernen.

Als Alternative zur kostenintensiven Membranfiltration (Marriott & Soerensen, 2003; Haberland *et al.*, 2002) wurde die chemische Spaltung emulgierender Agentien mit

Hilfe von Enzymen geprüft. Anhand der Ganzzell-Biokatalysatoren *Saccharomyces cerevisiae* und *Lactobacillus kefir* wurde exemplarisch gezeigt, daß sich diese Methodik leicht sowohl auf fungische als auch auf bakterielle Kulturen anwenden läßt.

1. Isolierung und Identifizierung der Bioemulgatoren

Bioemulgatoren sind von Mikroorganismen produzierte oberflächenaktive Biomoleküle, bestehend aus einer hydrophilen und einer hydrophoben Struktureinheit. Zu ihrer Spaltung wurden verschiedene Hydrolasen auf ihre deemulgierenden Eigenschaften getestet.

Bei 'dem Bioemulgator' der Hefe bzw. von *L. kefir* handelt es um ein hochoberflächenaktives Gemisch aus Glyco- und Lipoproteinen, die in sehr geringen Konzentrationen (<50 µg/mL) im Medium vorliegen.

Die Isolierung der Bioemulgatoren erwies sich als unerwartet aufwendig. Es gelang nicht, mit bestehender Aufarbeitungstechnologie (s. Methoden) die Bioemulgatoren zu trennen und zu isolieren. Grund hierfür ist ihre geringe Konzentration. Bei Konzentration oder Ausfällung bildeten die Emulgatoren stabile Aggregate, die sich nicht mehr in Lösung bringen lassen. In dieser ausgesprochen hohen Tendenz zur intermolekularen Wechselwirkung äußert sich die hohe Amphiphilie dieser Spezies, die auch für die äußerst effizienten oberflächen- und grenzflächenaktiven Eigenschaften dieser Verbindungsklasse verantwortlich ist.

Strukturmannoprotein der Hefezellwand

Bezüglich der Glycoproteinfraktion lag zunächst die Annahme nahe, daß das Strukturmannoprotein der Hefezellwand in bedeutendem Maße zur Emulsionsbildung beiträgt, da die lebenden Hefezellen zugrundegegangene Zellen lysieren und als Nährmedium nutzen.

Aus frisch aufgeschlossenem Zellmaterial (French Press) ließ sich das Mannoprotein der Hefe analog der Methode von Cameron et al. (1988) isolieren. Nicht jedoch aus dem Kulturmedium. Da davon auszugehen war, daß dies an einer Copräzipitation mit anderen Bioemulgatoren zu unlöslichen Aggregaten lag, wurde die Biosynthese des Mannoproteins durch Inkubation der Hefezellen mit Tunicamycin unterdrückt.

Tunicamycin bewirkt, daß die Verknüpfung des Mannoglycans mit dem Polypeptidfragment unterbleibt. Würde das Mannoprotein signifikant zur Emulsionsbildung beitragen, wäre ein deutlicher Effekt zu erwarten. Allerdings wiesen in Gegenwart des

N-Glycosylierungsinhibitors kultivierte Zellen ein nahezu identisches Emulgationsverhalten auf. Im günstigsten Falle reduzierte sich die t_p mit Pronase E von 60 auf 57 s. Damit geht kein maßgeblicher Beitrag zum Phänomen der Emulsionsbildung vom Mannoprotein der Hefezellwand aus. Ergänzend durchgeführte Untersuchungen mit Protease N01 und Amylase ließen ebenfalls keinen signifikanten Effekt erkennen.

Invertase

Vor dem Hintergrund, daß in Ganzzell-Biotransformationen Saccharose als Kohlenstoffquelle dient, wurde geprüft, ob das Glycoprotein Invertase einen Einfluß auf t_p besitzt. Es war kein meßbarer Emulgationseffekt durch das Glycoprotein erkennbar.

Oberflächenspannung

Die oberflächenaktiven Eigenschaften der gelösten Bioemulgatoren setzen die Oberflächenspannung des Kulturmedium stark herab. Während das Kulturmedium vor Anzucht mit $\sigma = 71$ mN/m denselben Wert wie reines Wasser aufwies (Lee et al., 2000), lag er für die Zellsuspension ($\sigma = 52$ mN/m) bzw. für zellfreies Medium ($\sigma = 53$ mN/m) deutlich darunter. Noch ausgeprägter erscheint der emulgierende Effekt bei Betrachtung der konzentrationsabhängigen Oberflächenspannung ($\Delta\sigma/c$). Tabelle 1 vergleicht den stärksten derzeit bekannten Emulgator, das SC3-Protein von *Schizophyllum commune*, mit dem Bioemulgator von *Saccharomyces cerevisiae* und den Tensiden Tween 80 sowie SDS.

Tabelle 1.

<i>Eintrag</i>	<i>Emulgator</i>	<i>c</i> ($\mu\text{g/mL}$)	σ (mN/m)	$\Delta\sigma$ (mN/m)	$\Delta\sigma/c$ (mNL/gm)
1	Bioemulgator (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	30	52	19	634
2	SC3P (<i>Schizophyllum commune</i>)	50	24	47	940
3	Tween 80	4 000 (=4 mg/mL)	37	24	6
4	SDS (Natrium-dodecylsulfat)	100 000 (=100 mg/mL)	30	41	0.41

2. Biokatalytische Deemulgation

Die Untersuchungen wurden in zellfreiem Medium bzw. in Zellsuspensionen durchgeführt, um mögliche Beiträge von Zellyseprodukten und der Zellen selbst zur Gelbildung aufzuklären. Hierfür wurde die Phasenseparationszeit (t_p) einer Probe mit der eines unbehandelten Standards verglichen. Damit stand ein reproduzierbares, quantifizierbares Maß für die Effizienz der enzymkatalysierten Lyse bioemulgierender Agentien zur Verfügung.

Die deemulgierenden Eigenschaften von Hydrolasen bezüglich Phasenseparationszeit und Gelbildung wurden eindeutig belegt. Die Ergebnisse für zellfreie Medien bzw. Zellsuspensionen von *Saccharomyces cerevisiae* sind in Abbildung 2 zusammengefaßt.

Zellfreies Medium

Die Phasenseparation enzymbehandelter zellfreier Medien zeigte deutliche Unterschiede gegenüber Zellsuspensionen. Sehr gute Ergebnisse wurden mit den Proteasen Ficin, Papain, Pronase E und Subtilisin (s. Abbildung 2A, Enzym Nr. 6, 11, 16, 22) erhalten. Mit diesen Enzymen behandelte Ansätze zeigen nahezu vollständige Phasentrennung nach ca. 0.5 - 2h. Zum Vergleich: unbehandelte Proben bildeten stabile Gele, die auch nach 7 d (168 h) keine Phasentrennung erkennen ließen. Unter optimierten Bedingungen betrug t_p für Pronase E nur noch 60 s.

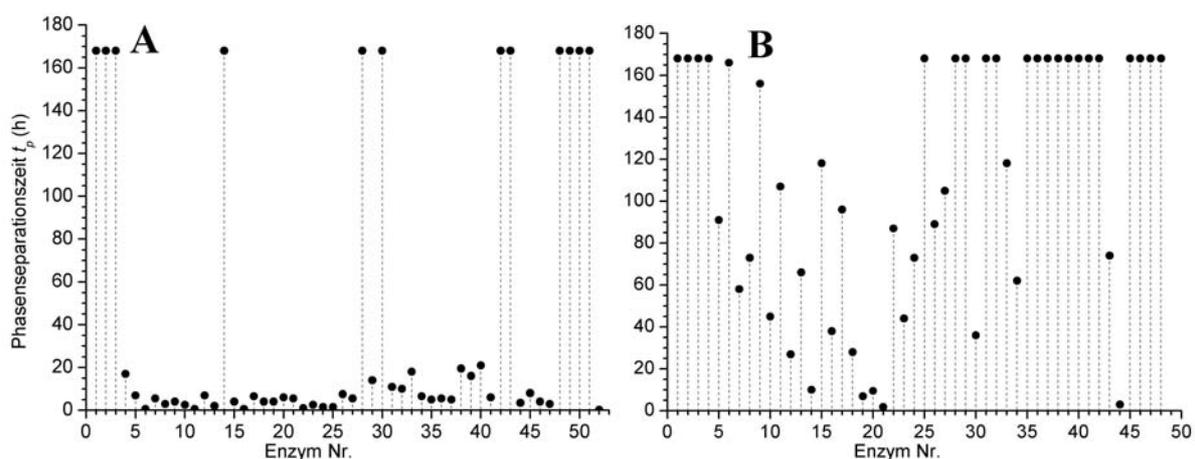


Abbildung 2. Hydrolasekatalysierte Spaltung des Bioemulgators von *Saccharomyces cerevisiae* (pH 6.6, 30°C). In zellfreiem Medium (A) war *Streptomyces griseus*-Protease (Pronase E; Enzym Nr. 16) mit $t_p = 1$ min die am besten geeignete Hydrolase, in Zellsuspensionen (B) mit $t_p = 5$ min die *Bacillus subtilis*-Protease (Protease N01; Enzym Nr. 21). Weiterführende Informationen bei Jörg et al. (2004).

Der deemulgierende Effekt von Glycosylasen war weniger deutlich ausgeprägt als bei Proteasen und Esterasen. Lipasen waren mit Ausnahme der *Candida antarctica*-Lipase B (s. Abb. 2, Enzym Nr. 41) zur Deemulgation ungeeignet.

Nach Hydrolasebehandlung von zellfreiem Medium ließen sich alle getesteten Produkte vollständig aus der wäßrigen Phase extrahieren ($\geq 99.5\%$). Die Qualität der Rohprodukte betrug 97-98% chemische Reinheit.

Zellsuspensionen

Am leistungsfähigsten waren die Proteasen Papain, Protease N01 und *Pseudomonas fluorescens*-Lipase (s. Abbildung 2B, Enzym Nr. 14, 19, 20, 21 und 44). Die Phasenseparationszeiten sind für eine effektive Extraktion noch zu hoch, was u.a. daran liegt, daß Zellsuspensionen wegen des konkurrierenden mikrobiellen Abbaus der zugegebenen Hydrolase nur 5 h inkubiert wurden. Auch hier läßt sich der eindeutige Trend zur beschleunigten Phasenseparation ablesen.

Die besten Ergebnisse wurden unter optimierten Bedingungen für Protease N01 gefunden. Hier konnte t_p auf 5 min. gesenkt werden (Abb. 2B, Nr. 21).

Enzympräparationen

Das ursprüngliche Konzept sah vor, mikrobielle Bioemulgatoren mit Hilfe von Hydrolasen zu spalten. Obwohl der Zeitrahmen für das ambitionierte Projekt wenige Spielräume zuließ, wurde ergänzend geprüft, inwieweit sich das Verfahren der biokatalytischen Deemulgierung auf technische Enzympräparationen erweitern läßt. Letztere haben mit bioemulgatorhaltigen Medien aus Ganzzell-Biotransformationen gemeinsam, daß die Bildung stabiler Gele und Schleime die extraktive Aufarbeitung erheblich stört. Der Unterschied besteht darin, daß hierfür keine mikrobiellen Bioemulgatoren verantwortlich sind, sondern amphiphile Bestandteile der Zellmembranen, da technische Enzympräparationen infolge des Zellaufschlusses Membranlysate enthalten. Da Zellmembranen Glycopeptid-, Lipopeptid- und Glycolipid-Strukturglieder aufweisen, erschien die Methode der hydrolasevermittelten Deemulgierung aussichtsreich. In umfangreichen Untersuchungen, die zum Teil an der TUD, größtenteils aber bei JFC durchgeführt wurden, gelang es optimale Deemulgationsbedingungen zu identifizieren. Auch hier erwies sich die mikrobielle Deemulgierung als die leistungsfähigste Strategie. In allen Fällen war kein Verlust an Enzymaktivität meß-

bar. Damit eignet sich die Methode generell zur Behandlung von Zellsuspensionen und Enzympräparationen.

Bakterielle Biokatalysatoren

Sowohl Bioemulgatoren aus *S. cerevisiae* als auch aus dem bakteriellen Biokatalysator *Lactobacillus kefir* waren der enzymatischen Spaltung zugänglich. Inkubationszeiten (t_i) und Phasenseparationszeiten (t_p) betragen für *L. kefir* im Durchschnitt etwa das doppelte der für Hefe ermittelten Werte. Wie bei *S. cerevisiae* wurden die besten Resultate für zellfreie Medien (Protease N-01, $t_p = 2$ min) erhalten. Bei Zellsuspensionen betrug sie für Pronase E $t_p = 9$ min.

Die insgesamt beste Phasenseparation wurde mit Protease N-01, gefolgt von Papain und Pronase E erhalten. Jedoch erforderte die Behandlung zellfreier Medien mit Protease N-01 gegenüber Papain und Pronase E die vierfache Enzymmenge.

Generell wird die Aufarbeitung durch die Hydrolasebehandlung aus Sicht der großmaßstäblichen Anwendung erheblich vereinfacht und effektiver.

Mikrobielle Emulsionsspaltung

Nachdem bekannt war, daß sich die hydrolasekatalysierte Spaltung von Bioemulgatoren unabhängig von der Art des Ganzzell-Biokatalysators anwenden ließ, und daß auch die Zusammensetzung der Bioemulgatormischungen für das Erreichen von t_p im unteren Minutenbereich nicht bekannt sein mußte, wurden erhebliche Fortschritte von der Verwendung lebender Mikroorganismen erwartet. Denn sie sollten als Multi-enzymssysteme über ausreichende enzymatische Kapazität zur Spaltung von Bioemulgatormischungen unterschiedlicher Zusammensetzung verfügen.

Anlaß für diese Versuche war das Erfordernis reproduzierbar sehr kurzer Phasenseparationszeiten für die kommerzielle Anwendung in Mixer-Settler-Einheiten. Die Vorgaben sind mit $t_p < 60$ s ausgesprochen anspruchsvoll. Trotz der beeindruckenden Leistungsfähigkeit der enzymatischen Deemulgation lag der Wert für Pronase E mit 1 min. noch am oberen Limit.

Für die mikrobielle Variante wurden verschiedene Bakterien- und Pilzstämmen getestet. Dabei erwies sich *Bacillus subtilis* als am leistungsfähigsten (Abbildung 3).

Nach Optimierung der Kultivierungs- und Deemulgationsbedingungen wurde eine t_p von ≤ 30 s erreicht! Eine vorhergehende Zellseparation ist nicht mehr erforderlich. Die Mikroorganismen können auch nach mehrwöchiger Lagerung bei -80°C eingesetzt

werden, so daß die Notwendigkeit entfällt, die mikrobiellen Deemulgatoren jedes Mal bei Bedarf frisch anzuzüchten. Dieser Punkt stellt insbesondere für kommerzielle Anwendung eine bedeutende Kostenersparnis dar.

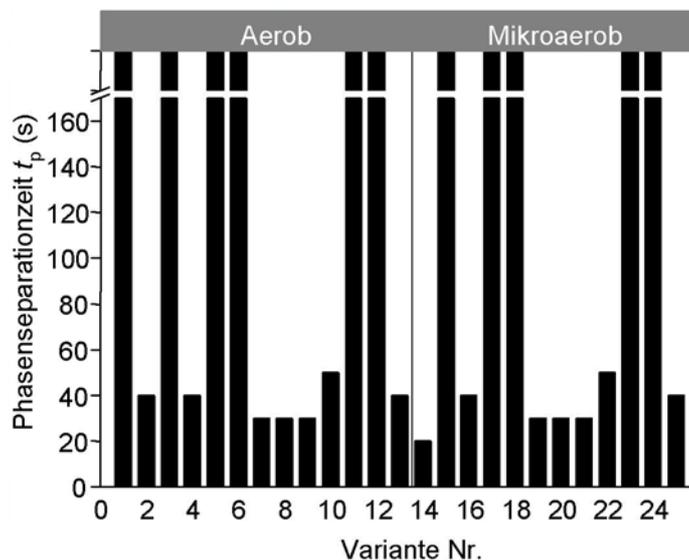


Abbildung 3. Ergebnisse der mikrobiellen Deemulgation. Es werden mit einigen Ausnahmen im allgemeinen sehr gute Ergebnisse erreicht, wobei die mikroaerobe Variante mit *Bacillus subtilis* mit $t_p = 20$ s den besten Wert liefert (Variante Nr. 14).

Produktstabilität

Die Produktstabilität gegenüber Hydrolasen ist ein zentrales Kriterium. Da alle getesteten Enzyme hydrolytische Aktivität aufwiesen, wurde die Produktintegrität in Hinblick auf Esterhydrolyse und Racemisierung geprüft.

Während die Stereozentren von chiralen Alkoholen und β -Hydroxyestern unverändert blieben, wurde die Esterfunktion in wechselnden Anteilen verseift. Erwartungsgemäß war dieser Effekt bei Esterasen und Lipasen am stärksten ausgeprägt. Für *Candida antarctica*-Lipase B wurden Hydrolyseverluste von bis zu 99.8% gefunden. Proteasen und Glycosylasen beließen die Esterfunktion mit Ausnahme von Ficin und Papain unverändert.

Für das repräsentative Modellsubstrat 2-Cyclopentanoncarbonsäure-ethylester wurde bei 84% der getesteten Enzyme weniger als 5% Verseifung gefunden, und in 51% der Fälle blieb die Enzymbehandlung ohne Einfluß auf die Esterfunktion. Diese Ergebnisse unterstreichen die sehr gute praktische Anwendbarkeit dieser Methode. Zum Vergleich: Die durch Emulsionsbildung verursachten Produktverluste betragen bis zu 20%.

3. Nebenprodukte

Nach Kenntnisstand zum Zeitpunkt der Antragstellung waren Produkt- und Racemierungsverluste auf die thermische Aufarbeitung zurückzuführen. Daß dies nur zum Teil richtig ist, erwies sich im Rahmen aufwendiger Untersuchungen zur Nebenproduktbildung. Wie Tabelle 2 zeigt, wurden insbesondere in Bezug auf die Ausbeute erhebliche Steigerungen erreicht, was das Ausmaß der Produktverluste durch der Extraktion nachgeschaltete Reinigungsoperationen eindrucksvoll aufzeigt. Für die Stereoisomerenreinheit sind die Werte uneinheitlich. Es wurden aber in fast allen Fällen Steigerungen erreicht.

Im Laufe umfangreicher Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Hefezelle bereits während der Biotransformation Substrat und Produkt angreift. Zwei Typen von Nebenreaktionen wurden identifiziert: (i) Esterhydrolyse, (ii) *Retro*-Claisen-Kondensation. Die Nebenreaktionen wurden auf molekularer Ebene aufgeklärt und die Reaktionen dem Cytoprotektivum Glutathion zugeschrieben. Mit der *Retro*-Claisen-Kondensation wurde ein neuartiger Konkurrenzprozeß beschrieben. Auch für die Esterhydrolyse stellt die Glutathionolyse der Esterfunktion ein Novum dar.

4. Ausbeuten und Stereoisomerenreinheiten

Nach Abschluß der Arbeiten zur biokatalytischen Deemulgation werden reproduzierbar hohe Ausbeuten und Stereoisomerenreinheiten erzielt (Tabelle 2).

Tabelle 2. Optimierte Stereoisomerenreinheiten und Ausbeuten

%	<i>Ausbeute</i>		<i>ee</i>		<i>de</i>	
	<i>alt</i>	<i>neu</i>	<i>alt</i>	<i>neu</i>	<i>alt</i>	<i>neu</i>
1	86	96	99.3	99.5	97.3	98.2
2	84	92	93.9	93.9	97.4	98.0
3	34	70	97.2	98.4	-	-

Wie hoch der Einfluß der Emulsionsbildung auf die isolierbare Ausbeute ist, wird am Beispiel des (*S*)-3-Hydroxybuttersäure-ethylesters besonders deutlich. Hier stieg die Ausbeute von 34% auf 70%. Dies entspricht einer Steigerung von 205%. Die Werte für die lipophileren cyclischen Ester stiegen um 10-12%.

Höhere Ausbeuten und Stereoselektivitäten sind nur zu erreichen, wenn es gelingt, Nebenreaktionen in der Zelle während der Biotransformation zu unterdrücken. Abbildung 4 vergleicht die Synthesevarianten.

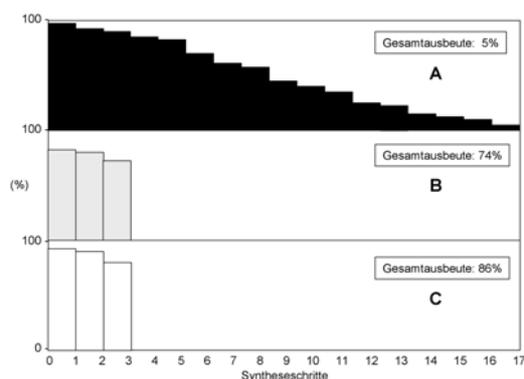


Abbildung 4. Ausbeuten der Synthesepfade zur Herstellung chiraler 2-Oxazolidinone. (A) Klassisch-chemische Variante, (B) ohne enzymatische Deemulgation, (C) nach enzymatischer Deemulgation.

5. Up-Scaling der Oxazolidinonsynthese

Das Reaktionsergebnis der Oxazolidinonsynthese hängt stark von der Temperaturkonstanz im Reaktor ab. Abbildung 5 zeigt exemplarisch die Oxazolidinonsynthese ausgehend von Acetessigester (**7**).

Die cyclisierende Decarboxylierung **10** → **6** erfolgt thermisch kontrolliert in Konkurrenz mit der hydrolytischen Generierung des respektiven β -Aminoalkohols **11**.

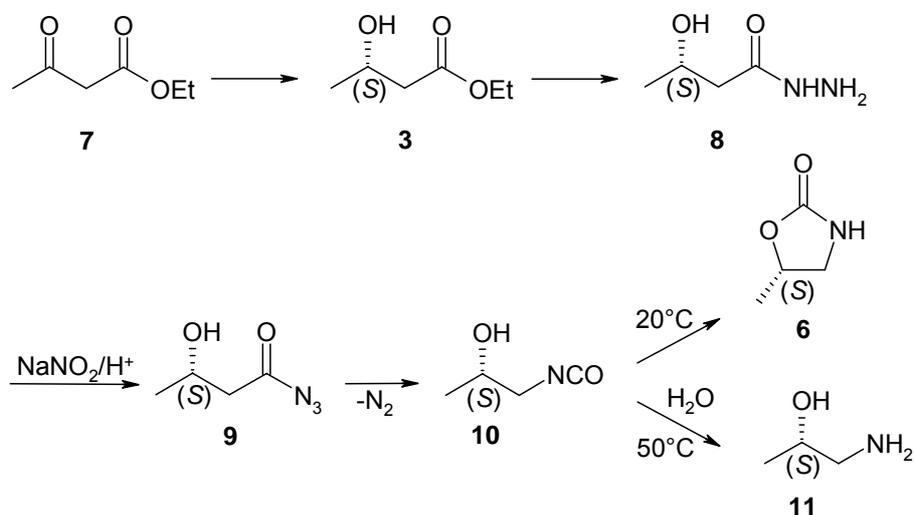


Abbildung 5. Synthesesequenz der Oxazolidinonsynthese ausgehend von Acetessigester (**7**). Der Schritt **8** → **6** verläuft als Eintopfsynthese, sodaß die Sequenz **7** → **6** als Dreistufenprozeß realisiert wird.

Dies äußerte sich in den isolierten Ausbeuten, die im 100g-Maßstab stark schwankten und in Einzelfällen unter 50% sanken (Tabelle 3). In jedem Fall war eine Abnahme der isolierten Ausbeute mit steigender Ansatzgröße zu beobachten.

Tabelle 3. Ausbeute der cyclisierenden Decarboxylierung.

<i>Produkt</i>	<i>Ansatzgröße</i>		<i>Ausbeute</i>
4	35 mmol	5 g	87 - 88%
	69 mmol	10 g	82 - 85%
	347 mmol	50 g	72 - 83%
	694 mmol	100 g	59 - 86%
5	32 mmol	5 g	89 - 90%
	63 mmol	10 g	88 - 89%
	316 mmol	50 g	82 - 87%
	633 mmol	100 g	63 - 86%
6	42 mmol	5 g	60 - 62%
	85 mmol	10 g	58 - 61%
	424 mmol	50 g	52 - 60%
	847 mmol	100 g	44 - 56%

In aufwendigen Untersuchungen konnte die Geschwindigkeit der Zugabe des Protonierungsmittels H_2SO_4 als ein wesentlicher, die Reaktion bestimmender Faktor identifiziert werden. Dabei ist die Solvatisierungsenthalpie von untergeordneter Bedeutung. Es konnten diesbezüglich keine signifikanten Einflüsse gemessen werden. Dagegen besitzt die im Verlaufe der Sextettumlagerung freiwerdende Reaktionswärme erheblichen Einfluß auf das System. Als erfolgsbestimmend erwies sich letztlich die feinabgestimmte Geschwindigkeit der Säurezugabe hinsichtlich Umsatz und Wärmetönung. Insbesondere in Ansatzgrößen ab 50 g/L erwies sich die freiwerdende Reaktionsenthalpie als maßgeblich (Tabelle 4). Dabei wurden für die Subkilogramm-Variante Gesamtausbeuten in Höhe von bis zu 84% erreicht.

Damit erklärt sich auch das vom Ansatzvolumen abhängige Abnehmen der isolierten Ausbeute schlüssig. Wie Tabelle 3 zeigt, sind gerade kleine Ansatzgrößen unproblematisch.

Eine zu langsame Zugabe der Säurekomponente führte indes zu unkontrollierten Nebenreaktionen intermediärer Nitrene mit nicht umgesetzttem redoxaktivem Säurehydrazid (Abbildung 6).

Tabelle 4. Einfluß des H₂SO₄-Feeds auf die Ausbeute der 2-Oxazolidinonsynthese. Es werden nicht nur reproduzierbar höhere Werte erhalten, sondern auch die Schwankungsbreite der Ergebnisse reduziert sich auf wenige Prozentpunkte!

Produkt	Ansatzgröße		Ausbeute
4	35 mmol	5 g	87 - 88%
	69 mmol	10 g	82 - 85%
	347 mmol	50 g	82 - 83%
	694 mmol	100 g	81 - 83%
5	32 mmol	5 g	89 - 90%
	63 mmol	10 g	88 - 89%
	316 mmol	50 g	83 - 86%
	633 mmol	100 g	82 - 84%
6	42 mmol	5 g	61 - 62%
	85 mmol	10 g	60 - 62%
	424 mmol	50 g	60 - 61%
	847 mmol	100 g	58 - 60%

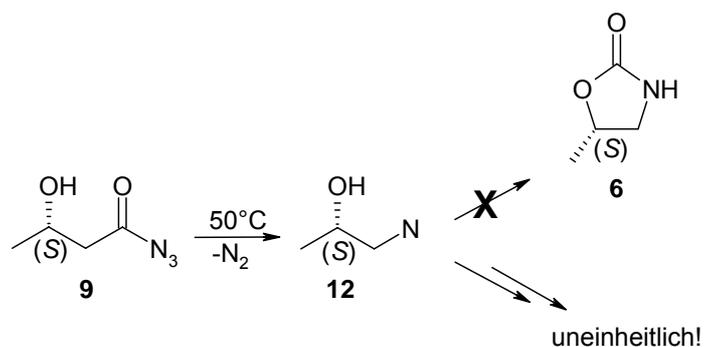


Abbildung 6. Die thermisch induzierte Nitrenbildung beeinflusst das Reaktionsergebnis erheblich. Die hochreaktiven Sextettspezies reagieren unspezifisch zu einer Vielzahl von Folgeprodukten.

Die Raum-Zeit-Ausbeuten für die cyclisierende Decarboxylierung sind in Tabelle 5 angegeben.

Tabelle 5. Raum-Zeit-Ausbeuten für die cyclisierende Decarboxylierung des Hydrazids.

<i>Produkt</i>	<i>Raum-Zeit-Ausbeute (gL⁻¹h⁻¹)</i>
2	9.6
4	10.7
6	7.6

6. Einfluß der mikrobiellen Deemulgierung auf die biologische Produktreinheit

Obwohl bereits die Reaktionsbedingungen der Oxazolidinonsynthese (1. Hydrazidierung, 2. saure Nitrosierung) das Vorliegen eventueller Biomolekülspuren im Produkt ausschließen, wurde angesichts der angestrebten Verwertung der 2-Oxazolidinone als chirale pharmazeutische Intermediate (CPI) geprüft, ob eventuell biologisch aktives Material aus dem Produktionsprozeß ins fertige Produkt gelangen kann bzw. inwieweit sich Biomoleküle im Fertigprodukt finden lassen.

Wäßrige Lösungen der Reinprodukte sowie konzentrierte Mutterlaugen wurden mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf das Vorhandensein von DNA getestet. Der Ausschluß eventueller Proteinspuren erfolgte gelelektrophoretisch nach Silberfärbung. Das Vorliegen von Sacchariden wurde massenspektroskopisch (LC/MS, MALDI-TOF) ausgeschlossen. In keinem der untersuchten Fälle wurden trotz Verwendung hochempfindlicher Nachweismethoden Proteine, Peptide oder Saccharide nachgewiesen. Eine Gefährdung des Patienten erscheint aus dieser Sicht nicht zu bestehen, da weitere chemische Folgemodifizierungen und Reinigungsschritte bis zum applizierbaren Wirkstoff durchgeführt werden, in deren Rahmen Biomoleküle nicht nur denaturiert, sondern auch entfernt werden.

Grundsätzlich ist eine Verwendung nicht-pathogener, genetisch nicht modifizierter Mikroorganismen vorzuziehen. Dennoch sind derzeit Verunreinigungen von ganzzellbiokatalytisch erzeugtem Material nicht bekannt.

7. Kommerzialisierung

Beim Kooperationspartner JFC wurden die an der TUD entwickelten Methoden zur biokatalytischen Spaltung der Bioemulgatoren im größeren Maßstab (bis 200 L Reaktionsvolumen) nachvollzogen und erfolgreich für eigene Produktionen eingesetzt.

Dabei zeigte die mikrobielle Deemulgation der Biotransformationsbrühen ebenfalls die besten Resultate.

Die Methoden zur großmaßstäblichen Deemulgation sind gleichermaßen für Hefekulturen und bakterielle Kulturen (*L. kefir* und rekombinante *E. coli*) sehr gut geeignet.

Zur Herstellung der stereoisomerenreinen β -Hydroxyester wurden in aufwendigen Untersuchungen die optimalen Prozeßparameter für die ganzzell-biokatalytische Reduktion der β -Ketoester bestimmt (Tabelle 6).

Tabelle 6. Wichtige Prozeßparameter für die Durchführung der Ganzzell-Biotransformationen der β -Ketoester im 15L-Maßstab.

<i>Produkt</i>	<i>Feed</i>	<i>MTD^a</i> (mmol/L)	<i>Endkonzentration</i> (mmol/L)	<i>Raum-Zeit-</i> <i>Ausbeute (gL⁻¹h⁻¹)</i>
1	Fed-batch	3.87	110	0.85
2	Fed-batch	1.55	50	0.42
3	Fed-batch	76.92	460	1.50

a) Maximal tolerierte Dosis (bestimmt über Wachstumshemmung).

Wegen der starken Inhibitionseffekte durch die Substrate mußten geeignete Feed-Strategien entwickelt werden. Vor dem Hintergrund der Nebenproduktproblematik wurde nach Bedingungen gesucht, unter denen sich unerwünschte Konkurrenzreaktionen weitgehend vermeiden ließen. Dies gelang durch fed-batch-Ansätze auch im Großmaßstab. Zwar müssen hierfür längere Reaktionszeiten in Kauf genommen werden (36 h gegenüber 20 h), dafür aber ließen sich die im Labor gefundenen Werte für Ausbeute und Stereoselektivität für die jeweiligen β -Ketoester verifizieren. Dank der reduzierten Materialverluste gelang es, die Raum-Zeit-Ausbeuten um durchschnittlich 10% zu steigern.

Angesichts der Erfolge bei der biokatalytischen Deemulgation von technischen Enzympräparationen wurde die ADH-katalysierte Produktion von 3-Hydroxybuttersäureethylester für die kommerzielle Anwendung optimiert. Auch hier mußten Kinetik und Feed sorgfältig aufeinander abgestimmt werden, um die Gefahr der Enzymdesaktivierung durch nichtumgesetztes Substrat auszuschließen.

Für die (S)-selektive ADH RS1 beispielsweise konnte ein K_m -Wert für Acetessigester (**7**) von 3,1 mM ermittelt werden. Der K_i -Wert für die Substratinhibition lag bei 71 mM. Um in kommerziell relevante Bereiche zu gelangen, müssen Produktkonzentrationen

von mindestens 250 mM erreicht werden, dazu war die Entwicklung eines geeigneten Eduktfeeds unerlässlich. Nach Optimierung der entsprechenden Feedraten konnten schließlich Endkonzentrationen von 300-350 mM erzielt werden.

5. Soll-/Ist-Vergleich

1. TU Dresden

Der Meilensteinplan sah für das Projekt folgendes Vorgehen vor:

Meilenstein	Jahr		07.2003 - 06.2004								07.2004 - 06.2005														
	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	
Downstream-Processing																									
Nebenproduktbildung																									
Oxazolidinonsynthese																									

Die Arbeiten zur Isolierung und Identifizierung des Bioemulgators der Hefe erwiesen sich als unerwartet schwierig. Mit Abschluß der Arbeiten zur mikrobiellen Deemulgierung wurde der **Meilenstein Downstream-Processing** fristgerecht im Dezember 2004 **erreicht**.

Aufgrund der hohen Leistungsfähigkeit der enzymatischen Spaltung von Bioemulgatoren werden Rohproduktreinheiten von 97-98% erreicht. Dadurch entfällt meist das Erfordernis einer nachgeschalteten Reinigungsoperation und die damit verbundene thermisch induzierte Bildung von Nebenprodukten. Ferner konnte gezeigt werden, daß intrazelluläre Prozesse erheblich zur Nebenproduktbildung beitragen. Die Art der Konkurrenzprozesse wurde aufgeklärt. Damit wurde der **Meilenstein Nebenproduktbildung** ebenfalls im Dezember **erreicht**.

Die Arbeiten zur Oxazolidinonsynthese wurden mit Projektende im Juni 2005 mit der Optimierung bis in den 100 g-Maßstab abgeschlossen. Ein weiteres Up-scaling auf Ansatzgrößen im Kilogramm-Maßstab war unter den gegebenen Umständen nicht möglich. Dies lag zum einen an dem hohen Zeitbedarf für die Optimierungsarbeiten der Oxazolidinonsynthese im 100g-Maßstab, zum anderen erfordern weitere Schritte zur Kommerzialisierung dieser Technologie eine chemische Mehrzweckanlage, die zum Zeitpunkt der Projektdurchführung nicht vorhanden war. Die ursprünglich für diesen Arbeitsteil vorgesehene Durchführung bei der Firma bitop in Witten war leider nicht realisierbar.

2. JFC – Jülich Fine Chemicals GmbH

Der Meilensteinplan sah für das Projekt folgendes Vorgehen vor:

Meilenstein	07.2003 - 06.2004												07.2004 - 06.2005											
	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J
Koordination, Planung																								
Kinetische Studien						■																		
Feed-Strategien																■								
Übertragung auf Großanlage																								
Oxazolidinonsynthese																								■

Die Scale-up-Fähigkeit des Verfahren und die kinetischen Studien zur ganzzell-bio-katalytischen Reduktion der benötigten β -Ketoester wurden im Dezember 2003 abgeschlossen. Der **Meilenstein Kinetische Studien** wurde damit fristgerecht **erreicht**.

Die Erarbeitung von Feed-Strategien zur großmaßstäblichen Synthese der β -Hydroxyester wurde Oktober 2004 abgeschlossen. Der **Meilenstein Feed-Strategien** wurde damit fristgerecht **erreicht**.

Die Übertragung auf die Großanlage im 200 L-Maßstab konnte bis zum Projektabschluss durchgeführt werden.

Die Arbeiten zur Oxazolidinonsynthese wurden mit Projektende im Juni 2005 abgeschlossen. Eine Kommerzialisierung konnte noch nicht erfolgen, da noch sicherheitstechnische Fragestellungen für den kg-Maßstab geklärt werden müssen.

6. Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen

Bedeutung der Ergebnisse für die Praxis

Die Probleme während der extraktiven Aufarbeitung von Ganzzell-Biotransformationen können durch die enzymatische Spaltung emulgierender Agentien behoben werden. Darüber hinaus eignet sich dieser neuartige Ansatz sowohl für Pilz- als auch für Bakterienkulturen. Wie Abbildung 7 zeigt, ist der präparative Aufwand im Vergleich zur herkömmlichen Methodik beträchtlich geringer.

Die biokatalytische Deemulgierung beeinflusst die Effizienz der extraktiven Aufarbeitung erheblich. Bei unvollständiger Extraktion können Wertstoffe in der wässrigen Phase verbleiben, und bei unvollständiger Phasentrennung gelangen wasserlösliche Metaboliten des Ganzzell-Biokatalysators in die organische Phase. Die hieraus resultierenden Verunreinigungen des Rohproduktes erfordern eine weitere Reini-

gungsoperation, häufig eine fraktionierte Destillation. Allerdings neigen viele chirale Alkohole, insbesondere cyclische β -Hydroxyester, bei thermischer Belastung zu Racemisierung und Zersetzung. Daß sich lipidlösliche Verunreinigungen aus hydrolase-behandelten zellfreien Medien bislang als vernachlässigbar erwiesen, ist ein weiterer Vorteil dieser Methode.

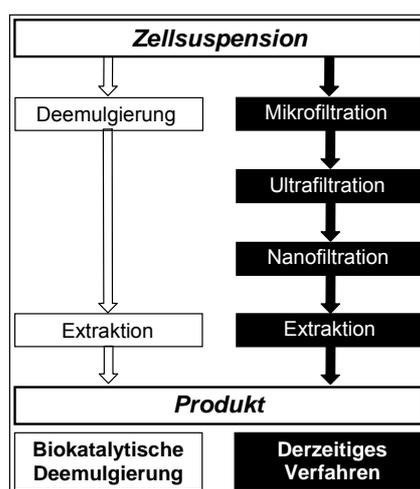


Abbildung 7.

Trotz der ausgeprägten deemulgierenden Wirkung von Hydrolasen ist für die exaktive Aufarbeitung von Ganzzell-Biotransformationen ein der Enzymbehandlung vorangehender Zellseparationsschritt erforderlich. Eine Identifizierung der Bioemulgatoren erscheint vor dem Hintergrund der Heterogenität dieser oberflächenaktiven Substanzen, die von verschiedenen Mikroorganismen produziert werden und der geforderten breiten Anwendbarkeit der Methodik angesichts der Leistungsfähigkeit der mikrobiellen Deemulgierungsvariante überflüssig. Tatsächlich bringt die mikrobielle Breitband-Spaltung der amphiphilen Biomoleküle den großen Vorteil kürzerer Phasenseparationszeiten (t_p) mit sich. Ein Entfallen der Zellseparation, wodurch sich die Produktseparation auf nur zwei Schritte verkürzte, ließ sich jedoch auch mit dieser Methode nicht realisieren (Abbildung 7).

In Form der Behandlung zellfreier Medien mit Proteasen steht eine leistungsfähige Aufarbeitungstechnologie für Ganzzell-Biotransformationen zur Verfügung. Die Kosten verringern sich weiter bei Anwendung der mikrobiellen Deemulgierung. Der Prozeß ist von der Kostenseite her vorteilhaft und einfach zu realisieren, weshalb er für die Mehrzahl der Anwendungen als Methode der Wahl erscheint. Dies unterstreicht die Reduktion der Downstream-Kosten von 75% auf ca. 50%.

Kommerzialisierung

Zum Zeitpunkt der Antragstellung wurde davon ausgegangen, daß die Projektergebnisse bereits im 2. Förderjahr in die kommerzielle Anwendung einfließen. Durch den intensiven Kontakt und Erfahrungsaustausch innerhalb des Projektverbundes gelang es schon im Herbst 2004 die mikrobielle Deemulgierungstechnologie bei JFC zu etablieren. Als Ergebnis dieser Bemühungen konnten bereits im 4. Quartal 2004 Umsätze in Höhe von über € 10.000 für den Verkauf chiraler β -Hydroxyester realisiert werden. Durch weitere Optimierung des Produktionsprozesses im 10-50 kg-Maßstab konnte eine weitere Reduktion des Verkaufspreises pro kg ermöglicht werden, was JFC einen zunehmenden Wettbewerbsvorteil am Weltmarkt ermöglichte. Damit gelang es im Jahr 2005, einen Umsatz von annähernd 100.000 EUR mit dieser Substanzklasse zu erzielen. Seit 2003 konnten die Herstellkosten nunmehr auf 25% des Ausgangswertes gesenkt werden. Hierzu trugen neben der Deemulgierungstechnologie auch andere Faktoren der Prozessoptimierung bei, wie z.B. gesunkene Rohmaterialkosten.

In der Folgezeit ist geplant, auch im Bereich der chiralen 2-Oxazolidinone kommerziell verstärkt tätig zu werden. Um diese Produkte im Multikilogramm-Maßstab herzustellen, ist allerdings eine so genannte Multi-Purpose-Chemieanlage notwendig, diese Investition (ca. 100.000 EUR reine Gerätekosten) will JFC 2006 tätigen. Die 2-Oxazolidinone sollen dann zu einem Preis von mindestens 20.000 EUR pro kg am Markt platziert werden, wobei natürlich mit wachsenden Mengen der kg-Preis entsprechend fallen wird. Erste Mustermengen sind aus den 100 g-Synthesen bereits für potentielle Kunden zugänglich.

Bedeutung der Ergebnisse für die Umwelt

Die hier vorgestellte Oxazolidinonsynthese stellt eine leistungsstarke Alternative zur existierenden Synthesemethodik dar. Durch Anwenden einer biokatalytischen Variante zur Produktseparation reduziert sich der Energieaufwand zur Abtrennung emulgierender Agentien. Dies gilt insbesondere dort, wo eine Wasserdampfdestillation Bestandteil des Downstream-Prozesses ist. Gleichzeitig wurde der Bedarf an der wertvollen Ressource Wasser reduziert, da mittels der biokatalytischen Deemulgierung auf das wasserverbrauchende Reinigen von Membranfiltereinheiten verzichtet werden kann bzw. sich eine Wasserdampfdestillation erübrigt. Mit der Aufklärung der Nebenproduktbildung auf molekularer Ebene wurde die Grundlage für die selektive

Unterdrückung intrazellulärer Konkurrenzprozesse gelegt. Solche Arbeiten liegen jedoch außerhalb des Projektrahmens. Die reproduzierbare Erhöhung der Stereoisomerenreinheit (siehe Tabelle 2) reduzierte nicht nur Abfallmengen und Entsorgungsaufwand, sondern war Grundlage für die Optimierung der Oxazolidinonsynthese. Diese vereinigt mehrere chemische Umlagerungen in einem einzigen Prozeß, wobei die aggressive, umweltschädigende Reagenzien vermeidende, hochselektive Niedertemperaturkonversion zu nahezu quantitativen Ausbeuten und extrem hohen Stereoisomerenreinheiten führt und bei zu vernachlässigenden Abfallmengen energetisch unaufwendig ist.

Damit ergeben sich Umweltentlastungspotentiale wie Einsparung von Substrat, Vermeidung von energieaufwendigen Separationsmethoden, Reduktion der Abfallmengen. Durch den weitgehenden Verzicht auf umweltgefährdende Chemikalien sowie die Verminderung potentiell zu spontaner Zersetzung neigender Nebenprodukte wurde das Gefährdungspotential von Mensch und Umwelt nachhaltig reduziert.

7. Diskussion

Biokatalytische Deemulgation

Die biokatalytische Deemulgation hat sich bereits in der Alltagspraxis bewährt. Das Verfahren liefert reproduzierbar gute Werte und ist jetzt die Standardaufarbeitungsmethode.

Zudem sind die Produkte den Enzymen gegenüber weitgehend hydrolysestabil und es besteht keine Racemisierungsgefahr.

Das Deemulgationsverhalten bakterieller Ganzzell-Biokatalysatoren unterscheidet sich zum Teil von dem der Hefe. Somit kann eine breit anwendbare Aufarbeitungsmethodik nicht auf die Bioemulgatoren einzelner Spezies zugeschnitten sein. Daher war das ursprüngliche Vorhaben, über die Isolierung und Identifizierung von Bioemulgatoren selektiv mit sehr kurzen t_p zu deemulgieren, hinfällig.

Angesichts des hohen präparativen Aufwandes zur Isolierung der Bioemulgatoren der Hefe fiel das Aufwand-Nutzen-Verhältnis für dieses Teilprojekt ungünstig aus. Dies gilt insbesondere auch aus dem Grund, daß sich durch die erfolgreiche Deemulgation mit Pronase E bzw. Protease N01 kein weitergehender praktischer Nutzen erkennen ließ, weshalb eine Isolierung der Bioemulgatoren für die industrielle Anwendung der biokatalytischen Deemulgation nicht erforderlich ist.

Unter Berücksichtigung all dieser Punkte wurde im Interesse einer praktikablen, breit und einfach anzuwendenden Deemulgationstechnologie (easy-to-handle-solution) auf die Isolierung der Bioemulgatoren verzichtet. Statt dessen hat sich der Ansatz, über eine Multienzym-Variante in Form der mikrobiellen Deemulgierung Bioemulgatoren verschiedener Zusammensetzung effizient zu lysieren, bewährt. Die Anmeldung dieses Verfahrens zum Patent unterstreicht die Leistungsfähigkeit des Verfahrens ebenso wie die erfolgreiche Überführung der Technologie in den Betriebsmaßstab.

Damit sind die Arbeiten zur biokatalytischen Deemulgation abgeschlossen.

Nebenprodukte

Unerwartete Ergebnisse brachten die Untersuchungen zur Nebenproduktproblematik. Der Einfluß einer der Extraktion nachgeschalteten thermischen Reinigungsstufe wirkt sich erheblich auf die isolierbare Ausbeute aus, und auch die Stereoisomerenreinheit profitiert von der neuen Aufarbeitungsmethodik. Trotz des bereits sehr hohen Niveaus konnten hier noch Steigerungen erzielt werden. So bedeutet ein Anstieg des *de* von 1 von 98.3% auf 99.2%, daß der Anteil der unerwünschten Stereoisomeren um 60% reduziert wurde! Weitere Ausbeuteverluste sind der Reaktion des Cytoprotektivums Glutathion mit dem Substrat bzw. dem Produkt in der Zelle zuzuschreiben. Hier wurden bedeutende Fortschritte erzielt, denn erstmals gelang es, die Konkurrenzreaktionen auf molekularer Ebene aufzuklären. In Form der *Retro*-Claisen-Kondensation wurde sogar erstmals ein neuartiger Reaktionstypus bezüglich der zellulären Reaktion auf das Vorhandensein xenobiotischer Substrate beschrieben.

Geeignete Strategien zur Unterdrückung dieser Konkurrenzprozesse ließen sich im zur Verfügung stehenden Zeitrahmen nicht entwickeln. Exploratorische Versuche zeigten jedoch, daß Eingriffe in den Glutathionhaushalt der Zelle massive zellphysiologische Konsequenzen nach sich ziehen. Ungeachtet dessen ist es bereits jetzt ein großer Erfolg, daß die den Produktverlusten zugrundeliegenden Ursachen, Aufarbeitungsbedingungen und cytosolischer Glutathiontiter, weitgehend verstanden werden.

Daher werden von geeigneten Strategien, die intrazelluläre Glutathionkonzentration zu erniedrigen, bzw. aus den sich daraus ergebenden Konsequenzen für die Zellphysiologie erhebliche Potentiale für die industrielle Biokatalyse erwartet, vor allem was eine weitergehende Erhöhung der Ausbeute bzw. eine Steigerung der Stereo-

somerenüberschüsse anbelangt. Der Einfluß der Zellphysiologie auf die Stereoisomerenverteilung in Ganzzell-Biotransformationen ist bereits belegt (Bertau, 2002).

Einfluß der mikrobiellen Deemulgierung auf die biologische Produktreinheit

Ein wichtiger Punkt hinsichtlich der Verwendung der Oxazolidinone in der Wirkstoffsynthese stellt die potentielle Verunreinigung des Materials mit Produkten des mikrobiellen Deemulgators dar. Diese Fragestellung ist grundsätzlich mit Erwägungen zur Verwendbarkeit ganzzell-biokatalytisch erzeugter Verbindungen gleichzusetzen, da aus dem Ganzzell-Biokatalysator, der zur Erzeugung des Wertstoffes dient, gleichermaßen biologisches Material in das Kulturmedium abgegeben wird, wie durch den Ganzzell-Biokatalysator, der zur Deemulgierung der Kulturbrühe dient. Ebenfalls darf sich eine solche Diskussion nicht auf Ganzzell-Systeme beschränken, sondern muß unabdingbar auch isolierte Enzyme miteinbeziehen, vor allem dann, wenn es sich um technische Enzympräparationen handelt. Von diesen kann stets in den Fällen, in denen gentechnisch modifizierte Organismen zur Produktion des Enzyms eingesetzt wurden, prinzipiell eine ungleich erheblichere Gefährdung ausgehen als von nichtpathogenen Mikroorganismen.

Da in keinem Fall sich weder bei enzymatischer noch bei mikrobieller Deemulgation Reste von Proteinen, Sacchariden oder anderen biologisch aktiven Biomolekülen im 2-Oxazolidinon nachweisbar waren, ist bei den hier untersuchten Produkten nicht von einer Gefährdung durch biologisch aktive Substanzen auszugehen.

Es ist aber fraglos erforderlich, im Einzelfall zu prüfen, ob prinzipiell eine Gefährdung des Patienten durch das Herstellungsverfahren eines Wirkstoffes resultieren kann. Dies gilt für biokatalytische Verfahren ebenso wie für konventionell-chemisch durchgeführte.

Oxazolidinonsynthese

Im Anschluß an die Erfolge hinsichtlich Ausbeute und Stereoisomerenreinheit der Ganzzell-Biotransformation wurde das Up-scaling der Oxazolidinonsynthese durchgeführt.

Für die Überführung der im Gramm-Maßstab bewährten Oxazolidinonsynthese in den Multikilogramm-Maßstab waren zu Beginn der Arbeiten erhebliche Komplikationen erwartet worden, da die cyclisierende Decarboxylierung thermisch kontrolliert mit der hydrolytischen Generierung der respektiven β -Aminoalkohole konkurriert.

Anfängliche Versuche hierzu belegten diese Annahme. Die isolierten Ausbeuten schwankten stark und sanken in Einzelfällen unter 50%. Nichtsdestotrotz muß an dieser Stelle hervorgehoben werden, daß selbst unter nicht optimierten Bedingungen die hier vorgestellte Synthesevariante die allen anderen Optionen bei weitem überlegene ist, selbst wenn die Ausbeuten unter den im 5-10 g-Maßstab durchgeführten Ansätzen blieben.

Ein großer Erfolg ist es daher, daß angesichts der erheblichen experimentellen Schwierigkeiten, die ein solch hochkomplexes Eintopfreaktionssystem wie das vorliegende mit sich bringt, im Subkilogramm-Maßstab (50 – 100 g) reproduzierbar gute Ausbeuten erreicht wurden. Als wichtiger Faktor erwies sich hier die kontrollierte Zugabe des Protonierungsagens. Die beim decarboxylierenden Ringschluß freiwerdende Reaktionswärme ist hauptverantwortlich für die bei größeren Ansätzen geringe Ausbeute sowie die beobachtete Schwankungsbreite der Ergebnisse.

Ein weiteres Up-scaling auf Ansatzgrößen im Kilogramm-Maßstab bedarf einer Mehrzweckanlage, die zum Zeitpunkt der Projektdurchführung nicht vorhanden war. In Zusammenhang damit wird weiterer Aufschluß über Optimierungsmöglichkeiten von Folgeexperimenten zur Synthese im Multikilogramm-Maßstab erwartet. So ist insbesondere die Temperaturkonstanz eine verfahrenstechnische Fragestellung, die sich aus den genannten Gründen im Zeitrahmen dieses Projektes nicht abschließend beantworten ließ.

Gemessen an der Synthese im Gramm-Maßstab (86%) ergeben sich für die Subkilogramm-Variante Gesamtausbeuten in Höhe von bis zu 84%. Damit wurden die Arbeiten zum Up-scaling der Oxazolidinonsynthese erfolgreich durchgeführt!

8. Kooperation innerhalb des Projekts

Eine wichtige Grundlage der erfolgreichen Bearbeitung dieses Projektes bildet seit Beginn der intensive Dialog der Projektpartner. Standardmäßig finden im zweiwöchigen Turnus telefonische Briefings statt, während derer aktuelle Fragestellungen und Ergebnisse diskutiert werden.

Den hohen Stellenwert des persönlichen Kontakts im Projektverbund unterstreichen ein Mitarbeiteraustausch und vier Projekttreffen. Dabei wurde darauf geachtet, daß der Kontakt nicht nur zwischen den Projektleitern, sondern auch mit und zwischen den Projektbearbeitern hergestellt wurde.

- 23. April 2004 an der TU Dresden.
- 04. Mai 2004, anlässlich der Bioperspectives in Wiesbaden.
- 29. August 2004, anlässlich der biocat 2004 in Hamburg.
- 3.-4. Oktober 2004 bei JFC - Jülich Fine Chemicals GmbH in Jülich.
- 3.-4. März 2005, anlässlich des Statusseminars in Hamburg.

Vom 02. August bis 11. September 2004 hat Herr M. Pitsch ein sechswöchiges Betriebspraktikum bei JFC mit der Maßgabe absolviert, das existierende Know-how an der TU Dresden an JFC zu vermitteln und sich mit den Maßgaben einer an kommerziellen Gesichtspunkten orientierten Aufarbeitung von Ganzzell-Biotransformationen intensiv vertraut zu machen, die Grundlage sind für die Planung der experimentellen Arbeiten an der TUD. Herr Pitsch war am Institut für Biochemie der TU Dresden als Diplomand tätig.

Kooperationen innerhalb des ICBio-Verbundes

Im Rahmen der Up-scaling-Versuche seitens JFC entwickelte sich eine intensive Kooperation mit dem ebenfalls im ICBio-Netzwerk vertretenen, an diesem Projekt ursprünglich jedoch nicht beteiligten Partner AC Biotec (ACB) in Jülich. Am 04. Oktober 2004 fand ein gemeinsames Projekttreffen zwischen TUD, JFC und ACB in Jülich statt.

Als Ergebnis des funktionierenden Netzwerkgedankens von ICBio wurde ein gemeinsames Patent durch die drei Verbundpartner angemeldet, das die aktuellen Entwicklungen auf dem Gebiet der mikrobiellen Deemulgierung zum Inhalt hat. Des Weiteren ist eine Publikation dieser Thematik in *Organic Process & Research Development* in Vorbereitung, um die Resultate dieser Forschungsarbeiten dem anwendungsorientierten Fachpublikum zeitnah verfügbar zu machen.

Die Kooperation der Partner TUD und JFC sowie JFC und ACB wird über einen entsprechenden Kooperationsvertrag geregelt. Die Verträge über die Kooperationen der TUD mit JFC und ACB liegen dem Abschlußbericht bei.

Kooperation im Anschluß an die Förderphase

Die bewährte Zusammenarbeit zwischen den Projektpartnern Julich Chiral Solutions GmbH (vormals JFC – Jülich Fine Chemicals GmbH) und der TU Dresden sowie dem ICBio-Verbundpartner AC Biotec wird über dem Förderzeitraum hinaus weitergeführt. Ziel ist es, die Deemulgierungstechnologie auf weitere biotechnologische

Produktionsverfahren zu erweitern. Darüberhinaus wird nach erfolgter Investition in die hierfür erforderliche Multi-Purpose-Anlage die Kommerzialisierung der chiralen 2-Oxazolidinone verstärkt vorangetrieben.

9. Fazit

Der Projektverbund TUD-JFC, später erweitert durch den ICBio-Verbundpartner AC Biotec hat sich nachhaltig bewährt. Es wurden leistungsfähige Strategien erarbeitet, die Grundlage für die kommerzielle Synthese chiraler 2-Oxazolidinone sind. So konnte die angestrebte biokatalytische Deemulgierung erfolgreich realisiert werden. Das Verfahren erlaubt die Deemulgierung von wässrigen Medien mit Hilfe von Enzymen bzw. Mikroorganismen bei äußerst günstigen Phasenseparationszeiten. Die für die industrielle Biokatalyse wertvollen Ergebnisse aus der Aufklärung der Nebenproduktbildung führte zu einem erweiterten Verständnis der in der Ganzzell-Biotransformationen stattfindenden intrazellulären Prozesse und eröffnet Perspektiven zur Unterdrückung unerwünschter Konkurrenzreaktion in kommerziellen Verfahren. Die erfolgreiche Optimierung der Oxazolidinonsynthese im 100g-Maßstab ist Grundlage für die Kommerzialisierung dieser essentiellen chiralen pharmazeutischen Intermediate.

10. Publikationen

Patente

1. Bertau, M.; Leppchen, K.; Daußmann, T., Curvers, S. (2005) Verfahren zur ganzzell-biokatalytischen Deemulgation von Zellsuspensionen und zellfreien Medien. Deutsche Patentanmeldung 10 2005 031 536.4.
2. Bertau, M.; Jörg, G.; Daußmann, T. (2003) Verfahren zur extraktiven Isolierung von organischen Komponenten aus Zellsuspensionen und zellfreien Medien. Offenlegungsschrift 103 29 819.3.

Veröffentlichungen

1. Leppchen, K.; Smolinski, J.; Unversucht, S.; Daußmann, T.; Curvers, S.; Bertau, M. (2005) Novel, highly efficient biocatalytic de-emulsification in extractive work-ups of whole-cell biotransformations. *Org. Process Res. Dev.*, in Vorbereitung.

2. Jörg, G.; Hémerly, T.; Bertau, M. (2005) Effects of cell-stress protectant glutathione on the whole-cell biotransformation of ethyl 2-chloro-acetoacetate with *Saccharomyces cerevisiae*. *Biocatal. Biotransform.* **23**, 9-17.
3. Jörg, G.; Leppchen, K.; Daußmann, T.; Bertau, M. (2004) Neuartiges Verfahren zur extraktiven Isolierung von organischen Komponenten aus Ganzzell-Biotransformationen. *Chem. Ing. Tech.* **76**, 1739-1742.
4. Jörg, G.; Leppchen, K.; Daußmann, T.; Bertau, M. (2004) A novel convenient procedure for extractive work-up of whole-cell biotransformations using demulsifying hydrolases. *Biotechnol. Bioeng.* **87**, 525-536.
5. Jörg, G.; Leppchen, K., Bertau, M. (2004) Ganzzell-Biokatalyse mit *Saccharomyces cerevisiae*. *Ber. Bunsen Ges.* (Sonderheft zur 103. Bunsentagung, 20.-22.05.2004 in Dresden), 67-69.

Vorträge

Jörg, G.; Leppchen, K.; Daußmann, T.; Bertau, M. (2004) A novel convenient procedure for the extractive work-up of whole-cell biotransformations. Bioperspectives mit 22. DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen, 02.-06. Mai 2004, Wiesbaden.

Literatur

- Barriga, J.A.T.; Cooper, D.T.; Idziak, E.S.; Cameron, D.R. (1999) Components of the bioemulsifier from *S. cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* **25**, 96-102.
- Bertau, M.; Scheller, D. (2003) Equilibrium dependent hydration of ethyl 4,4,4-trifluoro-acetoacetate in aqueous solutions and consequences for the whole-cell biotransformation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* **32**, 491-497.
- Bertau, M., Bürli, M., Hungerbühler, E., Wagner, P. (2001) A novel highly stereoselective synthesis of chiral 5- and 4,5-substituted 2-oxazolidinones. *Tetrahedron: Asymmetry* **12**, 2103-2107.
- Böer, E.; Wartmann, T.; Luther, B.; Manteuffel, R.; Bode, R.; Gellissen, G.; Kunze, G. (2004) Characterization of the AINV gene and the encoded invertase from the dimorphic yeast *Arxula adenivorans*. *Ant. van Leeuwenhoek* **86**, 121-134.
- Cameron, D.R.; Cooper, D.G.; Neufeld, R.J. (1988) The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. *Appl. Env. Microbiol.* **54**, 1420-1425.

- Frevert, J.; Ballou, C.E. (1985) *Saccharomyces cerevisiae* structural cell wall protein. *Biochemistry* **24**, 753-759.
- Haberland, J.; Hummel, W.; Dausmann, T.; Liese, A. 2002. New continuous production process for enantiopure (2*R*,5*R*)-hexanediol. *Org. Process. Res. Dev.* **6**, 458-462.
- Higuchi, T.; Connors, K.A. (1965) Phase-solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instrum.* **4**, 117-120.
- Jamieson, D.G.; Fu, L.; Usher, D.C.; Lavi, E. (2001) Detection of lipoprotein(a) in intraparenchymal cerebral vessels: correlation with vascular pathology and clinical history. *Exp. Mol. Pathol.* **71**, 99-105.
- Kim, S.H.; Lim, E.J.; Lee, S.O.; Lee, J.D.; Lee, T.H. (2000) Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **31**, 249-253.
- Lee, J.-W.; Park, S.-B.; Lee, H. (2000) Densities, surface tensions, and refractive indices of the water + 1,3-propanediol system. *J. Chem. Eng. Data* **45**, 166-168.
- Lohray, B.B.; Lohray, V.B.; Srivastava, B.K.; Kapadnis, P.B.; Pandya, P (2004) Novel tetrahydro-thieno pyridyl oxazolidinone: an antibacterial agent. *Bioorg. Med. Chem.* **12**, 4557-4564.
- Mai, A.; Artico, M.; Esposito, M.; Sbardella, G.; Massa, S.; Befani, O.; Turini, P.; Giovannini, V.; Mondovi, B. (2002) 3-(1*H*-Pyrrol-1-yl)-2-oxazolidinones as reversible, highly potent, and selective inhibitors of monoamine oxidase Type A. *J. Med. Chem.* **45**, 1180-1183.
- Marriott, J.; Soerensen, E. (2003) The optimal design of membrane systems. *Chem. Eng. Sci.* **58**, 4991-5004.
- Phillips, O.A.; Udo, E.E.; Ali, A.A.M.; Al-Hassawi, N. (2003) Synthesis and Antibacterial Activity of 5-Substituted Oxazolidinones. *Bioorg. Med. Chem.* **11**, 35-41.
- Rabasseda, X.; Sorbera, L.A.; Castaner, J. (1999) Befloxatone. *Drugs. Fut.* **24**, 1057-1067.
- Testa, L. Akssira, M. Zaballos-Garcia, E. Arroyo, P. Domingo, L.R. Sepulveda-Arques, J. (2003) Experimental and theoretical investigations for the regio and stereoselective transformation of *trans* 1,2,3-trisubstituted aziridines into *trans* oxazolidin-2-ones. *Tetrahedron* **59**, 677-683.

Anhang

1. Kooperationsverträge
2. Patente
3. Veröffentlichungen
4. Abstract