

**Etablierung innovativer umweltfreundlicher
Synthesetechniken zur nachhaltigen Produktion von
Chemikalien durch biokatalytische Oxyfunktionalisierung in
Kombination mit innovativen Ansätzen der integrierten
Produktaufarbeitung.
AZ 13145**

Projektpartner:

*Prof. Dr. Andreas Schmid (Koordinator), Lehrstuhl für Biotechnik, Fachbereich
für Bio- und Chemieingenieurwesen, Universität Dortmund
Bearbeitung: Dr. Bruno Bühler, Dipl. Biol. ETH Daniel Kuhn, M.Sc. F.
Özde Bayraktar, Dipl. Ing. Patty Kleinsteuber*

*Dr. Rudolf Krumbholz (Bewilligungsempfänger), K.D.-Pharma GmbH,
Bexbach
Bearbeitung: Dr. Peter Lembke, Dr. Götzinger*

*Prof. Dr. Bernhard Hauer, BASF AG, Ludwigshafen
Bearbeitung: Dr. Michael Breuer, Dr. Peter Saling*

Dr. Roland Wohlgemuth, SAFC Pharma AG, Buchs, Schweiz

Projektbeginn: 1.8.2003
Laufzeit: 1.8.2003 – 31.7.2005

Dortmund, 2008

Projektkennblatt
der
Deutschen Bundesstiftung Umwelt



Az	13145	Referat	32	Fördersumme	346.426,00 €
Antragstitel	Förderschwerpunkt Biotechnologie: Etablierung innovativer umweltfreundlicher Synthesetechniken zur nachhaltigen Produktion von Chemikalien durch biokatalytische Oxyfunktionalisierung in Kombination mit innovativen Ansätzen der integrierten Produktaufarbeitung				
Stichworte	Schwerpunkt-Biotechnologie , Abwasser , Abfall , Wasser Mikrobiologie , Umweltchemikalien , Expression				
	Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)	
	2 Jahre	1.4.2006	31.3.2008	2	
	Zwischenberichte	nach 19 Monaten			
Bewilligungsempfänger	K.D. Pharma Bexbach GmbH Am Kraftwerk 6 66450 Bexbach			Tel	06826-3006
				Fax	06826-3007
Projektkoordination	Universität Dortmund, Fachbereich für Bio- und Chemieingenieurwesen, Lehrstuhl für Biotechnik Emil-Figge-Str. 66			Projektleitung Prof. Dr. Schmid, Dr. Bühler Dr. Krumbholz	
	44227 Dortmund			Bearbeiter: Herr Kuhn, Frau Bayraktar, Frau Kleinsteuber, Dr. Lembke, Dr. Götzinger Dr. Wohlgemuth, Prof. Dr. Hauer, Dr. Breuer, Dr. Saling	
Kooperationspartner	<ul style="list-style-type: none"> - Fluka-Chemie AG, CH-9470 Buchs (Schweiz) - BASF AG, ZHF B9, 67056 Ludwigshafen, 				

Zielsetzung und Anlass des Vorhabens

Biokatalytische Oxyfunktionalisierungen sind, dank milder Reaktionsbedingungen, dem Verzicht auf Edel- und Schwermetallkatalysatoren und der hohen chemischen Selektivität, hinsichtlich einer nachhaltigen Umweltentlastung eine viel versprechende Alternative zu chemisch-katalytischen Prozessen. Die erfolgreiche industrielle Anwendung der Biokatalyse bedingt jedoch hohe Raum-Zeit-Ausbeuten und diese wiederum genügend hohe Biokatalysatoraktivitäten und -stabilitäten. Die Isolierung und Gewinnung der oxyfunktionalisierten Produkte durch effektives und umweltverträgliches Downstream-Processing (DSP) ist eine weitere Grundvoraussetzung für die industrielle Realisierung biokatalytischer Verfahren. Im vorliegenden Projekt sollen Aktivität und Stabilität (NADH-Regeneration) eines Ganzzell-Biokatalysators zur stereospezifischen Styrolepoxidierung durch Metabolismusanalyse und Metabolic Engineering untersucht und optimiert werden. Gleichzeitig soll ein integriertes Prozessführungskonzept bestehend aus Trenntechnologien in überkritischem/flüssigen CO₂ eine effiziente und umweltfreundliche Produktaufarbeitung aus dem bestehenden Emulsionsprozess erlauben. Für biokatalytische Hydroxylierungen soll außerdem eine weitere Enzymklasse (Dehydrogenasen) mit dem Potential, Limitationen durch Sauerstofftransfer und Kofaktorregeneration zu vermeiden, evaluiert und in das breit angelegte Prozessführungskonzept integriert werden.

Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Für die Styrolepoxidation werden rekombinante, Styrolmonooxygenase (StyAB) enthaltende *E. coli* in Zweiphasensystemen mit verschiedenartigen organischen Phasen eingesetzt. Hierfür soll die Ökoeffizienz analysiert und optimiert werden. Die metabolische Flussanalyse soll mögliche Limitationen identifizieren. Genetic Engineering im Bereich kofaktorregenerierender Enzyme und/oder deren Regulation soll höhere Produktivitäten und Stabilitäten erlauben. Für die Anwendung der Dehydrogenasen werden geeignete Expressionssysteme entwickelt und in geeigneten Wirten eingesetzt. Die Prozessentwicklung umfasst hier neben dem DSP auch Kultivations- und Reaktionsbedingungen. Zur Produktextraktion mit überkritischem CO₂ aus der Emulsion wird eine Kombination aus SFE (**S**upercritical **F**luid **E**xtraction) und SFC (**S**upercritical **F**luid **C**hromatography) entwickelt. CO₂ soll auch zur Phasentrennung zum Einsatz kommen.

Ergebnisse und Diskussion

Biokatalytische Oxyfunktionalisierungen sind, dank milder Reaktionsbedingungen, dem Verzicht auf Edel- und Schwermetallkatalysatoren und hoher chemischer Selektivität, hinsichtlich einer nachhaltigen Umweltentlastung eine vielversprechende Alternative zu chemisch-katalytischen Prozessen. Innerhalb des hier vorgestellten Projektes wurde beispielhaft die Ökoeffizienz eines in einem Vorprojekt (AZ13095) entwickelten und auf rekombinanten *E. coli* basierenden Prozesses zur enantioselektiven Styrolepoxidierung durch die BASF und extern durch E. Heinzle (Universität Saarbrücken) evaluiert. Im Vergleich zur chemischen Prozessalternative schnitt der Bioprozess ökonomisch in beiden Studien ökologisch jedoch nur in der Studie aus Saarbrücken positiv ab. Die Studien sahen In Bezug auf das im Zweiphasenprozess verwendete Lösungsmittel und das Wachstumssubstrat großes Verbesserungspotenzial. Biodiesel bzw. Ethyloleat und Glycerin wurden erfolgreich als Alternativen zu BEHP und Glukose eingesetzt. Dabei wurden über 8-9 h Reaktionszeit durchschnittliche Produktivitäten von 3-5 g/L_{tot}/h erreicht. Die Analyse der Ökoeffizienz zeigte, dass sich diese Verfahrensänderungen in der Tat sehr positiv auf die Ökoeffizienz des Prozesses auswirken.

Metabolische Flussanalysen zeigten einen sehr hohen biokatalysebedingten NADH-Verbrauch, welcher zu einer NADH-Limitation in wachsenden Zellen führte. Aufgrund dessen wurde eine Zitratzyklusmutante getestet, die in der Tat vielversprechende Resultate wie die Reduzierung der Essigsäureproduktion und die Erhöhung der Produktivität zeigte.

Mit der Chance Limitationen durch O₂-Transfer und NADH zu umgehen, wurden Wasser einbauende Dehydrogenasen in verschiedenen *Pseudomonas*-Stämmen zur Hydroxylierung von N-Heteroaromaten mit einer Aktivität von bis zu 54 U/g_{CDW} erfolgreich eingesetzt. Für 4-Hydroxychinaldin wurde zudem ein vielversprechender Zweiphasenprozess entwickelt.

Als eine Hauptlimitation für die industrielle Implementierung zweiphasiger Bioprozesse gilt vor allem die aufwändige Phasentrennung. Hier wurde überkritisches CO₂ sowohl zur Phasentrennung als auch zur Produktextraktion erfolgreich eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Phasentrennung der stabilen Emulsion mit überkritischem Kohlendioxid möglich und technisch realisierbar ist. Zudem wurde eine auf einer Hochdrucksichtzelle basierende Versuchsanlage aufgebaut, mit der die Löslichkeiten der beteiligten Komponenten in Kohlendioxid ermittelt werden konnten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, das Wertprodukt direkt aus der organischen Phase zu extrahieren.

Für die kontinuierliche Aufarbeitung der Emulsion bzw. der organischen Phase wurde eine präparative SFE/SFC-Anlage entwickelt und gebaut. Mit dieser Anlage und auf der Basis der ermittelten Extraktionsdaten konnte gezeigt werden, dass das Wertprodukt über mehrere Trennstufen effizient extrahiert werden kann. Die gleichzeitige Extraktion des Nebenproduktes (2-Phenylethanol) sowie des Induktors (n-Oktan) erlaubt eine effiziente Rückführung des organischen Lösungsmittels (BEHP).

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

Eine Publikation mit dem Titel „NADH Availability Limits Asymmetric Biocatalytic Epoxidation in Growing Recombinant *Escherichia coli*“ wurde in AEM veröffentlicht. Weitere Publikationen bezüglich DSP und Ökoeffizienz sind geplant. Präsentationen bezüglich des Projektes umfassen Vorträge und Poster an verschiedenen Tagungen, darunter die GVC/DECHEMA-Jahrestagung, 27.9.06, Wiesbaden, die European BioPerspectives 2007, 31.5.07, Köln, die Tagung “High Pressure meets Advanced Fluids”, 10.-11.3. 2008 in Aachen, das 11. European Meeting on Supercritical Fluids, 4.-7.5. 2008, Barcelona, die Biotrans, 8.-13.7.07, Oviedo, das 2. International Symposium on Biothermodynamics, 21.-22.2. 2008, Frankfurt, die Gordon Research Conference on Biocatalysis, 6.-11.7., 2008, Smithfield, RI, USA, das 7th European Symposium on Biochemical Engineering Science, 7.-10.9. 2008, Faro, Portugal und die European BioPerspectives 2008, 7.-9.10. 2008, Hannover.

Fazit

Ethyloleat und Glycerin wurden während der Styrolepoxidation erfolgreich als Alternativen zu BEHP und Glukose eingesetzt. Diese Änderungen wurden bezüglich Ökoeffizienz positiv reevaluiert. Die metabolische Flussanalyse zeigte NADH-Limitation in wachsenden Zellen. Das Testen einer Zitratzyklusregulationsmutante ergab vielversprechende Resultate wie die Reduzierung der Essigsäureproduktion und die Erhöhung der Produktivität. Wasser einbauende Dehydrogenasen zeigten hohe Aktivitäten in Ganzzellkatalysatoren. Für 4-Hydroxychinaldin wurde ein vielversprechender Zweiphasenprozess entwickelt. Die stabile Emulsion konnte mit komprimiertem CO₂ effizient gebrochen werden. Mit einer neu gebauten SFE/SFC-Anlage konnte gezeigt werden, dass das Wertprodukt über mehrere Trennstufen effizient extrahiert werden kann. Die interdisziplinäre Zusammenarbeit in diesem Projekt hat somit wichtige Erkenntnisse und Entwicklungen hin zu einer Technologieplattform für nachhaltige integrierte Bioprozesse erbracht.

Etablierung innovativer umweltfreundlicher Synthesetechniken zur nachhaltigen Produktion von Chemikalien durch biokatalytische Oxyfunktionalisierung in Kombination mit innovativen Ansätzen der integrierten Produktaufarbeitung.

AZ 13145

Projektpartner:

Prof. Dr. Andreas Schmid (Koordinator), Lehrstuhl für Biotechnik, Fachbereich für Bio- und Chemieingenieurwesen, Universität Dortmund

Bearbeitung: Dr. Bruno Bühler, Dipl. Biol. ETH Daniel Kuhn, M.Sc. F. Özde Bayraktar, Dipl. Ing. Patty Kleinsteuber

Dr. Rudolf Krumbholz (Bewilligungsempfänger), K.D.-Pharma GmbH, Bexbach

Bearbeitung: Dr. Peter Lembke, Dr. Götzinger

Prof. Dr. Bernhard Hauer, BASF AG, Ludwigshafen

Bearbeitung: Dr. Michael Breuer, Dr. Peter Saling

Dr. Roland Wohlgemuth, SAFC Pharma AG, Buchs, Schweiz

Projektbeginn: 1.8.2003

Laufzeit: 1.8.2003 – 31.7.2005

Dortmund, 2008

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	5
TABELLENVERZEICHNIS	7
1 ZUSAMMENFASSUNG	8
2 ANLASS UND ZIELSETZUNG	9
3 VERWENDETE METHODEN	13
3.1 ÖKOEFFIZIENZANALYSE DER UNIVERSITÄT SAARBRÜCKEN (KHOLIQ / HEINZLE) ..	13
3.2 KULTIVATION – PROZESSFÜHRUNG	13
3.3 ANALYTISCHE METHODEN:	14
3.4 DURCHFÜHRUNG VON MESSUNGEN ZUR EMULSIONSTRENNUNG UND ZUM EXTRAKTIONSVERHALTEN	14
3.5 PRODUKTAUFARBEITUNG MIT ÜBERKRITISCHEM CO ₂	15
4 ERGEBNISSE	16
4.1 ÖKOEFFIZIENZANALYSEN	16
4.1.1 Ökoeffizienzanalyse der biologischen und chemischen Epoxidierung	16
4.1.2 Verbesserung der Umweltverträglichkeit: Ethyloleat als Extraktionsphase	18
4.1.3 Verbesserung der Umweltverträglichkeit: Glycerin als Kohlenstoffquelle	21
4.2 METABOLISCHE FLUSSANALYSE	22
4.3 STABILISIERUNG DES TCA-ZYKLUS DURCH DIE REGULATIONS MUTANTE E. COLI MG1655 ΔPSDH::PTET	25
4.4 REGIOSPECIFIC HYDROXYLATION CATALYZED BY QUINOLINE 2-OXIDOREDUCTASE (C2O) AND QUINALDINE 4-OXIDASE (C4O).....	28
4.4.1 Evaluation of C2O based whole-cell biocatalysts.....	28
4.4.2 Evaluation of C4O based whole-cell biocatalysts.....	30
4.4.3 Investigation of the substrate spectrum of C2O and C4O	36

4.4.4	<i>Development of a Quinaldine hydroxylation process based on C4O-containing recombinant P. putida KT2440</i>	37
4.5	EMULSIONSTRENNUNG MIT KOMPRIMIERTEM CO ₂	40
4.6	EXTRAKTION MIT KOMPRIMIERTEM CO ₂	41
4.6.1	<i>Versuchsaufbau</i>	41
4.6.2	<i>Löslichkeiten der Lösungsmittel BEHP und Ethyloleat in komprimiertem Kohlendioxid</i>	42
4.6.2.1	<i>BEHP</i>	42
4.6.2.2	<i>Ethyloleat</i>	43
4.6.3	<i>Extraktionsverhalten im Mehrkomponentensystem (organisches Lösungsmittel BEHP) mit komprimiertem Kohlendioxid</i>	44
4.6.4	<i>Analyse zum Einfluss von Temperatur und CO₂-Konzentration auf das Extraktionsverhalten</i>	46
4.6.5	<i>Extraktionsverhalten im Mehrkomponentensystem (organisches Lösungsmittel Ethyloleat) mit komprimiertem Kohlendioxid</i>	48
4.6.6	<i>Ablagerungen von biogenen Stoffen</i>	48
4.6.7	<i>Schlussfolgerung</i>	49
4.7	PRODUKTEXTRAKTION ÜBER SFE/SFC	50
4.7.1	<i>Aufbau und Inbetriebnahme einer präparativen Laboranlage für die SFE/SFC</i>	50
4.7.1.1	<i>Prinzipielle Verfahrenbeschreibung: Counter-Current-SFE (ccSFE)</i>	52
4.7.1.2	<i>Prinzipielle Verfahrenbeschreibung: Supercritical Fluid Chromatography (SFC)</i> ...	53
4.7.2	<i>Versuche mit der Gegenstrom SFE (cc-SFE)</i>	53
4.7.2.1	<i>Optimierung der Extraktionstemperatur (bei p = konst.)</i>	54
4.7.2.2	<i>Reproduzierbarkeit der Extraktion</i>	57
4.7.2.3	<i>Aufreinigung der Modellösung 1 mit ccSFE unter optimierten Extraktionsbedingungen</i>	58
4.7.2.4	<i>Übertragung der ermittelten ccSFE Trennbedingungen auf die Aufreinigung von Modellösung 2 (mit Styroloxid statt Toluol)</i>	60
4.7.2.5	<i>Aufreinigung der originalen organischen Phase aus dem Bioprozess mittels ccSFE</i> 61	
4.7.2.6	<i>Ergebnisse der ccSFE Versuche und deren Konsequenzen für die anschließend geplante chromatographische Endreinigung des biotechnologisch gewonnenen Styroloxides (Soll – Ist Vergleich)</i>	62
4.7.3	<i>Schlußfolgerung</i>	63
5	DISKUSSION	64

5.1	SOLL-/IST-VERGLEICH – BEGRÜNDUNG FÜR ABWEICHUNGEN – ALLGEMEINE DISKUSSION	64
	AUFGRUND DER ÖKOEFFIZIENZSTUDIEN DER UNIVERSITÄT SAARBRÜCKEN UND DER BASF WURDE DER PRIMÄRE FOKUS DER FORSCHUNG IN DORTMUND AUF DIE VERBESSERUNG DER ÖKOEFFIZIENZ DES STYROLEPOXIDATIONSPROZESSES VERSCHOBEN. DER EINSATZ VON ETHYLOLEAT UND GLYZERIN WAR TROTZ LEICHTEN EINBUSSEN BEI DER PRODUKTIVITÄT UND DER ERREICHTEN PRODUKTKONZENTRATION VIELVERSPRECHEND.	64
5.2	WIRTSCHAFTLICHKEITSBETRACHTUNGEN	69
5.3	KOOPERATION INNERHALB DES PROJEKTS	71
6	ÖFFENTLICHKEITSARBEIT.....	71
7	FAZIT	73
8	LITERATUR.....	76

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Graphische Darstellung der zu entwickelnden Technologieplattform.	11
Abbildung 2. Fotografische Darstellung der Hochdrucksichtzelle.	14
Abbildung 3. Schematischer Aufbau einer SFC-Apparatur.	15
Abbildung 4. Massenindizes (links), Umweltkennzahlen (Mitte) und relative Produktionskosten (rechts) der chemischen und der biologischen Styrolepoxidierung.	17
Abbildung 5: Anteil der wichtigsten Komponenten zur Gesamtumweltbelastung des biologischen Prozesses.	17
Abbildung 6. Biotransformationen im Zweiphasensystem mit auf Glukose wachsenden <i>E. coli</i> JM101 (pSPZ10) als Biokatalysator und BEHP (A) oder Ethyloleat (B) als organischem Lösungsmittel.	19
Abbildung 7. Massenindizes (links) und Umweltkennzahlen (rechts) der Styrolepoxidierung in Gegenwart von BEHP oder Ethyloleat als organische Phase.	20
Abbildung 8. Anteil der wichtigsten Komponenten zur Gesamtumweltbelastung des Prozesses mit Ethyloleat als organische Phase.	20
Abbildung 9. Biotransformation im Zweiphasensystem mit auf Glycerin wachsenden <i>E. coli</i> JM101 (pSPZ10) als Biokatalysator und BEHP (A) bzw. Ethyloleat (B) als organischem Lösungsmittel.	21
Abbildung 10. Variierende Styrolepoxidierungsraten von <i>E. coli</i> JM101 (pSPZ10) während einer kontinuierlichen Kultivierung ($D=0.1 \text{ h}^{-1}$) in Gegenwart einer Extraktionsphase.	23
Abbildung 11. Relative Verteilung der absoluten Stoffwechselflüsse im zentralen Kohlenstoffmetabolismus von <i>E. coli</i> JM101.	24
Abbildung 12. Relative Verwendung von durch den Glukosekatabolismus produziertem NAD(P)H während kontinuierlichen Kultivierung.	25
Abbildung 13. Spezifische Epoxidierungsaktivität von ruhenden <i>E. coli</i> JM101, <i>E. coli</i> MG1655 und <i>E. coli</i> MG1655 $\Delta Psdh::Ptet$.	26
Abbildung 14. Biotransformationen im Zweiphasensystem mit <i>E. coli</i> MG1655 (pSPZ10) (A) und <i>E. coli</i> MG1655 $\Delta Psdh::Ptet$ (pSPZ10) (B) als Biokatalysatoren.	27
Abbildung 15. C2O activity of 2-methyl benzoate induced <i>P. putida</i> 86-1 Δqor (pUF1) (A) and quinoline-induced <i>P. putida</i> 86 cells (B) in resting cell assays.	29
Abbildung 16. Quinoline conversion profile during growth of <i>P. putida</i> 86 on quinoline (A) and both quinoline and glucose (B).	30
Abbildung 17. Evaluation of C4O activity towards quinaldine in various hosts.	31
Abbildung 18. Effect of different carbon and energy sources on the C4O activity of resting cells.	32
Abbildung 19. Inhibition analysis for benzoate.	32

Abbildung 20. Michaelis Menten kinetics for <i>P. putida</i> KT2440 (pKP1)	33
Abbildung 21. Activity for benzoate grown <i>P. putida</i> KT2440 (pKP1) after incubation for different time periods with and without glucose as the energy source.	34
Abbildung 22. Activity obtained for different colonies of <i>P. putida</i> KT2440 (pKP1).	35
Abbildung 23. Toxicity of quinaldine and 4-hydroxy quinaldine	36
Abbildung 24. Biotransformation of quinaldine by resting <i>P. putida</i> KT2440 (pKP1) cells with 1-decanol and 1-dodecanol as the organic phase.	39
Abbildung 25. Comparison of 1-decanol and 1-dodecanol as the organic phase during quinoline hydroxylation with <i>P. putida</i> KT2440 (pKP1).	39
Abbildung 26. Vergleich zwischen dem Phasenverhalten der Emulsion vor und nach der Behandlung mit überkritischem Kohlendioxid.	41
Abbildung 27. p,w-Diagramm der binären Mischung Kohlendioxid-BEHP.	43
Abbildung 28. p,w-Diagramm der binären Mischung Kohlendioxid-Ethyloleat.	44
Abbildung 29. p,w-Diagramm der pseudobinären Mischung Kohlendioxid-Modellgemisch.	45
Abbildung 30. Extraktion der Komponenten der organischen Phase mit komprimiertem CO ₂ .	46
Abbildung 31. Temperatureinfluss auf das Extraktionsverhalten von (S)-Styroloxid und BEHP in komprimiertem Kohlendioxid bei 120 bar und konstantem Massenanteil Kohlendioxid im "Feed" von 0,83.	47
Abbildung 32. Einfluss des Massenanteils an Kohlendioxid auf das Extraktionsverhalten von (S)-Styroloxid und BEHP in komprimiertem Kohlendioxid bei 145 bar und 45°C.	48
Abbildung 33. Schematischer Aufbau der SFE-/SFC Pilotanlage	50
Abbildung 34. Photo der SFE/SFC-Pilotanlage (KD-Pharma Bexbach GmbH).	51
Abbildung 35. Zusammensetzung der Kopf- und der Sumpffraktion in der ccSFE bei 40°C und 48°C (117 bar, 12 kg CO ₂ /h) in Gramm der Modellösung 1.	55
Abbildung 36. Zusammensetzung der Kopf- und der Sumpffraktion in der ccSFE bei 48°C (117 bar, 12 kg CO ₂ /h) in Gramm der Modellösung 1.	55
Abbildung 37. Zusammensetzung der Kopf- und der Sumpffraktion in der ccSFE bei 60 °C (117 bar, 12 Kg CO ₂ /h) in Gramm der Modellösung 1.	56
Abbildung 38. Zusammensetzung der ccSFE – Kopffraktion in Reproduzierbarkeitsversuchen an verschiedenen Tagen.	57
Abbildung 39. Zusammensetzung der ccSFE – Sumpffraktion in Reproduzierbarkeitsversuchen an verschiedenen Tagen.	58
Abbildung 40. Zusammensetzung der ccSFE Kopffractionen in % nach 4-facher Aufarbeitung.	59
Abbildung 41. Zusammensetzung der Kopf- und Sumpffractionen von Modellösung 2 nach erster Aufarbeitung in der ccSFE bei 60°C und 117 bar (12 kg CO ₂ /h).	60

Abbildung 42. Zusammensetzung der Kopf- und Sumpffractionen von der originalen organischen Phase aus dem Bioprozess nach erster Aufarbeitung in der ccSFE bei 60 °C und 117 bar (12 kg CO₂/h). 62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verteilungskoeffizienten ¹ in Zweiphasensystemen mit Bis(2-ethylhexyl)phthalat (BEHP) und Ethyloleat als organischen Phasen.	19
Tabelle 2: Zusammenfassung der vorgestellten Biotransformationen mit <i>E. coli</i> JM101 (pSPZ10) als Biokatalysator im Zweiphasensystem.	22
Tabelle 3. Zusammenfassung der Biotransformationen im Zweiphasensystem mit <i>E. coli</i> MG1655 (pSPZ10) und <i>E. coli</i> MG1655 $\Delta Psdh::P_{tet}$ (pSPZ10) als Biokatalysatoren.	27
Tabelle 4. Maximum molar 2-hydroxyquinoline yields achieved by growing <i>P. putida</i> 86	30
Tabelle 5. Kinetic parameters for purified C4O.	34
Tabelle 6. Catalytic activities of Quinoline 2-oxidoreductase (C2O) and Quinaldine 4-oxidase (C4O) in resting-cell assays.	37
Tabelle 7. Partition coefficients for quinaldine and 4-hydroxy quinaldine.	38
Tabelle 8. Kenndaten der wichtigsten Pilotanlagenbestandteile.	52
Tabelle 9. Zusammensetzung der Modellösungen 1 und 2 sowie der organischen Phase aus dem Bioprozess in g pro 100 g.	54
Tabelle 10. Arbeitsprogramm und Meilensteine – Soll-/Ist-Vergleich.	65

1 Zusammenfassung

Biokatalytische Oxyfunktionalisierungen sind, dank milder Reaktionsbedingungen, dem Verzicht auf Edel- und Schwermetallkatalysatoren und hoher chemischer Selektivität, hinsichtlich einer nachhaltigen Umweltentlastung eine vielversprechende Alternative zu chemisch-katalytischen Prozessen. Innerhalb des hier vorgestellten Projektes wurde beispielhaft die Ökoeffizienz eines in einem Vorprojekt (AZ13095) entwickelten und auf rekombinanten *E. coli* basierenden Prozesses zur enantioselektiven Styrolepoxidierung durch die BASF und extern durch E. Heinzle (Universität Saarbrücken) evaluiert. Im Vergleich zur chemischen Prozessalternative schnitt der Bioprozess ökonomisch in beiden Studien ökologisch jedoch nur in der Studie aus Saarbrücken positiv ab. Die Studien sahen In Bezug auf das im Zweiphasenprozess verwendete Lösungsmittel und das Wachstumssubstrat großes Verbesserungspotenzial. Biodiesel bzw. Ethyloleat und Glycerin wurden erfolgreich als Alternativen zu BEHP und Glukose eingesetzt. Dabei wurden über 8-9 h Reaktionszeit durchschnittliche Produktivitäten von 3-5 g/L_{tot}/h erreicht. Die Analyse der Ökoeffizienz zeigte, dass sich diese Verfahrensänderungen in der Tat sehr positiv auf die Ökoeffizienz des Prozesses auswirken.

Metabolische Flussanalysen zeigten einen sehr hohen biokatalysebedingten NADH-Verbrauch, welcher zu einer NADH-Limitation in wachsenden Zellen führte. Aufgrund dessen wurde eine Zitratzyklusmutante getestet, die in der Tat vielversprechende Resultate wie die Reduzierung der Essigsäureproduktion und die Erhöhung der Produktivität zeigte.

Mit der Chance Limitationen durch O₂-Transfer und NADH zu umgehen, wurden Wasser einbauende Dehydrogenasen in verschiedenen *Pseudomonas*-Stämmen zur Hydroxylierung von N-Heteroaromaten mit einer Aktivität von bis zu 54 U/g_{CDW} erfolgreich eingesetzt. Für 4-Hydroxychinaldin wurde zudem ein vielversprechender Zweiphasenprozess entwickelt.

Als eine Hauptlimitation für die industrielle Implementierung zweiphasiger Bioprozesse gilt vor allem die aufwändige Phasentrennung. Hier wurde überkritisches CO₂ sowohl zur Phasentrennung als auch zur Produktextraktion erfolgreich eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Phasentrennung der stabilen Emulsion mit überkritischem Kohlendioxid möglich und technisch realisierbar ist. Zudem wurde eine auf einer Hochdrucksichtzelle basierende Versuchsanlage

aufgebaut, mit der die Löslichkeiten der beteiligten Komponenten in Kohlendioxid ermittelt werden konnten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, das Wertprodukt direkt aus der organischen Phase zu extrahieren.

Für die kontinuierliche Aufarbeitung der Emulsion bzw. der organischen Phase wurde eine präparative SFE/SFC-Anlage entwickelt und gebaut. Mit dieser Anlage und auf der Basis der ermittelten Extraktionsdaten konnte gezeigt werden, dass das Wertprodukt über mehrere Trennstufen effizient extrahiert werden kann. Die gleichzeitige Extraktion des Nebenproduktes (2-Phenylethanol) sowie des Induktors (n-Oktan) erlaubt eine effiziente Rückführung des organischen Lösungsmittels (BEHP).

Die interdisziplinäre Zusammenarbeit in diesem Projekt hat somit wichtige Erkenntnisse und Entwicklungen hin zu einer Technologieplattform für nachhaltige integrierte Bioprozesse erbracht.

2 Anlass und Zielsetzung

Ziel des Projektes ist die Darstellung konkurrenzfähiger hochselektiver Bioprozesse zur Substitution von energie- und emissionsintensiven großchemischen Syntheseprozessen. Anhand industriell hochrelevanter Oxyfunktionalisierungen sollen prozesstechnische Lösungsansätze in Form einer Technologieplattform entwickelt werden. Durch die Selektivität der Enzymkatalyse können Reaktionssequenzen verkürzt und Nebenprodukte vermieden werden. Ein biokatalytisches Verfahren bietet also die Perspektive erheblicher Energie- und Stoffökonomie durch eine milde und selektive enzymatische Reaktionsführung. Die industrielle Relevanz der ausgewählten Biosynthesen (chirale Epoxide, funktionalisierte N-Heteroaromaten) gewährleistet, dass die Ökoeffizienz der zu entwickelnden integrierten Verfahren mit existierenden Syntheseprozessen verglichen und direkt quantifiziert werden kann.

Das Projektziel wird durch Zusammenführung von effizienten Biokatalysatoren mit hochinnovativer Prozesstechnologie auf der Basis von wässrig/organischen Zweiphasensystemen und überkritischen Fluiden angestrebt. Derart sollen nachhaltige biokatalytische Prozesse zur chemo-, regio- und stereoselektiven Oxyfunktionalisierung wirtschaftlich dargestellt werden. Folgenden Bereichen kommt dabei besondere Beachtung zu:

- Hohe Produktivitäten (5-15 g Produkt L⁻¹ h⁻¹)
- Erhöhung der Biokatalysatorstabilität (Erhöhung der Katalysedauer von 6 auf 10-20 h)
- Identifikation und Optimierung von kritischen Prozessparametern mittels vergleichenden Ökoeffizienzstudien
- Vermeidung von Substrat-, Produkt- und Nebenproduktinhibition und Elimination von toxischen Komponenten durch optimierte Prozessführung.
- Erhöhung der Produktselektivität der integrierten Trenntechnologien.
- Verringerung der Zahl der Downstream-Processing-Schritte.

Mit den angestrebten Verfahren soll ein ökonomisch und ökologisch positives biotechnologisches Pendant zu traditionellen katalytischen Verfahren der chemischen Synthese geschaffen werden. Zu nennen wären hier u.a. die schwermetallkatalysierten stereoselektiven Epoxidierungen oder Hydroxylierungen (z.B. Katalysatoren nach Sharpless, Chemie-Nobelpreis 2001).

Die Entwicklung einer nachhaltigen Plattformtechnologie zur effizienten biokatalytischen Oxyfunktionalisierung wird in diesem Projekt durch einen interdisziplinären Ansatz - die enge Zusammenarbeit von Biotechnologen und Verfahreningenieuren - angestrebt. Die beteiligten Industrie-Partner leisten Beiträge u.a. im Rahmen ihrer Expertise und profitieren direkt von entwickelten Technologien sowie den neu zugänglich gemachten Produkten. Durch die enge interdisziplinäre Zusammenarbeit wird in diesem Vorhaben eine vielversprechende Basis für die industrielle Realisierung der biokatalytischen Oxyfunktionalisierung geschaffen. Mittels innovativer scCO₂-Technologie und Prozessführung sowie durch Einsatz und Optimierung verschiedener Biokatalysatoren wird eine breite Anwendbarkeit demonstriert. Exemplarisch werden für zwei verschiedene Oxyfunktionalisierungsreaktionen geeignete Biokatalysatoren und Prozesslösungen entwickelt, charakterisiert und optimiert. Abbildung 1 stellt dieses Konzept schematisch dar.

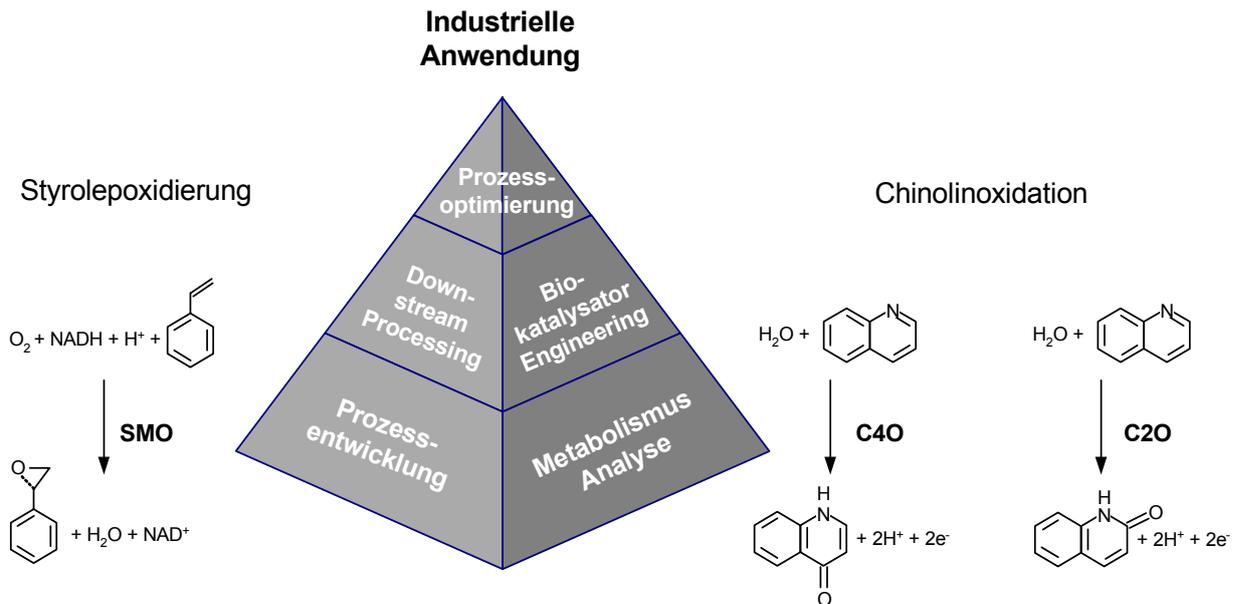


Abbildung 1. Graphische Darstellung der zu entwickelnden Technologieplattform.

Die exemplarisch ausgewählten Oxidationsreaktionen werden katalysiert durch die Styrolmonooxygenase (SMO), Chinolin-2-oxidoreduktase (C2O) sowie Chinaldin-4-oxidase (C4O).

Über quantitative Physiologie und Metabolismusanalyse soll die Effizienz der Styrolepoxidation untersucht werden. Dies soll eine Optimierung des Katalysators und der auf einem Zweiphasensystem basierenden Reaktionsführung {Panke, et al., 2002} erlauben. Alternativ zur Styrolmonooxygenase (SMO), welche den Hauptfokus des Projektes darstellt, werden molybdänhaltige Hydroxylasen zum Einsatz kommen, die anstelle von molekularem Sauerstoff Wasser als Sauerstoffdonor nutzen können. Als Beispiele werden Chinaldin-4-oxidase (C4O) von *Arthrobacter nitroguajacolicus* Rü61a {Parschat, et al., 2003} und Chinolin-2-oxidoreduktase (C2O) von *Pseudomonas putida* 86 {Frerichs-Deeken, et al., 2003} evaluiert. Basierend auf diesen zwei Enzymen sollen effiziente Ganzzellbiokatalysatoren entwickelt werden mit dem Potential, Limitationen durch Kofaktorregeneration und Sauerstofftransfer zu umgehen.

Bei der Produktaufarbeitung wird eine direkte Produktextraktion aus der Emulsion mittels superkritischem oder flüssigem CO₂ angestrebt. Dies und die Möglichkeit, die Produkte gleichzeitig oder direkt nachgeschaltet über SFE/SFC aufzureinigen (Trennung von Styrol, Styroloxyd, 2-Phenylethanol und Oktan), bringt eine erhebliche Vereinfachung des DSP mit sich, wodurch auch eine Reduktion von Kosten und Energieverbrauch erreicht werden soll. Bei der KD-Pharma soll dafür eine SCC/SCE

-Anlage entwickelt, aufgebaut und ausgetestet werden. Das in der Biotransformation als zweite Phase verwendete Lösungsmittel muss aus ökonomischen wie auch aus ökologischen Gründen recycelt werden. Dies soll durch eine Phasentrennung erreicht werden. Wie Vorversuche gezeigt haben kann auch dies mit superkritischem oder flüssigem CO₂ erreicht werden. Abhängig von Druck und Temperatur erlaubt die unterschiedliche Löslichkeit von CO₂ in den zwei Phasen und die sich dadurch ändernde Oberflächenspannung eine Phasentrennung. Es soll nun evaluiert werden, inwiefern sich die Produktextraktion und die Phasentrennung in einem Schritt verwirklichen lassen. Alternativ könnte die Phasentrennung vor- oder nachgeschaltet werden. Eine vorgängige Biomasseabtrennung über Filtrationsmembranen soll ebenfalls evaluiert werden.

Die Umweltverträglichkeit der entwickelten Prozesskonzepte wird von externen Gutachtern im Rahmen einer vom Koordinator in Auftrag gegebenen Studie wie auch BASF-intern evaluiert. Ein erster Vergleich der biologischen und chemischen (Jacobsen-Katalysator-basierten) enantioselektiven Styrolepoxidation mittels EATOS (nach Umweltparametern korrigierten Massenbilanzen, {Eissen, et al., 2003; Eissen and Metzger, 2002}) ohne Einbezug von Produktaufarbeitung, Lösungsmittelrecycling und Energieverbrauch hatte gezeigt, dass der biologische Prozess zwar 5-mal billiger jedoch nur bedingt umweltschonender ist. Im Falle des biologischen Prozesses war die Umweltbelastung hauptsächlich auf den hohen Lösungsmittelverbrauch zurückzuführen. Eine ökologische Prozessführung bedingt also ein effizientes Lösungsmittelrecycling und eine Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute bei weiterhin geringem Energieaufwand. Dies wiederum bedarf prozessintegrierter (semi)kontinuierlicher Verfahrenskonzepte mit geschlossenen Kreisläufen, was in diesem Vorhaben durch die Entwicklung und Kombination innovativer Trenntechnologien basierend auf überkritischem Kohlendioxid verwirklicht werden soll.

3 Verwendete Methoden

3.1 Ökoeffizienzanalyse der Universität Saarbrücken (Kholiq / Heinzle)

Diese Ökoeffizienzanalyse wurde entwickelt und hier auch durchgeführt, um in frühen Phasen der Prozessentwicklung bereits Risiken betreffend der Ökologie, Sicherheit und des Umweltschutzes systematisch zu erfassen. Sie beruht auf der Kenntnis der Stoffbilanzen des zu evaluierenden Prozesses {Biber and Heinzle 2004; Heinzle, et al., 1998}. Dabei wird das Gesamtgefährdungspotenzial aller eingesetzten und produzierten Chemikalien in folgende Wirkungskategorien unterteilt: Landverbrauch, Verfügbarkeit der Rohstoffe, Komplexität der Synthese, Brand- und Explosionsgefahr, akute Toxizität, chronische Toxizität, biologisches Risiko, Ökotoxizität, Potenzial für globale Erwärmung, Ozonabbau Potenzial, Versauerungspotenzial, Ozonbildungspotenzial, Geruch und Überdüngungspotenzial. Die Bewertung der Stoffe erfolgt durch die Einteilung in 3 definierte Gefährdungsklassen in jeder Kategorie, wobei Klasse A für hohe, B für mittlere und C für keine bzw. geringfügige Belastung steht {Heinzle, et al., 2006}. Die Ökoeffizienz des Prozesses errechnet sich aus dem Gefährdungspotenzial aller Chemikalien, gewichtet mit den Stoffbilanzen und der Relevanz der unterschiedlichen Kategorien.

3.2 Kultivation – Prozessführung

- Zur Kultivation in Schüttelflaschen wurde mit Kanamycin versetztes Komplexmedium LB und das Minimalmedium M9 {Sambrook, et al., 1989} verwendet.
- Zur Induktion wurde Oktan oder Dicyclopropylketon (DCPK) verwendet.
- Zur kontinuierlichen Kultivierung wurde M9-Medium mit Kanamycin verwendet {Sambrook, et al., 1989}.
- Hochzelldichtekultivationen im Satz- und Zulaufverfahren wurden wie früher beschrieben mit Minimalmedium RB durchgeführt {Bühler, et al., 2003}.
- Aktivitätsbestimmungen mit ruhenden Zellen wurden in glukosehaltigem Phosphatpuffer wie früher beschrieben durchgeführt {Bühler, et al., 2000}.

- Alle Biotransformationen wurden im Kleinlaborfermenter KLF 2000 von Bioengineering (Wald, Schweiz) durchgeführt. In Emulsionsprozessen wurde Bis-(2-ethylhexyl)phthalat (BEHP) oder Ethyloleat im Phasenverhältnis 1:1 verwendet.

3.3 Analytische Methoden:

- Styrol/Styroloxid/2-Phenylethanol/BEHP/Ethyloleat/Glukose/Acetate-Analysen mittels GC, GC-MS und HPLC.

3.4 Durchführung von Messungen zur Emulsionstrennung und zum Extraktionsverhalten

Hierfür wurde eine Versuchsanlage des Lehrstuhls für Thermodynamik verwendet. Das Kernstück der Versuchsanlage zur Durchführung von optischen Untersuchungen unter Hochdruck bildet eine Hochdrucksichtzelle (New Ways of Analytics, Lörrach, Deutschland) (Abbildung 2) mit variablem Volumen von ca. 30 - 60 ml. Durch Aufbringen eines Druckes im Hydraulikteil mit Hilfe der Hydraulik-Druckpresse M(O) 189, Maximator (Zorge, Deutschland) kann der hintere Saphir um 32 mm in der Längsachse verschoben werden. Hierdurch ist es möglich, in einem bestimmten Bereich den Druck in der Hochdrucksichtzelle unabhängig von der Konzentration der Komponenten und der Temperatur zu verändern. Die Temperatur wurde an zwei Stellen im System gemessen, im Mantel der Hochdrucksichtzelle und direkt im Reaktionsraum. Die Temperaturkonstanz während den Messungen wurde dabei über das im Reaktionsraum befindliche PT100 Thermoelement kontrolliert.

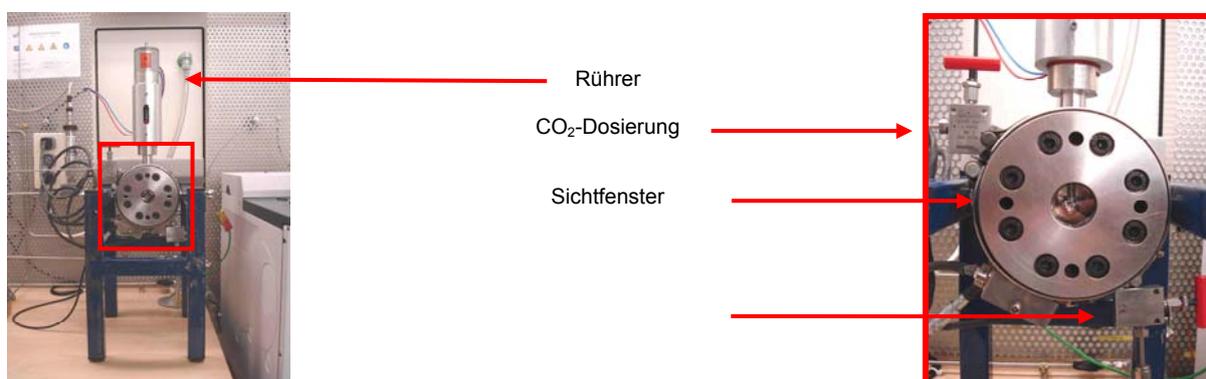


Abbildung 2. Fotografische Darstellung der Hochdrucksichtzelle.
Der Rot umrandete Bereich in der linken Darstellung ist vergrößert rechts dargestellt.

Neben der Möglichkeit, das Phasenverhalten der Emulsion optisch durch die beiden Saphir-Kolben zu beobachten, wurde die Anlage so weiterentwickelt, dass die Kohlendioxid-reiche Phase mittels GC direkt aus der Hochdrucksitzzelle analysiert werden kann (siehe Resultate). Dabei basiert die Probenahme auf einer von JAS, Joint Analytical Systems (Moers, Deutschland) entwickelte „Valvebox“.

Für die Messung des Phasenverhaltens wurden jeweils definierte Mengen an Probesubstanz in die Hochdrucksitzzelle eingewogen. Die Probezelle wurde nun kurz mit Kohlendioxid gespült und anschließend eine vorher bestimmte Masse an Kohlendioxid zudosiert. Nach Verschließen des Dosierventils wurde der Rührer eingeschaltet und das System über die Hydraulik auf einen Druck gebracht, in dem es, wie durch das Sichtfenster zu beobachten, ein einphasiges Verhalten zeigte. Anschließend wurde der Druck mit einer Geschwindigkeit von ca. 1 bar min^{-1} abgesenkt, bis eine Entmischung des Systems zu beobachten war. Die Messungen wurden jeweils drei Mal wiederholt. Das Verfahren war dabei für binäre Systeme wie auch für Mehrkomponentensysteme gleich.

Zur Messung des Extraktionsverhaltens wurde bei der Einwaage der Komponenten analog zu den Messungen des optischen Phasenverhaltens im binären bzw. Mehrkomponentensystem vorgegangen. Für die Evaluierung von Probenahme und Analytik wurden Kalibrierungsmessungen vorgenommen (Ergebnisse nicht gezeigt).

3.5 Produktaufarbeitung mit überkritischem CO_2

Zur Produktaufarbeitung mit überkritischem CO_2 wurde sowohl die SFE (Supercritical Fluid Extraction) als auch die SFC (Supercritical Fluid Chromatography) eingesetzt. Abbildung 3 zeigt den prinzipiellen Aufbau einer SFC-Apparatur.

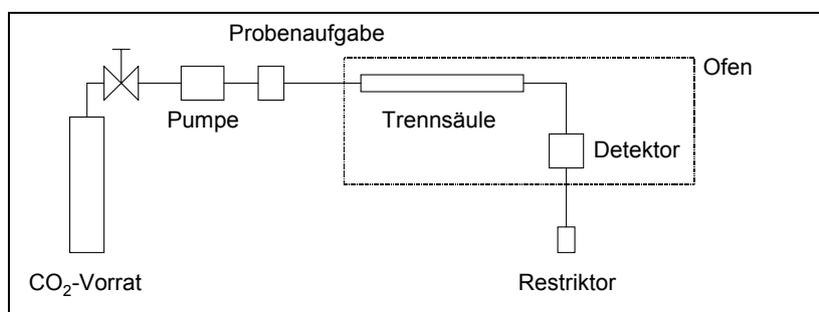


Abbildung 3. Schematischer Aufbau einer SFC-Apparatur.

Der Aufbau entspricht weitestgehend dem einer HPLC-Apparatur. Jedoch muss um in der gesamten Apparatur den entsprechenden Druck aufrechterhalten zu können, am Ende des Systems ein Restriktor vorhanden sein. Im optimalen Falle ist er variabel, so dass jeder beliebige Druck eingestellt werden kann.

4 Ergebnisse

4.1 *Ökoeffizienzanalysen*

4.1.1 *Ökoeffizienzanalyse der biologischen und chemischen Epoxidierung*

Die biokatalytische, enantioselektive Epoxidierung von Styrol zu (S)-Styroloxid wurde anhand der Daten aus dem diesem Projekt vorangegangenen DBU Projekt AZ13095 extern von Dr. A. Kholiq und Prof. Dr. E. Heinzle (Universität Saarbrücken) wie auch von der BASF evaluiert. Als Vergleich diente der chemische Produktionsprozess, der auf der hydrolytischen kinetischen Resolution des Racemats beruht. Dabei werden Jacobsen-Katalysatoren betrachtet {Keith, et al., 2001}. Im Folgenden sind die wichtigsten Resultate der Ökoeffizienzanalysen zusammengefasst. Die detaillierten Analysen sind als Anhang beigefügt.

Die Ökoeffizienzanalyse aus Saarbrücken (Kholiq / Heinzle) beweist sowohl das ökologische als auch das ökonomische Potential des in diesem Projekt vorgeschlagenen biologischen Prozesses (Abbildung 4). Zwar müssen im biologischen Prozess höhere Mengen an Stoffen eingesetzt werden, 79% des Verbrauchs macht jedoch Wasser aus, das vergleichsweise billig und unbedenklich ist. Die chemische Oxidation kommt hingegen nicht ohne harsche Bedingungen (Peressigsäure, Essigsäure), verschiedene komplexe Katalysatoren (Co-Acetat Jacobson-Katalysator, Salen-Co-Katalysator) und große Mengen an Lösungsmittel (Acetonitril) aus. Deren hohes Gefährdungspotential schlägt sich in der Umweltverträglichkeit (gemessen an der Umweltkennzahl) des gesamten Prozesses nieder, die wesentlich höher ausfällt als beim biologischen Prozess.

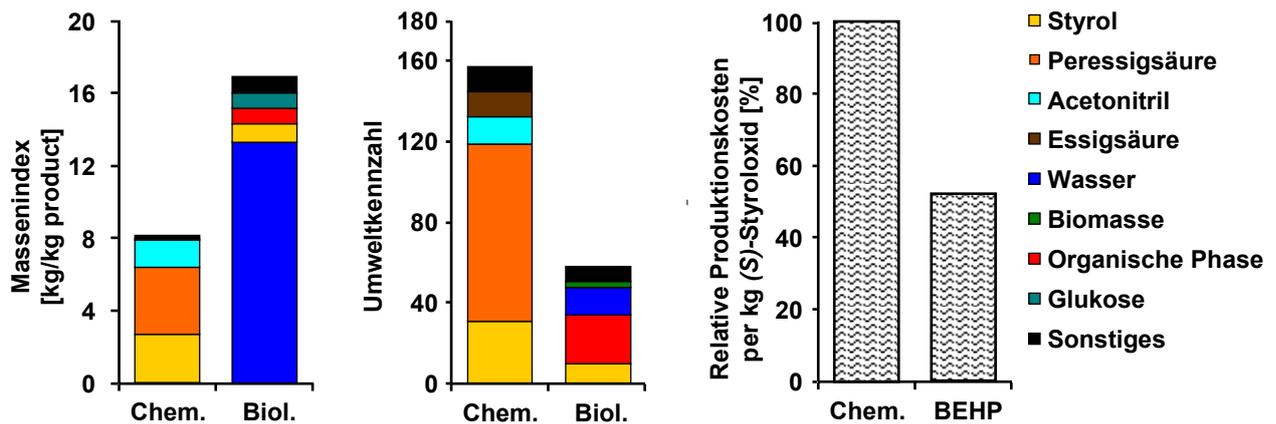


Abbildung 4. Massenindizes (links), Umweltkennzahlen (Mitte) und relative Produktionskosten (rechts) der chemischen und der biologischen Styrolepoxidierung.

Details zur Berechnung der Massenindizes und Umweltkennzahlen wurden von Heinzle, et al. {2006} beschrieben. Da Produktionskosten stark vom Masstab der Anlage und der Datenquellen abhängen, sind die relativen Werte zur chemischen Produktion (100%) angegeben.

Die ökonomische Evaluierung basiert auf der Abschätzung der industriellen Chemikalienpreise und den Standardwerten des SuperPro-Designers für die Anschaffungs- und Betriebskosten der Anlagen, einem Programm für Prozessmodellierungen (Intelligen Inc., Scotch Plains, USA). Eine erste Abschätzung der Produktionskosten für 100 Jahrestonnen zeigt, dass diese im biologischen Prozess geringer sind. Für beide Prozessvarianten ist zu beachten, dass die Produktionskosten mit zunehmender Jahresproduktionsmenge stark sinken.

Bei der Betrachtung des biokatalytischen Prozesses stellt das zur Extraktion verwendete Lösungsmittel Bis(2-ethylhexyl)phthalat (BEHP) mit 42% der gesamten Umweltbelastung trotz Recycling die größte Gefährdung hinsichtlich der Sicherheit, Gesundheit und der Umwelt dar (Abbildung 5). Dies vor allem aufgrund von dessen Toxizität und Synthese aus nichterneuerbaren, fossilen Ressourcen.

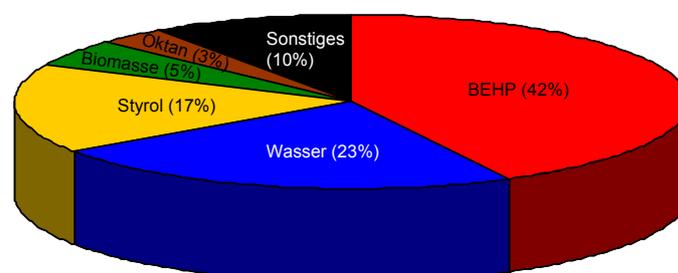


Abbildung 5: Anteil der wichtigsten Komponenten zur Gesamtumweltbelastung des biologischen Prozesses.

Chemikalien, die weniger als 2% zur Gesamtbelastung beitragen, sind in der Kategorie „Sonstiges“ erfasst.

Die Ökoeffizienzanalyse der BASF erlaubt dieselbe Schlussfolgerung bezüglich des verwendeten Lösungsmittels. Während diese Studie ökonomisch gesehen den biologischen Prozess ebenfalls im Vorteil sieht, verhält sich dies bei der Ökoeffizienz umgekehrt. Dies schreibt diese Studie vor allem der Verwendung von Glukose als Wachstumssubstrat zu, was mit dem hohen Flächenbedarf für dessen Produktion und somit einem hohen landwirtschaftlichen Risikopotential begründet wird.

4.1.2 Verbesserung der Umweltverträglichkeit: Ethyloleat als Extraktionsphase

Als kostengünstige, ungiftige Alternative zu BEHP zogen wir Biodiesel in Betracht, dessen Produktion vollständig auf erneuerbaren Rohstoffen wie verschiedensten Pflanzenölen und Tierfetten beruht {Fukuda, et al., 2001}. Für Ethyloleat, die Hauptkomponente von Biodiesel, wurde beispielhaft gefunden, dass es für Styrol, Styroloxid und das Nebenprodukt 2-Phenylethanol ähnliche Extraktionseigenschaften wie BEHP mit den erwähnten Vorteilen vereint (Tabelle 1).

Zur weiteren Evaluation von Ethyloleat/Biodiesel haben wir beide Lösungsmittel Ethyloleat und BEHP als organische Phase eingesetzt und die Prozessparameter verglichen (Abbildung 6). *E. coli* JM101 (pSPZ10) setzte in Gegenwart von Ethyloleat Styrol ähnlich effizient um wie in Gegenwart von BEHP (Tabelle 1). Die spezifischen Epoxidierungsaktivitäten sind über die Reaktionszeit lange identisch. Im Ethyloleat-basierten Prozess nimmt die Aktivität jedoch nach 5 h stark ab, während dies im BEHP-basierten Prozess erst kurz vor dem Komplettumsatz von Styrol der Fall ist. Für den letzteren Fall wurde nachgewiesen, dass die hier eingesetzte Substratkonzentration optimal ist und dass höhere Konzentrationen zur Toxifizierung durch Styroloxid führen {Park, et al., 2006}. Für den Ethyloleat-basierten Prozess deuten die Resultate also auf eine etwas frühere Vergiftung der Zellen durch Styroloxid hin. Der im Vergleich zum Zweiphasensystem BEHP/Medium tiefere Verteilungskoeffizient für Styroloxid im Systems Ethyloleat/BEHP und damit die höhere wässrige Styroloxidkonzentrationen ließen dies erwarten.

Tabelle 1: Verteilungskoeffizienten¹ in Zweiphasensystemen mit Bis(2-ethylhexyl)phthalat (BEHP) und Ethyloleat als organischen Phasen.

	BEHP	Ethyloleat
Styrol	2990±200	2500±400
Styroloxid	170±20	150±20
2-Phenylethanol	6±1	7±1

¹ Der Verteilungskoeffizient ergibt sich aus der Division der organischen Konzentration durch die wässrige Konzentration.

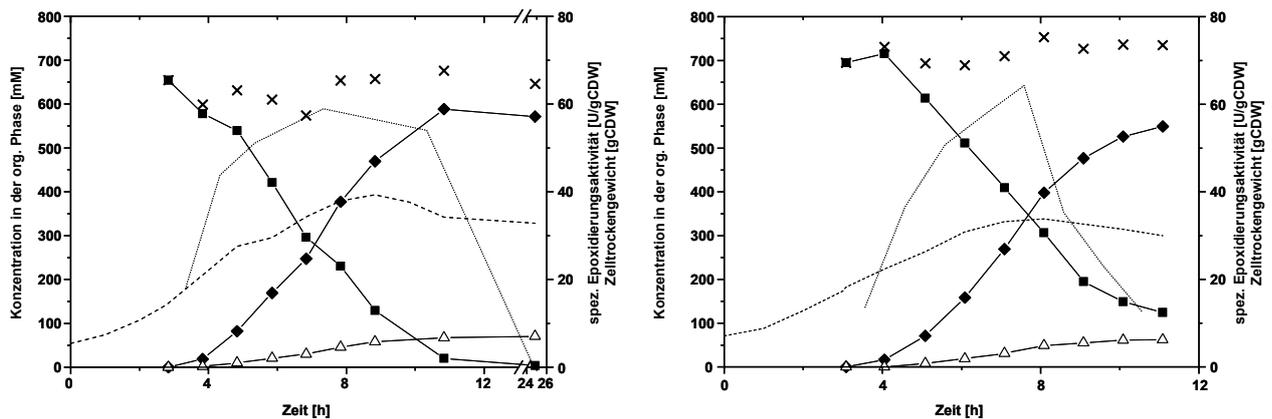


Abbildung 6. Biotransformationen im Zweiphasensystem mit auf Glukose wachsenden *E. coli* JM101 (pSPZ10) als Biokatalysator und BEHP (A) oder Ethyloleat (B) als organischem Lösungsmittel.

Die organische Phase mit Styrol und Oktan wurde zum Zeitpunkt 2,8 h (A) oder 4,0 h (B) zugegeben. Die Styrol- (■), Styroloxid- (◆) und 2-Phenylethanolkonzentrationen (▲) in der organischen Phase, die spezifische Epoxidierungsaktivität (····) und das Zelltrockengewicht (CDW) (---) sind eingetragen.

Die experimentell erhaltenen Parameter wurden nun auch für den Ethyloleat-basierten Versuch genutzt, um dessen Ökoeffizienz analog zum BEHP-basierten Prozess abzuschätzen und zu vergleichen. Durch die leicht niedrigeren Produktivitäten werden mit Ethyloleat als organischer Phase größere Mengen an Einsatzstoffen benötigt (Abbildung 7). Wesentlich verbessert durch den Austausch der organischen Phase präsentiert sich aber die stark reduzierte Umweltbelastung, was sich in einer deutlichen Reduktion der Umweltkennzahlen niederschlägt.

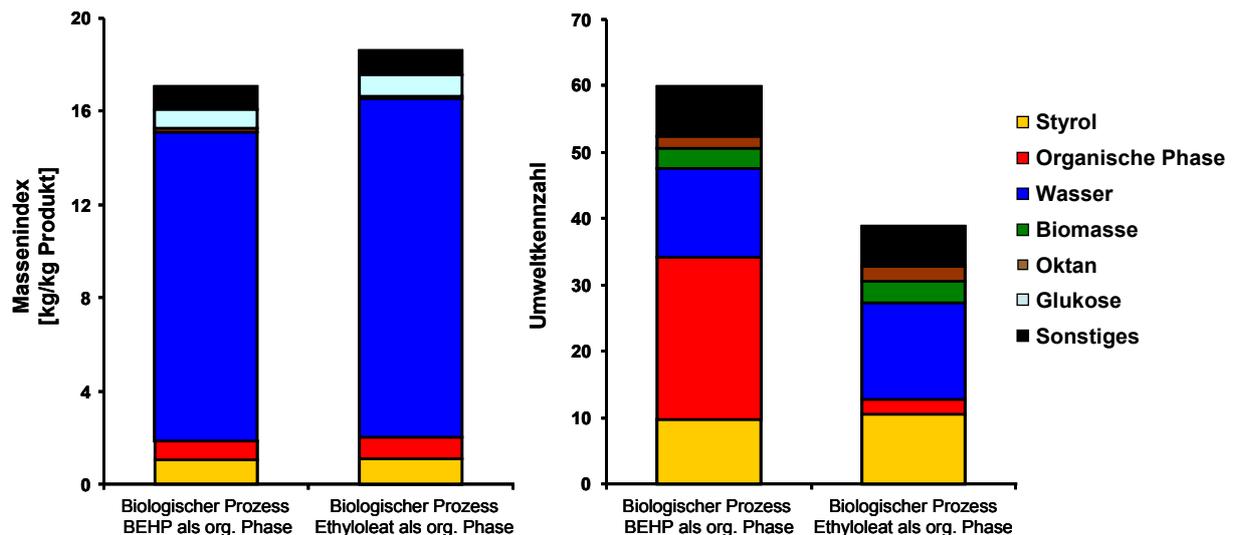


Abbildung 7. Massenindizes (links) und Umweltkennzahlen (rechts) der Styrolepoxidierung in Gegenwart von BEHP oder Ethyloleat als organische Phase.

Details zur Berechnung der Massenindizes und Umweltkennzahlen wurden von Heinzle et al. {2006} beschrieben.

Das Potential von Ethyloleat unterstreicht Abbildung 8: Nur noch 6% der Umweltbelastung ist auf die organische Phase zurückzuführen. Stärker schlägt der Verbrauch an Wasser (38%), Styrol (27%) und die produzierte Biomasse (8%) zu Buche. Im Vergleich zu BEHP, dem Hauptfaktor bezüglich Umweltbelastung im BEHP-basierten Prozess (Abbildung 5), stellt Ethyloleat für den Styrolepoxidationsprozess trotz marginal geringerer Produktivitäten eine valable Alternative als Extraktionsphase dar.

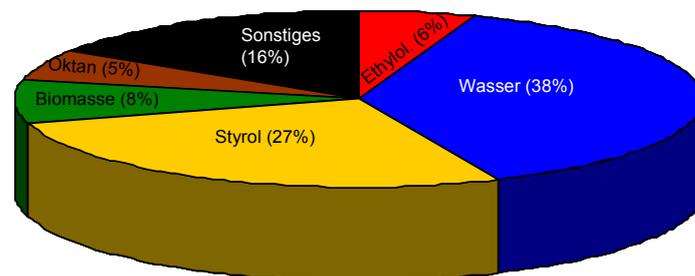


Abbildung 8. Anteil der wichtigsten Komponenten zur Gesamtumweltbelastung des Prozesses mit Ethyloleat als organische Phase.

Chemikalien, die weniger als 2% zur Gesamtbelastung beitragen, sind in der Kategorie „Sonstiges“ erfasst.

4.1.3 Verbesserung der Umweltverträglichkeit: Glycerin als Kohlenstoffquelle

Die Ökoeffizienz-Analyse der BASF zeigt, dass Glukose, die speziell für den Prozess hergestellt werden muss, die Ökoeffizienz des Prozesses stark beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu verursacht die massive Zunahme der Biodieselproduktion einen weltweiten Überschuss an Glycerin, das als unvermeidliches Nebenprodukt anfällt {Dharmadi, et al., 2006}. Prozesse, die auf Glycerin basieren, profitieren nicht nur von den niedrigen (bzw. sinkenden) Glycerinpreisen, sondern sind auch ökologisch interessant, da ein reichlich vorhandenes Abfallprodukt verwertet wird.

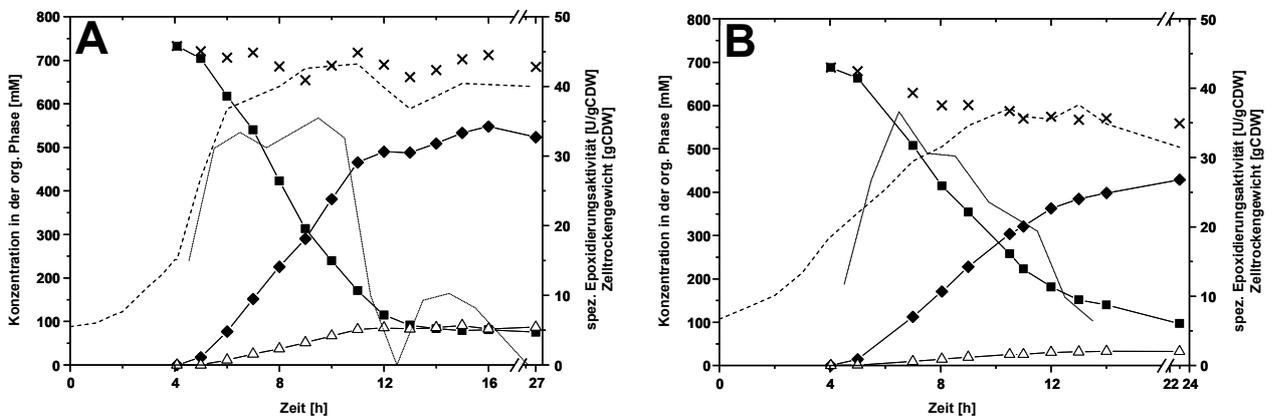


Abbildung 9. Biotransformation im Zweiphasensystem mit auf Glycerin wachsenden *E. coli* JM101 (pSPZ10) als Biokatalysator und BEHP (A) bzw. Ethyloleat (B) als organischem Lösungsmittel.

Die organische Phase mit Styrol und Oktan wurde zum Zeitpunkt 4,0 h zugegeben. Die Styrol- (■), Styroloxid- (◆) und 2-Phenylethanolkonzentrationen (▲) in der organischen Phase, die spezifische Epoxidierungsaktivität (····) und das Zelltrockengewicht (CDW) (---) sind eingetragen.

Abbildung 9A zeigt den typischen Verlauf einer Biotransformation mit rekombinanten *E. coli* (pSPZ10), die im Zulaufverfahren auf Glycerin wuchsen. Die spezifische Epoxidierungsaktivität ist dabei mit maximal 30-40 U/g_{CDW} geringer als jene von mit Glukose gefütterten Zellen (40-60 U/g_{CDW}). Trotzdem war es möglich, in der organischen Phase eine Styroloxidkonzentration von 533 mM zu erreichen (490 mM nach 8 h, Tabelle 2).

Tabelle 2: Zusammenfassung der vorgestellten Biotransformationen mit *E. coli* JM101 (pSPZ10) als Biokatalysator im Zweiphasensystem.

Lösungsmittel		BEHP ¹	Ethyloleat ²	BEHP ³	Ethyloleat ⁴
C-Quelle		Glukose	Glukose	Glyzerin	Glyzerin
Transformationszeit	[h]	8	8	8	8
Styroxidkonzentration ⁵	[mM]	588	526	490	363
Verbleibendes Styrol ⁵	[mM]	20	149	114	181
Ø-Produktivität	[g/L _{tot} /h]	4.4	3.9	3.7	2.7
Max. Zelltrockengewicht	[g/L]	39	34	47	37
Styroxid-Ertrag ⁵	[%]	90	76	67	57
2-Phenylethanol-Ertrag ⁵	[%]	10	9	12	5

¹ Experiment von Abbildung 6A; ² Experiment von Abbildung 6B; ³ Experiment von Abbildung 9A; ⁴ Experiment von Abbildung 9B. ⁵ nach 8 h.

Abschliessend wurde der kombinierte Effekt der oben vorgeschlagenen Optimierungen betrachtet: Abbildung 9B zeigt eine Biotransformation mit Ethyloleat als organischer Phase und *E. coli* JM101 (pSPZ10), die auf Glyzerin wuchsen. Wiederum ist die maximale spezifische Epoxidierungsaktivität mit 40 U/g_{CDW} eher gering. Interessanterweise erfolgt die Toxifizierung im Vergleich zum Glukose-basierten Prozess (Abbildung 6B) bereits bei tieferen Styroxidkonzentrationen (398 mM nach 10 h, Tabelle 2). Die geringere Zellkonzentration im Vergleich zum BEHP-basierten Prozess (Abbildung 9A) wirkt sich offensichtlich negativ auf Produktivität wie auch Ertrag der Biotransformation mit Ethyloleat aus, wobei noch abzuklären bleibt, ob dies ein allgemeines Verhalten ist (Tabelle 2).

4.2 Metabolische Flussanalyse

Während der Epoxidierung von Styrol mit wachsenden *E. coli* JM101 (pSPZ10) wird Glukose nicht nur für die Biomassensynthese sondern auch für die Produktion der rekombinanten Styrolmonooxygenase und von Energie (NAD(P)H, ATP) verbraucht. Um den Zusammenhang zwischen Epoxidation, Kohlenstoffmetabolismus und Energiehaushalt zu klären, berechneten wir basierend auf einem stöchiometrischen Modell des zentralen Kohlenstoffstoffwechsels die metabolischen Flüsse während der Epoxidierung von Styrol. Als experimentelle Datenbasis dienten die

Fließgleichgewichtszustände einer kontinuierlichen Kultivierung/Biotransformation, bei der die Styrolkonzentration im Feed schrittweise erhöht wurde (Abbildung 10).

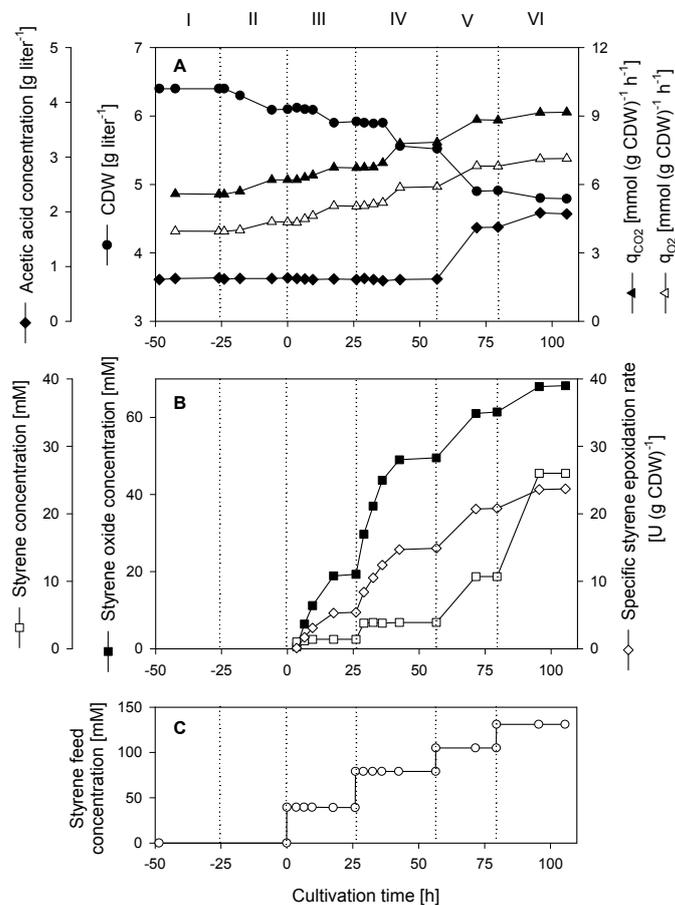


Abbildung 10. Variierende Styrolepoxidierungsraten von *E. coli* JM101 (pSPZ10) während einer kontinuierlichen Kultivierung ($D=0.1 \text{ h}^{-1}$) in Gegenwart einer Extraktionsphase.

Ab dem Zeitpunkt -25h wurde die *styAB* Expression mit 1.7 mM DCPK im organischen Zulauf induziert. Die Biotransformation wurde um $t = 0$ mit 40 mM Styrol im organischen Zulauf gestartet. Abb. A zeigt den Verlauf der Biomassen- und Essigsäurekonzentrationen und der spezifische O₂-Aufnahme- (q_{O_2}) und CO₂-Bildungsraten (q_{CO_2}), Abb. B die Styrol- und Styroloxidkonzentrationen in der organischen Phase und die spezifische Epoxidierungsrate und Abb. C die Styrolkonzentration im organischen Zulauf.

Die experimentellen Resultate (Abbildung 10) und die Resultate der Flussanalyse (Abbildung 11) zeigen, dass Induktion und steigende Epoxidierungsraten zu erhöhten spezifischen Glukoseaufnahmeraten führten. Die Flussverteilung veränderte sich wie folgt: In einer ersten Phase (Gleichgewicht I-IV) erhöhte sich der relative Fluss über den TCA-Zyklus, später nahm neben dem absoluten TCA-Zyklusfluss vor allem die Essigsäureproduktion zu (Gleichgewicht V; Abbildung 11). Die letzte Erhöhung der Styrolkonzentration (Gleichgewicht VI) führte nur zu einem geringen Anstieg der Raten für Glukoseaufnahme, TCA-Zyklus und Acetatproduktion, einhergehend mit

einer marginalen Steigerung der spezifischen Epoxidierungsrate. Insgesamt stieg die spezifische NAD(P)H-Regenerierungsrate von Gleichgewicht I zu VI um 65%. Zusammen mit dem reduzierten Biomassertrag auf Glukose deutet das auf einen mit der Expression und for allem der Epoxidationsrate signifikant steigenden NAD(P)H Verbrauch des Biokatalysators hin.

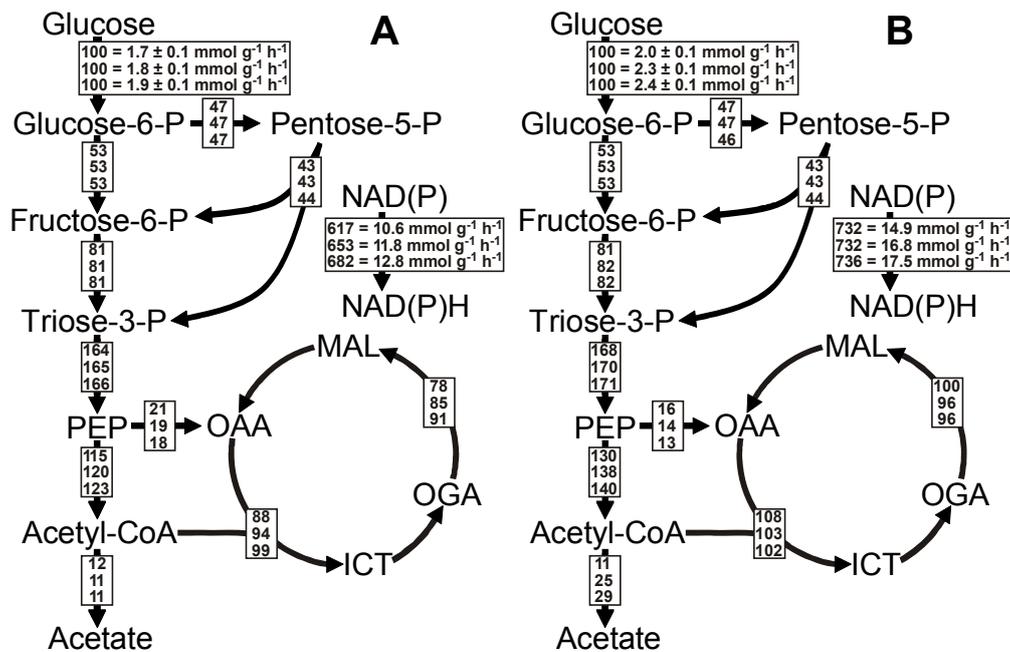


Abbildung 11. Relative Verteilung der absoluten Stoffwechselflüsse im zentralen Kohlenstoffmetabolismus von *E. coli* JM101.

Die Gleichgewichtszustände vom obigen Experiment (Abbildung 10) sind in A (I-III) und B (IV-VI). Alle Flüsse sind auf die jeweiligen Glukoseaufnahmeraten normiert. Absolute Flüsse sind zusätzlich für die Netto-NAD(P)H-Regenerationsrate gegeben, die die totale NAD(P)H Bildung abzüglich des NAD(P)H Konsums für die Netto-Biomassensynthese darstellt.

In Abbildung 12 ist der NAD(P)H-Verbrauch anteilig der Netto-Biomassensynthese, dem Erhaltungsstoffwechsel, der *styAB* Expression und der Styrolepoxidierung zugeordnet. Interessanterweise überschritt der biokatalyseabhängige NAD(P)H-Verbrauch den stöchiometrischen Bedarf an NADH für die Styrolepoxidierung um das 3,4 bis 4-fache. Der erhöhte NADH-Bedarf kann durch die Produktion von Nebenprodukten (2-Phenylethanol) und „Uncoupling“ der Epoxidation von der NADH-Oxidation an *StyAB*, was zur unproduktiven Reduktion von O_2 zu H_2O_2 führt, erklärt werden. Zudem können sich toxische Lösungsmittel wie Styrol, Styroloxid und 2-Phenylethanol in Zellmembranen einlagern und so diese selektive Barriere beschädigen und durchlässig machen {Sikkema, et al., 1995}. So muss zusätzliche

Energie für die Erhaltung von lebenswichtigen Membrangradienten wie dem Protonengradienten sowie für den Export von Lösungsmitteln aufgewendet werden.

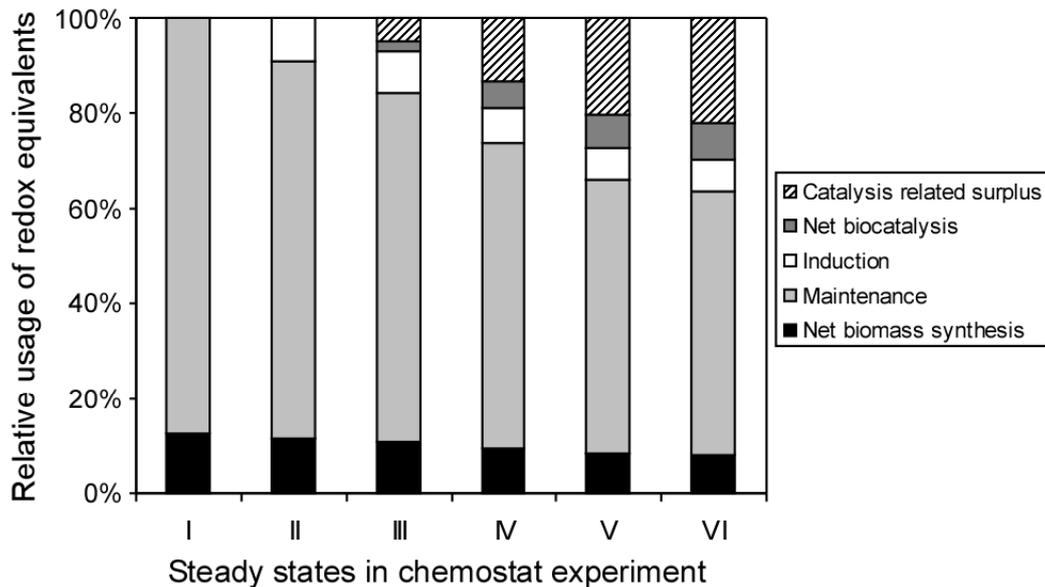


Abbildung 12. Relative Verwendung von durch den Glukosekatabolismus produziertem NAD(P)H während kontinuierlichen Kultivierung.

Diese Abbildung bezieht sich auf das Experiment von Abbildung 10. Ohne Induktion und Biokatalyse (Gleichgewichtszustand I) wird NAD(P)H für die Biomassensynthese und den Erhaltungsstoffwechsel der Zellen verbraucht, die als konstant über das ganze Experiment angenommen werden. Während der Biotransformation wird NAD(P)H zudem für die Expression von *styAB* (ebenfalls als konstant angenommen), für die Netto-Biokatalyse (1 mol NADH pro mol Styroloxid) und einen katalysebedingten Überschuss verbraucht.

Zudem haben Kinetik-Analysen gezeigt, dass die Epoxidation in Fließgleichgewicht VI nicht O₂- oder Styrol-limitiert ist (Resultate nicht gezeigt, siehe auch {Bühler, et al., 2008}), was auf eine Limitation durch das dritte Substrat hinweist. Diese Resultate wurden publiziert {Bühler, et al., 2008 } und zeigen klar, dass die Epoxidation durch die NADH-Regeneration und somit den zellulären Energiemetabolismus limitiert wird. Erste Einblicke aus der Flussanalyse zeigen nun, dass die Gründe dafür nicht alleine beim StyAB-bedingten NADH-Verbrauch liegen.

4.3 Stabilisierung des TCA-Zyklus durch die Regulationsmutante *E. coli* MG1655 Δ Psdh::*Ptet*

Durch die metabolische Flussanalyse konnte gezeigt werden, dass der relative Fluss über den TCA-Zyklus mit zunehmenden Biokatalyseraten bis zu einer maximalen Kapazität steigt. Gleichzeitig nimmt die Essigsäureproduktionsrate zu. Die Bildung dieses unerwünschten Nebenproduktes senkt nicht nur die Biomasse- und

Produktausbeute auf Glukose, sondern wirkt auch schon in geringen Konzentration toxisch auf die Zellen {Lasko, et al., 2000}.

E. coli MG1655 ist wie *E. coli* JM101 ein K12 Stamm und deshalb nahe mit diesem verwandt. In der verwendeten Regulationsmutante *E. coli* MG1655 $\Delta P_{sdh}::P_{tet}$ wurde der chromosomale *sdh* Promotor durch *P_{tet}* ersetzt. Dadurch werden in Abwesenheit von Tetrazyklin die Zitratzyklus-Gene für Succinat-Dehydrogenase, α -Ketoglutarat-Dehydrogenase und Succinyl-CoA-Synthetase konstitutiv exprimiert. Durch die Abkopplung des Zitratzyklus vom Regulationsnetzwerk des zentralen Kohlenstoffmetabolismus führt dies zur Stabilisierung des Zitratzyklus und zur Verringerung der Acetatproduktion {Veit, et al., 2007}.

E. coli MG1655 und *E. coli* MG1655 $\Delta P_{sdh}::P_{tet}$ wurden mit dem Plasmid pSPZ10 transformiert und auf verschiedenen Ebenen untereinander und mit *E. coli* JM101 (pSPZ10) verglichen. Zuerst wurden die spezifischen Epoxidierungsaktivitäten der Stämme in ruhenden Zellen untersucht (Abbildung 13). Diese sind in allen Stämmen sehr ähnlich (91, 89 und 97 U/g_{CDW} für JM101, MG1655 und MG1655 $\Delta P_{sdh}::P_{tet}$), was auch den bisher erreichten Werten von *E. coli* JM101 (pSPZ10) entspricht. Der leicht erhöhte Wert für *E. coli* MG1655 $\Delta P_{sdh}::P_{tet}$ (pSPZ10) liegt im Bereich des experimentellen Fehlers.

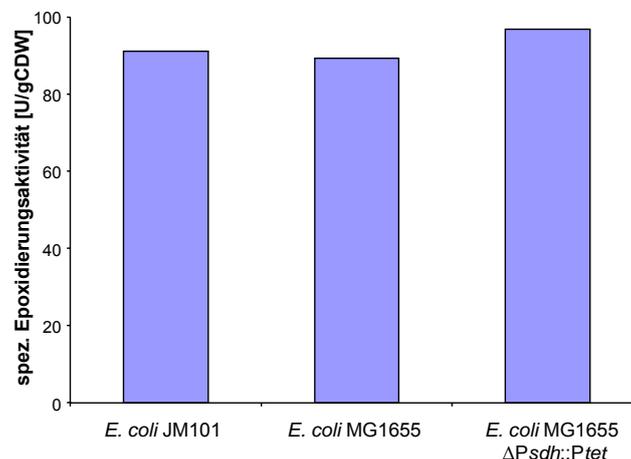


Abbildung 13. Spezifische Epoxidierungsaktivität von ruhenden *E. coli* JM101, *E. coli* MG1655 und *E. coli* MG1655 $\Delta P_{sdh}::P_{tet}$.

Nach Wachstum in Schüttelflaschen wurden die Zellen in 50 mM Kaliumphosphatpuffer mit 1% Glukose resuspendiert. Die Styroloxidproduktion wurde bei 30°C für 5 min gemessen.

In Fed-Batch Kulturen zeigen *E. coli* MG1655 (pSPZ10) und *E. coli* MG1655 $\Delta P_{sdh}::P_{tet}$ (pSPZ10) ähnliches Verhalten (Abbildung 14). So vermögen beide Stämme das eingesetzte Styrol (60 ml = 524 mmol) komplett umzusetzen.

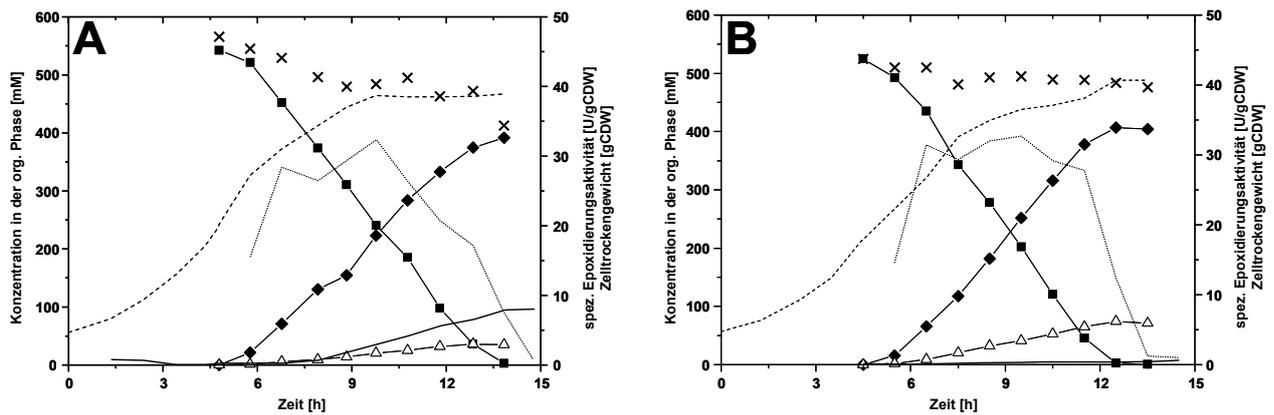


Abbildung 14. Biotransformationen im Zweiphasensystem mit *E. coli* MG1655 (pSPZ10) (A) und *E. coli* MG1655 $\Delta Psdh::Ptet$ (pSPZ10) (B) als Biokatalysatoren.

Die Kohlenstoffquelle war in beiden Experimenten Glukose und BEHP wurde als organisches Lösungsmittel genutzt. Die organische Phase mit Styrol und Oktan wurde zum Zeitpunkt 4,8 h (A) oder 4,5 h (B) zugegeben. Die Styrol- (■), Styroloxid- (◆) und 2-Phenylethanolkonzentrationen (▲) in der organischen Phase, die spezifische Epoxidierungsaktivität (·····), das Zelltrockengewicht (---) und die Acetatkonzentration (—) sind eingetragen.

Insgesamt schneiden beide *E. coli* MG1655 Stämme schlechter ab als *E. coli* JM101. Do sind die Epoxidierungsaktivitäten mit 30-40 U/g_{CDW} in beiden *E. coli* MG1655 Experimenten geringer (vergleiche Abbildung 6A mit Abbildung 14). Dabei vermag *E. coli* MG1655 $\Delta Psdh::Ptet$ (pSPZ10) die Aktivität über einen längeren Zeitraum zu halten. Der Komplettumsatz des Styrols wird deshalb ungefähr eine Stunde früher erreicht als mit dem Wildtyp, was sich auch in einer höheren Produktivität niederschlägt (Tabelle 3).

Tabelle 3. Zusammenfassung der Biotransformationen im Zweiphasensystem mit *E. coli* MG1655 (pSPZ10) und *E. coli* MG1655 $\Delta Psdh::Ptet$ (pSPZ10) als Biokatalysatoren.

Stamm		<i>E. coli</i> MG1655 (pSPZ10) ¹	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta Psdh::Ptet$ (pSPZ10) ²
Transformationszeit	[h]	9	8
Styroloxidkonzentration	[mM]	392	407
Verbleibendes Styrol	[mM]	3	3
Ø-Produktivität	[g/L _{tot} /h]	2.6	3.1
Max. Zelltrockengewicht	[g/L]	39	41
Acetatendkonzentration	[g/L]	8.1	0.5

¹ Experiment von Abbildung 14A; ² Experiment von Abbildung 14B

Der Wildtyp produziert schon sehr früh (4 h nach Zugabe der organischen Phase) signifikante Mengen an Essigsäure. Die Endkonzentration (8.1 g/L) ist vergleichbar mit der, die mit *E. coli* JM101 (pSPZ10) erreicht wird. *E. coli* MG1655 $\Delta P_{sdh}::Ptet$ (pSPZ10) produziert jedoch bis zum Ende der Biotransformation nur 0.5 g/L Essigsäure. Diese unterschiedlichen Essigsäurekonzentrationen können mitverantwortlich für den früheren Aktivitätsverlust und somit für die tiefere Produktivität des Wildtyps sein.

Es ist mit der Stabilisierung des TCA-Zyklus also gelungen, den Metabolismus so zu verändern, dass weniger Glukose ineffektiv zu Essigsäure umgewandelt wird. Dies reduziert die „Selbsttoxifizierung“ der Zellen und führt zu einem effizienteren Metabolismus, der die Biokatalyse besser unterstützen kann.

4.4 Regiospecific Hydroxylation catalyzed by Quinoline 2-oxidoreductase (C2O) and Quinaldine 4-oxidase (C4O)

4.4.1 Evaluation of C2O based whole-cell biocatalysts

In order to investigate the O₂ independent hydroxylation of N-heteroaromates by C2O and C4O, the wildtype strains *P. putida* 86 {Schwarz, et al., 1988} and *A. nitroguajacolicus* {Dembek, et al., 1989} and the recombinant strains *P. putida* 86-1 Δ qor (pUF1) {Frerichs-Deeken, et al., 2003} and *P. putida* KT2440 (pKP1) {Parschat, et al., 2003} were evaluated for hydroxylation activity. *P. putida* 86-1 Δ qor was generated by deleting the two copies of the *qorMSL* genes on the chromosome of *P. putida* 86. *P. putida* 86-1 Δ qor was then used as a host for *qorMSL* expression via a heterologous regulatory system. The recombinant expression of *qorMSL* and *qoxLMS* genes was achieved by introducing the genes of interest into the broad-host-range cloning vector pJB653, resulting in the plasmids pUF1 and pKP1. Induction of *qorMSL* and *qoxLMS* expression from the *P_m* promoter of pUF1 and pKP1 was achieved by the addition of the XylS effectors benzoate and 2-methyl benzoate.

The hydroxylation activities of both resting and growing cells were evaluated. In Abbildung 15 A and B, the evaluation of 2-methyl benzoate induced *P. putida* 86-1 Δ qor (pUF1) and quinoline-induced *P. putida* 86 cells for C2O activity in resting cell assays is given, respectively. High activities were achieved with *P. putida* 86, when glucose, quinoline, and glycerol were used as the carbon source during growth,

whereas the activities of citrate and benzoate grown cells were relatively low (Abbildung 15B). The activities achieved with *P. putida* 86-1 Δ qor (pUF1) generally were lower (Abbildung 15A). No activity was observed with glycerol or glucose as the growth substrate and energy source. Although benzoate induces expression of *qorMSL* genes in *P. putida* 86-1 Δ qor (pUF1), the activity was very low, when benzoate was used as both growth substrate and energy source during resting cell bioconversions. *P. putida* 86-1 Δ qor (pUF1) grown on citrate and both glucose and benzoate showed the highest activities. In general, the achieved activities show the principal feasibility of the C2O containing strains as biocatalysts for the hydroxylation of N-heteroaromates.

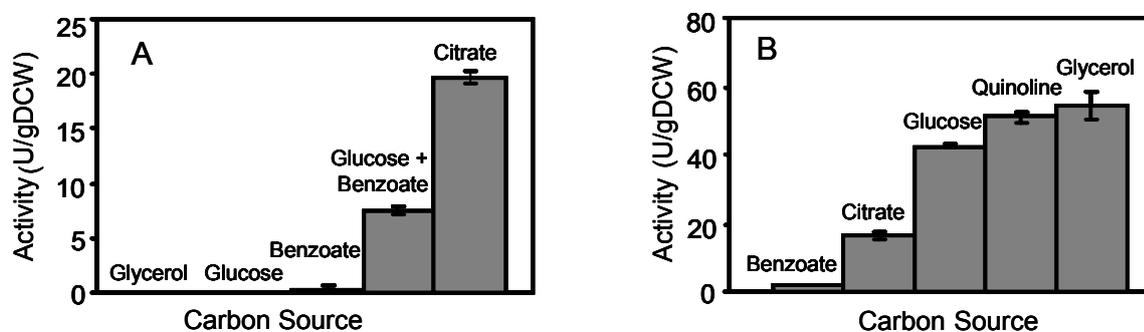


Abbildung 15. C2O activity of 2-methyl benzoate induced *P. putida* 86-1 Δ qor (pUF1) (A) and quinoline-induced *P. putida* 86 cells (B) in resting cell assays.

The energy source corresponded to the growth substrate. In the glucose + benzoate case only glucose was added.

Abbildung 16 shows the bioconversion of quinoline to 2-hydroxyquinoline by growing *P. putida* 86. The maximum molar product yields achieved with various carbon and energy sources are tabulated in Tabelle 4. With glucose as an additional growth substrate, quinoline hydroxylation by *P. putida* 86 was more efficient (no cometabolism). However, when glycerol or citrate were added, quinoline was the preferred growth substrate (data not shown).

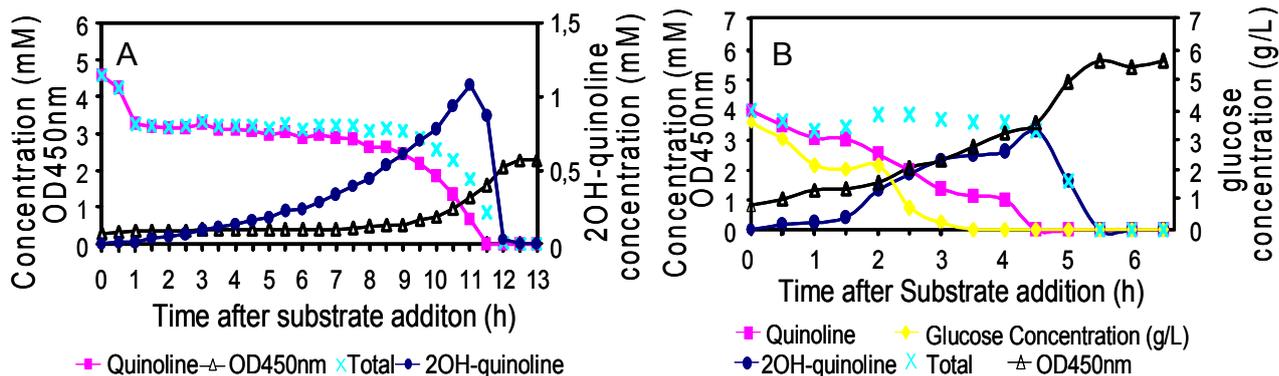


Abbildung 16. Quinoline conversion profile during growth of *P. putida* 86 on quinoline (A) and both quinoline and glucose (B).

Tabelle 4. Maximum molar 2-hydroxyquinoline yields achieved by growing *P. putida* 86

Growth substrate	Maximum Yield
Quinoline	26 %
Quinoline+Citrate	55 %
Quinoline+Glucose	88 %
Quinoline+Glycerol	58 %

4.4.2 Evaluation of C4O based whole-cell biocatalysts

In contrast to C2O-based biocatalysis, which was found to be most efficient with the wildtype *P. putida* 86, recombinant *P. putida* KT2440 (pKP1) showed promising C4O activities, whereas the *A. nitroguajacolicus* wildtype showed slow growth and low activities (results not shown). Bioconversions with C4O present in recombinant whole cells were thus further characterized in terms of host type, carbon and energy source, stability, kinetics, and toxicity. The achieved C4O activity was highly dependent on the type of strain, and on the carbon and energy source used. *P. putida* KT2440 showed 1.7 to 25-fold higher activities than *P. putida* VLB120 and *P. putida* S12 (Abbildung 17). For host selection, the growth of these hosts on quinaldine was also checked and no growth was observed.

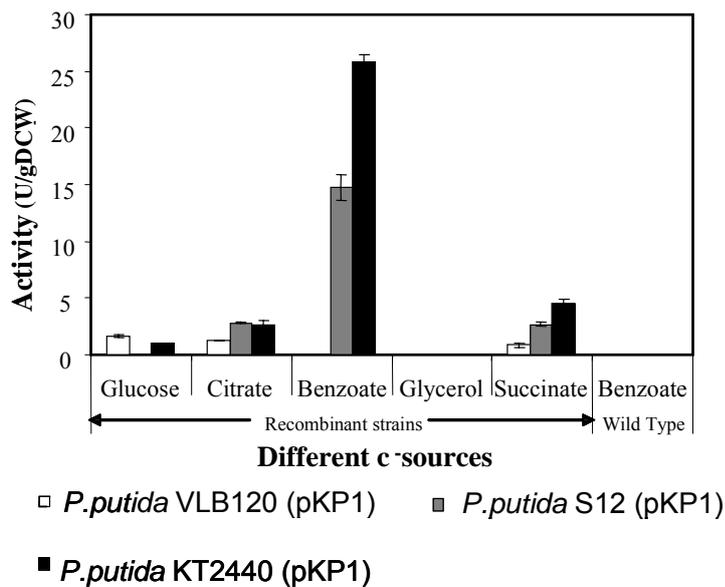


Abbildung 17. Evaluation of C40 activity towards quinaldine in various hosts.
 Glucose served as the energy source during resting cell activity assays.

Among the growth substrates tested, the activities of recombinant *P. putida* KT2440 and *P. putida* S12 were highest, when benzoate was used as the carbon source. As benzoate can serve as both inducer and growth substrate, similar activities were achieved in the absence and the presence of the inducer 2-methyl benzoate during growth on benzoate. As not only the growth substrate but also the energy source during bioconversions with resting cells might influence biocatalyst activity, both growth substrate and energy source were varied (Abbildung 18). The highest activities were achieved with benzoate as the carbon and energy source during growth and glucose as the energy source during resting cell biotransformations. However, all tested energy sources except for benzoate allowed a similar activity level. Interestingly, the activity of resting cells even seemed to be independent on the presence of an energy source.

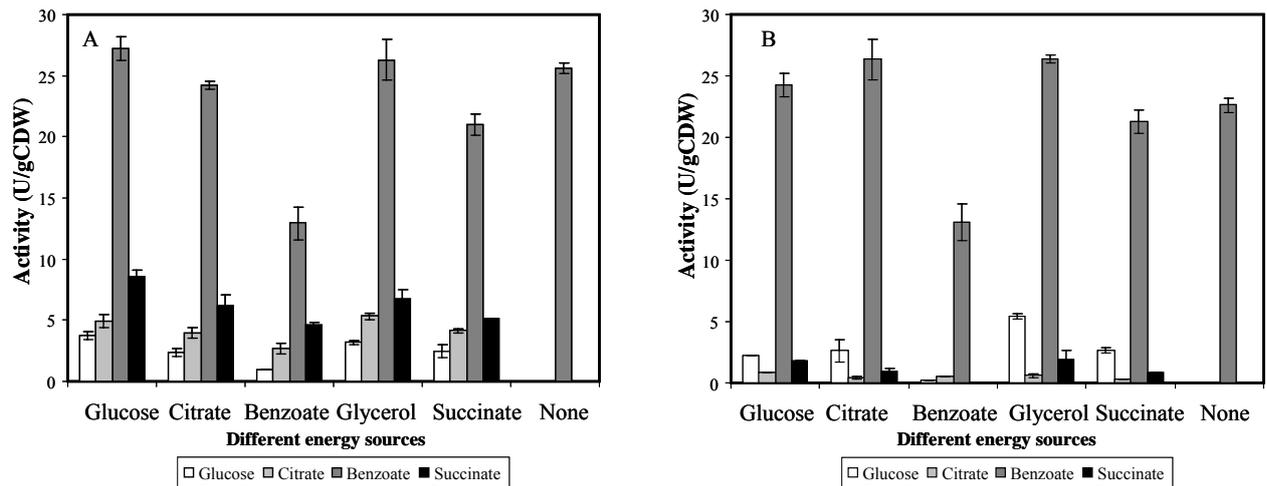


Abbildung 18. Effect of different carbon and energy sources on the C4O activity of resting cells.

2-methyl benzoate induced (A) and uninduced *P. putida* KT2440 (pKP1) were used as biocatalysts.

As the results shown in Abbildung 18 indicate that benzoate, the inducer of recombinant C4O expression, might inhibit C4O activity on the enzyme level, benzoate inhibition was further investigated in resting and growing cells. An inhibition by benzoate could indeed be confirmed (Abbildung 19).

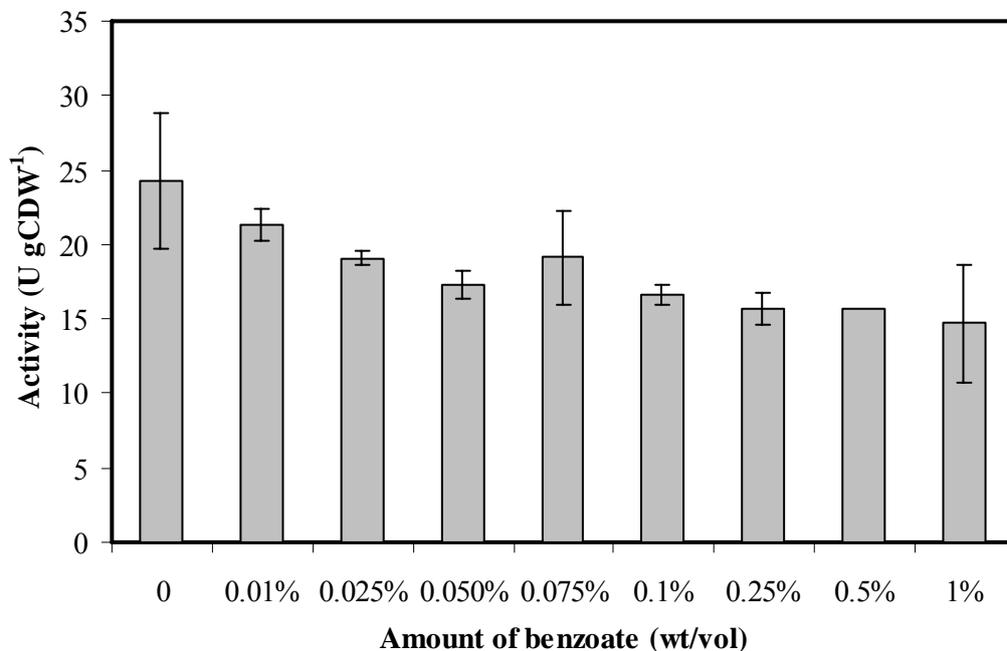


Abbildung 19. Inhibition analysis for benzoate.

Activity for benzoate-grown *P. putida* KT2440 (pKP1) with various concentrations of benzoate as the energy source during resting cell assays. Cells from the same culture were used for this experiment.

The initial C4O activities of growing cells with and without 2-methyl benzoate induction were 14.8 U/gDCW and 7.5 U/gDCW, respectively. A sharp decrease in C4O activity was observed after 30 min (data not shown). Thus, benzoate inhibition hindered the use of growing cells for biotransformations.

The analysis of the kinetics of quinaldine hydroxylation catalyzed by *P. putida* KT2440 (pKP1) showed that this reaction followed Michaelis-Menten kinetics with apparent values for V_{max} and K_s of 19.04 ± 0.29 U/gCDW and 64 ± 4 μ M, respectively (Abbildung 20). The K_s value was similar to literature values for purified C4O (Tabelle 5), thus indicating that mass transfer over the cellular membranes was efficient and not limiting under the conditions applied. On the basis of the V_{max} value and the C4O content in *P. putida* KT2440 (pKP1), a k_{cat} of 2.7 s^{-1} could be estimated for C4O in whole cells, which was considerably lower as compared to the isolated enzyme (Tabelle 5). This low k_{cat} value could be due to a limiting availability of the unknown electron acceptor and/or to the presence of inactive C4O due to misfolding or lacking molybdenum cofactor.

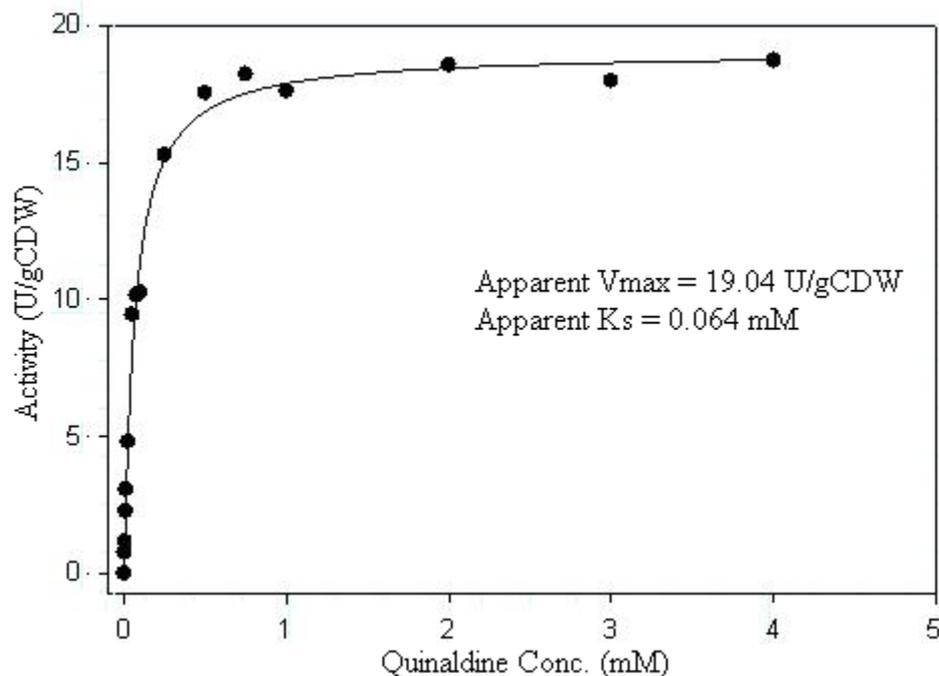


Abbildung 20. Michaelis Menten kinetics for *P. putida* KT2440 (pKP1)

Tabelle 5. Kinetic parameters for purified C4O.

Source of C4O	$K_{m\text{app}}$ (μM)	$k_{\text{cat app}}$ (s^{-1})	Reference
<i>A. ilicis</i> R�61a	34	16.7	Parschat et al., 2003
<i>P. putida</i> KT2440 (pKP1)	35	29.4	Parschat et al., 2003
<i>P. putida</i> KT2440 (pKP1)	38	19.3	Kappl et al., 2006

Short- and long-term C4O stabilities were determined by periodic activity assays of resting cells incubated in potassium phosphate buffer with and without an energy source. For the tested period of 42 h, the enzyme activity only slight decreased with glucose as the energy source, whereas cells incubated without an energy source showed a significant activity decrease (Abbildung 21).

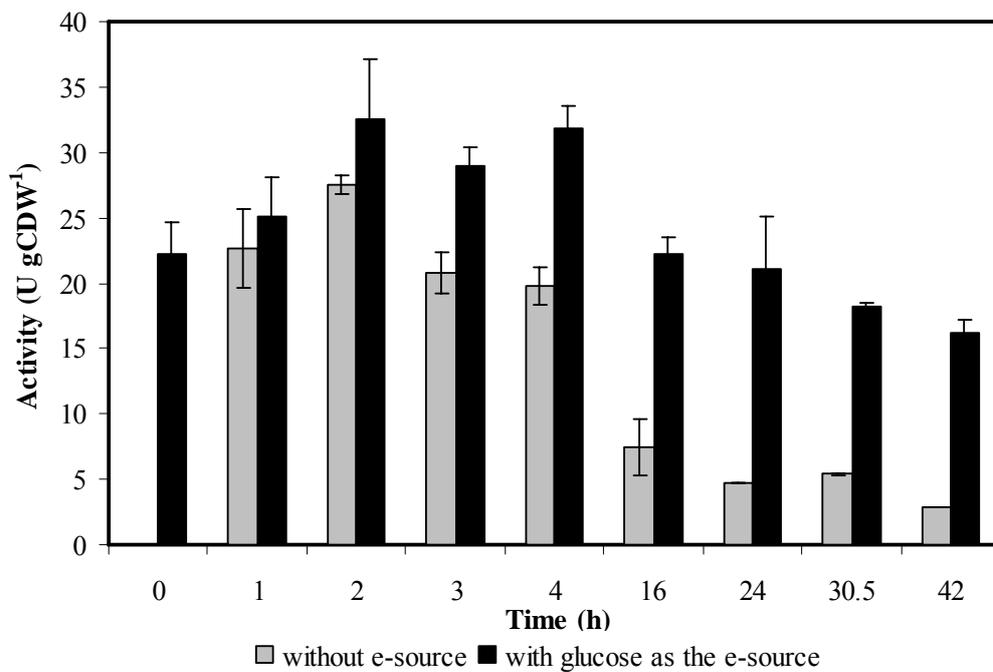


Abbildung 21. Activity for benzoate grown *P. putida* KT2440 (pKP1) after incubation for different time periods with and without glucose as the energy source.

As the quinaldine hydroxylation activity *P. putida* KT2440 (pKP1) of obtained in different experiments varied between 20 and 30 U/g_{CDW}, the biological variability of the activity was evaluated by testing 6 colonies picked from LB-agar plates. After precultivation in liquid LB and minimal medium (M9*), cells growing in M9* medium were induced, harvested, and tested for their specific quinaldine hydroxylation activities. As shown in Abbildung 22, some variation was indeed observed. Nevertheless, the activity can be considered to be reproducible with a variation coefficient of 15.8%.

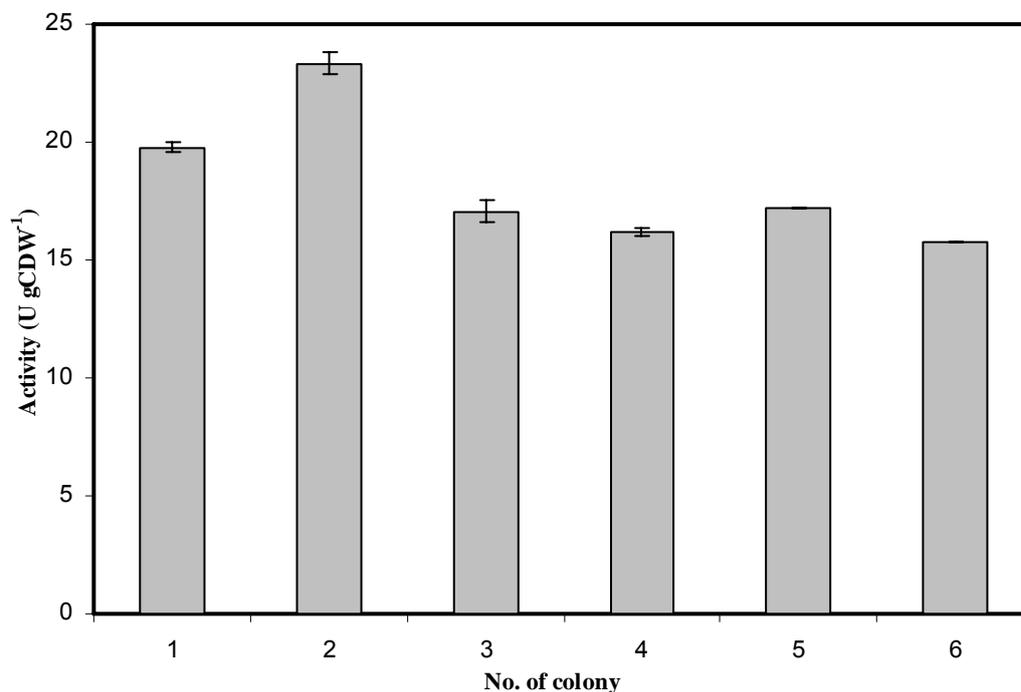


Abbildung 22. Activity obtained for different colonies of *P. putida* KT2440 (pKP1).

The investigation of substrate and product toxicities showed that both quinaldine and 4-hydroxy quinaldine significantly affected growth of *P. putida* KT2440 (Abbildung 23). The toxicity limits of quinaldine and 4-hydroxy quinaldine for *P. putida* KT2440 were determined to be 3 mM and 1.5 mM, respectively. Such substrate and product toxicities can be overcome by continuous substrate addition and in situ product removal, i.e. by introducing an organic phase during the biotransformation, serving as a substrate reservoir and as a product sink.

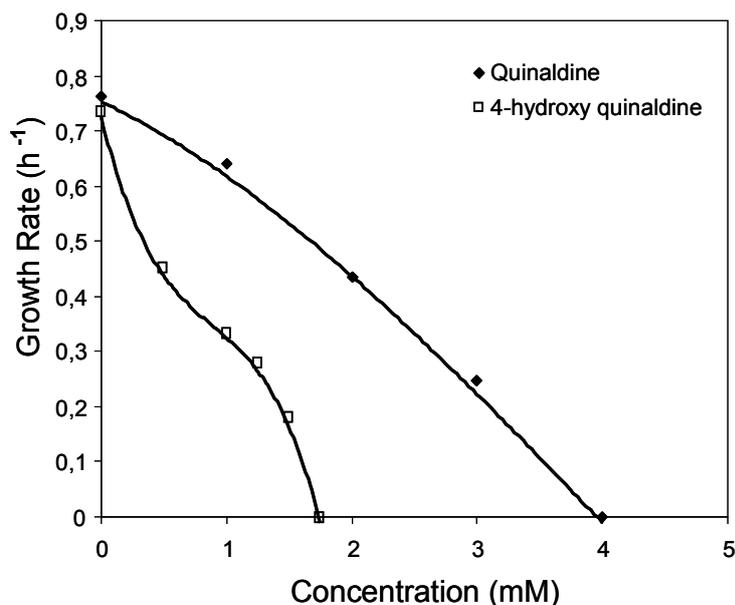


Abbildung 23. Toxicity of quinaldine and 4-hydroxy quinaldine

4.4.3 Investigation of the substrate spectrum of C2O and C4O

To evaluate the general utility of C2O- and C4O-based biocatalytic systems, their catalytic activity towards heteroaromatic substrates – proposed by SAFC Pharma based on their commercial interest – was tested. Resting-cell assays with *P. putida* 86-1Δqor (pUF1) expressing C2O and *P. putida* KT2440 (pKP1) expressing C4O were performed with 1 mM substrate (5-hydroxy quinoline, 6-hydroxy quinoline, 8-hydroxy quinaldine, 2-quinoline carbonitrile, 3-quinoline carbonitrile, and 3-quinoline carboxaldehyde). The activity towards the reference substrate quinoline was 3 and 14 U/g_{CDW} for C2O and C4O, respectively. The rates of substrate conversion relative to the conversion of quinoline are presented in Tabelle 6.

Tabelle 6. Catalytic activities of Quinoline 2-oxidoreductase (C2O) and Quinaldine 4-oxidase (C4O) in resting-cell assays.

Substrate	Relative activity	
	C2O	C4O
Quinoline	100	100
5-Hydroxyquinoline	48	2.1
6-Hydroxyquinoline	96	130
8-Hydroxyquinaldine	n.d.	93
2-Quinolinecarbonitrile	n.d.	110
3-Quinolinecarbonitrile	16	4.0
3-Quinolinecarboxaldehyde	230	86

n.d.: not detectable, Activities are presented relative to the activity towards quinoline which was 3 and 14 U/g_{CDW} for C2O and C4O, respectively.

C2O does not convert 8-hydroxy quinaldine and 2-quinoline carbonitrile, which was expected as they have a substituent in the 2-position. The other tested substrates are converted by C2O and C4O. HPLC-DAD was used for the analysis and, in correlation with the conversion of all substrate, the appearance of a product peak was observed. This product peak eluted at different time points when C2O and C4O containing cells were used as biocatalysts, showing that the two biocatalysts give different products. The products could not be identified by HPLC-DAD as reference compounds for the possible products are not available. Product identification can be done with GC-MS/MS or, alternatively, products can be isolated via preparative HPLC for structure determination by NMR. Based on the promising substrate conversion rates observed, product identification is planned in a further collaboration with SAFC Pharma.

4.4.4 Development of a Quinaldine hydroxylation process based on C4O-containing recombinant *P. putida* KT2440

Various organic phases with a wide range of logP_{oct} values were tested to overcome the toxicity limitations. 1-Decanol (logP_{oct} = 4) and 1-dodecanol (logP_{oct} = 5) were selected as the most suitable organic phases. Toxicities of these organic solvents for *P. putida* KT2440 were also determined. The presence of these organic solvents at two different organic phase : culture ratios, 1:3 and 1:5, showed no significant effect on

the growth rates. Partition coefficients for quinaldine and 4-hydroxy quinaldine in these two organic-aqueous two-liquid phase system are given in Tabelle 7.

Tabelle 7. Partition coefficients for quinaldine and 4-hydroxy quinaldine.

	1-Decanol	1-Dodecanol
Quinaldine	229 ± 33	182 ± 1
4-Hydroxy quinaldine	237 ± 11	130 ± 12

For biotransformations in these two-liquid phase systems, resting cells were used to overcome benzoate inhibition. *P. putida* KT2440 (pKP1) cells were grown on benzoate in batch mode to an end cell density of 2 g_{CDW}/L, followed by fed-batch cultivation to 6.7 g_{CDW}/L, when the cells were harvested by centrifugation, washed, and resuspended in glucose containing potassium phosphate buffer. The cell concentration during two-liquid phase biotransformations with resting cells amounted to 9 g_{CDW}/L and remained constant throughout the experiment. Quinaldine and 4-hydroxy quinaldine concentrations during two-liquid phase biotransformations with different two-liquid phase ratios are given in Abbildung 24.

In biotransformations with dodecanol as the organic phase and an organic to aqueous phase ratio of 1:5, the specific biocatalyst activity and the volumetric productivity amounted to 7.5±0.9 U/g_{CDW} and 2.1 g/L_{tot}/h, respectively, for the first 6 h. The achieved productivity under non-optimized conditions is already in a range, which is feasible for fine chemical production {Straathof, et al. 2002}. The specific activity of resting *P. putida* KT2440 (pKP1) was however lower than the activities reached with resting cells in pyrex tubes.

The comparison of biotransformation performance with 1-dodecanol and 1-decanol as the organic phase shows that, independently of the aqueous-organic phase ratio applied, the achieved quinaldine hydroxylation activity with 1-dodecanol as the organic phase is higher than that achieved with 1-decanol (Abbildung 25).

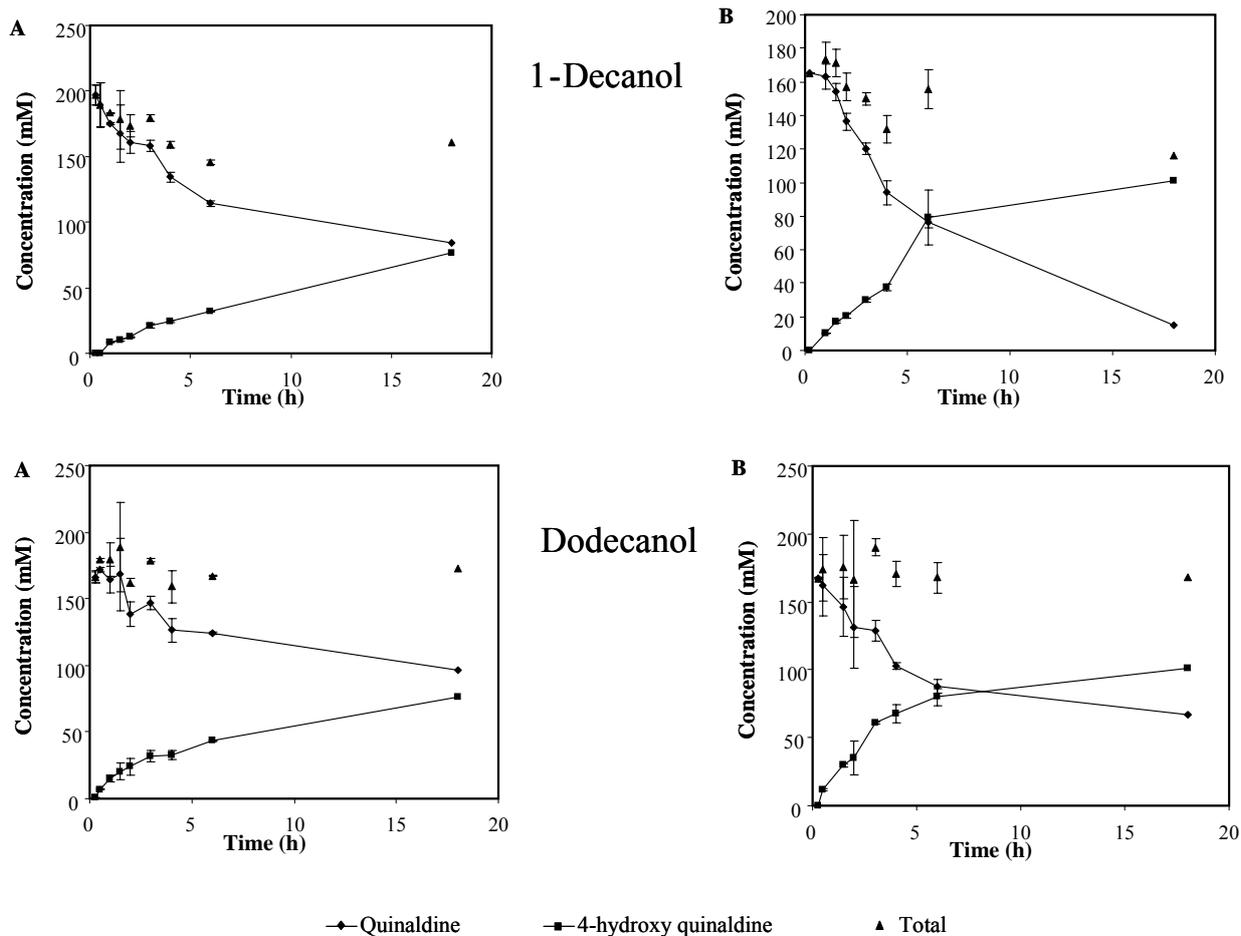


Abbildung 24. Biotransformation of quinaldine by resting *P. putida* KT2440 (pKP1) cells with 1-decanol and 1-dodecanol as the organic phase.
 The organic-aqueous phase ratios amounted to 1:3 (A) and 1:5 (B).

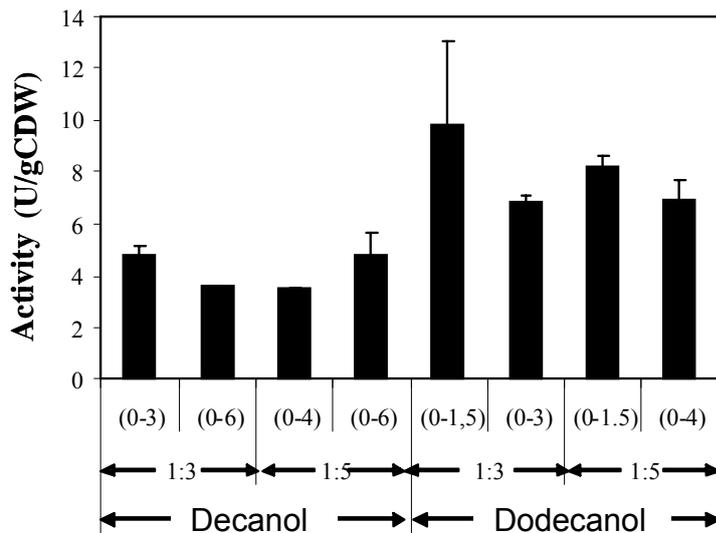


Abbildung 25. Comparison of 1-decanol and 1-dodecanol as the organic phase during quinaldine hydroxylation with *P. putida* KT2440 (pKP1).
 Numbers in brackets show the time range for which activities were calculated.

It was reported that the decrease in metabolic activity may limit the activity of cofactor dependent enzymes in whole-cell biocatalysts {Bühler, et al., 2002}. This may be the reason for the reduction in the 4-hydroxy quinaldine formation rate after 6 h. In the experiments shown in Abbildung 24, the decrease in metabolic activity may result from oxygen limitation as the biotransformation was carried out in stirred tank bioreactors without active aeration. It was also reported that molecular oxygen might be a physiological electron acceptor of C4O {Stephan, et al., 1995}. this, oxygen limitation may have been the predominant reason not only for the lower activity as compared to resting cell assays but also for the decrease in C4O activity over time. The limiting inducer (benzoate) concentration during fed-batch cultivation may have been another reason for the reduced product formation rates. Furthermore, inhibition due to the product formation is also an issue to be checked.

Thus, optimization of mass transfer (oxygen, substrate) and induction conditions might allow improving the already promising quinaldine hydroxylation performance, which enabled a product concentration of 100 mM in the organic phase.

In summary, by the use of whole-cell biocatalysts, which provide and regenerate the unknown electron acceptors of the enzymes C2O and C4O, we could reach activities up to 60 U/g_{DCW} for the production of oxyfunctionalized N-heteroaromates.

Activities achieved highly depend on the type of substrate, induction conditions, host strain, and carbon and energy source used. The results given above clearly show the feasibility of the C2O- and C4O-containing whole cells as catalysts for carbon oxyfunctionalization.

4.5 Emulsionstrennung mit komprimiertem CO₂

Unabhängig von diesem Projekt konnten die Lehrstühle Biotechnik und Thermodynamik zeigen, dass es möglich ist, stabile Emulsionen aus Ganzzell-Biotransformationen unter Verwendung von komprimiertem Kohlendioxid zu trennen. Dieses Know-how wurde nun auf das im Rahmen des DBU-Projektes betrachtete Reaktionssystem unter Verwendung von BEHP als organischem Lösungsmittel angewendet. Bei den dazu verwendeten Emulsionen handelt es sich um originale Reaktionsgemische von abgeschlossenen Biotransformationen mit *Escherichia coli* JM101 (pSPZ10). Es konnten Bedingungen (CO₂-Konzentration, Druck und Temperatur) gefunden werden, die eine problemlose Trennung der Emulsion

ermöglichen. In Abbildung 26 ist klar zu erkennen, dass sich die Emulsion nach der Behandlung mit komprimiertem Kohlendioxid in eine organische und eine wässrige Phase trennen ließ, wobei sich Zellbestandteile (Zelltrümmer, biogene Makromoleküle, Tenside) an der Phasengrenze im unteren Bereich der oberen, organischen Phase absetzten. Dieses Trennungsverhalten blieb auch nach dem Ausgasen des CO₂ bestehen.

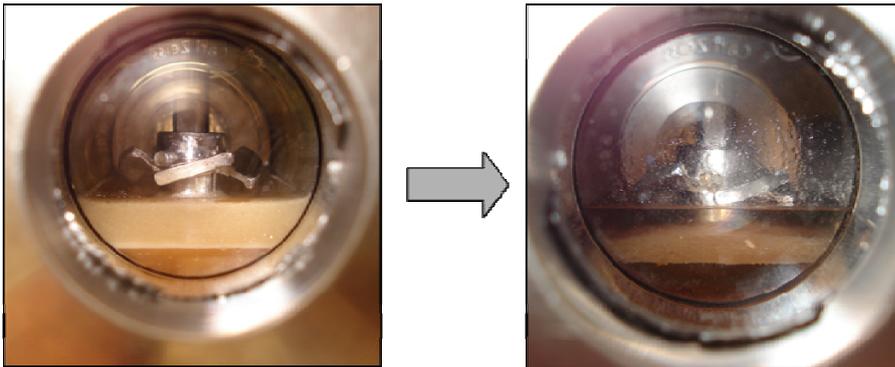


Abbildung 26. Vergleich zwischen dem Phasenverhalten der Emulsion vor und nach der Behandlung mit überkritischem Kohlendioxid.

Links ist der Zustand nach Abtrennung der Zellen durch Zentrifugation dargestellt, Rechts der Zustand nach der Behandlung mit Kohlendioxid.

Die oben beschriebenen Versuche zum Brechen der Emulsion mit komprimiertem Kohlendioxid wurden ebenfalls für ein Reaktionsgemisch mit Ethyloleat als organischem Lösungsmittel durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Prinzip der Emulsionstrennung mit komprimiertem Kohlendioxid trotz der besseren Löslichkeit von Ethyloleat in komprimiertem Kohlendioxid auch für ein Zweiphasensystem mit Ethyloleat als organischer Phase Anwendung finden kann. Zur Trennung notwendige Drücke und Temperaturen entsprachen dabei in etwa den bereits für das Reaktionsgemisch mit BEHP und in vorherigen Zusammenarbeiten erarbeiteten Prozessbedingungen.

4.6 Extraktion mit komprimiertem CO₂

4.6.1 Versuchsaufbau

Zur Realisierung der Probenahme direkt aus der sich unter Drücken bis 200 bar und Temperaturen bis 180°C befindlichen Messzelle, wurde ein VICI Valco[®] (Schenkon, Schweiz) Flüssigprobenahmeventil modifiziert und speziell für unseren Anwendungsfall entwickelt. Dabei wird in einer internen Probenschleife ein

Probenvolumen von 0,5 µl entnommen. Beim erstmaligen Schalten des Ventils wird diese interne Probenschleife in eine externe 500 µl Probenschleife entspannt. Diese externe Probenschleife wird temperiert, um der durch den hohen Joule-Thompson Koeffizienten des CO₂ bedingten Abkühlung entgegenzuwirken. Um das Spülen der internen Probenschleife mit Probe aus dem Autoklaven zu gewährleisten, wurde hinter dem Probenahmeventil ein Druckminderer (Restriktor) eingebaut. Dieser erlaubt auch bei hohen Drücken bis 250 bar in der Sichtzelle, dass die Fließgeschwindigkeit der Probe in der Leitung zwischen Messzelle und Probenahmeventil beim Spülen gering bleibt. Beim nochmaligen Schalten des Ventils wird die in der externen Probenschleife befindliche Probe direkt in den Trägergasstrom eines Agilent 7890A Gaschromatografen injiziert. Die Konfiguration des Gaschromatografen wurde dabei auf die zu bestimmenden Komponenten angepasst.

Durch diese Konfiguration war es möglich, Proben direkt aus der Kohlendioxidreichen Phase zu entnehmen und diese mittels angeschlossenen Gaschromatografen direkt zu analysieren. Dabei konnten im Gaschromatografen sowohl Verunreinigungen im Kohlendioxid als auch in der organischen Phase mit einer genügend hohen Empfindlichkeit nachgewiesen werden (Agilent, *User Manual/Part Distription*: Agilent Technologies, 2007).

4.6.2 Löslichkeiten der Lösungsmittel BEHP und Ethyloleat in komprimiertem Kohlendioxid

4.6.2.1 BEHP

Um Daten zum Phasengleichgewichtsverhalten des Lösungsmittels BEHP in komprimiertem Kohlendioxid zu erhalten, wurde zunächst das binäre System BEHP/CO₂ vermessen. Dabei wurde der Autoklav mit einer bestimmten Masse an BEHP befüllt und eine definierte Masse Kohlendioxid zudosiert. Für dieses Massenverhältnis wurde dann bei eingeschaltetem Rührer der Druck bestimmt, bei dem aus dem einphasigen ein zweiphasiges System wurde (Trübungspunkt). Durch Variation der Massenanteile des Kohlendioxids konnten so die in Abbildung 27 dargestellten Gleichgewichtskurven bei 45 und 75°C ermittelt werden. Es ist zu erkennen, dass sich das BEHP bei einem Massenanteil an Kohlendioxid von ~0,9 und bei Drücken bis 180 bar nicht vollständig in Kohlendioxid löst. Dies bestätigt die

bei den Messungen zur Kalibrierung der Gasphasenanalytik gemachte Beobachtung, dass eine binäre Mischung (1:9) von Kohlendioxid und BEHP bis 200 bar nicht in den einphasigen Zustand zu überführen war.

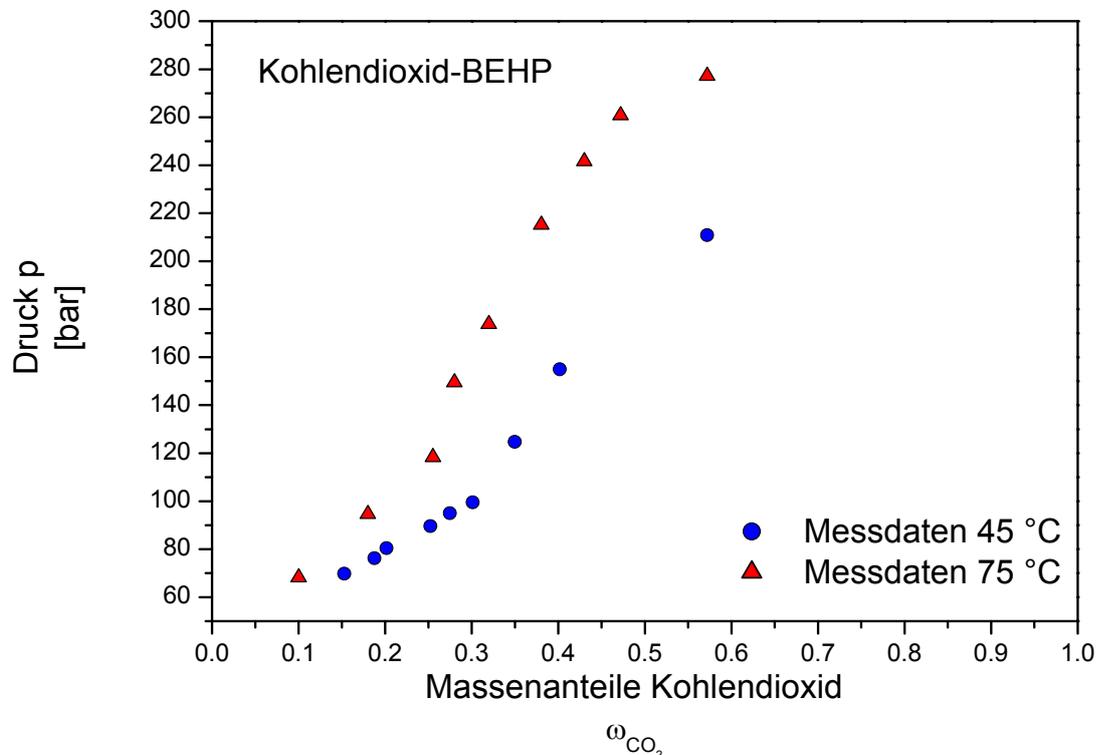


Abbildung 27. p,w-Diagramm der binären Mischung Kohlendioxid-BEHP.
Aufgetragen sind Trübungspunkte aus optischen Messungen in der Hochdrucksichtzelle bei 45°C und 75°C.

4.6.2.2 Ethyloleat

Nachdem seitens des Lehrstuhls für Biotechnik der Einsatz eines alternativen Lösungsmittels für die Biotransformation vorgeschlagen wurde, wurden die Messungen zum Löslichkeitsverhalten sowie zur Emulsionstrennung mit komprimiertem Kohlendioxid hierfür ebenfalls durchgeführt.

Im Gegensatz zur binären Mischung Kohlendioxid-BEHP waren für die Mischung Kohlendioxid-Ethyloleat bereits Mischungsdaten in der Literatur zu finden (siehe Abbildung 28).

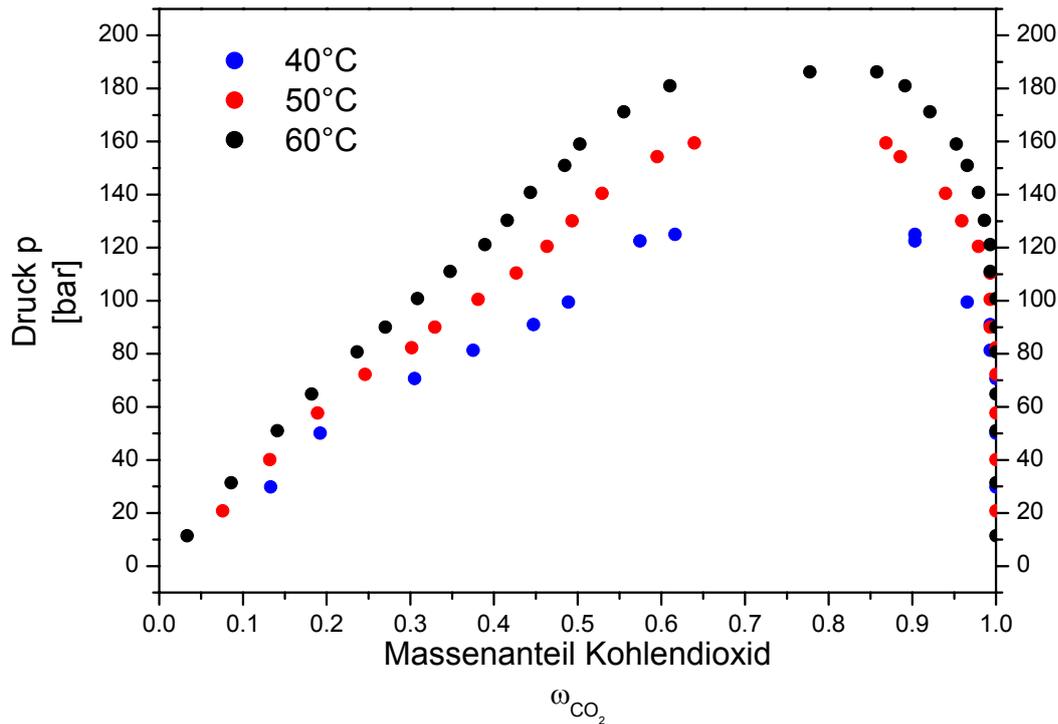


Abbildung 28. p,w-Diagramm der binären Mischung Kohlendioxid-Ethyloleat.

Aufgetragen sind Trübungspunkte aus optischen Messungen bei 40°C, 50°C und 60°C. {Bharath, et al., 1989}

Aus dem Vergleich von Abbildung 27 und Abbildung 28 ist zu erkennen, dass sich das Ethyloleat wesentlich besser in der Kohlendioxid-reichen Phase löst als BEHP. Die hieraus resultierenden Probleme für die Aufarbeitung eines biokatalytischen Reaktionsgemisches unter Verwendung von Ethyloleat als organischem Lösungsmittel werden im Anschluss an dieses Kapitel gesondert behandelt.

4.6.3 Extraktionsverhalten im Mehrkomponentensystem (organisches Lösungsmittel BEHP) mit komprimiertem Kohlendioxid

Im Anschluss wurde nun das Phasengleichgewichtsverhalten eines Modellgemisches einer organischen Phase, wie sie aus einer ideal verlaufenden Biotransformation resultiert (605 mM Styroloxid, 56 mM 2-Phenylethanol, 20 mM Oktan in BEHP), untersucht. Um hinsichtlich des Phasengleichgewichtsverhaltens in komprimiertem Kohlendioxid einen Vergleich dieser Modelllösung und der reinen organischen Phase zu erhalten, wurden zunächst optische Messungen durchgeführt.

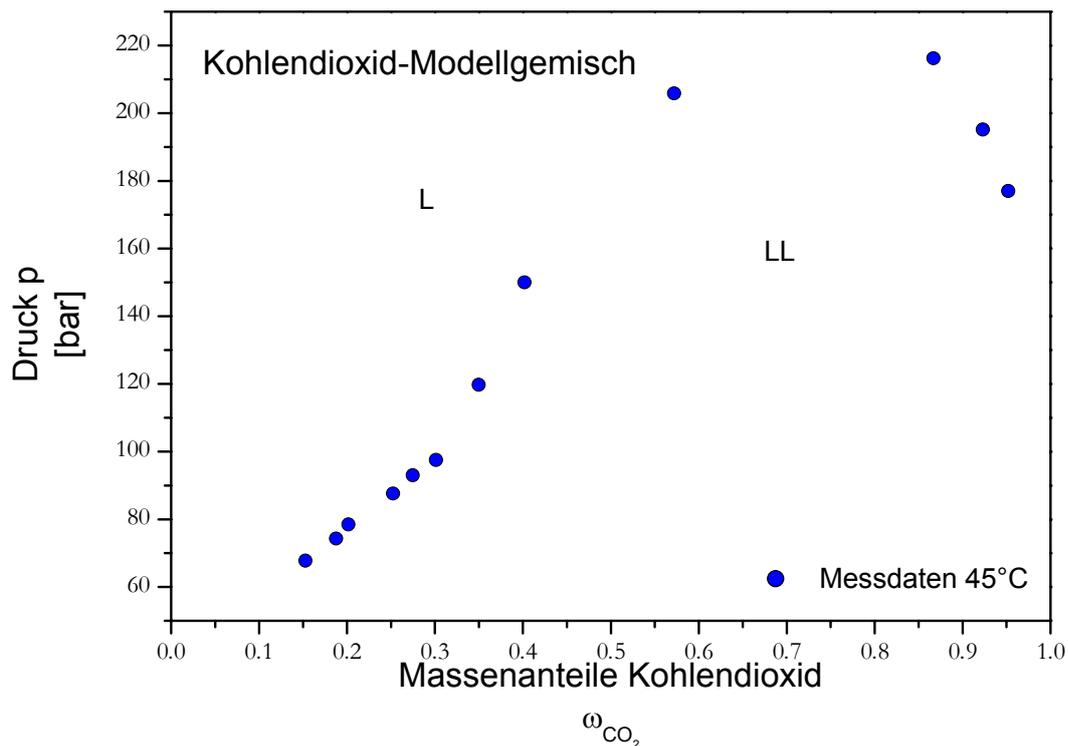


Abbildung 29. p,w-Diagramm der pseudobinären Mischung Kohlendioxid-Modellgemisch. Aufgetragen sind Trübungspunkte aus optischen Messungen in der Hochdrucksichtzelle bei 45°C. Beschriftet sind weiterhin das Einphasengebiet (L), sowie das Zweiphasengebiet (LL).

Aus dem Vergleich von Abbildung 27 und Abbildung 29 geht hervor, dass sich die organische Phase bezüglich ihres Phasengleichgewichtsverhaltens in komprimiertem Kohlendioxid prinzipiell wie reines BEHP verhält. Neben dieser Information können aus den gewonnenen Messdaten auch Erkenntnisse über die Verteilung des Kohlendioxids in den im Zweiphasengebiet existierenden Phasen gewonnen werden. Diese sind für eine Betrachtung der weiteren Aufarbeitung unerlässlich.

Um Daten zur Selektivität der Extraktion bei hohen Konzentrationen an Kohlendioxid zu erhalten, wurden mit dem oben beschriebenen Versuchsaufbau drei Extraktionsversuche durchgeführt. In Abbildung 30 sind die mit komprimiertem Kohlendioxid extrahierten Massenanteile der organischen Komponenten bei einem eingewogenen Massenanteil an Kohlendioxid von $w_{\text{CO}_2} = 0,83$ zu einem Massenanteil Modellgemisch von $w_{\text{Modellgemisch}} = 0,17$ gegen den Druck, bei einer Temperatur von 45°C, aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass der Massenanteil von Styroloxid in der CO_2 -Phase mit steigendem Druck stark zunimmt. Der Massenanteil der übrigen Komponenten in der CO_2 -Phase bleibt dabei nahezu konstant. Über den gesamten Versuch reichert sich das organische Lösungsmittel BEHP nicht in größeren Mengen in der CO_2 -Phase an. Diese Ergebnisse decken sich mit den

Beobachtungen, die bezüglich des Phasengleichgewichtsverhaltens des pseudobinären Systems Kohlendioxid-Modellgemisch gemacht wurden (siehe Abbildung 29).

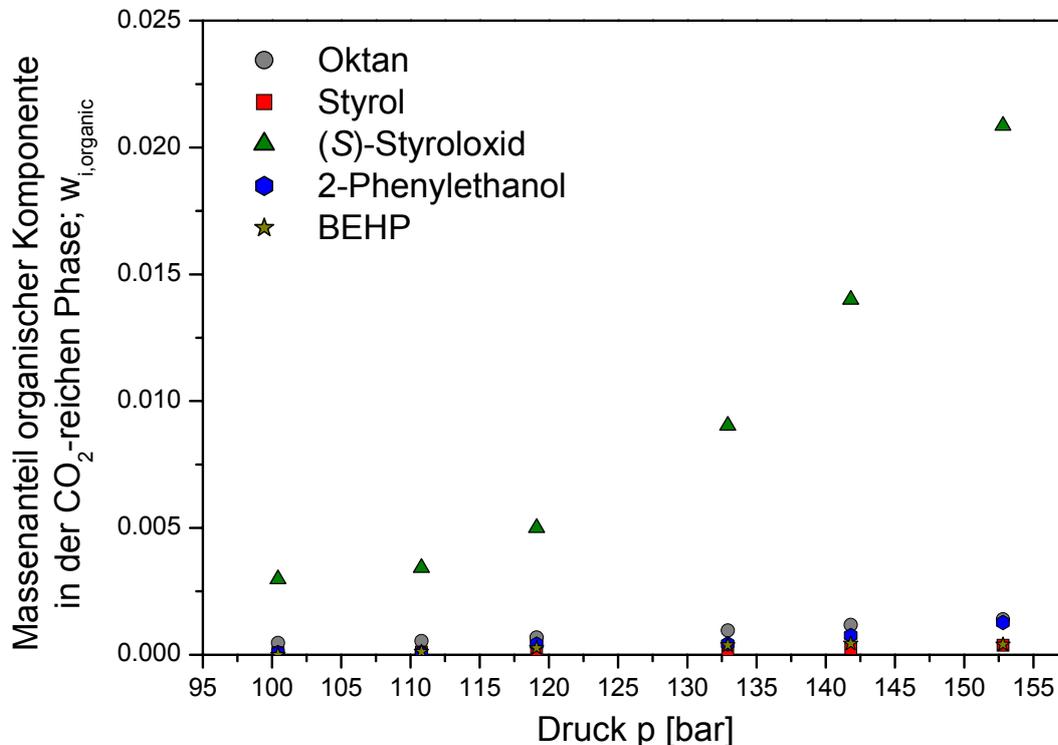


Abbildung 30. Extraktion der Komponenten der organischen Phase mit komprimiertem CO₂. Auftragung der bei einer Einwaage von 0,83 Massenanteilen Kohlendioxid und 0,17 Massenanteilen Modellgemisch im Gaschromatografen detektierten Massenanteile der organischen Komponenten in der Kohlendioxid-reichen Phase gegen den Druck.

Bei allen Versuchen zur Extraktion mit komprimiertem Kohlendioxid konnte beobachtet werden, dass ausgehend von niedrigen Drücken zwischen 90 und 110 bar bis hin zu den apparativen Limitierungen durch Kolbenposition und/oder Drucklimitation der Ventile eine selektive Zunahme des Massenanteils an Styroloxid in der CO₂-Phase stattfand. Es ist also eine selektive Extraktion des Wertproduktes gegeben.

4.6.4 Analyse zum Einfluss von Temperatur und CO₂-Konzentration auf das Extraktionsverhalten

Um den Einfluss der Prozessgrößen Temperatur und CO₂-Konzentration auf das Extraktionsverhalten zu ermitteln, wurden weitere Extraktionsversuche in der Hochdrucksichtzelle durchgeführt. Hierbei wurde ein definiertes Massenverhältnis

von Kohlendioxid zu Modellgemisch vorgelegt und anschließend bei konstantem Druck vermessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 31 dargestellt.

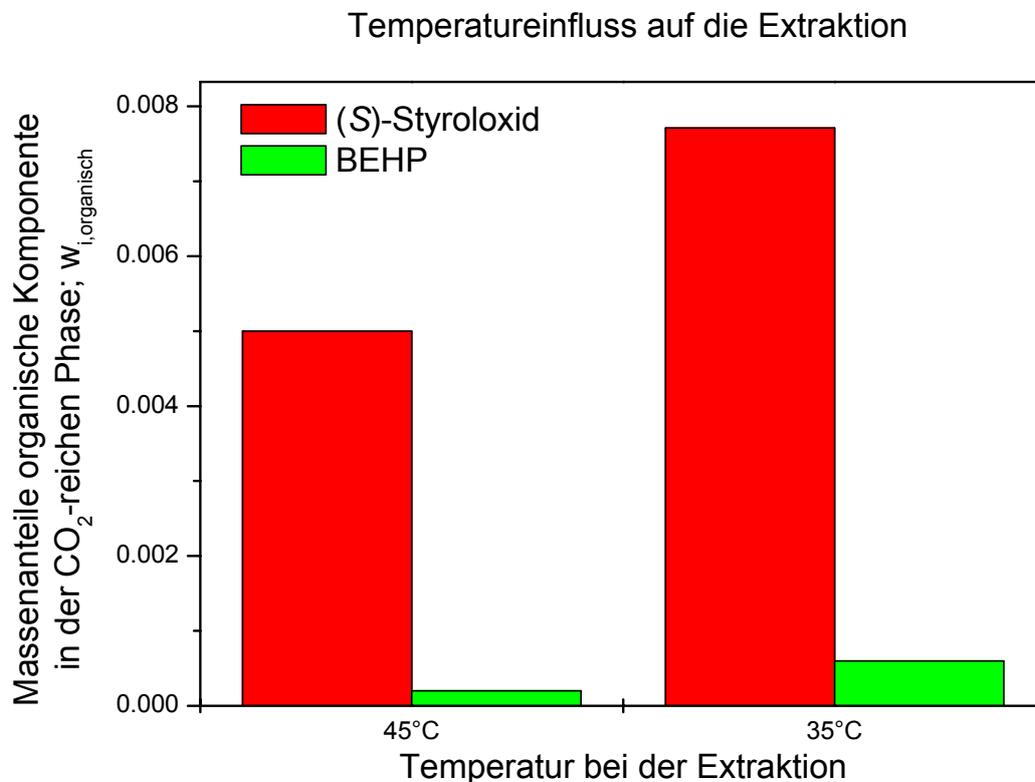


Abbildung 31. Temperatureinfluss auf das Extraktionsverhalten von (S)-Styroloxid und BEHP in komprimiertem Kohlendioxid bei 120 bar und konstantem Massenanteil Kohlendioxid im "Feed" von 0,83.

Es ist zu erkennen, dass die Menge an Styroloxid in der CO₂-reichen Phase bei gleichem Druck bei einer Temperatur von 35°C höher ist als bei einer Temperatur von 45°C.

Nach der Untersuchung des Temperatureinflusses wurde nun der Einfluss der Kohlendioxid-Konzentration im „Feed“ bestimmt. Hierzu wurden Messungen bei 45°C und einem Druck von 145 bar durchgeführt. Variiert wurde lediglich der Massenanteil von Kohlendioxid in einem mit KD-Pharma abgestimmten Konzentrationsbereich. Die Ergebnisse sind in Abbildung 32 zusammengefasst.

Einfluss des Massenanteils an Kohlendioxid auf die Extraktion

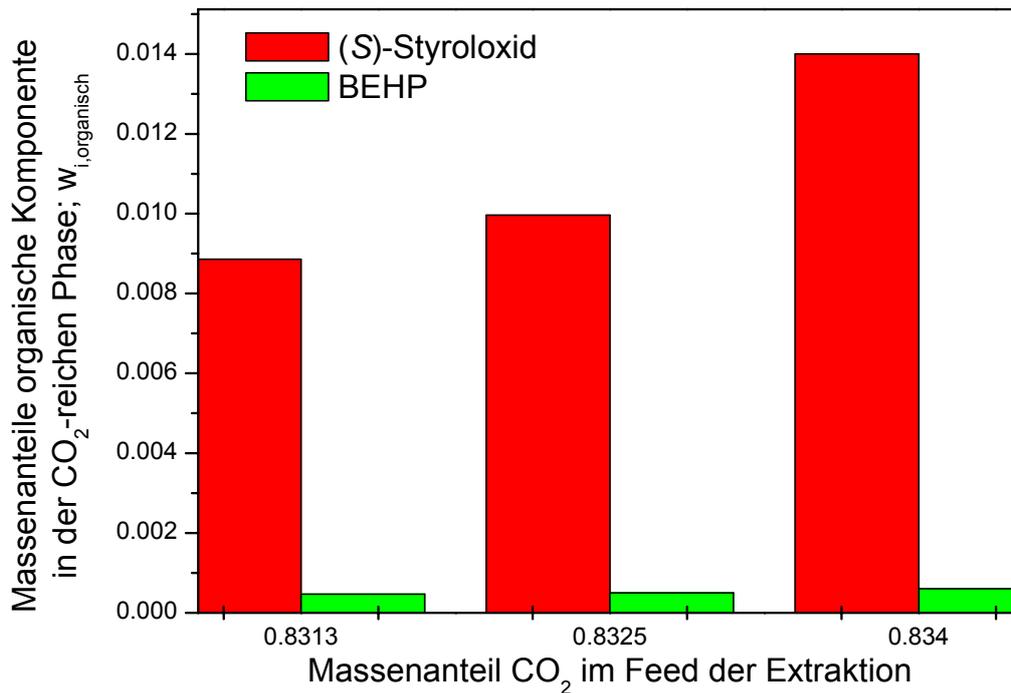


Abbildung 32. Einfluss des Massenanteils an Kohlendioxid auf das Extraktionsverhalten von (S)-Styroloxid und BEHP in komprimiertem Kohlendioxid bei 145 bar und 45°C.

Es ist zu erkennen, dass die Konzentration an Styroloxid, in der CO₂-reichen Phase, erwartungsgemäß bei gleichem Druck und gleicher Temperatur mit zunehmender CO₂-Konzentration steigt.

4.6.5 Extraktionsverhalten im Mehrkomponentensystem (organisches Lösungsmittel Ethyloleat) mit komprimiertem Kohlendioxid

Da Ethyloleat bei den im vorigen Kapitel angegebenen Extraktionsbedingungen bereits vollständig im Kohlendioxid löslich ist (vergl. Abbildung 28), ist eine Extraktion des Styroloxids mit komprimiertem CO₂ aus diesem Lösungsmittel technisch nicht realisierbar.

4.6.6 Ablagerungen von biogenen Stoffen

Bei den optischen Messungen wurden nicht nur wichtige Daten zum Trennverhalten der Emulsion gemessen, sondern auch Ablagerungen von biogenen Stoffen in der Apparatur beobachtet. Rückstände aus der Emulsion überzogen die Messzelle in Form von Partikelagglomeraten mit einem dünnen Film, der sich nur schwer entfernen ließ. Durch Auswaschen der Messzelle mit Aceton oder Ethanol konnten

diese ebenso wenig entfernt werden wie durch Spülen mit destilliertem Wasser. Erst durch eine Mukasol® Reinigungslösung konnte eine Reinigung der Oberflächen erreicht werden. Der Film bildete sich dabei gleichermaßen auf Metall- und Glasoberflächen (Saphirkolben).

4.6.7 Schlussfolgerung

Aus den Experimenten zur Druck-, Temperatur- und CO₂-Konzentrationsabhängigkeit des Extraktionsverhaltens konnten weiterhin wichtige Erkenntnisse hinsichtlich einer Prozessimplementierung gewonnen werden.

So nimmt bei einer Temperatur von 35°C bereits bei Drücken ab 160 bar die Konzentration an BEHP in der Kohlendioxid-reichen Phase stärker zu als die des Styroloxids (bei einem CO₂-Massenanteil von 0,83). Hierdurch wird eine große Menge an BEHP in der CO₂-reichen Phase mitgerissen, wodurch eine weitere Aufarbeitung zur Abtrennung des Wertproduktes von mitgerissenem Lösungsmittel nachgeschaltet werden muss. Bei einer Temperatur von 45°C tritt dieser Effekt erst bei wesentlich höheren Drücken auf. Daher wird eine Extraktion bei Temperaturen um 45°C empfohlen, da hier wenig BEHP in der CO₂-reichen Phase gelöst ist und dennoch eine hinreichende Menge Styroloxid in der CO₂-reichen Phase gelöst werden kann.

Aus Experimenten zur CO₂-Konzentrationsabhängigkeit konnte gezeigt werden, dass bei einer Erhöhung des Kohlendioxidanteils im „Feed“ über 0,87 der Anteil an extrahiertem Lösungsmittel stark ansteigt. Wie sich bei Versuchen der KD-Pharma gezeigt hat, werden bei einem Massenanteil von CO₂ größer 0,87 bereits signifikante Mengen an Lösungsmittel mitgerissen. Dies beruht auf der Tatsache, dass der Dichteunterschied der vorliegenden Phasen in der Nähe des Einphasengebietes nahe Null ist. Daher wird für die Extraktion ein Massenanteil von CO₂ im „Feed“ von nicht mehr als 0,85 empfohlen.

Die Wahl von Ethyloleat als Lösungsmittel würde eine Extraktion des Styroloxids aus der Reaktionsmischung erheblich erschweren. Eine selektive Produktextraktion im industriellen Maßstab wird vom Lehrstuhl für Thermodynamik als nicht realisierbar eingestuft.

Abschließend kann für die Extraktionsmessungen mit komprimiertem Kohlendioxid gesagt werden, dass es bei Verwendung des Lösungsmittels BEHP möglich ist, bestimmte Komponenten, in diesem Fall Styroloxid, bei bestimmten Drücken und

Massenverhältnissen Kohlendioxid zu organischer Phase selektiv in die Kohlendioxid-reiche Phase zu überführen.

4.7 Produktextraktion über SFE/SFC

4.7.1 Aufbau und Inbetriebnahme einer präparativen Laboranlage für die SFE/SFC

Für Versuche zur Supercritical Fluid Extraction (SFE) und Supercritical Fluid Chromatography (SFC) als Aufarbeitungsmethode für 2-phasige Bioprozesse wurde von der KD-Pharma eine SFE/SFC-Technikumsanlage entworfen und gebaut. Da es sich bei dieser Anlage um eine hoch spezialisierte Technik handelt, deren Einzelteile nicht oder nur zu sehr hohen Preisen käuflich erworben werden können, wurde ein Großteil der Anlage im Hause entworfen und gebaut (Abbildung 33 und Abbildung 34, Tabelle 8). Dieser Bau nahm mehr Zeit in Anspruch als geplant (siehe unten).

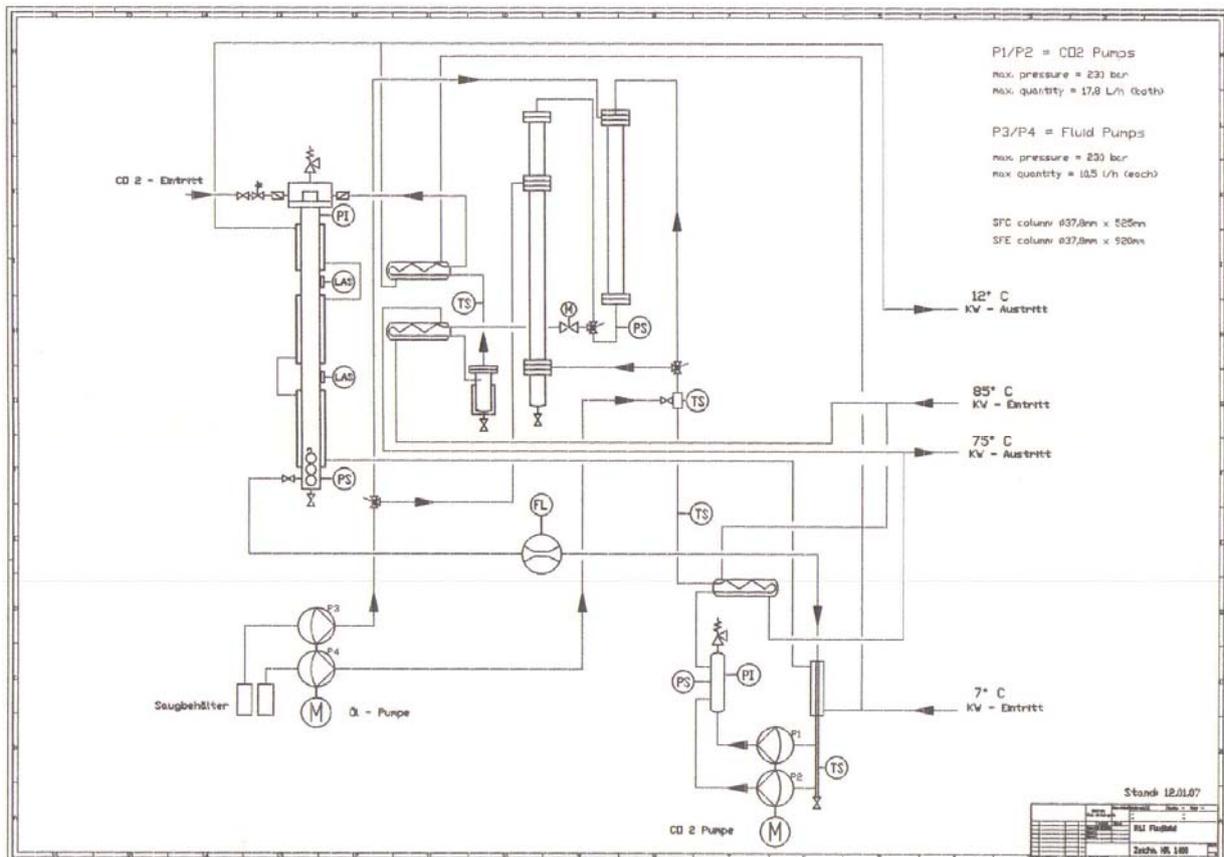
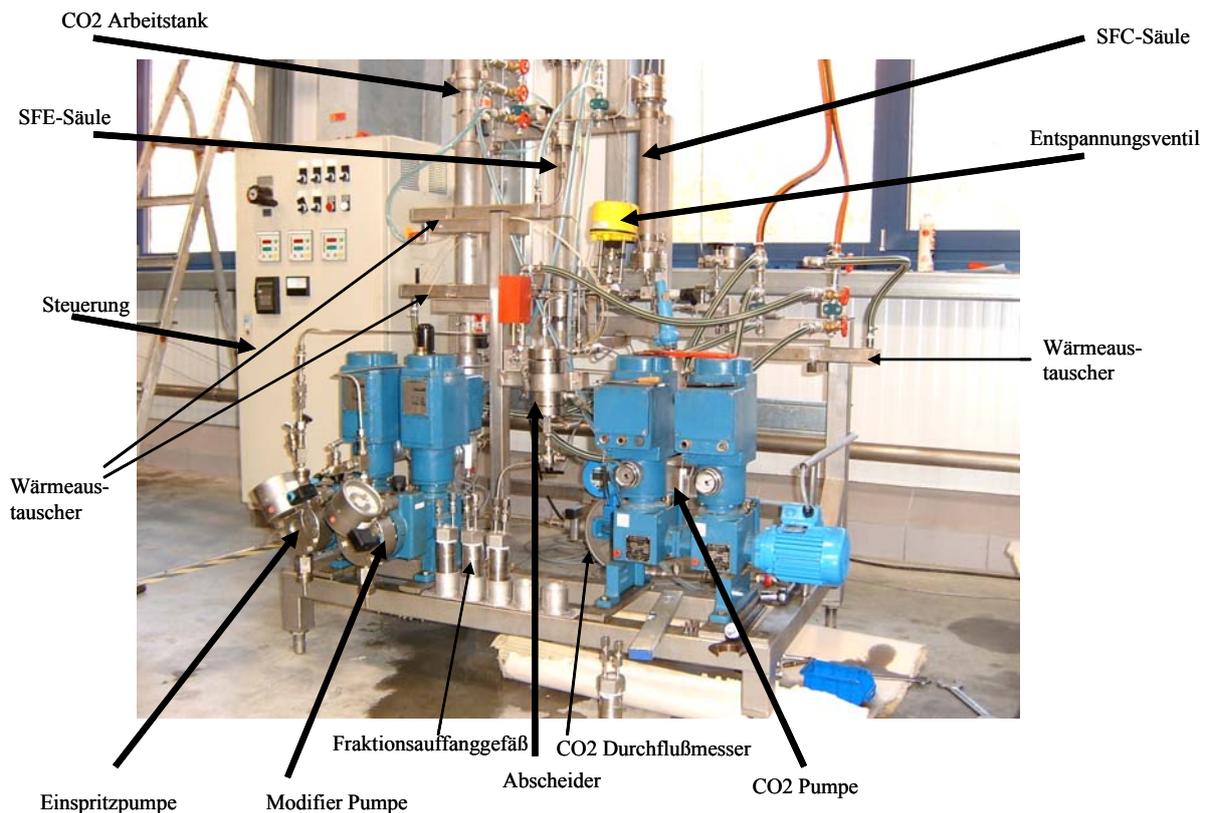


Abbildung 33. Schematischer Aufbau der SFE-/SFC Pilotanlage



KD-Pharma Bexbach GmbH

Abbildung 34. Photo der SFE/SFC-Pilotanlage (KD-Pharma Bexbach GmbH).

Die Anlage zeichnet sich insbesondere dadurch aus, daß sie sowohl im SFE- als auch im SFC-Modus gefahren werden kann. Sie zeichnet sich durch folgende Eigenschaften aus:

- Hohe Flexibilität (Betriebsdruck variabel bis 230 bar, Betriebstemperatur bis 70°C, Fluß bis 17,8 L/h.)
- Modifizierpumpe (insbesondere für SFC-Modus wichtig)
- 4 unabhängige Fraktionsauffanggefäße für SFC-Modus
- Einfaches Umschalten vom SFC- auf SFE-Modus (Gegenstrom SFE)
- Verhältnismäßig große SFC-Säule (fast 590 mL) zum präparativen Arbeiten
- Hohe Sicherheitsvorkehrung zur Verhinderung von unkontrollierten Aerosolaustritt
- Einfache und bedienungsfreundliche Steuerung (SPS mit PLS)

Tabelle 8. Kenndaten der wichtigsten Pilotanlagenbestandteile.

	Nr.	Hersteller	Eigenschaften	Bemerkungen
CO2 Pumpe	2	Lewa	pmax = 230 bar, Flußmax = 17,8 L/h	Kolben für CO2-Betrieb von KD bearbeitet
Öl-Pumpe	1	Lewa	pmax = 230 bar, Flußmax = 10,5 L/h	
Modifier	1	Lewa	pmax = 230 bar, Flußmax = 10,5 L/h	
SFC-Column	1	KD-Pharma	pmax= 250 bar; 37,8mm x 525mm (589 ml), 321 g Kiesgelpackung	
SFE-Column	1	KD-Pharma	pmax= 250 bar; 37,8mm x 920mm (1.032 ml)	
CO2-Arbeitstank	1	KD-Pharma	pmax = 70 bar; Volumen=2,9L	Mit 3 Schwimmern versetzt zur Füllmengenüberprüfung
Probenabscheider	1	KD-Pharma	pmax = 70 bar, Zyklonabscheider	
Fraktionauffanggefäße	4	KD-Pharma	pmax = 1 bar	Spezielles Sicherheitsvorrichtung zur Vermeidung von Aerosolaustritt
Wärmeaustauscher 1	1	KD-Pharma	pmax = 70 bar; (Vorkühler)	Vor CO2-Pumpe
Wärmeaustauscher 1	1	KD-Pharma	pmax = 250 bar;(Heizung)	Vor SFC/SFE Säule
Wärmeaustauscher 1	1	KD-Pharma	pmax = 70 bar; (Verdampfer)	Nach Entspannungsventil
Wärmeaustauscher 1	1	KD-Pharma	pmax = 70 bar; (Kondensor)	Vor CO2-Arbeitstank
Entspannungsventil	1	Kämmer	Durchgangsventil Serie 0800E2	
CO2-Durchflussmesser	1	Krohne	MFS3000 10E, pmax=250 bar; 0,25 Kg/min	
Steuerung	1	KD-Pharma	SPS mit PLS	

4.7.1.1 Prinzipielle Verfahrenbeschreibung: Counter-Current-SFE (ccSFE)

Bei der SFE, genauer gesagt der Gegenstrom-SFE oder counter-current-SFE (ccSFE) handelt es sich um ein selektives, kontinuierliches und umweltschonendes Extraktionsverfahren. Hierbei wird die aufzutrennende Probe im oberen Drittel der Säule kontinuierlich in den entgegenkommenden CO₂-Strom fein zerstäubt. Das überkritische CO₂ wird im unteren Teil der Säule eingeleitet und strömt nach oben. Die feinen Probentröpfchen, die beim Einspritzen der aufzutrennenden Lösung entstehen, fallen aufgrund der Schwerkraft nach unten und werden je nach ihrer Löslichkeit bei den gegebenen Trennbedingungen (p, T und Fluß von CO₂) in eine CO₂-lösliche und in eine CO₂-unlösliche Fraktion aufgetrennt. Die CO₂-lösliche Fraktion wird im oberen Teil der Trennkolonne, in der sogenannten „Kopffraktion“ gewonnen, während die CO₂-unlösliche Fraktion im „Sumpf“ der Kolonne abgelassen werden kann.

4.7.1.2 Prinzipielle Verfahrenbeschreibung: Supercritical Fluid Chromatography (SFC)

Die Chromatographie mit überkritischen CO₂ zeichnet sich durch ihre hohe Selektivität und vor allem dadurch aus, dass sie ohne organische, meist toxische Lösungsmittel auskommt. Wie bei jedem chromatographischen Prozess werden auch bei der SFC die zu gewinnenden Fraktionen stark in der mobilen Phase verdünnt. Im Gegensatz zur klassischen Flüssigkeitschromatographie, wo dabei im Produktionsmaßstab tonnenweise hoch toxische und entflammbare Lösungsmittel anfallen, erhält man bei der präparativen SFC die gewünschte Fraktion in ihrer aufkonzentrierten Form. Das verwendete CO₂ wird bis zu 99% im Kreislauf gefahren. Es entfallen somit enorme Kosten für das Handling, Lagerung und das Abdestillieren von sonst üblichen organischen Lösungsmitteln.

Die im Rahmen des Projektes AZ 13145 gebaute SFC-Pilotanlage enthält eine Säule von 525 mm Länge mit einem inneren Durchmesser von 37,8 mm. Ihr reales Bettvolumen beträgt etwa 500 mL, die mit 321 g stationärer Phase (= modifiziertes Kieselgel) gefüllt sind. Geht man nun von der Daumenregel aus, daß im präparativen Maßstab je Gramm Kieselgel etwa 10-30 mg aufzutrennendes Gemisch aufgegeben werden können, so ist zu erwarten, dass wir auf unserer Pilotanlage mindestens 3–10 g „SFE-Kopffraktion“ pro Injektion aufarbeiten können. Ziel ist eine maximale Ausbeute an möglichst reinem Styroloxid.

4.7.2 Versuche mit der Gegenstrom SFE (cc-SFE)

Bedingt durch das toxische Potential von Styrol, Styroloxid und BEHP, die hohen Mengen an Material, das für die Versuche eingesetzt werden mußte, und die starke Aerosolbildung bei der ccSFE wurde die cc-SFE-Methodenentwicklung zunächst mit einer Modelllösung 1 durchgeführt (Tabelle 9). Bei dieser Modelllösung 1 wurde das Styroloxid durch Toluol ersetzt. Anschließend wurde eine Modelllösung 2 angesetzt, die Styroloxid enthielt und der tatsächlichen Zusammensetzung der organischen Phase aus dem Bioprozess sehr ähnlich war (Tabelle 9). Mit Modelllösung 2 sollten die SFE- Extraktionsbedingungen, die zuvor mit Modelllösung 1 gefunden wurden, bestätigt werden. Erst anschließend wurde die originale organische Phase aus dem Bioprozess nach Abtrennung der Biomasse auf der ccSFE-Anlage gefahren.

Tabelle 9. Zusammensetzung der Modellösungen 1 und 2 sowie der organischen Phase aus dem Bioprozess in g pro 100 g.

	Modellösung 1 (g/100g)	Modellösung 2 (g/100g)	Originale organische Phase* (g/100g)
BEHP	74,89	92,36	73,5
Toluol	20,37	0	0
Styroloxid	0	6,78	19,7
2-Phenylethanol	3,26	0,21	1,5
n-Oktan	0,77	0,63	5,3

- = organische Phase aus dem Bioprozess

4.7.2.1 Optimierung der Extraktionstemperatur (bei $p = \text{konst.}$)

Um den Einfluß der Extraktionstemperatur auf die Trennselektivität der ccSFE zu bestimmen wurden verschiedene Läufe bei konstanten Extraktionsdruck (117 bar) und konstantem CO₂-Fluß (12 L/h) gefahren. Diese Läufe wurden mit Modellösung 1 bei 40 °C, 48 °C und 60 °C durchgeführt. Aus Vorversuchen war bereits bekannt (siehe Abbildung 30), daß bei einem Druck von etwa 110 bis 120 bar ein ausreichend großer Unterschied in der Löslichkeit von BEHP und Styroloxid vorliegt.

Abbildung 35, Abbildung 36 und Abbildung 37 zeigen die Zusammensetzung der Aufgabelösung (Modellösung 1) sowie der Kopf- und Sumpffraktion aus der ccSFE bei verschiedenen Temperaturen.

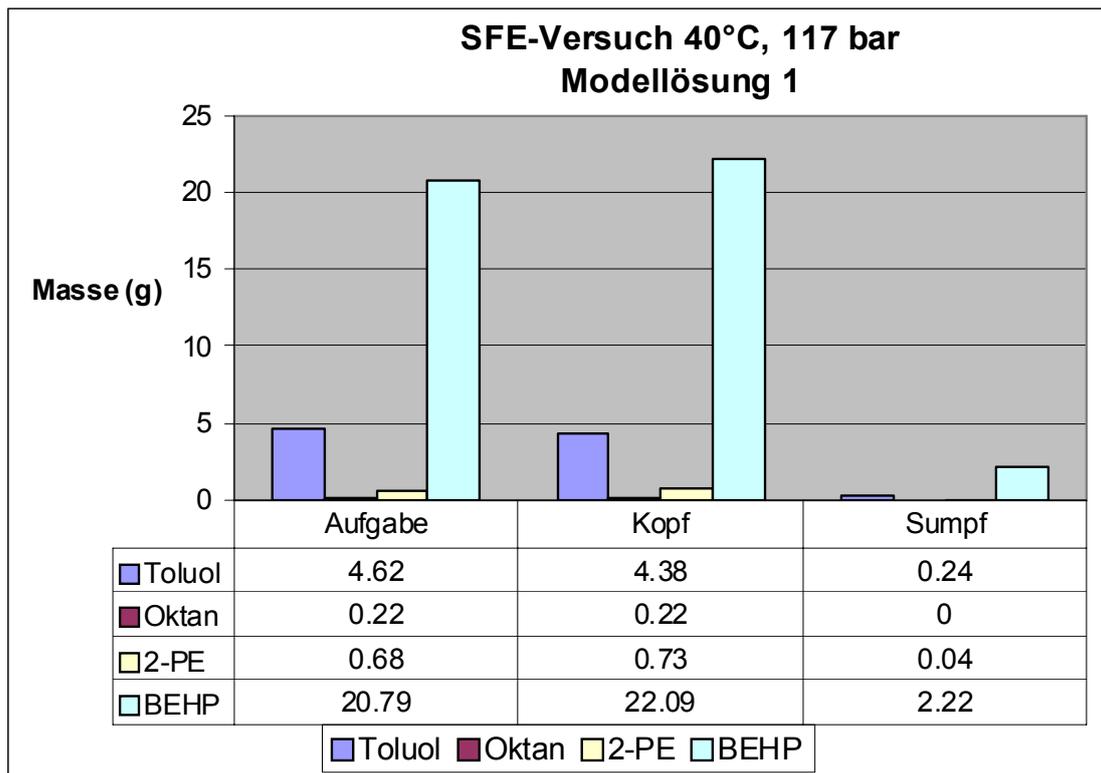


Abbildung 35. Zusammensetzung der Kopf- und der Sumpffraktion in der ccSFE bei 40°C und 48°C (117 bar, 12 kg CO₂/h) in Gramm der Modellösung 1.

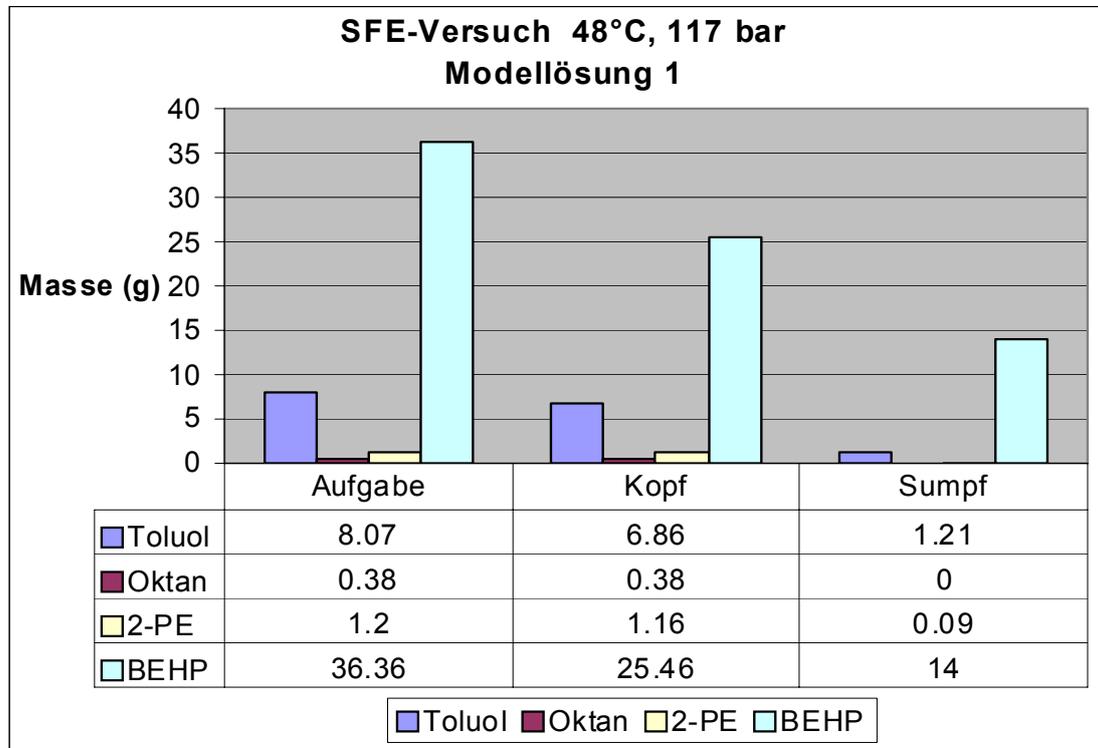


Abbildung 36. Zusammensetzung der Kopf- und der Sumpffraktion in der ccSFE bei 48°C (117 bar, 12 kg CO₂/h) in Gramm der Modellösung 1.

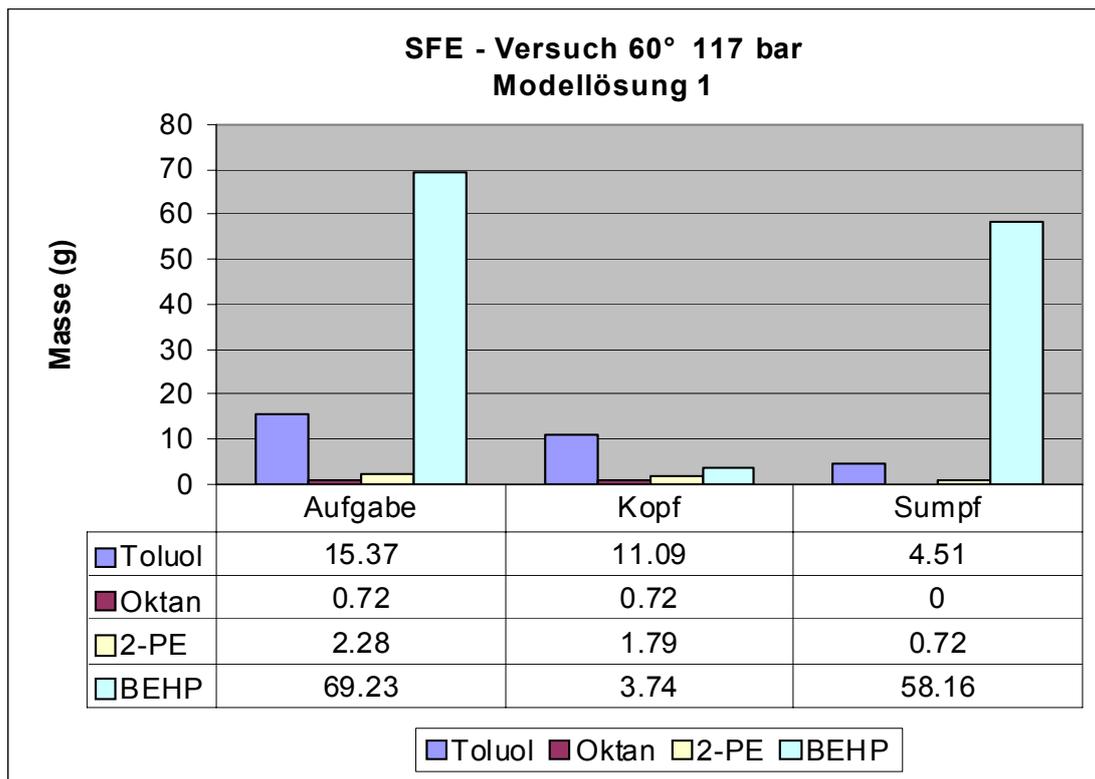


Abbildung 37. Zusammensetzung der Kopf- und der Sumpffraktion in der ccSFE bei 60 °C (117 bar, 12 kg CO₂/h) in Gramm der Modellösung 1.

Aus diesen Abbildungen erkennt man, daß bei einem Extraktionsdruck von 117 bar und einem CO₂-Fluß von 12 kg/h die beste Selektivität bei 60°C erzielt wurde. Eine höhere Temperatur konnte aus apparativen Gründen nicht eingestellt werden.

In Vorversuchen (siehe Abbildung 30) wurde gefunden, daß BEHP nur sehr schwer in überkritischem CO₂ löslich ist, während sich die übrigen Komponenten der organischen Phase recht gut lösen. Daher überraschen im ersten Augenblick die Ergebnisse in Abbildung 35, Abbildung 36 und Abbildung 37. Ein ziemlich hoher Anteil an BEHP wurde in der Kopffraktion gefunden. Da BEHP in CO₂ weitestgehend unlöslich ist, sollte es fast quantitativ in der Sumpffraktion vorliegen. Dies konnte jedoch nicht bestätigt werden. Selbst bei 60°C befanden sich noch 21,6% des BEHP in der Kopffraktion der ccSFE. Diese Beobachtung läßt sich folgendermaßen erklären:

Scheinbar wird auf Grund des hohen BEHP-Überschusses in der Aufgabelösung (Modellösung 1 besteht aus ca. 80% BEHP) ein Teil des BEHPs mit dem CO₂-Strom ungelöst nach oben in die Kopffraktion mitgerissen. Je tiefer die Extraktionstemperatur gewählt wird, bei konstanten Druck, desto höher wird die

Dichte des CO₂ und damit auch die Gefahr des Verschleppens von BEHP in die Kopffraktion.

Zusätzlich ist zu bedenken, daß sich ein geringer Teil des BEHP trotz der tiefen Löslichkeit des BEHPs in CO₂ löst. Aufgrund des hohen Überschusses an BEHP in der aufzutrennenden Probelösung gewinnt dieser geringe lösliche Teil aber an Bedeutung und wird daher eine vollständige Abtrennung des BEHPs vom Produkt Styroloxid (Toluol) in einem ccSFE-Schritt unmöglich machen.

4.7.2.2 Reproduzierbarkeit der Extraktion

Um zu Überprüfen, ob die ccSFE bei konstanten Extraktionsbedingungen (CO₂-Fluß, Temperatur und Druck) reproduzierbare Ergebnisse liefert, wurde die Modellösung 1 mehrmals hintereinander an verschiedenen Tagen bei 117 bar, 60 °C und 12 kg CO₂/h, aufgereinigt.

Wie aus Abbildung 38 und Abbildung 39 ersichtlich wird, kann von einer ausreichenden Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ausgegangen werden.

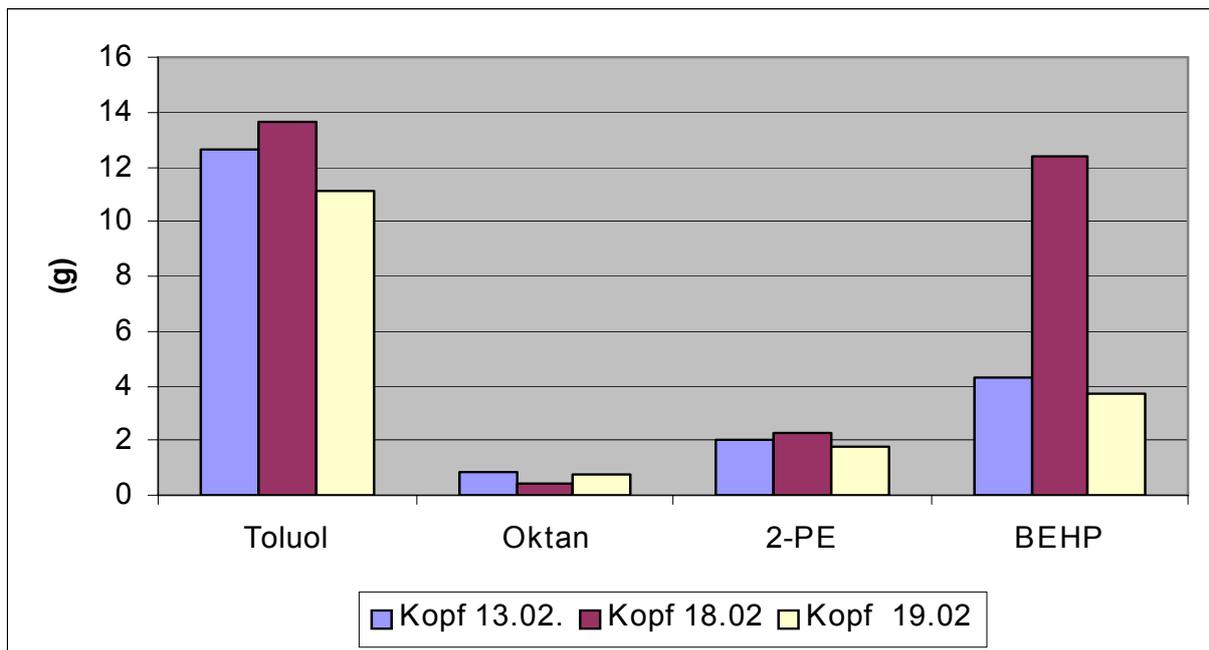


Abbildung 38. Zusammensetzung der ccSFE – Kopffraktion in Reproduzierbarkeitsversuchen an verschiedenen Tagen.

Modellösung 1 bei 117 bar, 60 °C, 12 kg CO₂/h.

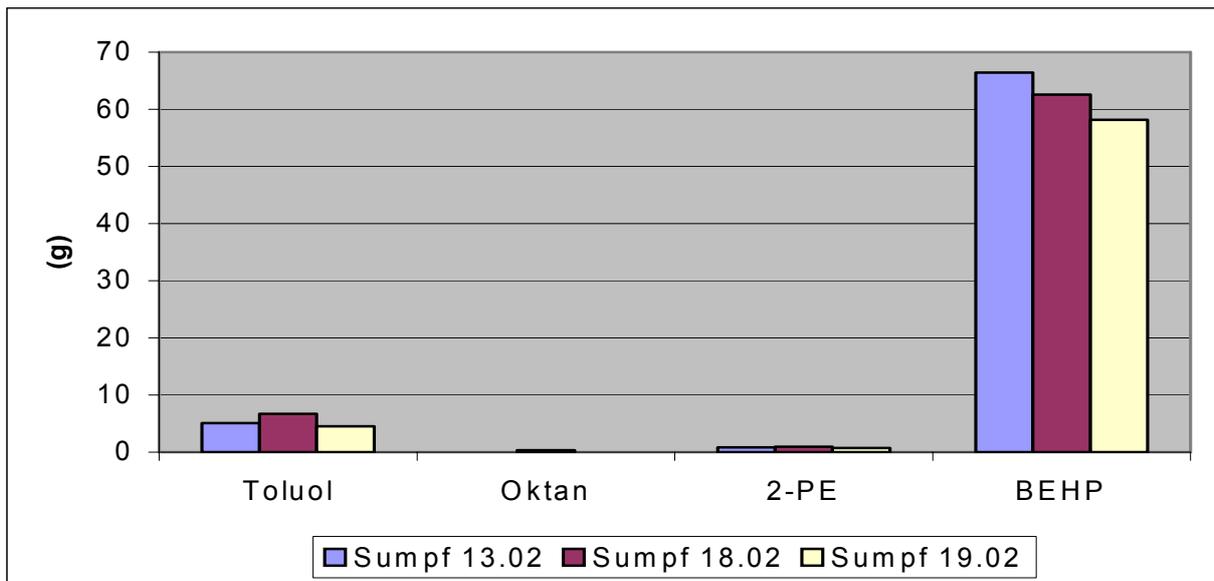


Abbildung 39. Zusammensetzung der ccSFE – Sumpffraktion in Reproduzierbarkeitsversuchen an verschiedenen Tagen.

Modellösung 1 bei 117 bar, 60 °C und 12 kg CO₂/h.

Zwar zeigt die am 18.02.2008 erhaltene Kopffraktion einen deutlich höheren BEHP-Gehalt als die Vergleichsfraktionen, doch sind alle anderen Komponenten der Kopf- und Sumpffractionen durchaus vergleichbar. Der Ausreißerwert von BEHP am 18.02.2008 ist wahrscheinlich auf ein zuvor ungenügend gereinigtes Auffanggefäß zurückzuführen.

4.7.2.3 Aufreinigung der Modellösung 1 mit ccSFE unter optimierten Extraktionsbedingungen.

Um eine möglichst gute Abtrennung des BEHP von der Kopffraktion (Styroloxid bzw. Toluol) zu erreichen, wurde die erhaltene Kopffraktion erneut mittels ccSFE unter gleichen Extraktionsbedingungen behandelt. Insgesamt 4 mal wurde dieser Vorgang wiederholt.

Diese, zunächst sehr aufwendig erscheinende Versuchsreihe ist von großer Bedeutung, da mit jedem neuen Durchgang durch die ccSFE-Säule die effektive Säulentrennstrecke um die im Versuch eingesetzte Säulenlänge verlängert wird. In unserem Fall wurde 4 mal aufgearbeitet. Dies bedeutet, dass wir unsere effektive Säulentrennstrecke, und damit die theoretischen Trennstufen, um das 4-fache erhöht haben. In der Praxis würde man gleich eine 4-fach längere ccSFE-Trennsäule verwenden und könnte so vergleichbare Ergebnisse erzielen und zusätzlich

kontinuierlich produzieren. Die für dieses DBU-Projekt erbaute ccSFE-Anlage war mit einer Säule von 92 cm ausgestattet. Durch das wiederholte Aufarbeiten konnte eine Trennsäule von 368 cm Länge simuliert werden. Zudem kann die Extraktionseffizienz durch Kolonneneinbauten wie zum Beispiel Packungen erhöht werden.

Abbildung 40 zeigt die Ergebnisse dieser wiederholten Aufarbeitung der gewonnenen Kopffractionen aus Modellösung 1. Dabei wird ersichtlich, dass der BEHP-Anteil in der Kopffraction stark abnimmt während gleichzeitig der Toluol-Anteil (Ersatz für Styrol) stark zunimmt.

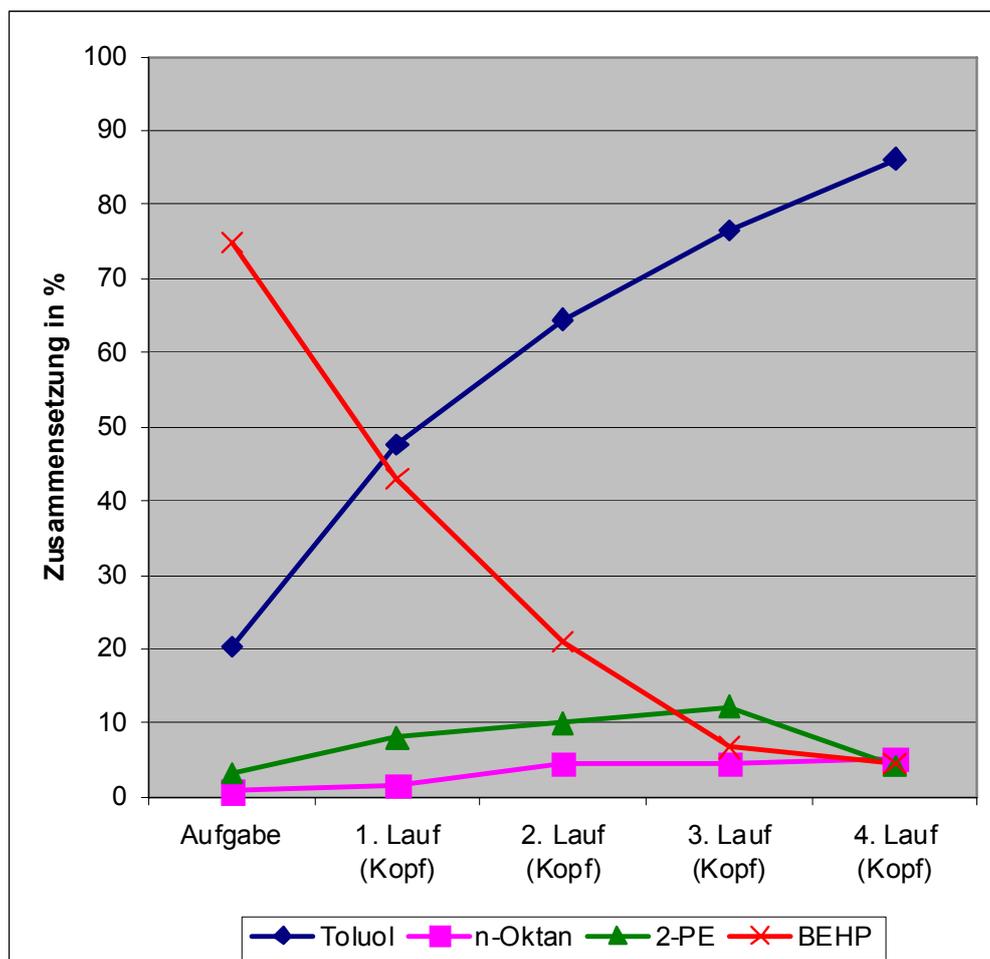


Abbildung 40. Zusammensetzung der ccSFE Kopffractionen in % nach 4-facher Aufarbeitung.

Abbildung 40 deutet ebenfalls darauf hin, dass ein erneuter Durchgang der im vierten Durchlauf erhaltenen Kopffraction eine weitere Verbesserung der Trennung ergeben sollte. Dies entspräche einer ccSFE Säulenlänge von 460 cm. Mit einer solchen Säule sollte man bei 117 bar und 60°C eine über 90% reine Toluol (Styroloxid) Fraktion erhalten können, die nur noch mit Resten an n-Oktan und 2-Phenylethanol

kontaminiert ist. Man erkennt jedoch auch, dass der Kurvenverlauf für den BEHP-Anteil abflacht und sich bei etwa 3-4% stabilisiert. Dies bedeutet, dass eine vollständige Abtrennung des BEHP von der Styroloxid-Phase mittels der hier eingesetzten ccSFE-Apparatur nicht zu erwarten ist.

4.7.2.4 Übertragung der ermittelten ccSFE Trennbedingungen auf die Aufreinigung von Modellösung 2 (mit Styroloxid statt Toluol)

Zur Überprüfung ob Modellösung 1 tatsächlich repräsentativ ist für die im Bioprozess erhaltenen organische Phase, wurde eine zweite Modellösung („Modellösung 2“ siehe Tabelle 9) angesetzt. Diese unterscheidet sich im wesentlichen von der Modellösung 1 dadurch, daß das Toluol in Modellösung 1 durch Styroloxid in Modellösung 2 ausgetauscht wurde. Allerdings wurde in Modellösung 2 aus Gründen des Arbeitsschutzes nur etwa ein Drittel der in der organischen Phase aus dem Bioprozess zu erwartenden Styroloxidmenge eingesetzt.

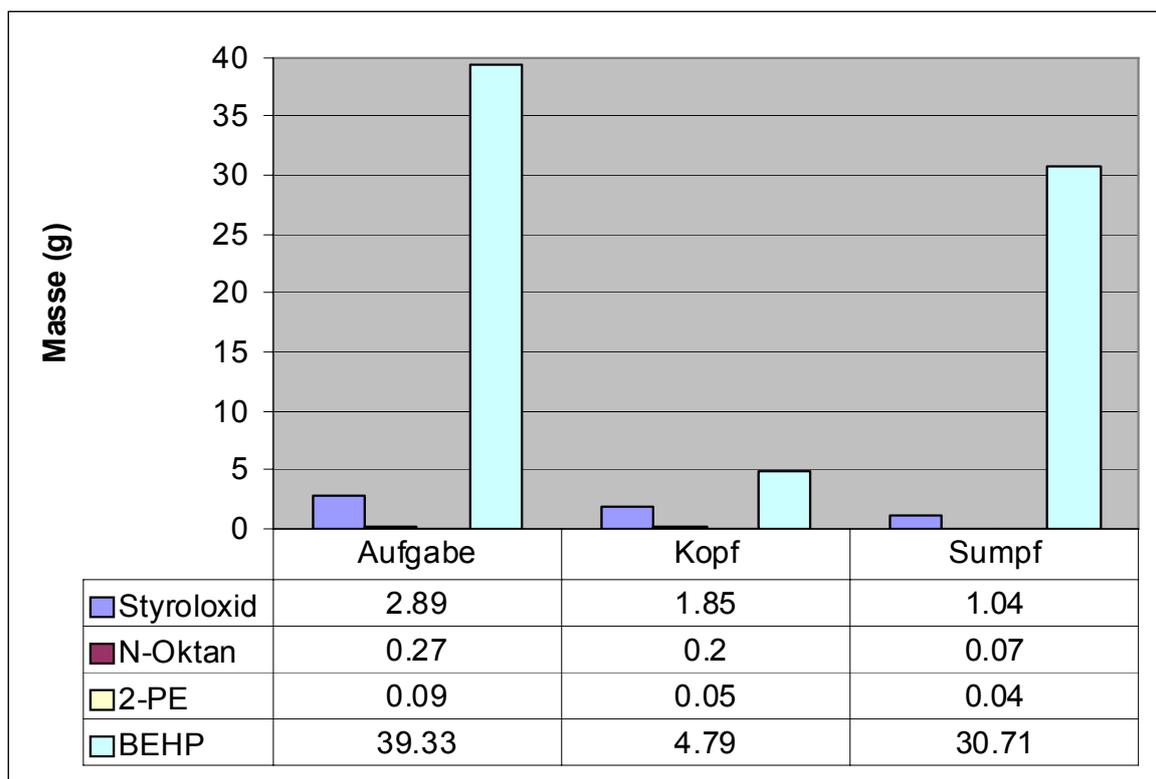


Abbildung 41. Zusammensetzung der Kopf- und Sumpffractionen von Modellösung 2 nach erster Aufarbeitung in der ccSFE bei 60°C und 117 bar (12 kg CO₂/h).

Vergleicht man Abbildung 41 mit Abbildung 37 so zeigt sich, daß Modellösung 1 und Modellösung 2 bei gleichen ccSFE-Bedingungen sehr ähnlich aufgetrennt werden.

Daher ist auch bei Modellösung 2 zu erwarten, daß bei einem kontinuierlichen Durchlauf mit einer längeren ccSFE-Trennsäule von etwa 4 bis 5 Metern Länge ein Styroloxidgehalt von etwa 90% erreicht wird.

4.7.2.5 *Aufreinigung der originalen organischen Phase aus dem Bioprozess mittels ccSFE*

Zur Überprüfung der mit den Modellösungen 1 und 2 erzielten Ergebnisse wurde unter identischen Trennbedingungen (60°C, 117 bar und 12 k CO₂/h) ein Versuch mit der originalen organischen Phase aus in Dortmund durchgeführten Biotransformationen gefahren.

Abbildung 42 zeigt die Verteilung der Hauptbestandteile der organischen Phase im aufgegebenen Gemisch sowie in der Kopf- und der Sumpffraktion. Wie bereits zuvor gefunden, wird auch in diesem Fall eine deutliche Aufreinigung des Styroloxides mit der ccSFE erzielt. Die Extraktionseffizienz war sogar etwas höher als mit den Modellösungen. Auch hier ist davon auszugehen, dass man mit einer verlängerten Trennsäule von 4 bis 5 Metern eine Styroloxidkonzentration von über 90% erreichen kann. Eine vergleichbar gute Trennung wäre ebenfalls mit einer kürzeren Trennsäule, die mit einem internen Rückfluß-System („Hot Finger“) ausgestattet ist, zu erreichen. Eine vollständige Abtrennung von BEHP ist jedoch auch hier nicht gelungen. Selbst bei einer längeren Trennsäule ist nach bisherigen Erkenntnissen eine vollständige Abtrennung von BEHP nicht zu erwarten und man muß mit einem verbleibenden Restgehalt von bis zu 5 % in der Styroloxidphase rechnen. Dies liegt zum Einen an der wenn auch geringen so doch vorhandenen Löslichkeit von BEHP in CO₂ bei 117 bar und 60°C. Zum Anderen könnte diese Restkontamination an BEHP in der gewonnenen ccSFE-Kopffraktion auf ein „Mitschleppereffekt“ zurückzuführen sein. Die für dieses Projekt gebaute ccSFE Apparatur enthält lediglich ein Leerrohr als ccSFE-Trennsäule. Daher ist es denkbar, daß ein Teil des BEHP's mit dem im Gegenstrom fließenden CO₂ in die Kopffraktion gelangt. Dieser Mitschleppereffekt würde eine höhere Löslichkeit des BEHP's im CO₂ vortäuschen. Vermutlich spielen beide Effekte (Löslichkeit und „Schleppereffekt“) eine Rolle wobei Letzterer überwiegen sollte.

Das Mitschleppen von BEHP kann durch eine Optimierung der Apparatur wie beispielsweise den Einsatz von Raschigringen deutlich vermindert oder gar verhindert werden.

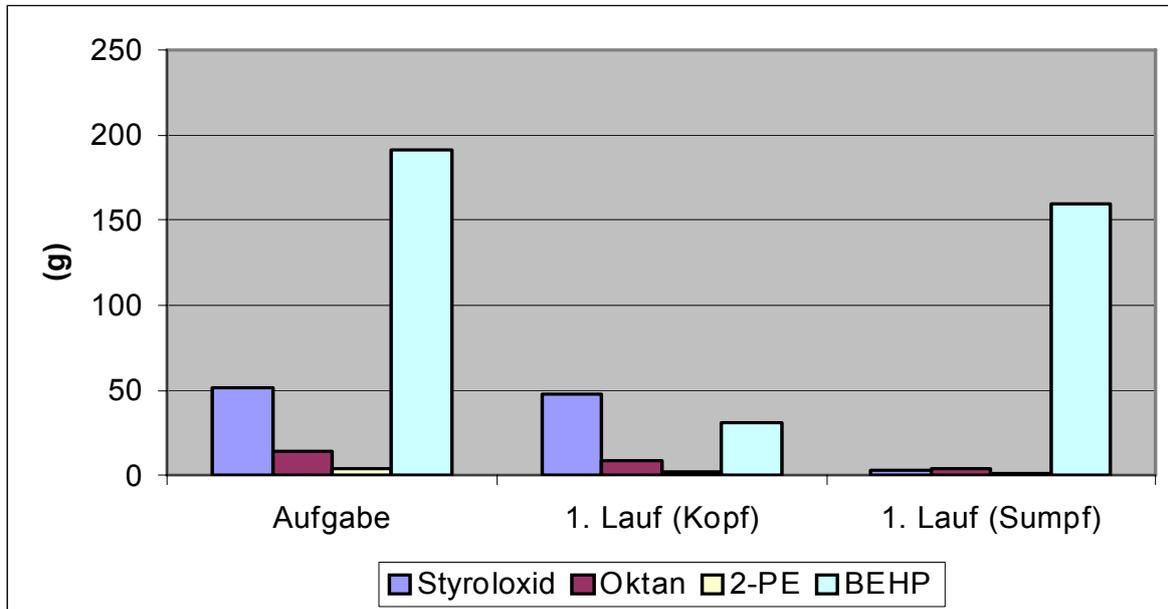


Abbildung 42. Zusammensetzung der Kopf- und Sumpffractionen von der originalen organischen Phase aus dem Bioprozess nach erster Aufarbeitung in der ccSFE bei 60 °C und 117 bar (12 kg CO₂/h).

4.7.2.6 Ergebnisse der ccSFE Versuche und deren Konsequenzen für die anschließend geplante chromatographische Endreinigung des biotechnologisch gewonnenen Styroloxides (Soll – Ist Vergleich).

Hypothese war, dass mittels einer kontinuierlichen ccSFE und anschließender diskontinuierlicher SFC (Chromatographie mit überkritischem CO₂) die organische Phase aus der Biotransformation mit dem wertgebenden Bestandteil Styroloxid effizient, wirtschaftlich und umweltfreundlich aufgearbeitet werden kann. Dabei sollte das BEHP, das im großen Überschuss vorlag, mittels ccSFE vollständig und das 2-Phenylethanol überwiegend von Styroloxid und n-Oktan abgetrennt werden. Die verbleibende Styroloxid-Phase sollte dann anschließend mittels überkritischer Chromatographie (SFC) weiter aufgearbeitet werden, um das Styroloxid quantitativ von n-Oktan und 2-Phenylethanol zu trennen. Entsprechende Vorversuche am Anfang des Projektes mit der analytischen SFC zeigten eine genügend hohe Selektivität des Trennsystems, um diese Endaufreinigung zu ermöglichen. Insbesondere der Einsatz einer Aminopropyltrennsäule erwies sich als vorteilhaft. Diese zeigte deutlich bessere Trennungen als die zum Vergleich verwendeten RP-18, Diol- oder Phenylsäulen.

Leider zeigte sich im Verlauf der ccSFE-Versuche im Pilotmaßstab, dass das BEHP nicht vollständig von den anderen Bestandteilen der organischen Phase abgetrennt werden konnte. Ebenfalls zeigte sich, daß das 2-Phenylethanol in CO₂ besser löslich war als zunächst erwartet. Vor allem der unerwartete Übergang des BEHP in die Kopffraktion der ccSFE hatte Konsequenzen für den nachfolgenden Endaufreinigungsschritt mittels SFC, da BEHP irreversibel auf der Aminopropylsäule absorbiert wird und selbst bei höheren Drücken (bis zu 240 bar) nicht mehr eluiert/desorbiert werden kann. Dies hat zur Folge, daß die Kapazität und schließlich auch die Selektivität der SFC-Säule mit jeder neuen Injektion stark abnimmt, und wäre von großem Nachteil für eine industrielle Anwendung dieses Verfahrens. Es ist zwar denkbar, das absorbierte BEHP mittels Alkohol als Modifier in CO₂ von der Trennsäule zu desorbieren. Für den industriellen Einsatz würde dies jedoch eine deutliche Produktionskostenerhöhung mit sich bringen, was nicht nur auf den zusätzlichen Alkoholverbrauch sondern auch auf die erhöhten Kosten für die Explosionsschutz, Lagerung, längere Rekonditionierungszeiten der SFC-Säule und somit verringerte Produktionskapazität zurückzuführen wäre.

4.7.3 Schlußfolgerung

Die in diesen Projekt gewonnenen Erkenntnisse bezüglich des Einsatzes der ccSFE und eventueller nachfolgender SFC als Down-Stream-Processing bei der biotechnologischen Produktion von Styroloxid lassen folgende Schlüsse zu:

- Eine deutliche Aufkonzentrierung des Styroloxides aus der organischen Phase des Bioprozesses von etwa 20% auf bis zu 90% sollte mittels dem kontinuierlichen ccSFE Verfahren unter Verwendung einer Trennsäule von 4 bis 5 Meter Länge möglich sein.
- n-Oktan geht wie erwartet quantitativ in die Kopffraktion der SFE über.
- 2-Phenylethanol geht ebenfalls in signifikanten Mengen in die Kopffraktion der SFE.
- BEHP konnte nicht quantitativ mittels ccSFE entfehrt werden. Es verblieb ein Restgehalt von etwa 3% bis 5%, der eine geplante anschließende chromatographische Endaufreinigung des Styroloxides mittels SFC unter Verwendung einer Aminopropylphase unmöglich machte.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die industrielle kontinuierliche ccSFE nach deren technischer Optimierung durchaus für die Aufkonzentrierung von Styroloxid aus der organischen Phase des Bioprozesses eingesetzt werden kann. Das für die Endaufreinigung vorgesehene SFC–Verfahren unter Verwendung einer Aminopropylphase und reinem CO₂ erwies sich als nicht durchführbar, bedingt durch die irreversible Absorption von BEHP an der stationären Phase des Systems. Zur finalen Reinigung wäre also noch ein Destillations- bzw. Rektifikationsschritt notwendig.

5 Diskussion

5.1 *Soll-/Ist-Vergleich – Begründung für Abweichungen – allgemeine Diskussion*

Tabelle 10 zeigt den Soll-/Ist-Vergleich für die verschiedenen Partner. Abweichungen im Vergleich zum Antrag werden im Folgenden diskutiert.

Aufgrund der Ökoeffizienzstudien der Universität Saarbrücken und der BASF wurde der primäre Fokus der Forschung in Dortmund auf die Verbesserung der Ökoeffizienz des Styrolepoxidationsprozesses verschoben. Der Einsatz von Ethyloleat und Glycerin war trotz leichten Einbussen bei der Produktivität und der erreichten Produktkonzentration vielversprechend.

Beide Ökoeffizienzstudien zeigten deutlich, dass Ethyloleat als organisches Lösungsmittel vom ökologischen Standpunkt her klar zu bevorzugen ist. Trotz leicht höheren eingesetzten Mengen kann die Umweltbelastung erheblich gesenkt werden, so ist die über die Methode von Heinzle et al. ermittelte Umweltkennzahl der Styrolepoxidierung mit Ethyloleat um rund 40% kleiner als im auf BEHP-basierten Prozess.

Weniger deutlich ist der Effekt der Umstellung von Glukose auf Glycerin als Wachstumssubstrat. Die BASF bewertet die landwirtschaftliche Produktion der Glukose wesentlich negativer als Heinzle et al., in deren Methode Glukose und Glycerin als equivalent bezüglich Umweltbelastung angesehen werden. Je nach Standort kann eine Umstellung jedoch durchaus sinnvoll werden, wenn Glycerin beispielsweise in einem Verbund als Abfallprodukt anfällt. Die steigenden Preise für

Glukose und die sinkenden Preise für Glycerin unterstreichen die Wichtigkeit alternative Wachstumssubstrate zu untersuchen.

Tabelle 10. Arbeitsprogramm und Meilensteine – Soll-/Ist-Vergleich.



Partner	Arbeitspakete	Projektlaufzeit			
		1. HJ	2. HJ	3. HJ	4. HJ
Partner 1: Uni-Dortmund	Katalysatorentwicklung/charakterisierung (Chinolinoxidation)	XX ✓	XX ✓		
	Metabolismusanalyse, Katalysatorengineering (alle Katalysatoren)	XX ✓	XX ✓	XX ✓	✓
	Prozessentwicklung/charakterisierung (Chinolinoxidation)		XX ✓	XX ✓	✓
	Reaktionstechnische Optimierung (alle Reaktionen) mit Partner 2			XX ✓	XX ✓
	Ökoeffizienzstudie (Auftragsvergabe)	XX ✓			XX ✓
Partner 2: KD-Pharma	Aufbau und Inbetriebnahme einer Laboranlage für die SFE/SFC im präparativen Maßstab	XX ✓	XX ✓	✓	
	Untersuchungen zur Produktextraktion/aufreinigung via SCE aus Emulsion (evtl. Unterauftrag an LS-TH, Uni-Do)		XX ✓	XX ✓	✓
	Evaluation einer Filtration zur Biomasseabtrennung und/oder Phasentrennung		XX --	XX --	
	Evaluation einer Phasentrennung mittels überkritischem und flüssigem CO ₂ (Unterauftrag an LS-TH, Uni-Do)		XX ✓	XX ✓	
	Untersuchungen zur Kombination SFE/SFC		XX --	XX --	
	Integration der SFE/SFC mit oder ohne Phasentrennung in Bioprozess zusammen mit Partner 1			XX ✓	XX ✓
Partner 3: Fluka	Definition neuer relevanter Produkte	XX ✓			
	Evaluierung der Technologieplattform für die Herstellung von Laborchemikalien		XX ✓	XX ✓	XX ✓
	Unterstützung des Gesamtvorhabens mit Verbrauchsmaterial/Chemikalien	XX ✓	XX ✓	XX ✓	XX ✓
Partner 4: BASF	Beratung industrielle Machbarkeit		XX ✓	XX ✓	XX ✓
	Prozessevaluierung (Technikum BASF)	XX ✓			XX ✓
	Ökoeffizienzstudie	XX ✓			XX ✓

X Vorgabe aus Zeitplan Projektantrag **O** Aktuell bearbeitete Aufgabe
✓ Erledigte Aufgabe **--** Nicht in Angriff genommen

Um die Produktivitätslimitationen zu evaluieren und den Biokatalysator zu optimieren, wurde eine metabolische Flussanalyse durchgeführt. Diese zeigte, dass in *E. coli* JM101 (pSPZ10) mit steigender Anforderung an den Metabolismus durch steigende Styrolepoxidationsraten der relative Fluss über den Zitratzyklus zunimmt. Dies ist für hohe Epoxidationsraten auch für die Essigsäureproduktion der Fall, vor allem nachdem eine Sättigung des Zitratzyklus auftritt.

Deshalb wurde in diesem Projekt die Regulationsmutante *E. coli* MG1655 $\Delta P_{sdh}::Ptet$, bei der der Zitratzyklus durch konstitutive Expression von dessen Enzymen stabilisiert wird, untersucht. Während in ruhenden Zellen bezüglich der Katalysatoreffizienz kaum ein Unterschied zum Wildtyp zu erkennen war, zeigte die im Zulaufverfahren (Fed-Batch Kultur) wachsende Mutante während der Biotransformation eine konstantere und leicht höhere Styrolepoxidationsaktivität und dadurch eine erhöhte Produktivität. Allerdings muss betont werden, dass sowohl *E. coli* MG1655 als auch *E. coli* MG1655 $\Delta P_{sdh}::Ptet$ klar tiefere Epoxidierungsaktivitäten als *E. coli* JM101 aufweisen. Dieses Projekt hat aber über die Anwendung der Flussanalyse gezeigt, dass man die Produktivitäten durch eine Stabilisierung des Zitratzyklus weiter steigern kann.

Für den Styroloxidprozess wurde in einer Zusammenarbeit zwischen TU-Dortmund und BASF eine Prozessevaluierung vorgenommen. Diese wurde in der Form einer Gruppenarbeit von Studenten der TU-Dortmund durchgeführt (siehe Anhang). Um Simulationen der einzelnen Prozesssteile (unit operations) durchzuführen, wurde dabei ein konventionelles Down-Stream Processing (Zentrifugation und dreifache Rektifikation), für das Modelle und Daten existieren, angenommen. Diese Studie, die auch eine komplette Prozessauslegung umfasst, zeigt die grundsätzliche wirtschaftliche Eignung und die technologische Durchführbarkeit des Prozesses.

Für die O₂-unabhängige Hydroxylierung von N-Heteroaromaten wurden für verschiedenen *Pseudomonas*-Stämme hohe Aktivitäten gefunden. Zudem wurden die relativ komplexen Zusammenhänge bezüglich Katabolitrepression, Induktion und Enzyminhibition untersucht. Dies erlaubte die Entwicklung eines Zweiphasenprozesses für die Chinaldinhydroxylierung mit C4O in rekombinanten *P. putida* KT2440 (pKP1). Die hohe Löslichkeit der als optimal für die Reaktionsführung evaluierten Lösungsmittel Dekan und Dodekan verunmöglicht jedoch eine

Aufarbeitung über Extraktion mit komprimiertem CO₂. Eine Phasentrennung mit komprimiertem CO₂ ist aber auch hier möglich.

Um die generelle Anwendbarkeit von C2O- und C4O-basierten Biokatalysatoren zu testen, wurden deren katalytische Aktivitäten für die Umsetzung von heteroaromatischen Substraten, die basierend auf kommerziellen Überlegungen durch SAFC Pharma vorgeschlagen wurden, getestet. Dabei wurden sehr interessante Aktivitäten gefunden. Diese Arbeiten können nun in einer Kollaboration mit SAFC Pharma weitergeführt werden.

Die Ergebnisse des Lehrstuhls für Thermodynamik (TU Dortmund) bestätigen, dass sich die bei der Biotransformation generierte stabile Emulsionen in überkritischem CO₂ spontan auflöst und in zwei Phasen trennt. Diese Versuche wurden in einem Batch-Verfahren durchgeführt. Des weiteren zeigen die gewonnen Daten, dass unter optimalen Druck- und Temperaturbedingungen ein Teil der Emulsion (Styroloxid, Oktan, 2-Phenylethanol) in CO₂ löslich ist. Diese Fraktion würde also die Trennsäule in der Kopffraktion verlassen, während die unter den angewendeten Trennbedingungen in CO₂ weitgehend unlöslichen Bestandteile Wasser und BEHP im unteren Bereich der Säule („Sumpff“) aufgefangen werden können. Zudem ist zu erwarten, dass sich die Sumpffraktion nach Kontakt mit dem überkritischen CO₂ in zwei Phasen absetzt und so das BEHP einfach wiedergewonnen werden kann.

Auf der anderen Seite wäre es wirtschaftlich von Vorteil, die Bioreaktorsuspension/-emulsion samt Bakterien in einem überkritischen CO₂-Verfahren zu trennen. In diesem Fall könnte das Wasser von den anderen Bestandteilen getrennt werden und die anschließende kontinuierliche SFE würde nur noch dazu dienen, das BEHP (Sumpffraktion) von Styroloxid, Oktan und 2-Phenylethanol (Kopffraktion) abzutrennen. Die erhaltene Kopffraktion müsste dann in einem anschließenden chromatographischen Schritt (SFC) oder mittels einer Rektifikation in die Einzelkomponenten aufgetrennt werden. Diese letzte Strategie wurde nun verfolgt.

Die erzielten Resultate weisen darauf hin, dass die Phasentrennung in einem Batchverfahren auch ohne vorherige Abtrennung der Zellen möglich ist. Dies macht eine Filtration unnötig. Diese Verfahrensvariante ersetzte somit die ursprünglich geplante Evaluation einer Filtration zur Biomasseabtrennung und/oder Phasentrennung (siehe Tabelle 10).

Die Extraktionsversuche des Lehrstuhls für Thermodynamik, bei denen die organische Phase eingesetzt wurde, zeigten vielversprechende Resultate für die Extraktion von Styroloxid, woraufhin von der KD-Pharma die Extraktion von Styroloxid (sowie n-Oktan und 2-Phenylethanol) mittels der neu gebauten SFE/SFC-Pilotanlage untersucht wurde.

Als alternatives Lösungsmittel wurde Ethyloleat nun auch im DSP evaluiert. Dies stellt wie die bereits durchgeführten Biotransformationen mit diesem Lösungsmittel eine ursprünglich nicht geplante Aktivität dar. Bei dieser Evaluation zeigte sich, dass dieses Lösungsmittel relativ gut in komprimiertem CO₂ löslich ist und deshalb Nachteile bei der SFE mit sich bringt. Eine Phasentrennung mittels komprimiertem CO₂ ist jedoch möglich.

Bedingt durch die hohen Anforderungen an Design, Bau und Steuerung der SFE/SFC-Pilotanlage, sowie den zur Zeit. sehr langen Lieferzeiten für Edelstahl, wurde für den Bau deutlich mehr Zeit als im ursprünglichen Arbeitsplan vorhergesehen (+ 6 Monate) benötigt. Der Umbau der LEWA CO₂-Pumpen erwies sich als sehr langwierig und aufwendig. Diese Pumpen waren aus 2. Hand und dienten ursprünglich zum Fördern von Flüssigkeiten bei Drücken bis maximal 60 bar. Um auf einen Arbeitsdruckbereich von 230 bar zu kommen, mussten die Kolben und Kolbenbuchsen verkleinert werden. Gleichzeitig musste die Hubfrequenz erhöht werden, um auf eine vergleichbare Fördermenge zu kommen. Aufgrund der relativ großen Totvolumina in den Pumpenköpfen und Pumpenventile sowie der hohen Kompressibilität von CO₂ wurde zwar am Ende der benötigte Arbeitsdruck erreicht, die Fördermenge war jedoch immer noch unzureichend. Erst nach aufwendigen Optimieren aller Totvolumina, Austausch von Ventilen bzw. Bearbeitung der Ventilsitze, usw. erfüllten die beiden CO₂-Pumpen die an sie gestellten Anforderungen (230 bar, 16-18 L/h). Die SFE/SFC-Pilotanlage wurde erstmals in der KW 44 2007 erfolgreich in Betrieb genommen. In den verbleibenden Monaten November 2007 bis März 2008 wurden nun Versuche mit Modell- und Reallösungen durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass eine direkte Produktextraktion mittels ccSFE nach Biomassenabtrennung und Phasentrennung sowohl für Modell- als auch für Reallösungen möglich ist. Zudem stellte sich heraus, dass eine längere Säule mit Einbauten für dieses Verfahren gewählt werden sollte, um ein Mitreißen des BEHP

zu vermeiden. Da auch die anderen Komponenten (n-Oktan, 2-Phenylethanol und ev. Reste an Styrol) extrahiert werden, kann BEHP effizient recycelt werden.

BEHP konnte jedoch nicht vollständig von den anderen Bestandteilen der organischen Phase abgetrennt werden. Dieser unerwartete Übergang des BEHP in die Kopffraktion der ccSFE verunmöglichte einen Endaufreinigungsschritt mittels SFC, da BEHP irreversibel an die stationäre Phase adsorbiert und selbst bei höheren Drücken (bis zu 240 bar) nicht mehr eluiert/desorbiert werden kann. Dies verunmöglichte die Anwendung der SFC für das vorliegende Trennproblem. Es ist denkbar, das absorbierte BEHP mittels Alkohol als Modifier in CO₂ von der Trennsäule zu desorbieren, was jedoch zu einem aufwändigeren und komplizierteren Verfahren und somit eine deutliche Produktionskostenerhöhung führen würde. Als Alternative könnte eine Rektifikation für die Endreinigung gewählt werden.

5.2 Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen

Biotransformationen basierend auf Oxygenasen/Hydroxylasen wurden bisher sehr selten auf industriellem Maßstab etabliert. Bekannte Beispiele im Maßstab 1 bis 150 t/Jahr sind HPOPS, BASF (D), Simvastatin (Merck SD, USA), div. Epoxyalkane (Japan Energy, JP), Hydroxyprolin (Kyowa Hakko Kogyo, JP) und die Produktpalette hydroxylierter N-Heteroaromaten der Lonza AG (CH). Selbst diese kommerzialisierten Prozesse zeigen niedrige Produktivitäten und Produktkonzentrationen. Ökonomische industrielle Anwendungen basieren auf Produktivitäten von 1–10 g L⁻¹h⁻¹ bei Produktkonzentrationen von 5–10 % {Straathof, et al., 2002}. Hier wurden, bezogen auf die wässrige Phase, durchschnittliche Produktivitäten um 8-10 g L_{aq}⁻¹ h⁻¹ oder 4-5 g L_{tot}⁻¹ h⁻¹ (maximale Produktivitäten bis 8 g L_{tot}⁻¹ h⁻¹) und, bezogen auf die organische Phase, Produktkonzentrationen bis zu 7.6% erreicht. Der biologische Prozess ist dem auf dem Jacobsen-Katalysator basierenden chemischen Prozess speziell bezüglich Enantioselektivität überlegen. Um 86% e.e. zu erreichen ist im chemischen Prozess eine Umkristallisation notwendig, während der biologische Prozess direkt über 99,9% e.e. ergibt. Dies veranschaulicht die industrielle Eignung der biokatalytischen Oxyfunktionalisierung. Auch für die Funktionalisierung von N-Heteroaromaten konnten vielversprechende spezifische Aktivitäten und Produktivitäten erreicht werden, die nun mit den hier

entwickelten Reaktions- und DSP-Technologien in nachhaltigen Prozessen optimiert und ausgenutzt werden können.

Die integrierte Produktisolierung über Phasentrennung sowie Produktextraktion und –reinigung mittels scCO_2 in einem (halb)kontinuierlichen Verfahren sollte zu einer signifikanten Erhöhung der Produkt/Substrat-Ausbeute und Reduzierung der Abfallmengen durch Kreislaufschließung der Prozesslösungen führen. Dieser integrierte ISPR-Ansatz (In Situ Product Removal) reduziert laufende Prozesskosten, wodurch das Verfahren wirtschaftlich betrieben werden kann.

Nach Einschätzung der SAFC Pharma AG hat die biokatalytische Epoxidierung von Styrol eine hohe Produktivität erreicht und ist somit auch für die Produktion von Laborchemikalien von Interesse. Die Zielrichtung des Prozesses kann nun auf die Selektivität der Epoxidierung gerichtet werden und im Hinblick auf die weitere Exploration der Selektivität der SMO die restlichen Anteile an Phenylethanol-Nebenprodukt minimiert werden. Für die weitere Exploration der Epoxidierungs-Selektivität von SMO sind neben den zu Projektbeginn erwähnten Substraten weitere Edukte in Entwicklung oder fertiggestellt worden. Aus der Gruppe der aromatischen Kohlenwasserstoffe sind dies neben den zu Projektbeginn vorliegenden Edukten p-Divinylbenzol und p-Vinylbenzonnitril die Verbindungen 1-Benzopyran-2-one und Octahydronaphthalin. Aus der Gruppe der cycloaliphatischen Kohlenwasserstoffe sind neben 4-Vinyl-1-cyclohexen, 5-Vinyl-2-norbornen neu die beiden Edukte (+)-(1R,5S)-cis-Bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-on und (-)-(1S,5R)-cis-Bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-on hergestellt worden.

Für die Exploration der Selektivität bei C4O und C2O wurden 8-Hydroxychinaldin, 2-Chinolinnitril, 3-Chinolinnitril, 5-Chinolinaldehyd, 6-Chinolinaldehyd, 8-Chinolinaldehyd und 3-Chinolincarboxylaldehyd als Edukte zur Verfügung gestellt.

Die grundsätzliche wirtschaftliche Eignung und Konkurrenzfähigkeit sowie die technologische Durchführbarkeit des Styroloxidprozesses wurde in einer Zusammenarbeit zwischen TU-Dortmund und BASF in Form einer ausführlichen Gruppenarbeit von Studenten der TU-Dortmund evaluiert und positiv beurteilt (siehe Anhang).

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden allgemein die Entwicklung neuartiger Bioprozesse ermöglichen, deren Produktivität (und damit Wirtschaftlichkeit) hoch genug ist, um herkömmliche Prozesse der Petrochemie für die Funktionalisierung

von Kohlenwasserstoffen durch kostengünstige und umweltfreundliche biotechnologische Alternativen zu ersetzen.

5.3 Kooperation innerhalb des Projekts

Im Rahmen des Projektes fanden gegenseitige Besuche und Erfahrungsaustausch zwischen der Technischen Universität Dortmund (Lehrstühle BT sowie TH) und der KD-Pharma statt. Dabei wurden die verfügbaren Anlagen sowie Vorgehensweisen vorgestellt. Die gesammelten Erfahrungen flossen in die Planung der Versuche wie auch der Laboranlage mit ein. Der Lehrstuhl TH (Unterauftragnehmer der Partner 1 und 2) stand ständig in engem Kontakt mit dem Lehrstuhl BT. Viele Versuche wurden gemeinsam durchgeführt. Es wurden 4 Projekttreffen abgehalten, die am 13.1.06 (vorgängig zum Umbau des Projektes) und am 13.9.06 in Dortmund, am 21.3.07 in Bexbach (KD-Pharma) und am 4.9.07 in Dortmund (trilateral: KD-Pharma, Lehrstühle TH und BT) stattfanden. Am 13.12.2007 fand anlässlich des Statusseminars ein weiteres Projekttreffen statt.

Die Zusammenarbeit zwischen den Partnern zeichnete sich durch große Interdisziplinarität aus, bei der jeder Kooperationspartner vom anderen in Denk- und Vorgehensweise hinzugelernt hat, was für die Bearbeitung weiterer FuE Vorhaben nützlich sein wird.

6 Öffentlichkeitsarbeit

Eine Publikation mit dem Titel „NADH Availability Limits Asymmetric Biocatalytic Epoxidation in Growing Recombinant *Escherichia coli*“ wurde kürzlich in „Applied and Environmental Microbiology“, Band 74(5), Seiten 1436-1446, veröffentlicht (siehe Anhang). Weitere Publikationen bezüglich DSP und Ökoeffizienz sind geplant. Präsentationen bezüglich des Projektes umfassen Vorträge an der GVC/DECHEMA-Jahrestagung, 27.9.06, Wiesbaden (Whole-Cell Biocatalysis for the Oxyfunctionalization of Hydrocarbons – Efficiency and Limitations), an der European BioPerspectives 2007, 31.5.07, Köln (Systems Biotechnology of Resting *E. coli* as a Platform for Sustainable Redox Biocatalysis), an der Tagung “High Pressure meets Advanced Fluids”, 10.-11.3. 2008 in Aachen (Innovatives Downstream Processing zweiphasiger Ganzzell-Biotransformationen mit überkritischem Kohlendioxid), am 11. European Meeting on Supercritical Fluids, 4.-7.5. 2008 in Barcelona, Spanien

(Innovative down-stream processing in whole-cell biocatalysis using supercritical carbon dioxide), drei Poster an der Biotrans, 8.-13.7.07, Oviedo (Evaluation of the efficiency of recombinant *E. coli* as an epoxidation catalyst by a systems biotechnology approach; Sustainability evaluation and optimization of a biocatalytic two-liquid phase epoxidation process; Application of Molybdenum-Containing Hydroxylases in Hydroxylation Reactions) und ein Poster am 2. International Symposium on Biothermodynamics, 21.-22.2. 2008 in Frankfurt (Innovative Down-Stream Processing in Whole-Cell Biocatalysis Using Supercritical Carbon Dioxide). Folgende Präsentationen werden dieses Jahr noch stattfinden: Ein Poster an der Gordon Research Conference on Biocatalysis, 6.-11.7., 2008, Smithfield, RI, USA (Application of Molybdenum-Containing Dehydrogenases for Carbon Oxyfunctionalization), ein Vortrag und ein Poster am 7th European Symposium on Biochemical Engineering Science, 7.-10.9. 2008, Faro, Portugal (Using systems biotechnology and eco-efficiency analyses to enable sustainable redox biocatalysis; Application of quinaldine 4-oxidase containing recombinant *P. putida* as a biocatalyst in hydroxylation reactions), und ein Vortrag an der European BioPerspectives 2008, 7.-9.10. 2008 in Hannover (Using systems biotechnology and eco-efficiency analyses to enable sustainable redox biocatalysis). Alle Abstracts sind im Anhang zu finden.

Die Entwicklung, Charakterisierung und Optimierung von Ganzzellkatalysatoren zur biokatalytischen Oxyfunktionalisierung für nachhaltige Anwendungen in der Chemieindustrie wird auch in Zukunft weiter geführt. Dasselbe gilt für das Down-Stream Processing mit komprimiertem Kohlendioxid. Für letzteres ist an der TU Dortmund eine neue Anlage innerhalb eines S1-Bereiches geplant. Um diese Anlage und die zukünftigen Arbeiten zu finanzieren wurde ein DFG-Antrag gestellt.

Im hier beschriebenen Projekt konnten entscheidende Fortschritte und Kenntnisse bezüglich unkonventioneller Fluidtechnologien erzielt werden, die für eine zukünftige Kommerzialisierung wichtig sind. Zukünftige Anwendungen der Biokatalysatoren wie auch der Fluidtechnologien werden in erster Linie in Zusammenarbeit mit den Projektpartnern KD-Pharma, BASF und Fluka AG (SAFC-Pharma) angestrebt.

7 Fazit

Biokatalytische Oxyfunktionalisierungen sind, dank milder Reaktionsbedingungen, dem Verzicht auf Edel- und Schwermetallkatalysatoren und hoher chemischer Selektivität, hinsichtlich einer nachhaltigen Umweltentlastung eine vielversprechende Alternative zu chemisch-katalytischen Prozessen. Innerhalb des hier vorgestellten Projektes wurde beispielhaft die Ökoeffizienz eines in einem Vorprojekt (AZ13095) entwickelten und auf rekombinanten *E. coli* basierenden Prozesses zur enantioselektiven Styrolepoxidierung durch die BASF und extern durch E. Heinzle (Universität Saarbrücken) evaluiert. Im Vergleich zur chemischen Prozessalternative schnitt der Bioprozess ökonomisch in beiden Studien ökologisch jedoch nur in der Studie aus Saarbrücken positiv ab. Die Studien sahen In Bezug auf das im Zweiphasenprozess verwendete Lösungsmittel und das Wachstumssubstrat großes Verbesserungspotenzial. Biodiesel bzw. Ethyloleat und Glycerin wurden erfolgreich als Alternativen zu BEHP und Glukose eingesetzt. Deren Einsatz war trotz leichten Einbussen bei der Produktivität und der erreichten Produktkonzentration vielversprechend. Dabei wurden über 8-9 h Reaktionszeit durchschnittliche Produktivitäten von 3-5 g/L_{tot}/h erreicht. Beide Ökoeffizienzstudien zeigten deutlich, dass Ethyloleat als organisches Lösungsmittel vom ökologischen Standpunkt her klar zu bevorzugen ist. Trotz leicht höheren eingesetzten Mengen kann die Umweltbelastung erheblich gesenkt werden, so ist die über die Methode von Heinzle et al. ermittelte Umweltkennzahl der Styrolepoxidierung mit Ethyloleat um rund 40% kleiner als im auf BEHP-basierten Prozess. Weniger deutlich ist der Effekt der Umstellung von Glukose auf Glycerin als Wachstumssubstrat. Die BASF bewertet die landwirtschaftliche Produktion der Glukose wesentlich negativer als Heinzle et al., in deren Methode Glukose und Glycerin als equivalent bezüglich Umweltbelastung angesehen werden. Je nach Standort kann eine Umstellung jedoch durchaus sinnvoll werden, wenn Glycerin beispielsweise in einem Verbund als Abfallprodukt anfällt. Die steigenden Preise für Glukose und die sinkenden Preise für Glycerin unterstreichen die Wichtigkeit alternative Wachstumssubstrate zu untersuchen.

Metabolische Flussanalysen zeigten einen sehr hohen biokatalysebedingten NADH-Verbrauch, welcher zu einer NADH-Limitation in wachsenden Zellen führte. Mit steigender Anforderung an den Metabolismus durch steigende Styrolepoxidationsraten nahm der relative Fluss über den Zitratzyklus zu. Dies ist bei

hohen Epoxidationsraten auch für die Essigsäureproduktion der Fall, vor allem nachdem eine Sättigung des Zitratzyklus auftritt. Aufgrund dessen wurde eine Zitratzyklusmutante getestet, bei der der Zitratzyklus durch konstitutive Expression von dessen Enzymen stabilisiert wird. Während in ruhenden Zellen bezüglich der Katalysatoreffizienz kaum ein Unterschied zum Wildtyp zu erkennen war, zeigte die im Zulaufverfahren (Fed-Batch Kultur) wachsende Mutante während der Biotransformation eine konstantere und leicht höhere Styrolepoxidationsaktivität und dadurch eine erhöhte Produktivität. Ob das nur durch das Wegbleiben des toxischen Effekts von Acetat, das bei der Mutante nur in geringsten Mengen anfällt, bedingt ist, muss noch abgeklärt werden. Sicher ist jedoch, dass Styrol durch die Entkopplung der Zitratzyklusgene von der natürlichen Regulation besser umgesetzt werden kann. Allerdings muss betont werden, dass sowohl *E. coli* MG1655 als auch *E. coli* MG1655 $\Delta P_{sdh}::P_{tet}$ klar tiefere Epoxidierungsaktivitäten als *E. coli* JM101 aufweisen. Dieses Projekt hat aber über die Anwendung der Flussanalyse gezeigt, dass man die Produktivitäten durch eine Stabilisierung des Zitratzyklus weiter steigern kann. So könnte man eine analoge Mutante zu *E. coli* MG1655 $\Delta P_{sdh}::P_{tet}$ in *E. coli* JM101 herstellen. Zudem zeigt dies das Potential des Metabolic-Engineering-Ansatzes für die Optimierung von rekombinanten Ganzzellbiokatalysatoren bezüglich energieabhängiger Biotransformationen.

Für den Styroloxidprozess wurde in einer Zusammenarbeit zwischen TU-Dortmund und BASF eine Prozessevaluierung vorgenommen. Diese wurde in der Form einer Gruppenarbeit von Studenten der TU-Dortmund durchgeführt (siehe Anhang). Diese Studie, die auch eine komplette Prozessauslegung umfasst, zeigt die grundsätzliche wirtschaftliche Eignung und die technologische Durchführbarkeit des Prozesses.

Für die O_2 -unabhängige Hydroxylierung von N-Heteroaromaten wurden für verschiedene *Pseudomonas*-Stämme hohe Aktivitäten gefunden. Zudem wurden die relativ komplexen Zusammenhänge bezüglich Katabolitrepression, Induktion und Enzyminhibition untersucht. Dies erlaubte die Entwicklung eines Zweiphasenprozesses für die Chinaldinhydroxylierung mit C4O in rekombinanten *P. putida* KT2440 (pKP1). Über die Optimierung von Massentransfer (Sauerstoff, Substrat) und Induktionsbedingungen kann nun eine weitere Verbesserung der schon jetzt vielversprechenden Chinaldinumsatzraten, die das Erreichen von 100 mM Produktkonzentration in der organischen Phase erlaubten, angestrebt werden.

Diese hervorragende Basis für O₂-unabhängige Oxyfunktionalisierungen wird am Lehrstuhl für Biotechnik auch in Zukunft weiterverfolgt.

Die Resultate, die in diesem Abschlussbericht präsentiert wurden, zeigen klar, dass sich C₂O- und C₄O-enhaltende ganze Zellen, die die unbekanntesten Elektronenakzeptoren herstellen und regenerieren, als Katalysatoren für Kohlenstoffoxyfunktionalisierungen eignen. Zudem zeigten diese Enzyme interessante Substratspektren gegenüber den von SAFC-Pharma vorgeschlagenen Substraten.

Als eine Hauptlimitation für die industrielle Implementierung zweiphasiger Bioprozesse gilt vor allem die aufwändige Phasentrennung. Hier wurde überkritisches CO₂ sowohl zur Phasentrennung als auch zur Produktextraktion erfolgreich eingesetzt. Die Ergebnisse des Lehrstuhls für Thermodynamik (TU Dortmund) bestätigen, dass sich die bei der Biotransformation generierte stabile Emulsionen in überkritischem CO₂ spontan auflöst und in zwei Phasen trennt. Als bevorzugt wurde somit eine Verfahrensweise vorgeschlagen und evaluiert, bei der die Bioreaktorsuspension/-emulsion samt Bakterien in einem überkritischen CO₂-Verfahren getrennt wird, gefolgt von einer kontinuierlichen SFE, die dazu dient, das BEHP (Sumpffraktion) von Styroloxid, Oktan und 2-Phenylethanol (Kopffraktion) abzutrennen. Die erhaltene Kopffraktion müsste dann in einem anschließenden chromatographischen Schritt oder mittels einer Rektifikation in die Einzelkomponenten aufgetrennt werden. Die Extraktionsversuche des Lehrstuhls für Thermodynamik mit der organischen Phase zeigten vielversprechende Resultate, woraufhin von der KD-Pharma die Extraktion von Styroloxid (sowie n-Oktan und 2-Phenylethanol) mittels einer innerhalb dieses Projektes neu gebauten SFE/SFC-Pilotanlage untersucht wurde. Es konnte gezeigt werden, dass eine direkte Produktextraktion mittels ccSFE nach Biomassenabtrennung und Phasentrennung sowohl für Modell- als auch für Reallösungen möglich ist. Dabei wird eine direkte serielle Kopplung der Phasentrennung und der ccSFE im Hochdruckbereich (d.h. ohne das CO₂ und die abgetrennte organische Phase zu dekomprimieren) vorgeschlagen. Zudem stellte sich heraus, dass eine längere Säule mit Einbauten für dieses Verfahren gewählt werden sollte, um ein Mitreißen des BEHP zu vermeiden. Da auch die anderen Komponenten (n-Oktan, 2-Phenylethanol und ev. Reste an Styrol) extrahiert werden, kann BEHP effizient rezykliert werden.

BEHP konnte jedoch nicht vollständig von den anderen Bestandteilen der organischen Phase abgetrennt werden. Dieser unerwartete Übergang des BEHP in die Kopffraktion der ccSFE verunmöglicht einen Endaufreinigungsschritt mittels SFC, da BEHP irreversibel an die stationäre Phase adsorbiert. Es ist denkbar, das absorbierte BEHP mittels Alkohol als Modifier in CO₂ von der Trennsäule zu desorbieren, was jedoch zu einem aufwändigeren und komplizierteren Verfahren und somit eine deutliche Produktionskostenerhöhung führen würde. Als Alternative könnte eine Rektifikation für die Endreinigung gewählt werden.

Als alternatives Lösungsmittel wurde Ethyloleat auch im DSP evaluiert. Bei dieser Evaluation zeigte sich, dass dieses Lösungsmittel relativ gut in komprimiertem CO₂ löslich ist und deshalb Nachteile bei der SFE mit sich bringt. Eine Phasentrennung mittels komprimiertem CO₂ ist jedoch möglich.

Die interdisziplinäre Zusammenarbeit in diesem Projekt hat somit wichtige Erkenntnisse und Entwicklungen hin zu einer Technologieplattform für nachhaltige integrierte Bioprozesse erbracht.

8 Literatur

- Bharath R, Inomata H, Arai K, Shoji K, Noguchi Y. 1989. Vapor-liquid equilibria for binary mixtures of carbon dioxide and fatty acid ethyl esters. *Fluid Phase Equilib* 50:315-327.
- Biwier A, Heinzle E. 2004. Environmental assessment in early process development. *J Chem Technol Biotechnol* 79:597-609.
- Bühler B, Bollhalder I, Hauer B, Witholt B, Schmid A. 2003. Use of the two-liquid phase concept to exploit kinetically controlled multistep biocatalysis. *Biotechnol Bioeng* 81:683-694.
- Bühler B, Park J-B, Blank LM, Schmid A. 2008. NADH availability limits asymmetric biocatalytic epoxidation in a growing recombinant *Escherichia coli* strain. *Appl Environ Microbiol* 74:1436-1446.
- Bühler B, Schmid A, Hauer B, Witholt B. 2000. Xylene monooxygenase catalyzes the multistep oxygenation of toluene and pseudocumene to corresponding alcohols, aldehydes, and acids in *Escherichia coli* JM101. *J Biol Chem* 275:10085-10092.

- Bühler B, Witholt B, Hauer B, Schmid A. 2002. Characterization and application of xylene monooxygenase for multistep biocatalysis. *Appl Environ Microbiol* 68:560-568.
- Dembek G, Rommel T, Lingens F, Hoke H. 1989. Degradation of quinaldine by *Alcaligenes* sp. and by *Arthrobacter* sp. *FEBS Lett* 246:113-116.
- Dharmadi Y, Murarka A, Gonzalez R. 2006. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: A new platform for metabolic engineering. *Biotechnol Bioeng* 94:821-829.
- Eissen M, Hungerbühler K, Dirks S, Metzger J. 2003. Mass efficiency as metric for the effectiveness of catalysts. *Green Chem* 5:G25-G27.
- Eissen M, Metzger JO. 2002. Environmental performance metrics for daily use in synthetic chemistry. *Chem Eur J* 8:3580-3585.
- Frerichs-Deeken U, Goldenstedt B, Gahl-Janssen R, Kappl R, Huttermann J, Fetzner S. 2003. Functional expression of the quinoline 2-oxidoreductase genes (*qorMSL*) in *Pseudomonas putida* KT2440 pUF1 and in *P. putida* 86-1 Delta *qor* pUF1 and analysis of the Qor proteins. *Eur J Biochem* 270:1567-1577.
- Fukuda H, Kondo A, Noda H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J Biosci Bioeng* 92:405-416.
- Heinzle E, Biwer A, Eissen M, Kholiq MA. 2006. Evaluation of biotechnological processes in early phases of the development regarding risks concerning ecology, security and health. *Chem Ing Tech* 78:301-305.
- Heinzle E, Weirich D, Brogli F, Hoffmann VH, Koller G, Verduyn MA, Hungerbühler K. 1998. Ecological and economic objective functions for screening in integrated development of fine chemical processes. 1. Flexible and expandable framework using indices. *Ind Eng Chem Res* 37:3395-3407.
- Kappl R, Sielker S, Ranguelova K, Wegner J, Parschat K, Huttermann J, Fetzner S. 2006. Spectroscopic and biochemical studies on protein variants of quinaldine 4-oxidase: Role of E736 in catalysis and effects of serine ligands on the FeSI and FeSII clusters. *Biochemistry* 45:14853-14868.
- Keith JM, Larrow JF, Jacobsen EN. 2001. Practical considerations in kinetic resolution reactions. *Adv Synth Catal* 343:5-26.
- Lasko DR, Zamboni N, Sauer U. 2000. Bacterial response to acetate challenge: a comparison of tolerance among species. *Appl Microbiol Biotechnol* 54:243-247.

- Panke S, Held M, Wubbolts MG, Witholt B, Schmid A. 2002. Pilot-scale production of (S)-styrene oxide from styrene by recombinant *Escherichia coli* synthesizing styrene monooxygenase. *Biotechnol Bioeng* 80:33-41.
- Park JB, Bühler B, Habicher T, Hauer B, Panke S, Witholt B, Schmid A. 2006. The efficiency of recombinant *Escherichia coli* as biocatalyst for stereospecific epoxidation. *Biotechnol Bioeng* 95:501-512.
- Parschat K, Hauer B, Kappl R, Kraft R, Huttermann J, Fetzner S. 2003. Gene cluster of *Arthrobacter ilicis* Ru61a involved in the degradation of quinaldine to anthranilate. *J Biol Chem* 278(30):27483-27494.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schwarz G, Senghas E, Erben A, Schafer B, Lingens F, Hoke H. 1988. Microbial metabolism of quinoline and related compounds. I. Isolation and characterization of quinoline-degrading bacteria. *System Appl Microbiol* 10:185-190.
- Sikkema J, de Bont JA, Poolman B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev* 59:201-222.
- Stephan I, Tshisuaka B, Fetzner S, Lingens F. 1996. Quinaldine 4-oxidase from *Arthrobacter* sp R61a, a versatile procaryotic molybdenum-containing hydroxylase active towards N-containing heterocyclic compounds and aromatic aldehydes. *Eur J Biochem* 236:155-162.
- Straathof AJ, Panke S, Schmid A. 2002. The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr Opin Biotechnol* 13:548-556.
- Veit A, Polen T, Wendisch VF. 2007. Global gene expression analysis of glucose overflow metabolism in *Escherichia coli* and reduction of aerobic acetate formation. *Appl Microbiol Biotechnol* 74:406-421.