

**“Innovatives nachhaltiges Verfahren zur Biotransformation von in Wasser un-
oder schwer löslichen Verbindungen und deren Aufarbeitung bei Verwendung
ionischer Flüssigkeiten als Lösungsvermittler
am Beispiel der enantiomerenreinen Gewinnung von 2-Octanol als Intermediat
für die Herstellung von Feinchemikalien und Pharmawirkstoffen“**

Projekt:
AZ13169-32

Förderungszeitraum:
01.03.2007-28.02.2009

Projektpartner:

ITMC RWTH

Institut für Technische Chemie und Makromolekulare Chemie
Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen


JÜLICH
FORSCHUNGSZENTRUM

Institut für Biotechnologie 2
Forschungszentrum Jülich


X-Zyme

Firma X-Zyme GmbH, Düsseldorf

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	5
2	Anlass und Zielsetzung.....	8
3	Arbeitsschritte und Ergebnisse	11
3.1	Herstellung der Enzyme.....	11
3.1.1	Untersuchung ausgewählter Alkoholdehydrogenasen der zweiten Mutationsgeneration für die enantioselektive Reduktion von 2-Octanon.....	11
3.1.2	Fermentationsoptimierung der Mutante RX3-9.....	12
3.1.3	Aufreinigung der Alkoholdehydrogenasen RX3, RX4 und RX3-9.....	12
3.1.4	Fermentation im großen Maßstab.....	16
3.2	Charakterisierung der Enzyme in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten	17
3.2.1	Aktivität der ADH in ionischen Flüssigkeiten.....	17
3.2.2	Stabilität der ADH in ionischen Flüssigkeiten.....	19
3.3	Untersuchung verschiedener Cofaktorregeneriermethoden	22
3.3.1	Stabilität der Cofaktoren in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten	22
3.3.2	Elektrochemische Cofaktorregenerierung.....	25
3.3.3	Substratgekoppelte Cofaktorregenerierung	31
3.3.4	Enzymgekoppelte Cofaktorregenerierung	31
3.4	Synthesen.....	35
3.4.1	Synthesen mit ionischer Flüssigkeit.....	35
3.4.2	Synthesen mit Substrat als zweiter Phase.....	37
3.4.3	Analytik und Aufarbeitung.....	38
3.5	Ökoeffizienzanalyse.....	39
3.5.1	Herstellung der verwendeten Enzyme	40
3.5.2	Synthese von 2-Octanol	41
4	Diskussion.....	43
5	Öffentlichkeitsarbeit.....	46
6	Fazit	47

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Alkoholdehydrogenase-katalysierte enantioselektive Synthese von Octanol.....	8
Abbildung 2: Ergebnisse zur Aktivitätsbestimmung aller getesteten ADH Mutanten der zweiten Mutationsgeneration	11
Abbildung 3: Aktivität der ADH in IL 1	17
Abbildung 4: Aktivität der ADH in IL 2	18
Abbildung 5: Aktivität der ADH in IL 3	19
Abbildung 6: Stabilität der ADH in IL 1	20
Abbildung 7: Stabilität der ADH in IL 2	21
Abbildung 8: Stabilität von NADPH in IL	22
Abbildung 9: Stabilität von NADPH in IL	23
Abbildung 10: Stabilität von NADH in IL.....	24
Abbildung 11: Elektrochemische Regenerierung von NADPH	25
Abbildung 12: Leitfähigkeitserhöhung des Reaktionsmediums bei 25 °C	25
Abbildung 13: Elektrochemische Reduktion von NADP ⁺	26
Abbildung 14: Kenngrößen der elektrochemischen Reduktion von NADP ⁺	27
Abbildung 15: Einfluss des Rhodiummediators auf die Stabilität der ADH.....	28
Abbildung 16: Einfluss des Biokatalysators auf den Rhodiumkatalysator	29
Abbildung 17: Reaktoraufbau.....	29
Abbildung 18: Mediatorsynthese	30
Abbildung 19: Reaktionsverlauf.....	30
Abbildung 20: Aktivität der MDH in IL.....	31
Abbildung 21: Stabilität der MDH in IL	32
Abbildung 22: Aktivität der GDH in IL.....	33
Abbildung 23: Stabilität der GDH in IL.....	34
Abbildung 24: Reaktionsverläufe der Synthese von 2-Octanol bei Zugabe verschiedener Mengen an TRIS-(2-OH-Et)-MAM MeSO ₄	35
Abbildung 25: Einfluss der Substratkonzentration auf die Enzymaktivität	36
Abbildung 26: Einfluss der Produktkonzentration auf die Enzymaktivität	36

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Im Rahmen der Untersuchungen verwendete IL	9
Tabelle 2: Aktivität und Enantioselektivität der untersuchten ADHs	12
Tabelle 3: Optimale Fermentationsparameter zur Expression der RX3-9	12
Tabelle 4: Aktivitäten der RX3 vor und nach Hitzefällung	13
Tabelle 5: Aktivitäten der RX4 vor und nach Hitzefällung	14
Tabelle 6: Aktivitäten der RX3-9 vor und nach Hitzefällung	14
Tabelle 7: Aktivitäten der RX3, RX4 und RX3-9 vor und nach Säulenchromatographie	15
Tabelle 8: Aktivitäten der RX3, RX4 und RX3-9 vor und nach Ammoniumsulfatfällung	15
Tabelle 9: Ergebnisse der elektrochemischen Reduktion von NADP ⁺	27
Tabelle 10: Kennzahlen der Synthesen mit IL.....	35
Tabelle 11: Kennzahlen der Synthesen mit Substrat als zweiter Phase	37

1 Zusammenfassung

Ziel des vorliegenden Projektes war die Erarbeitung eines alternativen Lösungsmittelkonzeptes zur Anwendung in einer integrierten Aufarbeitung im Produktionsschritt. Die hier zu Grunde liegende Strategie beruht auf der Kombination so genannter ionischer Flüssigkeiten (IL) als Lösungsvermittler mit überkritischen Fluiden als Extraktionsmittel, die den Vorteil einer kontaminationslosen Produktextraktion, einer umweltfreundlichen Rezyklierung der Zusätze, sowie eines erweiterten Einsatzes von Biokatalysatoren mit sich bringt. Zudem wurden neue Ansätze für die biokatalytische Umsetzung von in Wasser unlöslicher oder schwerlöslicher Verbindungen und deren Aufarbeitung angestrebt. Das vorgestellte Konzept sollte zunächst für die biokatalytische Synthese von enantiomerenreinem 2-Octanol herangezogen werden.

Im Rahmen des Projekts war es möglich, durch zweistufige Mutagenese der zum Zeitpunkt des Projektantrags bereits vorliegenden Alkoholdehydrogenase (ADH) drei hochaktive und enantioselektive R-ADH-Mutanten (RX3, RX4 und RX4-9) zu erzeugen, deren Anwendbarkeit in Anwesenheit von ionischen Flüssigkeiten bestätigt wurde. Mit Hilfe umfangreicher Optimierungsprozesse bezüglich Fermentationsparameter (u. a. Induktion und Wahl des Expressionsstamms), Klonierungsstrategien und Enzymaufreinigung konnten die Aktivitäten bis zur technischen Anwendbarkeit gesteigert werden. Die Produktion der Biokatalysatoren konnte zu Projektende bereits im Rahmen von 300 L-Fermentationen erfolgen. Fortführend wird derzeit eine 6000 L-Fermentation angestrebt.

Von besonderer Wichtigkeit war die Identifizierung verschiedener IL, die eine ausreichende Kompatibilität mit dem Biokatalysator aufweisen. Zu diesem Zweck wurde zunächst der Einfluss der verschiedenen IL auf die Kompatibilität mit einer Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus* untersucht. Dabei wurden Imidazolium-, Pyridinium- und hydroxyfunktionalisierte tertiäre Ammoniumkationen in Kombination mit organischen und anorganischen Anionen verwendet. Besonders die hydroxyfunktionalisierten tertiären Ammoniumverbindungen zeigten gute Ergebnisse bezüglich Aktivität und Stabilität der ADH. Die meisten dieser IL sind - bei einer Dosierung von 10 Vol% im Reaktionsmedium - in der Lage das Enzym in Lösung zu stabilisieren, ohne seine Aktivität negativ zu beeinflussen. Außerdem stabilisieren manche IL die reduzierten Cofaktoren NAD(P)H in Lösung.

Darüber hinaus wurden verschiedene Methoden zur Cofaktorregenerierung untersucht. Besonders ressourcenschonend wäre die elektrochemische Cofaktorregenerierung, bei der man sich zusätzlich die Leitfähigkeit steigernde Wirkung der IL zu nutze machen könnte. Untersuchungen zur elektrochemischen Reduktion von NADP^+ zeigten auch eine deutlich Verbesserung der Raum-Zeit-Ausbeute und der Wechselzahl des eingesetzten Rhodiummediators in Gegenwart von IL im Gegensatz zur Durchführung in reinem Puffer. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen diesen Prozesskennzahlen und dem Anteil an IL im Reaktionsmedium. Aufgrund einer gegenseitigen Desaktivierung des Mediators und der ADH ist es jedoch nicht möglich diese Synthese in einem einfachen Satzreaktor durchzuführen, weshalb ein neues Reaktorkonzept realisiert wurde, das die räumliche Trennung von Biokatalysator und Rhodiumkomplex gewährleistet. Da die so erreichten Produktivitäten verhältnismäßig gering sind wurde außerdem die enzymgekoppelte Cofaktorregenerierung mit Hilfe einer Glucosedehydrogenase bzw. einer Malatdehydrogenase untersucht. Für diese Enzyme wurden Versuche in Gegenwart der IL durchgeführt, die sich bei den Untersuchungen mit der ADH als besonders vorteilhaft heraus gestellt hatten. Bei den Experimenten zeigte sich, dass die GDH für unsere Zwecke besser geeignet ist, weshalb für die eigentlichen Synthesen die Cofaktorregenerierung über dieses Enzym ausgewählt wurde.

Anhand der Untersuchungen bezüglich des Einflusses der IL auf den Biokatalysator und die Versuche zur Auswahl einer geeigneten Cofaktorregeneriermethode wurde die Auswahl an möglichen IL reduziert. Für TRIS-(2-OH-Et)-MAM MeSO_4 wurden Synthesen mit 10, 25 und 50 Vol%-Anteile durchgeführt, bei denen sich jedoch im Vergleich zur Synthese in reinem Puffer keine Verbesserung der Produktivitäten zeigte. Detaillierte Kinetik-untersuchungen ergaben, dass für die ADH eine deutliche Produktinhibierung vorliegt, weshalb die Zugabe eines Lösungsvermittlers zur Verbesserung der Substratlöslichkeit nur dann vorteilhaft ist, wenn der Lösungsvermittler nicht auch die Produktlöslichkeit heraufsetzt. Da für das untersuchte Enzym die maximale Reaktionsgeschwindigkeit in Puffer schon bei einer Konzentration kleiner 8 mM (= maximale Löslichkeit im verwendeten Puffer) erreicht war, während gleichzeitig aufgrund der geringen Löslichkeit des Produktes zu hohe Konzentrationen dieses vermieden werden konnten, wurden zusätzlich Versuche in reinem Puffer und mit Substrat als zweiter Phase durchgeführt. In diesem Setup konnten folgende Ergebnisse realisiert werden: $\text{STY} = 800 \text{ mmolL}^{-1}\text{d}^{-1}$ (= $103 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$), $ee > 99,9 \%$, $\text{TTN}_{\text{ADH}} = 33300$, $\text{TTN}_{\text{GDH}} = 13100$, $\text{TTN}_{\text{NADP}^+} = 8000$. Obwohl eine selektive Extraktion des Produktes von der wässrigen Phase mittels überkritischem

CO₂ möglich ist, ist das in bei dieser Reaktion nicht unbedingt nötig, das das Produkt noch vollständigem Umsatz als zweite Phase vorliegt.

Mit Hilfe der Software Sabento wurde die ökonomische und ökologische Prozessbeurteilung durchgeführt. Sabento prognostiziert für die Herstellung der Enzyme einen Gewinn von ~ 60.000.000 € bei einer Amortisationszeit von 0,1 Jahren, während für die Synthese von 2-Octanol ein Gewinn von ~ 500.000.000 € bei einer Amortisationszeit < 0,1 Jahren angenommen wird (selbst bei Annahme einer Reduzierung des Produktpreises auf 20 % des jetzigen Preises).

Bei der Herstellung der Enzyme werden aufgrund der verschiedenen, jedoch für die spätere Synthese benötigten, Aufreinigungsschritte verhältnismäßig große Mengen an Rohstoffen bzw. Energie benötigt. Für die Herstellung eines Kilos Enzym werden laut Sabento ein Input von ~ 3000 kg an Stoffen und 1000000 KJ Energie eingesetzt. Problematisch ist, dass die Herstellung relativ komplex ist und das ein erhöhtes Eutrophierungspotential besteht. Für die Synthese eines Kilos an 2-Octanol wird jedoch lediglich ein Input von ~ 10 kg an Stoffen und 2600 kJ Energie benötigt. Insgesamt ist der hier vorgestellte Prozess zur Herstellung von 2-Octanol sowohl unter ökonomischen als auch unter ökologischen Gesichtspunkten interessant. In Zukunft soll überprüft werden ob alle bei der Herstellung der isolierten Enzyme benötigten Aufreinigungsschritte nötig sind. Generell traten bei der Verwendung der Software einige Probleme auf, die durch den Support des Ifu leider nicht gelöst werden konnten.

2 Anlass und Zielsetzung

Ziel des vorliegenden Projektes war die Erarbeitung eines alternativen Lösungsmittelkonzeptes zur Anwendung in einer integrierten Aufarbeitung im Produktionsschritt. Die hier zu Grunde liegende Strategie beruht auf der Kombination so genannter ionischer Flüssigkeiten (IL) als Lösungsvermittler mit überkritischen Fluiden als Extraktionsmittel, die den Vorteil einer kontaminationslosen Produktextraktion, einer umweltfreundlichen Rezyklierung der Zusätze, sowie eines erweiterten Einsatzes von Biokatalysatoren mit sich bringt. Zudem wurden neue Ansätze für die biokatalytische Umsetzung von in Wasser unlöslicher oder schwerlöslicher Verbindungen und deren Aufarbeitung angestrebt. Das vorgestellte Konzept sollte zunächst für die biokatalytische Synthese von enantiomerenreinem 2-Octanol herangezogen werden.

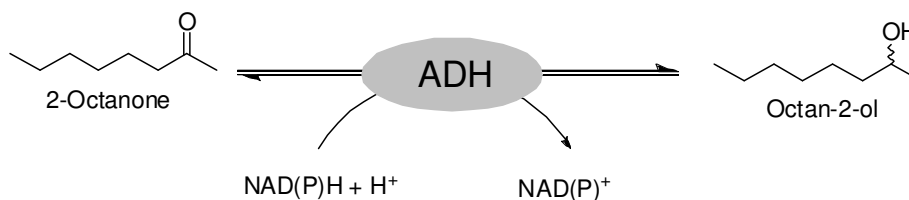


Abbildung 1: Alkoholdehydrogenase-katalysierte enantioselektive Synthese von Octanol

Die reduktive Darstellung von enantiomerenreinem 2-Octanol (siehe Abbildung 1) mit rekombinant verfügbaren Enzymen und mit Methoden der elektroenzymatischen Cofaktorregenerierung stellt ein viel versprechendes kommerziell relevantes Modellsystem dar. Das hier vorgeschlagene Verfahren kann durch unmittelbare Anwendung bei der Herstellung enantiomerenreiner Alkohole zu einer erheblichen Umweltentlastung führen.

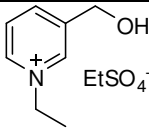
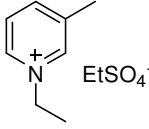
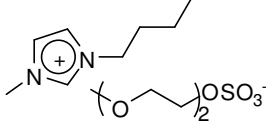
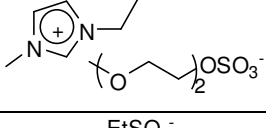
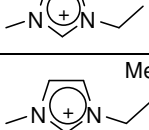
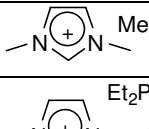
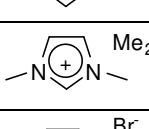
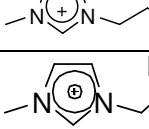
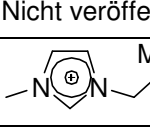


Seitens der RWTH Aachen wurden neue Verfahren zur präparativen Aufarbeitung und vollständigen Rezyklierung des Lösungsvermittlers erforscht. Die Anwendung in Kombination mit elektroenzymatischen Methoden, für die ionische Flüssigkeiten als Lösungsvermittler besonders interessant sind, wurde in Kooperation mit dem Institut für Biotechnologie (IBT), Forschungszentrum Jülich, untersucht.

Einen weiteren grundlegenden Projektschritt stellte der Einsatz einer durch X-Zyme optimierten Alkoholdehydrogenase bzw. das Screening nach ADH-Mutanten dar, die sich neben einer hohen Aktivität bei der Reduktion von 2-Octanon zu 2-Octanol auch

hinsichtlich ihrer Stabilität in ionischen Flüssigkeiten und überkritischen Fluiden ausgezeichneten.

Von besonderer Wichtigkeit war die Identifizierung verschiedener IL, die eine ausreichende Kompatibilität mit dem Biokatalysator aufweisen. Zu diesem Zweck wurden Imidazolium-, Pyridinium- und hydroxy-funktionalisierte tertiäre Ammoniumkationen in Kombination mit organischen und anorganischen Anionen ausgewählt. In Tabelle 1 und 2 sind die verwendeten IL einzusehen.

Tabelle 1: Im Rahmen der Untersuchungen verwendete IL

Name	Struktur	Abkürzung
1-Ethyl-3-hydroxymethylpyridinium-ethylsulfat		[EM(OH)PY] [EtSO ₄]
1-Ethyl-3-methylpyridinium-ethylsulfat		[EMPY] [EtSO ₄]
1-Butyl-3-methylimidazolium-2(2-methoxy-ethoxy)ethylsulfat		[BMIM] [MDEGSO ₄]
1-Ethyl-3-methylimidazolium-2(2-methoxy-ethoxy)ethylsulfat		[EMIM] [MDEGSO ₄]
1-Ethyl-3-methylimidazolium-ethylsulfat		[EMIM] [EtSO ₄]
1-Butyl-3-methylimidazolium-methylsulfat		[BMIM] [MeSO ₄]
1,3-Dimethylimidazolium-methylsulfat		[MMIM] [MeSO ₄]
1-Ethyl-3-methylimidazolium-Diethylphosphat		[EMIM] [Et ₂ PO ₄]
1,3-Dimethylimidazolium-dimethylphosphat		[MMIM] [Me ₂ PO ₄]
1-Methyl-3-octylimidazolium-bromid		[OMIM] [Br]
1-Ethyl-3-methylimidazolium-dicyanamid		[EMIM] [N(CN) ₂]
IL X	Nicht veröffentlicht	
1-Ethyl-3-methylimidazolium-methansulfonat		[EMIM] [MeSO ₃]

Tris-(2-hydroxyethyl)-methyl-ammoniummethylsulfat		[TRIS-(2-OH-Et)-MAM] [MeSO ₄]
1-Ethyl-3-methylimidazolium-n-Octylsulfat		[EMIM] [OctSO ₄]
AMMOENG 100		
AMMOENG 101		
AMMOENG 102		
AMMOENG 112		
AMMOENG 140	Nicht veröffentlicht	

3 Arbeitsschritte und Ergebnisse

3.1 Herstellung der Enzyme

3.1.1 Untersuchung ausgewählter Alkoholdehydrogenasen der zweiten Mutationsgeneration für die enantioselektive Reduktion von 2-Octanon

Nach der Erstellung einer weiteren Mutantengenbibliothek auf Basis der als äußerst aktiv ermittelten Alkoholdehydrogenase RX3 konnten weitere 9 ADHs identifiziert werden, die zur Umsetzung von 2-Octanon befähigt sind.

Analog zu den Versuchen bezüglich der bereits charakterisierten ADH-Mutanten dienten photometrische Messungen der Bestimmung der Aktivität.

Standard-Assay:

970 μ L 100mM Kpi (pH 7,0) mit 5 mM 2-Octanon

20 μ L 15 mM NADPH

10 μ L Enzymlösung (Rohextrakte)

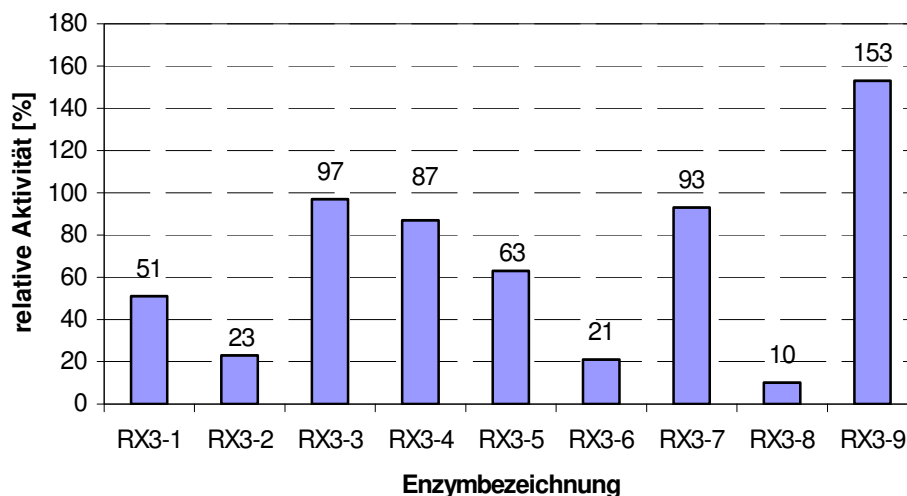


Abbildung 2: Ergebnisse zur Aktivitätsbestimmung aller getesteten ADH Mutanten der zweiten Mutationsgeneration

Um bessere Vergleiche erzielen zu können wurde die gemessene Aktivität der RX3-ADH als 100% definiert.

Die Analyse der Enantioselektivität erfolgte über die Bestimmung des ee-Wertes mittels GC-Chromatographie (chirales Säulenmaterial Lipodex G). Die Ergebnisse sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 2: Aktivität und Enantioselektivität der untersuchten ADHs

Biokatalysator	rel. Aktivität (%)	ee-Wert
RX3-1	51	99,3 %
RX3-2	23	99,1 %
RX3-3	97	99,6 %
RX3-4	87	99,8 %
RX3-5	63	99,1 %
RX3-6	21	99,3 %
RX3-7	93	99,4 %
RX3-8	10	99,8 %
RX3-9	153	99,9 %

Die aktivste Mutante RX3-9 wird fortan bezüglich der Expression, sowie Aufreinigung und kinetische Charakterisierung weitergehend untersucht.

3.1.2 Fermentationsoptimierung der Mutante RX3-9

Die Enzymvariante wurde einer Expressionsoptimierung unterzogen, mit dem Ziel einer Aktivitätssteigerung. Hierbei zeigte sich, dass durch Veränderung der Parameter des Standardfermentationsverfahrens keine Aktivitätserhöhungen hervorgerufen werden konnten.

Tabelle 3: Optimale Fermentationsparameter zur Expression der RX3-9

Expressionsstamm	E.coli JM105
Induktionszeitpunkt	OD580= 0,7
Induktionsstärke	1mM IPTG
Expressionsdauer	20h

3.1.3 Aufreinigung der Alkoholdehydrogenasen RX3, RX4 und RX3-9

Der Erarbeitung eines einheitlichen Aufreinigungsprotokolls beziehungsweise der Entwicklung einer verlässlichen Qualitätskontrolle muss besondere Aufmerksamkeit im Hinblick auf den Einsatzbereich der Erzeugnisse zukommen. Die Enzyme werden im Rahmen der Pharmaproduktherstellung genutzt und unterliegen demnach Auflagen hoher Reinheitsanforderung.

Um Enzyme mit möglichst geringem Fremdprotein zu erhalten und somit unerwünschte Nebenreaktionen zu vermeiden wurden verschiedene Methoden zur Aufarbeitung mit dem Ziel der maximal möglichen spezifischen Aktivität des Enzyms erprobt.

3.1.3.1 Hitzefällung

Bei der Hitzefällung werden hitzelabile Fremdproteine denaturiert und der Probe durch Zentrifugation (15000x g, 15 min, 4 °C) entzogen. Voraussetzung dieser Methode ist, dass das aufzureinigende Enzym eine gewisse Hitzestabilität besitzt. Um die optimalen Bedingungen zu bestimmen, wurden verschiedene Temperaturen und unterschiedliche Inkubationszeiten gewählt.

Tabelle 4: Aktivitäten der RX3 vor und nach Hitzefällung

Temperatur	Dauer	Relative Aktivität
Ohne Hitzefällung	-	100%
30 °C	6h	32%
30 °C	24h	9%
37 °C	6h	15%
37 °C	24h	3%
40 °C	6h	-
40 °C	24h	-
45 °C	6h	-
45 °C	24h	-

Tabelle 5: Aktivitäten der RX4 vor und nach Hitzefällung

Temperatur	Dauer	Relative Aktivität
Ohne Hitzefällung	-	100%
30 °C	6h	100%
30 °C	24h	80%
37 °C	6h	100%
37 °C	24h	70%
40 °C	6h	90%
40 °C	24h	50%
45 °C	6h	60%
45 °C	24h	20 %

Tabelle 6: Aktivitäten der RX3-9 vor und nach Hitzefällung

Temperatur	Dauer	Relative Aktivität
Ohne Hitzefällung	-	100%
30 °C	6h	100%
30 °C	24h	100%
37 °C	6h	100%
37 °C	24h	100%
40 °C	6h	100%
40 °C	24h	85 %
45 °C	6h	100 %
45 °C	24h	70 %

3.1.3.2 Säulenchromatographie

Die Säulenchromatographie stellt ein weiteres Anreicherungsverfahren zur Reinigung von Enzymen dar. Hierbei werden die unterschiedlichen Adsorptionseigenschaften der Proteine genutzt, um diese aufzutrennen. Q-Sepharose diente bei den vorliegenden Versuchen als Säulenmaterial, während mit 350mM Ammoniumsulfat und Natriumchlorid eluiert wurde.

Den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse der Aufreinigungsversuche zu entnehmen. Die relativen Aktivitätswerte beziehen sich auf die der unbehandelten Mutanten.

Tabelle 7: Aktivitäten der RX3, RX4 und RX3-9 vor und nach Säulenchromatographie

Mutante	rel. Aktivität [%] vor der Aufreinigung	rel. Aktivität [%] nach der Aufreinigung
RX3	100%	10%
RX4	100%	30%
RX3-9	100%	12%

3.1.3.3 Ammoniumsulfatfällung

Eine weitere Aufreinigungsmethode ist die Ausfällung mit Ammoniumsulfat. Die durch die Zugabe erzeugte hohe Salzkonzentration hat zur Folge, dass die Hydrathülle der Proteine abgebaut wird. Dabei werden durch die Wassermoleküle die polareren Ionen des Salzes hydratisiert, so dass das Protein ausfällt. Wichtig ist es, die geeignete Ammoniumsulfatkonzentration zu finden, bei der das gewünschte Protein ausfällt (hier 20%). Das Ammoniumsulfat wird vollständig in der Probe gelöst und abzentrifugiert (15000x g, 15 min, 4 °C). Die Aktivität wird sowohl im Überstand als auch im resuspendierten Pellet gemessen, da es vorkommen kann, dass nur ein Teil des Proteins ausgefällt wird.

Tabelle 8: Aktivitäten der RX3, RX4 und RX3-9 vor und nach Ammoniumsulfatfällung

Probe	Spezifische Aktivität
RX3 ohne (NH ₄) ₂ SO ₄	100%
RX3 Überstand	-
RX3 Bodensatz	250%
RX4 ohne (NH ₄) ₂ SO ₄	100%
RX4 Überstand	-
RX4 Bodensatz	386%
RX3-9 ohne (NH ₄) ₂ SO ₄	100%
RX3-9 Überstand	-
RX3-9 Bodensatz	273%

Die Ammoniumsulfatfällung stellt für alle drei Enzymmutanten eine geeignete Methode zur Aufreinigung dar.

3.1.4 Fermentation im großen Maßstab

Mit den als optimal zu betrachtenden Fermentationsparametern wurden die ADH-Mutanten RX3, RX4 und RX3-9 im größeren Maßstab produziert und gemäß der oben beschriebenen Ammoniumsulfat-Methode aufgearbeitet. Das Scale-up bis hin zur 300L-Fermentation erwies sich hierbei als unproblematisch.

3.2 Charakterisierung der Enzyme in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten

3.2.1 Aktivität der ADH in ionischen Flüssigkeiten

Von besonderer Wichtigkeit ist die Identifizierung verschiedener IL, die eine ausreichende Kompatibilität mit dem Biokatalysator aufweisen. Zu diesem Zweck wurde zunächst der Einfluss verschiedener IL auf die Aktivität einer Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus sp.* untersucht. Die bei diesen Versuchen erzielten Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen zusammengefasst:

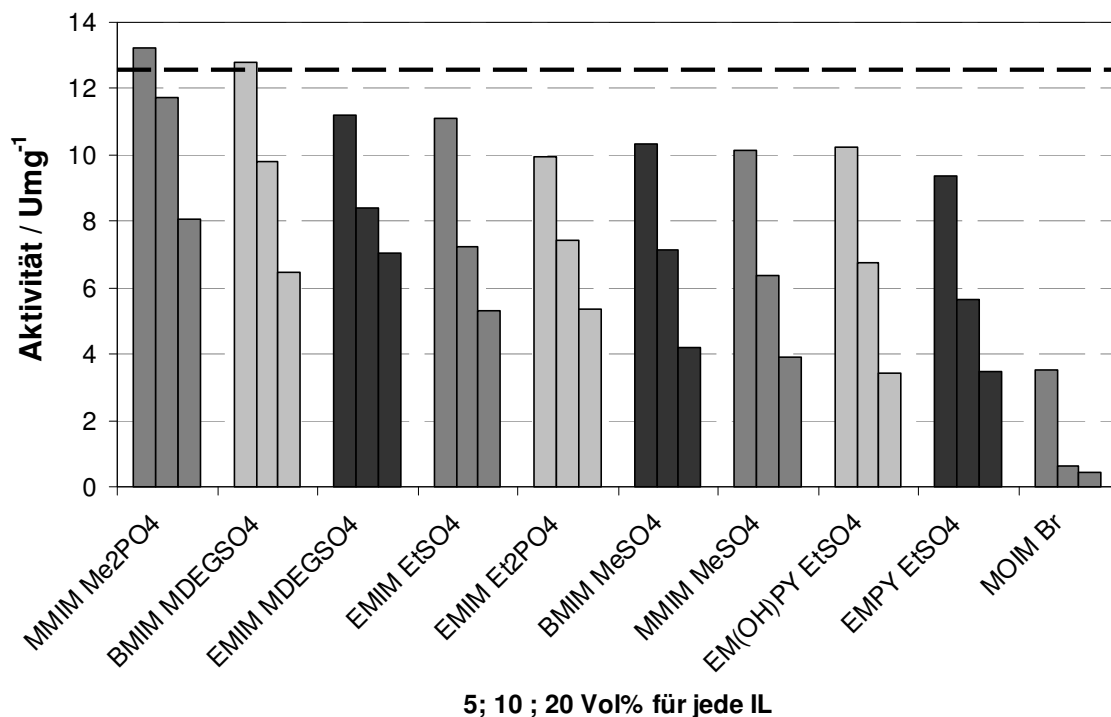


Abbildung 3: Aktivität der ADH in IL 1

10,67 μmol Acetophenon, 0,04 μmol NADPH, ADH in geeigneten Verdünnungen, $T = 25^\circ\text{C}$. Für jede IL wurden 5; 10 und 20 Vol%-Anteile getestet und die Werte von links nach rechts in der jeweiligen Gruppierung aufgetragen. Die gestrichelte, schwarze Linie repräsentiert die Aktivität der ADH in reinem Puffer ($50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KPi pH 7).

In Abbildung 3 ist der Einfluss verschiedener IL, sowie verschiedener Volumenanteil der jeweiligen IL auf die Aktivität der ADH dargestellt. In reinem Puffer wies die ADH eine Aktivität von $12,6\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ auf. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Aktivität - bis auf wenige Ausnahmen - durch die Zugabe der IL reduziert wird. Lediglich für 5 Vol% der IL MMIM Me₂PO₂ und EMIM MDEGSO₄ macht sich eine leichte Aktivitätserhöhung des Enzyms bemerkbar. Mit steigendem Anteil der jeweiligen IL nimmt die Aktivität des Biokatalysators weiter ab. In den meisten Fällen würden die

resultierenden Aktivitäten jedoch immer noch ausreichen um einen Prozess zu realisieren.

Aufgrund neuer Erkenntnisse bezüglich der Struktur-Wirkungsbeziehungen zwischen IL und Biokatalysator wurden noch weitere IL untersucht. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 4 dargestellt:

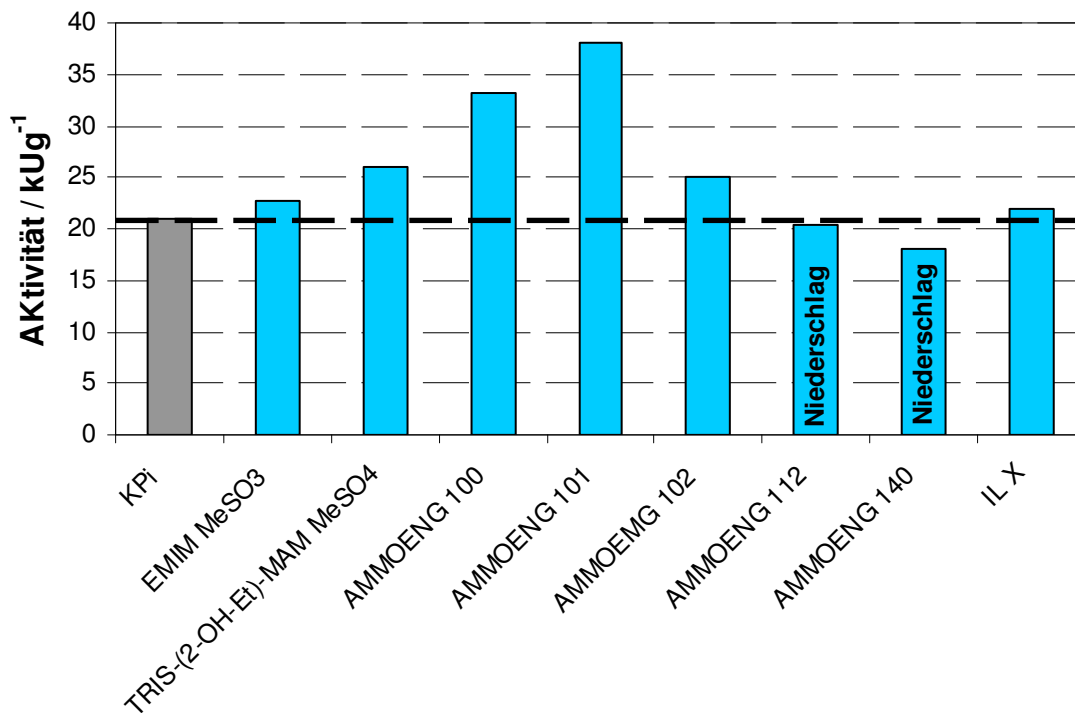


Abbildung 4: Aktivität der ADH in IL 2

7,2 mM 2-Octanon, 0,5 mM NADPH, ADH in geeigneten Verdünnungen, T = 30 °C, 100 mM KPi pH 7 + 10 vol% IL. Die gestrichelte, schwarze Linie repräsentiert die Aktivität der ADH in reinem Puffer (21 kUg⁻¹).

Man erkennt deutlich, dass diese IL einen positiveren Einfluss auf die Enzymaktivität haben. Lediglich in den IL AMMOENG 112 bzw. AMMOENG 140 wird eine reduzierte Aktivität gemessen. Bei Verwendung dieser IL bildete sich jedoch auch immer ein nicht definierbarer Niederschlag, weshalb lediglich für die anderen sechs IL auch noch Versuche mit einem höheren Anteil an IL durchgeführt wurden (siehe Abbildung 5). Die Erhöhung des IL-Anteils bewirkte eine Desaktivierung des Enzyms, die resultierenden Aktivitäten sind allerdings immer noch deutlich besser als bei den zuvor untersuchten IL, weshalb bei den folgenden Versuchen häufig nur diese IL berücksichtigt wurden.

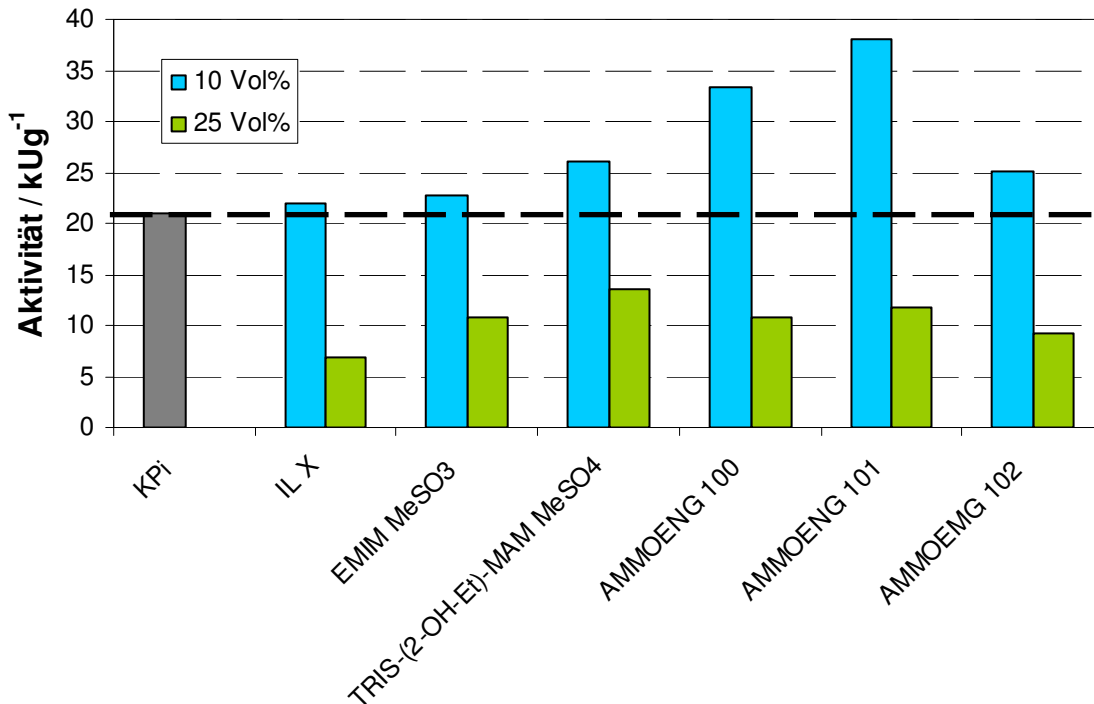


Abbildung 5: Aktivität der ADH in IL 3

7,2 mM 2-Octanon, 0,5 mM NADPH, ADH in geeigneten Verdünnungen, T = 30 °C, 100 mM KPi pH 7 + 10 vol%. Die gestrichelte, schwarze Linie repräsentiert die Aktivität der ADH in reinem Puffer (21 kUg⁻¹).

3.2.2 Stabilität der ADH in ionischen Flüssigkeiten

Da es durchaus vorstellbar ist, dass sich die IL negativ auf die Halbwertszeit des Enzyms auswirken, ist es wichtig den Einfluss der IL auf die Stabilität der ADH zu ermitteln. Die in diesen Versuchen erzielten Ergebnisse für die beim ersten Aktivitätsscreening verwendeten IL (Abbildung 3) können der Abbildung 6 entnommen werden. Da mit der IL MOIM Br vergleichsweise geringe Aktivitäten erzielt wurden, wurde sie bei den Stabilitätsmessungen nicht berücksichtigt.

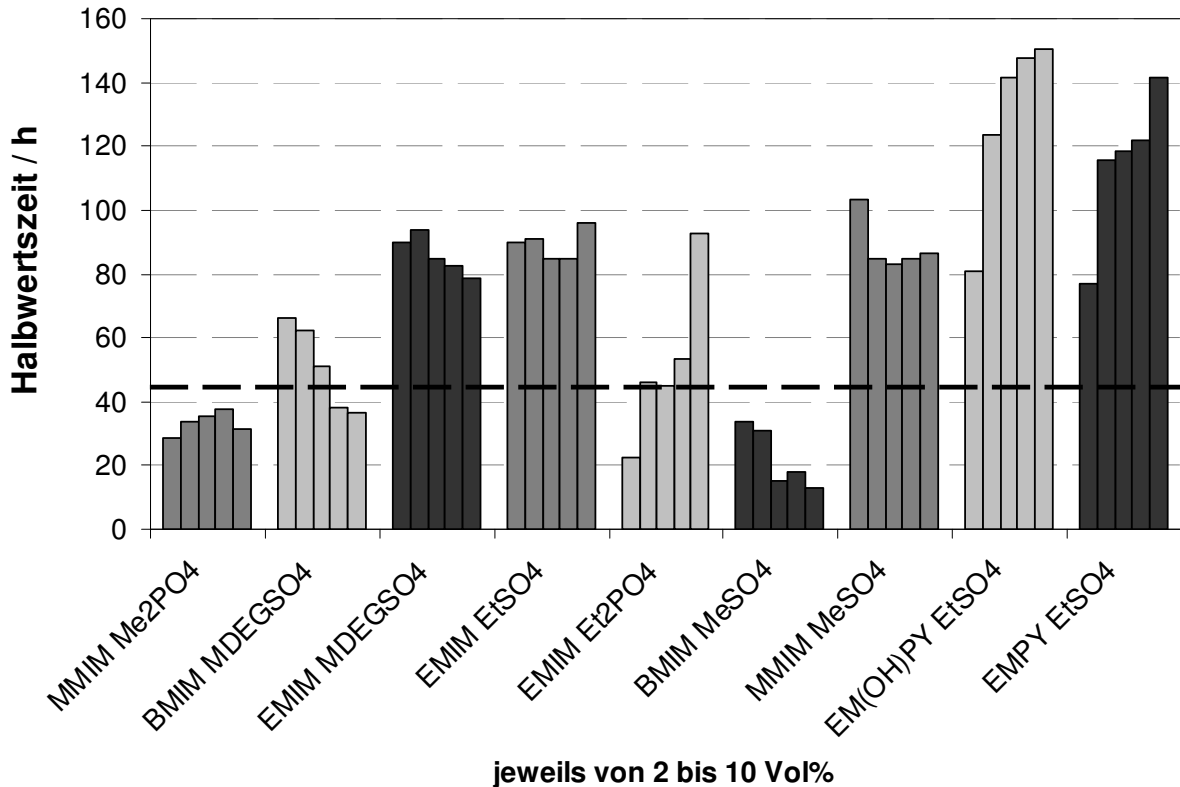


Abbildung 6: Stabilität der ADH in IL 1

Die Proben wurden bei 25 °C gelagert und zu unterschiedlichen Zeiten die verbleibende Aktivität der ADH gemessen. Für jede IL wurden 2, 4, 6, 8 und 10 Vol%-Anteile getestet und die Werte von links nach rechts in der jeweiligen Gruppierung aufgetragen. Die Halbwertszeit in reinem Puffer ($50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KP}_i$ pH 7) betrug 45 h; sie wird durch die gestrichelte, schwarze Linie repräsentiert.

Wie Abbildung 3 belegt, hatte der Zusatz von bis zu 10 Vol% der meisten IL einen positiven Einfluss auf die Stabilität der ADH. Lediglich in Gegenwart der IL MMIM Me₂PO₄ und BMIM MeSO₄ wurden deutlich geringere Halbwertszeiten gemessen. Die besten Ergebnisse wurden mit den beiden Pyridinium-IL erzielt; mit einem Volumenanteil von 10 % von EM(OH)PY EtSO₄ und EMPY EtSO₄ konnte die Stabilität mindestens verdreifacht werden.

Auch für die verschiedenen hydroxyfunktionalisierten IL wurden Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 7 dargestellt:

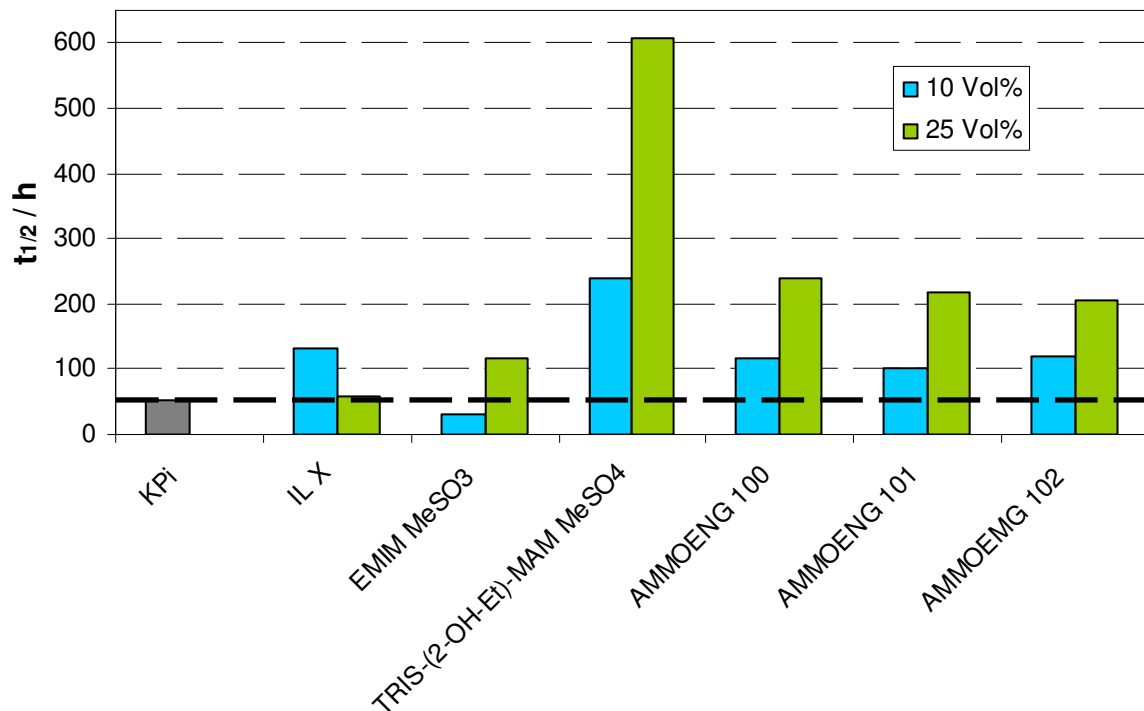


Abbildung 7: Stabilität der ADH in IL 2

Die Proben wurden bei 25 °C gelagert und zu unterschiedlichen Zeiten die verbleibende Aktivität der ADH gemessen. Die Halbwertszeit in reinem Puffer (100 mmol·L⁻¹ KP_i pH 7) betrug 51 h; sie wird durch die gestrichelte, schwarze Linie repräsentiert.

Auch die Verwendung dieser IL hatte einen positiven Einfluss auf die Stabilität des Biokatalysators. Besonders auffällig ist die mit der IL TRIS-(2-OH-Et)-MAM MeSO₄ einhergehende Verbesserung der Halbwertszeiten; mit einem Volumenanteil von 10 % wird eine Stabilisierung um den Faktor 4,7 und bei einem Anteil von 25 Vol% um den Faktor 11 erreicht.

3.3 Untersuchung verschiedener Cofaktorregeneriermethoden

3.3.1 Stabilität der Cofaktoren in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten

Neben der Beeinflussung des Biokatalysators wurde auch vermutet, dass die IL die Stabilität der benötigten Cofaktoren NAD(P)(H) beeinflussen können. Aus diesem Grund wurden auch diese möglichen Effekte untersucht. Die Stabilität der Cofaktoren besitzt sowohl beim Aspekt der Umweltfreundlichkeit, als auch der Wirtschaftlichkeit der Prozesse hohe Relevanz.

Da der Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf die Stabilität der Cofaktoren bislang noch nicht beschrieben ist, wurden mit verschiedenen IL, die sich für die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten ADHs eignen, Cofaktorstabilitätsuntersuchungen durchgeführt. In Abbildung 8 sind die Ergebnisse der Messreihen für NADPH zusammengefasst:

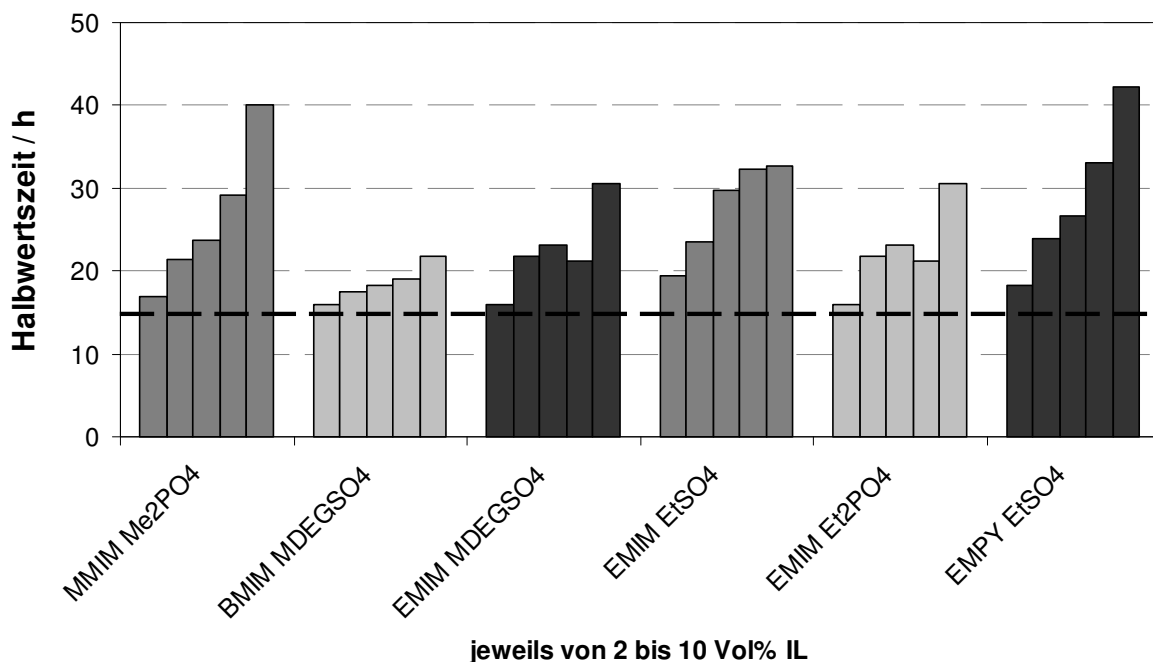


Abbildung 8: Stabilität von NADPH in IL

Die Proben wurden bei 25 °C gelagert und zu unterschiedlichen Zeiten die Menge an enzymaktiven NADPH bestimmt. Für jede IL wurden 2, 4, 6, 8 und 10 Vol%-Anteile getestet und die Werte von links nach rechts in der jeweiligen Gruppierung aufgetragen. Die Halbwertszeit in reinem Puffer ($50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KP}_i$ pH 7) betrug 14,4 h; sie wird durch die gestrichelte, schwarze Linie repräsentiert.

Wie in Abbildung 8 ersichtlich wird in Gegenwart aller ionischen Flüssigkeiten eine Stabilisierung von NADPH erreicht. Mit steigendem Anteil an IL verlängern sich die für NADPH beobachteten Halbwertszeiten. Die besten Ergebnisse wurden mit

10 Vol% EMPY EtSO₄ erzielt; während die Halbwertszeit von NADPH in Puffer lediglich 14,4 h betrug, war so fast eine Verdreifachung auf 42,3 h möglich.

Auch für die hydroxyfunktionalisierten IL wurden Untersuchungen bezüglich ihres Einflusses auf die Stabilität von NADPH durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 9 dargestellt:

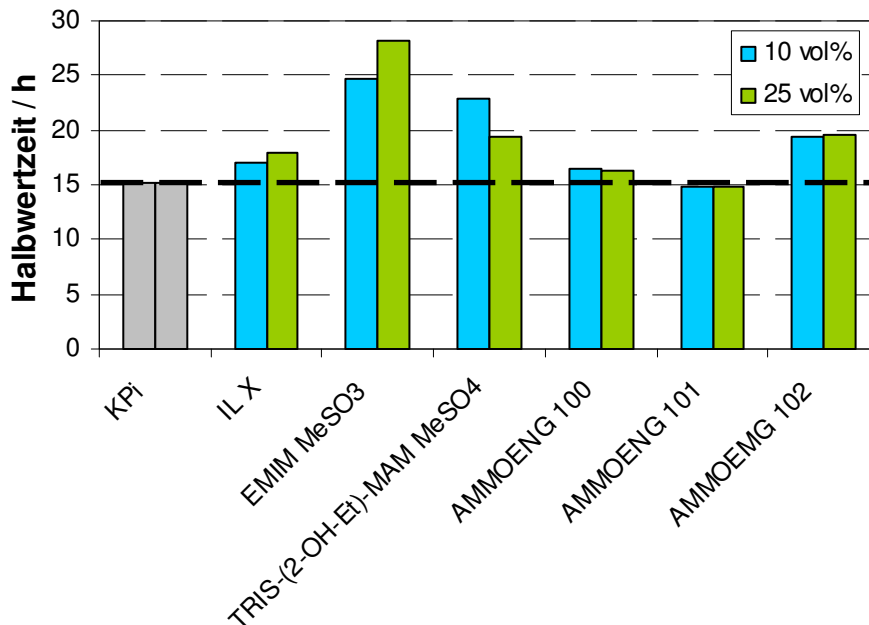


Abbildung 9: Stabilität von NADPH in IL

Die Proben wurden bei 25 °C gelagert und zu unterschiedlichen Zeiten die Menge an enzymaktiven NADPH bestimmt. Die Halbwertszeit in reinem Puffer (100 mmol·L⁻¹ KPi, pH 7) betrug 15,2 h; sie wird durch die gestrichelte, schwarze Linie repräsentiert.

Die so erzielten Halbwertszeiten sind in den meisten Fällen nicht besser als in reinem Puffer, jedoch haben die IL auch keinen negativen Einfluss auf die Stabilitäten. Wie zu erwarten ist die Stabilisierung deutlich von der verwendeten IL abhängig.

Auch für die nicht-phosphorylierten Formen des Cofaktors wurden Versuche zur Stabilität in Gegenwart von IL durchgeführt. Im Vergleich zu den Stabilitäten in reinem Puffer ($t_{1/2} = 51,3$ h) wurden auch für NADH deutliche Verbesserungen der Halbwertszeiten erreicht (siehe Abbildung 10). Die erzielten Werte steigen wiederum mit dem Volumenanteil an IL an. Die beste Halbwertszeit wurde ebenfalls mit EMPY EtSO₄ erreicht, bei einem Volumenanteil von 10% steigt die Halbwertszeit auf 129 h.

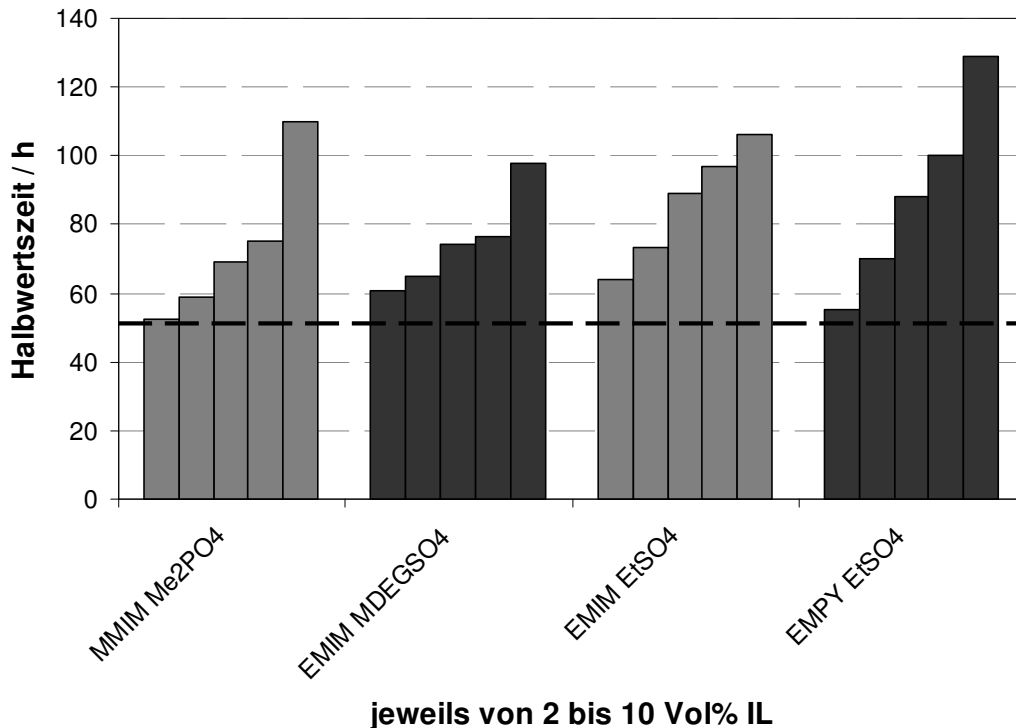


Abbildung 10: Stabilität von NADH in IL

Die Proben wurden bei 25 °C gelagert und zu unterschiedlichen Zeiten die Menge an enzymaktiven NADH bestimmt. Für jede IL wurden 2, 4, 6, 8 und 10 Vol%-Anteile getestet und die Werte von links nach rechts in der jeweiligen Gruppierung aufgetragen. Die Halbwertszeit in reinem Puffer ($50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KP}_i$, pH 7) betrug 51,3 h; sie wird durch die gestrichelte, schwarze Linie repräsentiert.

Bei den Untersuchungen zur Stabilität von NADP^+ bzw. NAD^+ in Gegenwart der gleichen ionischen Flüssigkeiten wurden innerhalb des Messzeitraums von sieben Tagen keine Unterschiede zur Stabilität in reinem Puffer deutlich. Die Menge an enzymaktiven Cofaktor blieb annähernd konstant.

Da bislang nur Verbindungen bekannt sind, die die Stabilität der Cofaktoren reduzieren oder im besten Fall nicht beeinflussen sind diese Ergebnisse von besonderem Interesse. Es wurde eine Erfindungsmeldung abgefasst um eine Patentierung des Zusatzes von IL als cofaktorstabilisierende Agenzien zu erreichen.

3.3.2 Elektrochemische Cofaktorregenerierung

Zur Realisierung eines industrierelevanten Prozesses muss eine effiziente Cofaktorregenerierung etabliert werden. Im Rahmen des Projekts steht dabei besonders die elektrochemische Regenerierung der benötigten Redoxäquivalente im Vordergrund (siehe Abbildung 11), weshalb verschiedene Untersuchungen dazu durchgeführt wurden.

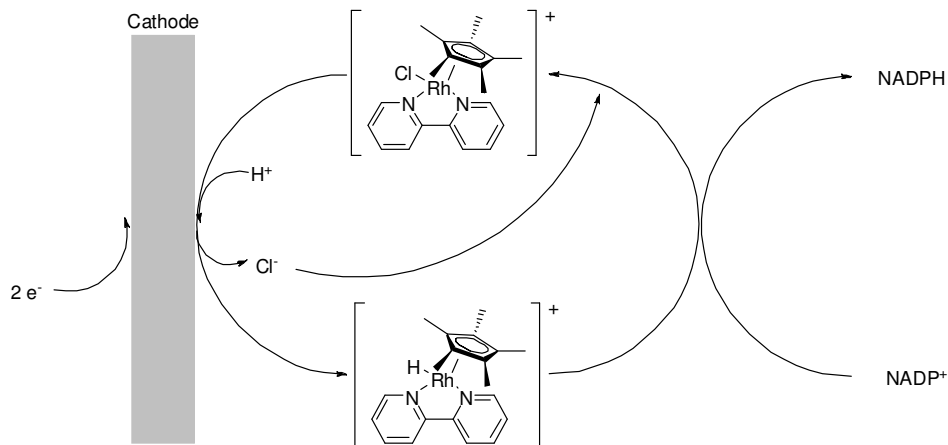


Abbildung 11: Elektrochemische Regenerierung von NADPH

Zunächst wurde der Einfluss verschiedener IL auf die Leitfähigkeit des Reaktionsmediums untersucht. Die Leitfähigkeit des 50 mmol·L⁻¹ Kaliumphosphatpuffers pH 7 betrug ~ 7,3 mS·cm⁻¹.

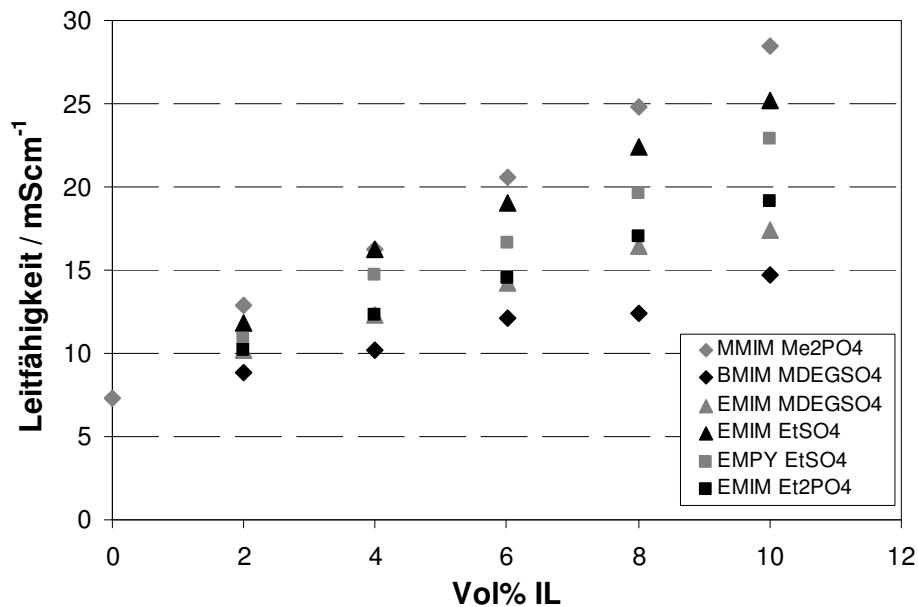


Abbildung 12: Leitfähigkeitserhöhung des Reaktionsmediums bei 25 °C

Wie Abbildung 12 belegt, haben alle untersuchten IL selbst bei geringen Anteilen von 2 Vol% schon einen positiven Einfluss auf die Leitfähigkeit. Mit steigendem

Volumenanteil an IL nimmt die Leitfähigkeit linear zu. Den schwächsten Effekt zeigt BMIM MDEGSO₄; mit 10 Vol% wird lediglich eine Verdopplung der Leitfähigkeit erreicht, während mit der gleichen Menge an MMIM Me₂PO₄ fast eine Vervierfachung der Leitfähigkeit möglich ist. Durch die Erhöhung der Leitfähigkeit des Reaktionsmediums ist später eine Verbesserung der Produktivität des Prozesses möglich.

Darüber hinaus wurde auch der Einfluss einer IL auf die elektrochemische Reduktion von NADP⁺ zu NADPH untersucht. Abbildung 13 gibt zunächst den Reaktionsverlauf dieser Synthese in einem wässrigen Puffermedium wieder:

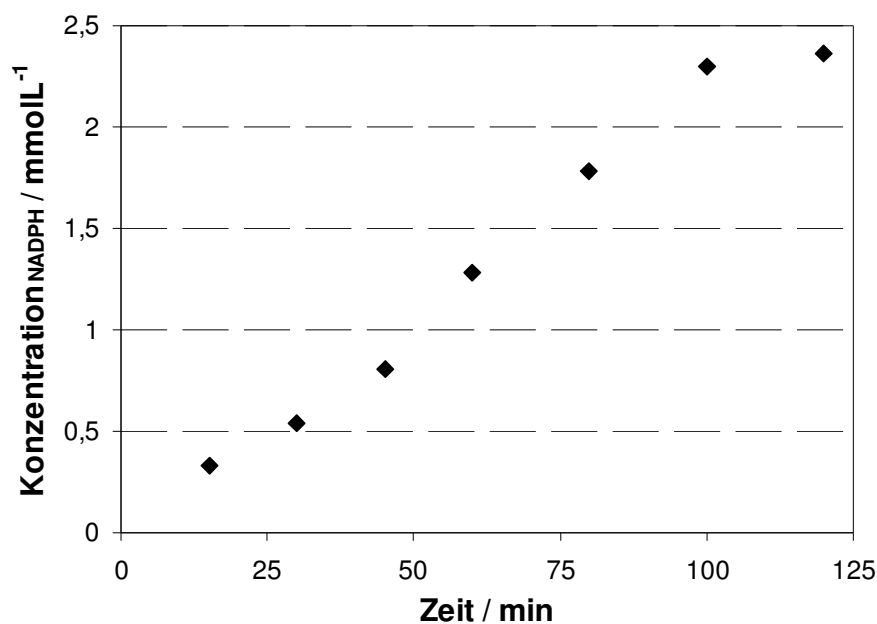


Abbildung 13: Elektrochemische Reduktion von NADP⁺

50 mmol·L⁻¹ Kaliumphosphatpuffer pH 7 mit Argon entgast, Volumen: 200 mL, 0,05 mmol·L⁻¹ Rhbpy, 2,5 mmol·L⁻¹ NAD(P)⁺, Arbeitselektrode: Graphit, Gegenelektrode: Platin, Referenzelektrode: Ag|AgCl, Potential: - 750 mV vs. Ag|AgCl

Da die elektrochemische Aktivierung den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dieser Reaktion darstellt, folgt die Produktentwicklung einem zeitlich linearen Verlauf. Es ergibt sich eine Produktivität von 27,1 mmol·L⁻¹·d⁻¹ und eine Wechselzahl in Höhe von 22,6 h⁻¹ für den Mediator.

Die Kenngrößen wurden folgendermaßen berechnet:

Raum-Zeit-Ausbeute
$$RZA = \frac{m_{\text{Produkt}}}{V_{\text{Reaktion}} \cdot t_{\text{Reaktion}}}$$

Wechselzahl des Mediators
$$\text{tof} = \text{turnover frequency} = \frac{n_{\text{Produkt}}}{n_{\text{Mediator}} \cdot t}$$

Unter vergleichbaren Reaktionsbedingungen wurden auch die Synthesen mit verschiedenen Anteilen an EMPY EtSO₄ im Reaktionsmedium durchgeführt. Es ergeben sich ähnliche Reaktionsverläufe wie bei der Synthese in reinem Puffer dargestellt. In Tabelle 9 sind die wichtigsten Kenngrößen der jeweiligen Synthesen zusammengefasst:

Tabelle 9: Zusammenfassung der Ergebnisse der elektrochemischen Reduktion von NADP⁺

Reaktionsmedium	RZA / mmol·L ⁻¹ ·d ⁻¹	tof _{Rhbp} / h ⁻¹
100 % Puffer	27,1	22,6
2 Vol% EMPY EtSO ₄ + 98 Vol% Puffer	36,8	30,7
5 Vol% EMPY EtSO ₄ + 95 Vol% Puffer	50,6	42,2
10 Vol% EMPY EtSO ₄ + 90 Vol% Puffer	74,2	61,8

Mit steigendem Anteil an EMPY EtSO₄ im Reaktionsmedium werden bessere Ergebnisse bezüglich Produktivität und Wechselzahl des Mediators Rhbp erreicht. Trägt man die jeweiligen Kenngrößen in einem Diagramm gegen den Volumenanteil an EMPY EtSO₄ auf, so ergibt sich folgendes:

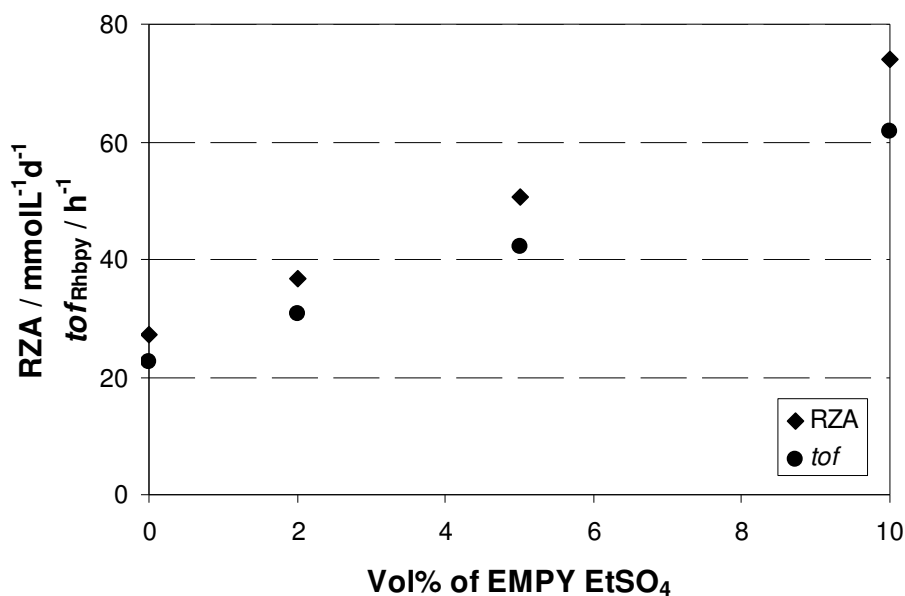


Abbildung 14: Kenngrößen der elektrochemischen Reduktion von NADP⁺

Durch die erhöhte Leitfähigkeit des Reaktionsmediums wird die elektrochemische Aktivierung des Mediators beschleunigt, die Wechselzahl für den Mediator und damit

auch die Produktivität der Synthesen nehmen linear mit steigendem Anteil an EMPY EtSO₄ zu (Abbildung 14). Die IL hat somit einen positiven Einfluss auf die elektrochemische Reduktion von NADP⁺ und die Kopplung mit einer enzymkatalysierten Reaktion könnte viel versprechende Ergebnisse liefern.

Bei detaillierten Untersuchungen zeigte sich jedoch, dass das Enzym in Gegenwart des Mediators bzw. das der Mediator in Gegenwart des Enzyms nicht stabil ist. In Abbildung 15 sind zum Vergleich die Stabilitäten des Enzyms in reinem Puffer bzw. in Gegenwart geringer Mengen des Mediators aufgetragen. In Gegenwart des Mediator beträgt die Halbwertszeit der ADH nur noch 10 % der Halbwertszeit in reinem Puffer.

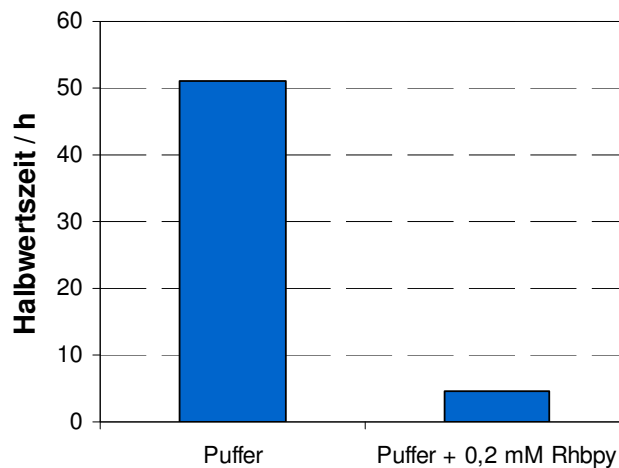


Abbildung 15: Einfluss des Rhodiummediators auf die Stabilität der ADH

Darüber hinaus wurde mittels cyclischer Voltammetrie der Einfluss verschiedener Aminosäuren auf den resultierenden Aktivierungsstrom des Mediators untersucht. Die resultierenden Ströme sind in der folgenden Abbildung dargestellt:

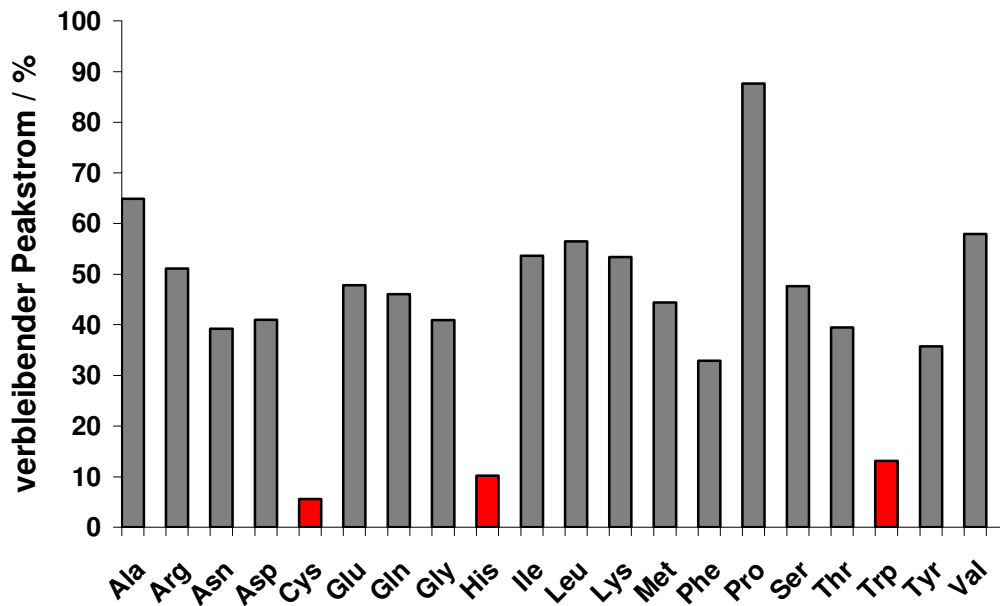


Abbildung 16: Einfluss des Biokatalysators auf den Rhodiumkatalysator

Dargestellt ist der resultierende Peakstrom im Vergleich zum Peakstrom in Puffer. Verwendete Elektroden: Arbeitselektrode: Graphit, Gegenelektrode: Platin, Referenz: Ag/AgCl.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde ein Reaktorkonzept zur räumlichen Trennung der elektrochemischen Cofaktorregenerierung und der eigentlichen enzymkatalysierten Synthese realisiert. Der Reaktoraufbau ist in Abbildung 17 dargestellt.

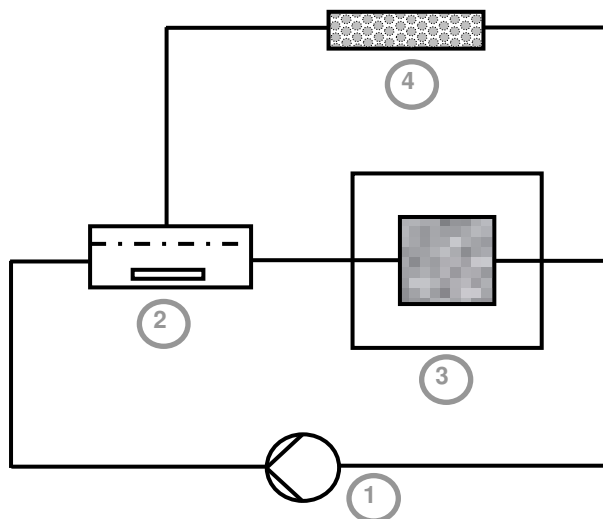


Abbildung 17: Reaktoraufbau

1 = Pumpe, 2 = Membranreaktor, 3 = Elektrolysezelle, 4 = immobilisiertes Enzym

Um nur den Transfer des Cofaktors zwischen Enzymmembranreaktor und Elektrolysezelle zu ermöglichen, wurde der Rhodiummediator polymer-vergrößert (Syntheseroute nach Abbildung 18) und mittels einer Membran zurück gehalten.

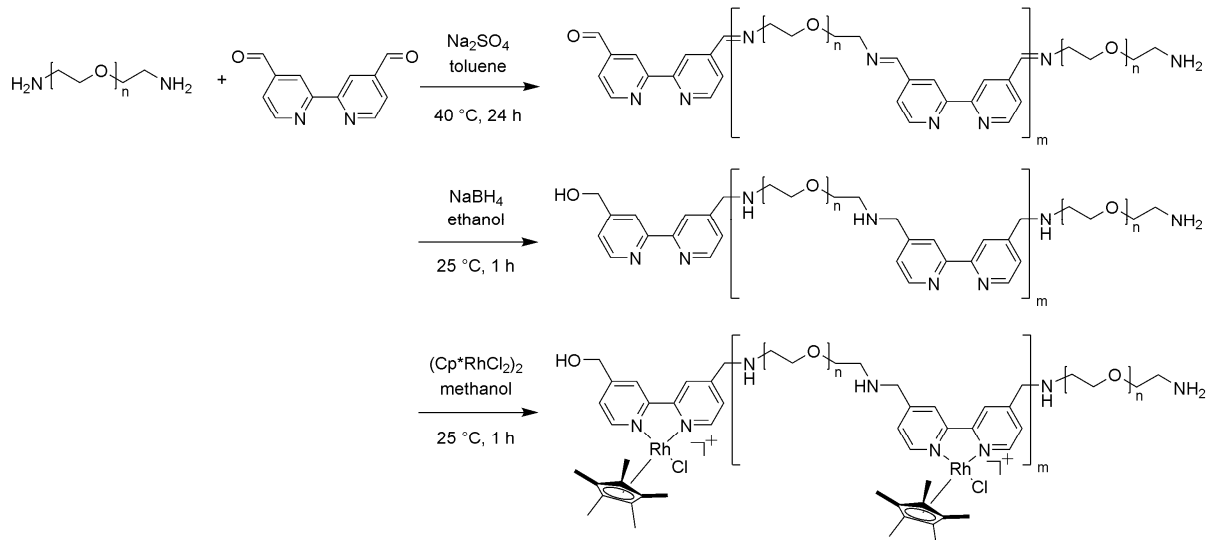


Abbildung 18: Mediatorsynthese

Details zur Syntheseroute können der Publikation F. Hildebrand, S. Lütz, Chem. Europ. J. **2009**, accepted. entnommen werden.

Der so hergestellte Mediator konnte erfolgreich bei der elektroenzymatischen Reduktion von p-Cl-Acetophenon eingesetzt werden (siehe Abbildung 19). Dabei konnte eine Produktivität von $10\text{ mmolL}^{-1}\text{d}^{-1}$ ($ee > 97.3\%$) und eine $\text{TTN}_{\text{Rh-Mediator}} > 200$ erreicht werden. Im Laufe der Reaktion wurde das Enzym nicht deaktiviert. Nach erfolgter Synthese war das Enzym ebenso aktiv wie zu Beginn. Der Mediator konnte zu 86 % wieder gewonnen werden. Die Ergebnisse der elektrochemischen Untersuchungen werden in F. Hildebrand, S. Lütz, Chem. Europ. J. **2009**, accepted. bzw. in C. Kohlmann, et al., J. Am. Chem. Soc. **2009**, submitted. veröffentlicht.

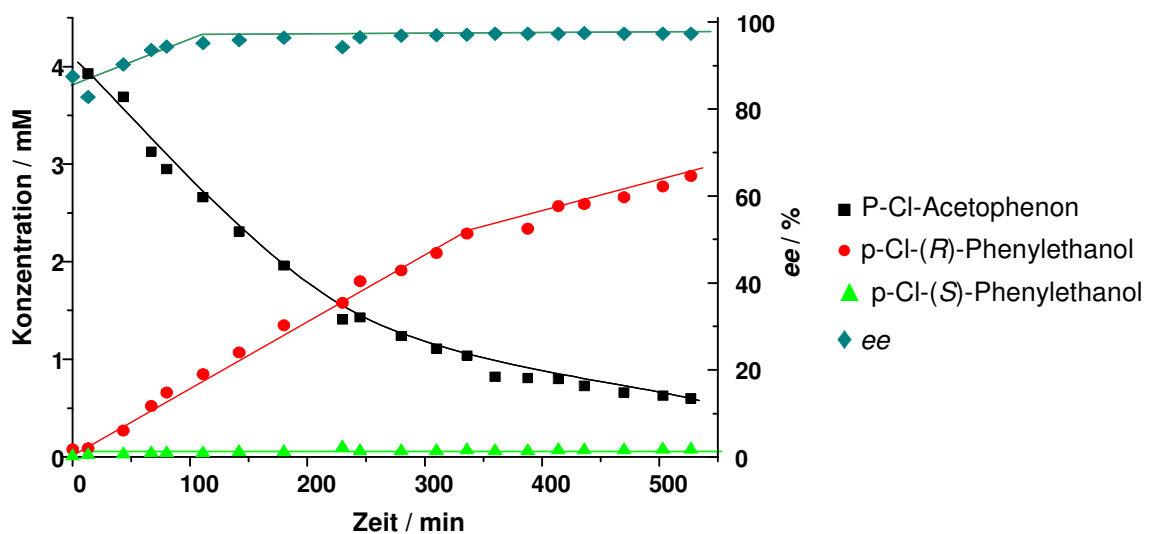


Abbildung 19: Reaktionsverlauf

100 mL 100 mM KP_i -Puffer, pH = 7; 3 mM MgCl_2 , $20\text{ }^\circ\text{C}$, 4 mM p-Cl-Acetophenon, 0,1 mM Mediator, 1 mM NADP^+ , $-800\text{ mV vs. Ag|AgCl}$.

3.3.3 Substratgekoppelte Cofaktorregenerierung

Da das Projekt auf eine Vermeidung organischer Lösungsmittel abzielt, wurde die substratgekoppelte Cofaktorregenerierung nicht in Betracht gezogen.

3.3.4 Enzymgekoppelte Cofaktorregenerierung

Da die ursprünglich geplante elektrochemische Cofaktorregenerierung aufgrund der geringen Produktivitäten ($10 \text{ mmolL}^{-1}\text{d}^{-1}$) für einen industriellen Prozess nicht in Betracht gezogen werden kann, wird im Folgenden auf die Möglichkeit zur enzymgekoppelten Cofaktorregenerierung eingegangen. Als mögliche Regenerienzyme werden eine Malatdehydrogenase (MDH) und eine Glucosedehydrogenase (GDH) in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten charakterisiert.

3.3.4.1 Malatdehydrogenase

In Abbildung 20 ist der Einfluss verschiedener IL auf die Aktivität einer Malatdehydrogenase dargestellt:

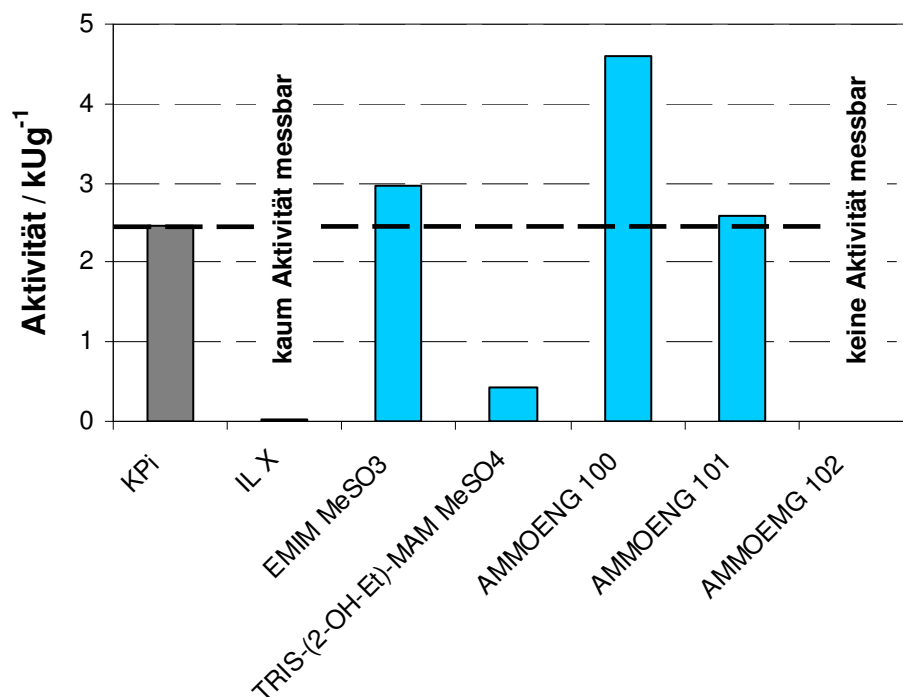


Abbildung 20: Aktivität der MDH in IL

180 mM L-Äpfelsäure, 0,5 mM NADP^+ , MDH in geeigneten Verdünnungen, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, 100 mM KPi pH 7 + 10 vol% IL. Die gestrichelte, schwarze Linie repräsentiert die Aktivität der MDH in reinem Puffer ($2,5 \text{ kUg}^{-1}$).

Im Vergleich zu den Untersuchungen der Alkoholdehydrogenase wird ein negativerer Einfluss sichtbar; lediglich für drei der untersuchten IL ist noch eine akzeptable Restaktivität verfügbar. Außerdem zeigt sich in diesem Fall eine besonders deutliche Abhängigkeit der Aktivitäten von den jeweiligen IL. Allerdings ist keine Systematik zu

erkennen. Für die vielen IL in denen das Enzym aktiv war wurden zusätzlich Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt (Abbildung 21). Diese zeigten gute Stabilitäten für die IL EMIM MeSO₃ und TRIS-(2-OH-Et)-MAM MeSO₄. Mit der IL AMMOENG 100 wurden gute Ergebnisse bezüglich der Enzymaktivität gefunden, jedoch zeigte sich bei den Stabilitätsuntersuchungen eine Reduzierung der Halbwertszeit der MDH von 21 h auf 4,1 h.

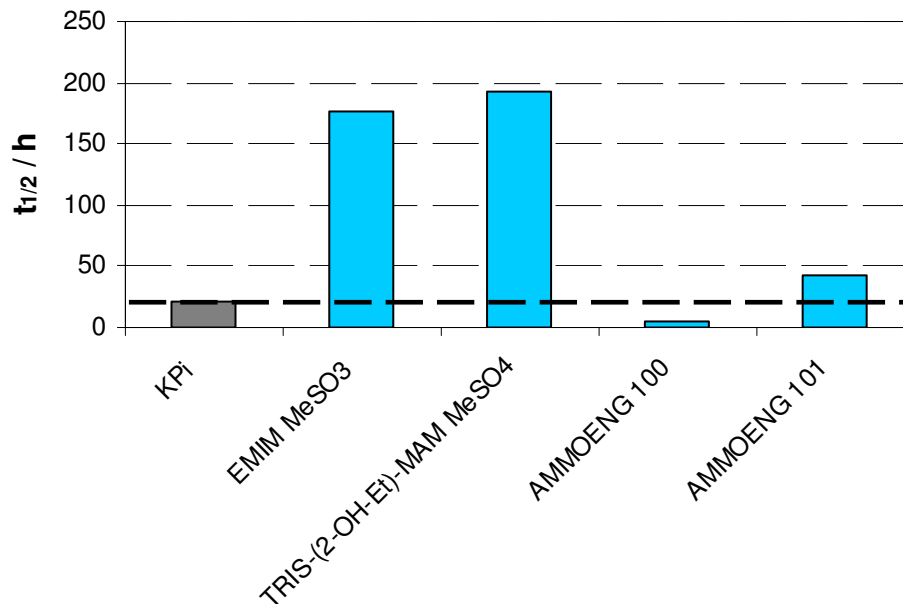


Abbildung 21: Stabilität der MDH in IL

Die Proben wurden bei 25 °C gelagert und zu unterschiedlichen Zeiten die verbleibende Aktivität der MDH gemessen. Die Halbwertszeit in reinem Puffer (100 mmol·L⁻¹ KP_i pH 7) betrug 21 h; sie wird durch die gestrichelte, schwarze Linie repräsentiert.

3.3.4.2 Glucosedehydrogenase

Als weiteres mögliches Regenerierenzym wurde eine Glucosedehydrogenase untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 22 zusammengefasst:

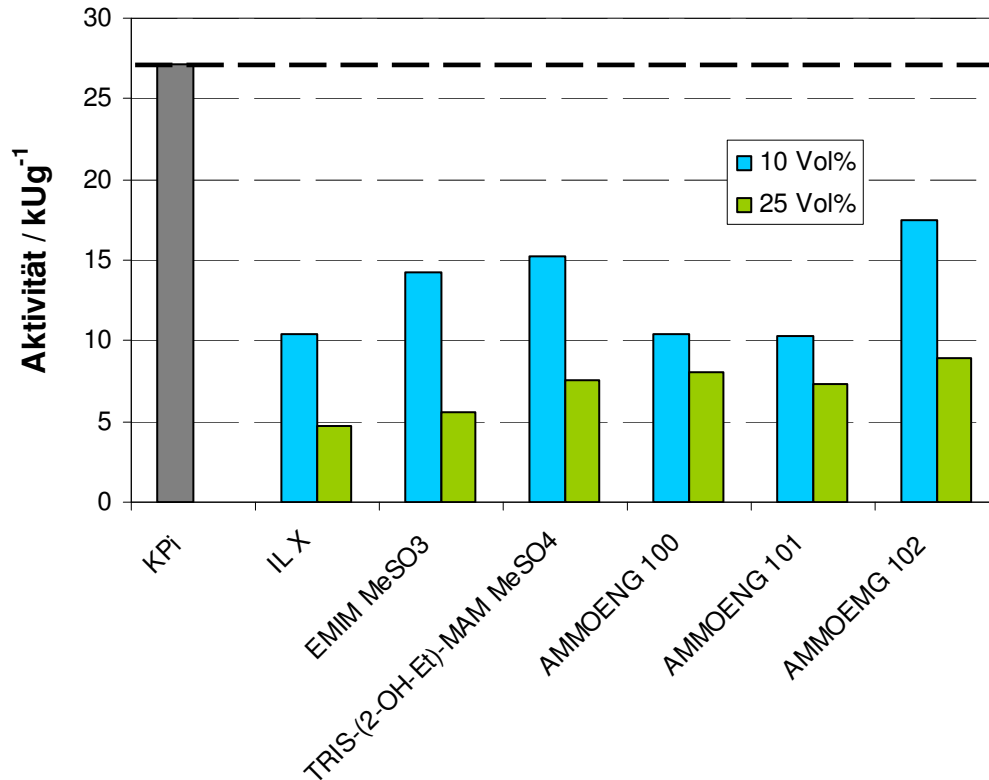


Abbildung 22: Aktivität der GDH in IL

180 mM Glucose, 0,5 mM NADP⁺, GDH in geeigneten Verdünnungen, T = 30 °C, 100 mM KPi pH 7 + IL. Die gestrichelte, schwarze Linie repräsentiert die Aktivität der GDH in reinem Puffer (27 kUg⁻¹).

Im Gegensatz zur ADH wird die GDH in Gegenwart von IL deutlich deaktiviert. Im Vergleich zur MDH zeigt sich jedoch keine so starke Abhängigkeit des Einflusses von den verschiedenen ILs. Für 10 vol% IL werden Restaktivitäten zwischen 50 % und 30 % der Aktivität in reinem Puffer gefunden. Mit steigendem Anteil an IL wird das Enzym stärker deaktiviert.

In Abbildung 23 ist der Einfluss der IL auf die Stabilität des GDH dargestellt. Wie auch schon die MDH weist die GDH in Gegenwart der IL AMMOENG 100 die geringste Stabilität auf. Auch durch die IL AMMOENG 102 wird die Halbwertszeit des Enzyms deutlich reduziert. Mit alle weiteren ILs werden verbesserte Stabilitäten deutlich.

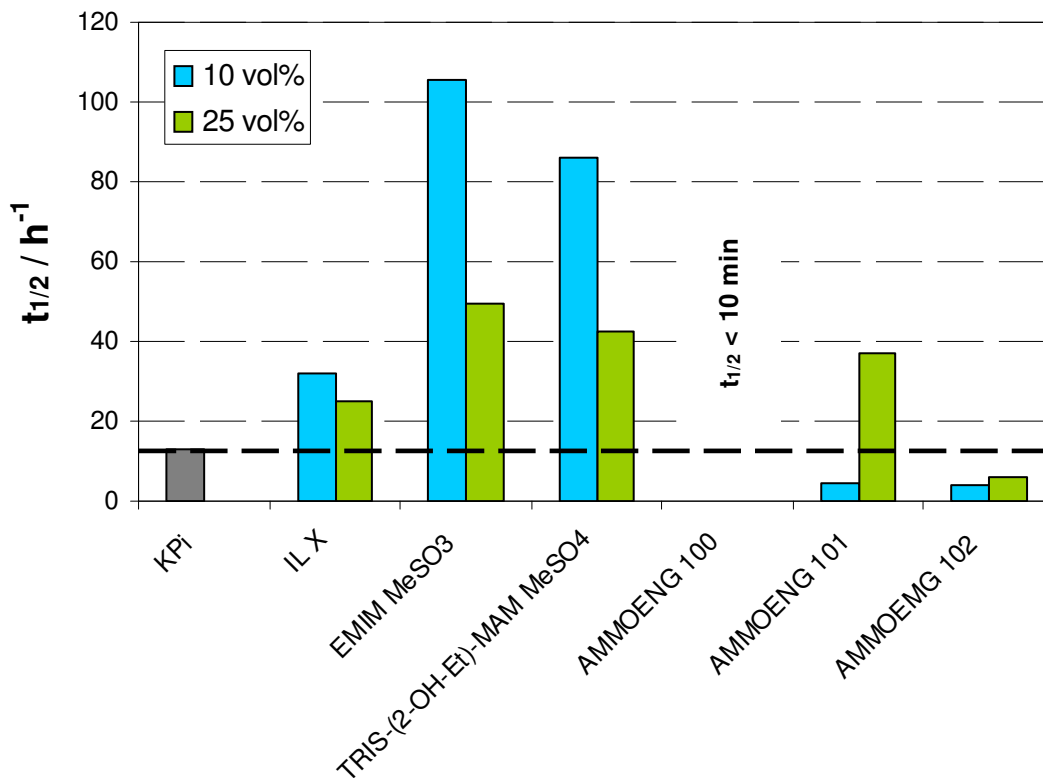


Abbildung 23: Stabilität der GDH in IL

Die Proben wurden bei 25 °C gelagert und zu unterschiedlichen Zeiten die verbleibende Aktivität der GDH gemessen. Die Halbwertszeit in reinem Puffer (100 mmol·L⁻¹ KPi, pH 7) betrug 13 h; sie wird durch die gestrichelte, schwarze Linie repräsentiert.

3.4 Synthesen

3.4.1 Synthesen mit ionischer Flüssigkeit

Anhand der Voruntersuchungen wurde die Enzymgekoppelte Cofaktorregenerierung mit Hilfe der Glucosedehydrogenase als Regenerierenzym ausgewählt. Ein geeignetes Verhältnis von ADH zu GDH, ebenso wie die einzusetzende Menge an Cofaktor wurde anhand von Synthesen im Satzreaktor festgelegt. Mit den so ermittelten Parametern wurden Versuche mit Zugabe von IL durchgeführt. In Abbildung 24 sind die Reaktionsverläufe der Synthese von 2-Octanol bei Zugabe verschiedener Mengen an TRIS-(2-OH-Et)-MAM MeSO₄ dargestellt. In Tabelle 10 sind die berechneten Kennzahlen der Synthesen zusammengefasst.

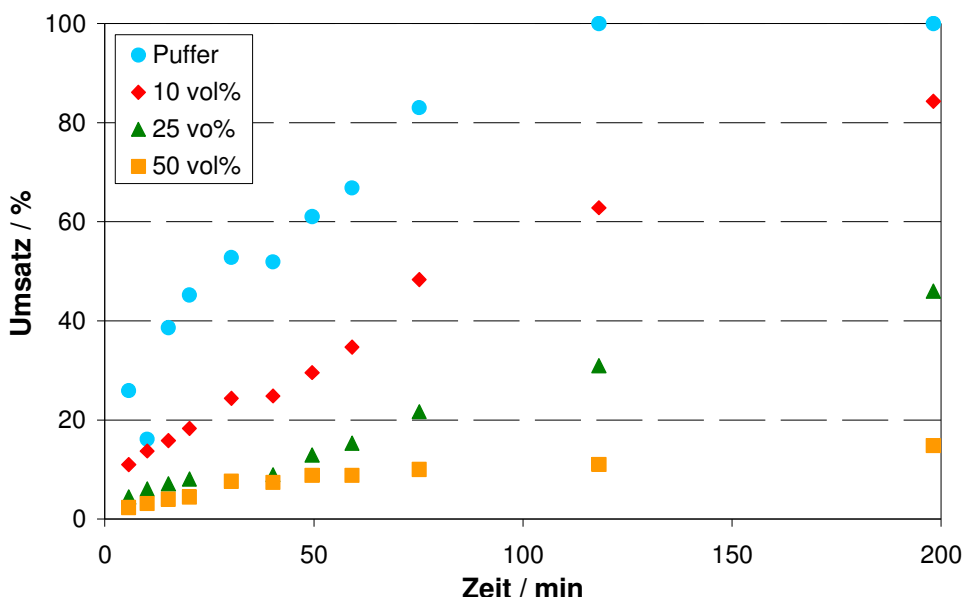


Abbildung 24: Reaktionsverläufe der Synthese von 2-Octanol bei Zugabe verschiedener Mengen an TRIS-(2-OH-Et)-MAM MeSO₄

8 mL 100 mM KPi-Puffer pH 7, 2,5 mM MgSO₄, x vol% IL, 8 mM 2-Octanon, 0,1 mM NADP⁺, 100 mM Glucose, 0,2 mg ADH, 0,2 mg GDH

Tabelle 10: Kennzahlen der Synthesen mit IL (berechnet für den erreichten Umsatz nach 2 h)

	Puffer	+ 10 vol% IL	+ 25 vol% IL	+ 50 vol% IL
ee / %	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9
STY / mmolL ⁻¹ d ⁻¹	97,5	61,2	30,2	10,7
STY / gL ⁻¹ d ⁻¹	12,5	7,85	3,87	1,38
TTN _{ADH}	33300	20900	10300	3700
TTN _{GDH}	13100	8200	4100	1400
TTN _{NADP⁺}	80	50	25	9

Die Zugabe an ionischer Flüssigkeit führte nicht zu einer Verbesserung der Produktivität. Anhand der Reaktionsverläufe erkennt man deutlich, dass die Reaktionsgeschwindigkeit mit steigendem Anteil an IL abnimmt. Dies würde man nach Untersuchung des Einfluss der Substratkonzentration auf die Enzymaktivität (siehe Abbildung 25) zumindest bei einem Anteil von 10 vol% IL noch nicht erwarten. Betrachtet man jedoch den Einfluss des entstehenden Produktes (siehe Abbildung 26), so zeigt sich, dass die ADH durch dieses inhibiert wird. In Gegenwart von 10 vol% IL ist der Einfluss jedoch ausgeprägter als in reinem Puffer.

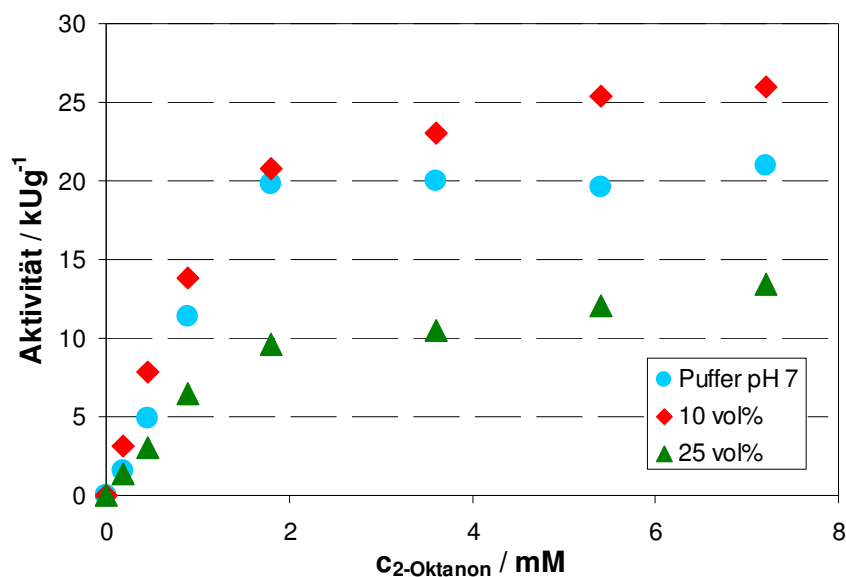


Abbildung 25: Einfluss der Substratkonzentration auf die Enzymaktivität
x mM 2-Octanon, 0,5 mM NADPH, T = 30 °C, 100 mM KPi pH 7 + x vol% IL.

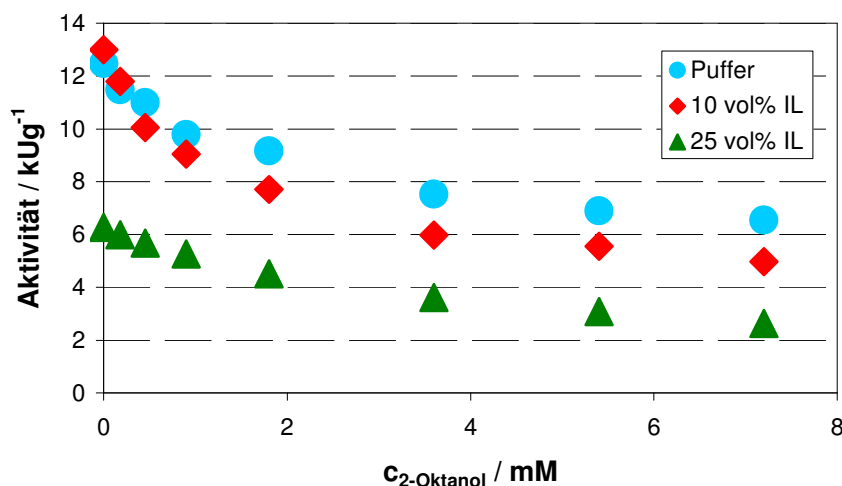


Abbildung 26: Einfluss der Produktkonzentration auf die Enzymaktivität
7,2 mM 2-Octanon, x mM 2-Octanol 0,5 mM NADPH, T = 30 °C, 100 mM KPi pH 7 + x vol% IL.

3.4.2 Synthesen mit Substrat als zweiter Phase

Da die Zugabe an IL nicht nur die Substrat- sondern auch die Produktlöslichkeit beeinflusst und diese anhand der im vorigen Kapitel zusammengefassten Erkenntnisse zum Erhalt der Enzymaktivität niedrig sein sollte, kommen nur Löslichkeitsvermittler in Frage, die lediglich die Substratlöslichkeit beeinflussen. Da die ADH darüber hinaus in Puffer schon unterhalb der maximalen Löslichkeit von 8 mM ihre maximale Reaktionsgeschwindigkeit (v_{max}) erreicht, wurde zusätzlich zu den Versuchen mit ionischer Flüssigkeit auch Versuche mit Substrat als zweiter Phase durchgeführt. In Tabelle 11 sind die wesentlichen Kennzahlen dieser Synthesen im Vergleich zu den Ergebnissen bei maximaler Löslichkeit (8 mM) dargestellt.

Tabelle 11: Kennzahlen der Synthesen mit Substrat als zweiter Phase

Die Kennzahlen wurden für den Zeitpunkt bei Erreichen des vollen Umsatzes berechnet.

C_{Octanon} / mM	8	80	400	800
m_{ADH} / mg	0,2	2	10	20
m_{GDH} / mg	0,2	2	10	20
C_{Glucose} / mM	100	180	500	900
C_{NADP+} / mM	0,1	0,1	0,1	0,1
ee / %	> 99.9	> 99.9	> 99.9	> 99.9
STY / mmolL⁻¹d⁻¹	96.5	237	480	800
STY / gL⁻¹d⁻¹	12.4	30.4	61.5	103
TTN_{ADH}	33300	33300	33300	33300
TTN_{GDH}	13100	13100	13100	13100
TTN_{NADP+}	80	800	4000	8000

Anhand der ermittelten Kennzahlen erkennt man sehr deutlich, dass man aufgrund der Kinetik des Enzyms keinen Lösungsvermittler benötigt. Da die so erreichten Werte Prozess-relevant sind wurde die nachfolgende Prozessbeurteilung mit Hilfe von Sabento für den Prozess mit einem Anteil von 800 mM Substrat durchgeführt.

3.4.3 Analytik und Aufarbeitung

3.4.3.1 GC-Analytik für die Bestimmung der Reaktionsverläufe

Zur Bestimmung der Umsätze wurden nach bestimmten Zeitabständen Proben gezogen und diese mit gleichem Volumen an Hexan extrahiert. Die organische Phase wurde mittels Gaschromatographie analysiert. Bei den Versuchen mit Substrat als zweiter Phase wurden aus der organischen Phase Proben gezogen, diese mit Hexan verdünnt und anschließend ebenfalls gaschromatographisch untersucht.

Folgende Methode wurde verwendet:

80 °C (3min), 10 °C/min bis auf 120 °C (6 min), Säule: Varian Chirasil Dex (25 m)

3.4.3.2 GC-Analytik für die Bestimmung der Enantiomerenreinheit des Produkts

Zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit des Produktes wurden zunächst 300 µL wässrige Probe mit 300 µL Hexan extrahiert. Anschließend wurden 250 µL der organischen Phase mit 50 µL N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA) versetzt und für 20 min auf 80 °C geheizt. Die so erhaltenen Proben wurden wie folgt analysiert: 80 °C (3 min), 1 °Cmin⁻¹ bis auf 100 °C (5 min). Säule: Varian Chirasil Dex (25 m).

3.4.3.3 Aufarbeitung mit Hilfe von überkritischem CO₂

Die Extraktion des entstehenden Produktes mittels überkritischem CO₂ stellt eine interessante, ressourcenschonende Alternative zur Extraktion mit organischen Lösungsmitteln dar. Die dazu benötigten Parameter bezüglich Druck und Temperatur sind moderat. So kann man bei 80 bar CO₂, 35 °C, 1 mLmin⁻¹ eine vollständige Abtrennung von 20 mM 2-Octanol (4 mL) innerhalb von 2 min erreichen.

3.5 Ökoeffizienzanalyse

Mit Hilfe der Software SABENTO (Version 1.2.0.316) wurden sowohl für die Herstellung der verwendeten Biokatalysatoren als auch für die Synthese von 2-Octanol eine ökonomische und eine ökologische Prozessbeurteilung durchgeführt. Die zu diesem Zweck gemachten Annahmen und die jeweiligen Berichte von SABENTO können dem Anhang entnommen werden. Die aufgetretenen Probleme werden in den nachfolgenden Unterkapiteln zusammengefasst.

Generell ergaben sich folgende Softwareprobleme:

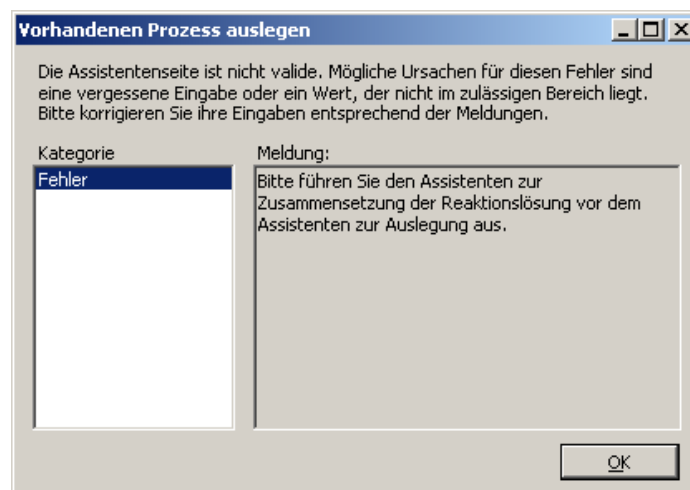
- Die Software konnte nur auf einem Computer benutzt werden, auf dem keine – außer den für Sabento benötigten – Programme installiert waren.
- Zusätzlich brauchte man Administratorrechte um die Software verwenden zu können.
- Nach der Berechnung von mehr als 5 Prozessen wurden die Ergebnisse unlogisch, dann hieß es die Lizenz sei nicht mehr gültig und man musste die jeweiligen .gdb-Dateien an anderer Stelle abspeichern und mit leeren neu anfangen.

Bei der Verwendung des Programms sind folgende Auffälligkeiten bemerkt worden:

- Geht man bei den Assistenten „Zurück“ und dann „Weiter“ erscheint eine Fehlermeldung und man musste abrechnen.
- Es steht nicht dasselbe im Handbuch wie in dem Assistenten:

standteile, die Salze darstellen, dem Material *gelöste anorganische Verbindungen* zugerechnet, welches sich in der Fermentationsbrühe befindet.

Zur korrekten Ausführung dieses Assistenten wird der Biotrockenmassegehalt benötigt. Führen sie daher immer zuerst den Assistenten zur Auslegung aus (siehe vorheriger Abschnitt), bevor sie die Reaktionslösung zusammensetzen.



- Einige wesentliche Aufarbeitungsmethoden wie z.B. Extraktion, aber auch Hitzefällung zur Proteinaufreinigung fehlen.
- Wählte man bei der Aufarbeitung einen Pufferbehälter, wurde immer ein Gesamtaufreinigungswirkungsgrad von ca. 900 000 %, und später dann ein Umsatz von 0 € angegeben.
- Bei der Zentrifuge mal ein Gesamtaufreinigungswirkungsgrad von 60 %, mal von 100 % angenommen.
- In den jeweiligen Sankey-Diagrammen sind verschiedenste Zuflüsse eingezeichnet, die man jedoch nicht bearbeiten kann.
- In den Sankey-Diagrammen sind ein Zufluss für das Medium und ein weiterer für Reagenzien angegeben. Dennoch musste man alle benötigten Reagenzien über das Medium zugeben, da es keine Möglichkeiten gab den Reagenzienzufluss zu bearbeiten.
- Bei der Sozialen Bewertung wird gelegentlich Prozessentwicklung und Prozessanwendung verwechselt.
- Außerdem konnte man, wenn in Klammern steht „siehe Hilfe“ diesen Button nicht benutzen (Schrift grau).
- Die Assistenten enthalten viele Rechtschreibfehler.

3.5.1 Herstellung der verwendeten Enzyme

Die Herstellung der Enzyme wurde wie folgt modelliert:

- Prozessführung:
Mikroorganismus, intrazellulär, Belüftung, keine Kühlung, keine pH-Regulierung
- Aufarbeitung:
Zentrifuge, Suspendieren, Kugelmühle, Suspendieren, Zentrifuge, Filtrieren, Gefriertrocknen

Dabei traten jedoch folgenden Ungereimtheiten auf:

- Beim Auslegen des Prozesses wird ein Gesamtaufreinigungswirkungsgrad von 59.4% angegeben, wobei die Produktmasse vor der Aufarbeitung 8.15 t und nach der Aufarbeitung 4.84 t beträgt. Schaut man sich nun aber den Stoffstrom am Gefriertrockner (Downstream-Ende) an, beträgt die ADH-Masse 8.07 t.

- Bei Veränderung des spez. elektrischen Energiebedarf und des thermischen Energiebedarfs (Aufarbeitungsschritt Gefriertrocknung) bleibt die benötigte Energiemenge am Ende die gleiche.
- Wieso muss bei der Belüftung eines Prozesses Wasser eingeleitet werden?
- Eine Veränderung des CSB-Bedarfs machte bei der abschließenden ökologischen Analyse keinen Unterschied.

3.5.2 Synthese von 2-Octanol

Die Synthese von 2-Octanol wurde wie folgt modelliert:

- Prozessführung:
Enzymatisch, keine Kühlung, keine Belüftung, pH-Regulierung
- Aufarbeitung
Zentrifuge

Folgende Probleme bzw. Fragen traten auf:

- Es war nicht möglich eine annähernd passende Aufarbeitungsmethode auszuwählen. Bei unseren Versuchen wurde das Produkt durch Extraktion vom Reaktionsmedium abgetrennt, diese Aufarbeitungsmethode steht jedoch nicht zur Auswahl.
- Wie wird der pH-Regulator zugegeben?
- Inwiefern werden die Salze in die Berechnung der Abwasserkosten und ökologische Analyse einbezogen? Die Salze sind auch nach Ausgleich der Bilanzen in den Abfallströmen nicht wiederzufinden.
- Wir hatten angegeben, dass 1% Reste im Kessel verbleiben, wieso verbleiben dann nicht auch 1% der Salze im Kessel?
- Es ist unlogisch dass die Materialkosten bei dem Prozess mit pH-Regulator geringer sind als bei dem Prozesse ohne pH-Regulator (Materialkosten beinhalten nicht die Energiekosten, alles andere in den beiden Prozessen ist identisch, Abfallkosten bleiben die gleichen).

Beispiel:

- unser Prozesse ohne pH-Regulierung: 335 247 887 €
- unser Prozesse mit pH-Regulierung: 263 667 122 €

- Wieso muss für einen enzymatischen Prozess angeimpft werden? Nimmt das Programm an, dass das Enzym erst noch fermentiert werden muss? Ein Versuch den Prozess nach dieser Annahme zu modellieren war jedoch nicht möglich, weshalb wir davon ausgegangen sind, dass man das Enzym direkt einleiten kann.
- Es wurden 16 t ADH und GDH eingegeben, es werden jedoch jeweils 41 t ausgegeben. Woher kommen die Mengen?
- Was passiert nach der Aufarbeitung mit den Enzymen? Sie werden noch in die Zentrifuge eingeleitet, kommen aber dann in den Abfallströmen nicht mehr vor.
- Wieso ist die Umweltbewertungszahl der Outputseite immer 0? Wird 2-Octanol gar nicht mehr betrachtet?
- Woher kommt die Menge an 2-Octanol?

Beispielrechnung:

Eingabe 2-Octanon: $m = 662814,3654 \text{ kg}$ ($M = 128,21 \text{ g/mol}$)

Es können also maximal $5169755,596 \text{ mol}$ 2-Octanol ($M = 130,23 \text{ g/mol}$) gebildet werden. $m = 673257,2717 \text{ kg}$

Sabento gibt 859 t aus.

Wo kommt die Restmenge her? Es müsste, wenn 1% der Reaktionsmischung im Kessel zurückbleibt und dann in den Abfallstrom beim Ansetzen der Reaktionslösung eingeleitet wird, weniger als die berechnete Menge gebildet werden.

4 Diskussion

Im Rahmen des Projekts war es möglich, durch zweistufige Mutagenese der zum Zeitpunkt des Projektantrags bereits vorliegenden Alkoholdehydrogenase (ADH) drei hochaktive und enantioselektive R-ADH-Mutanten (RX3, RX4 und RX4-9) zu erzeugen, deren Anwendbarkeit in Anwesenheit von ionischen Flüssigkeiten bestätigt wurde. Mit Hilfe umfangreicher Optimierungsprozesse bezüglich Fermentationsparameter (u. a. Induktion und Wahl des Expressionsstamms), Klonierungsstrategien und Enzymbereinigung konnten die Aktivitäten bis zur technischen Anwendbarkeit gesteigert werden. Die Produktion der Biokatalysatoren konnte zu Projektende bereits im Rahmen von 300 L-Fermentationen erfolgen. Fortführend wird derzeit eine 6000 L-Fermentation angestrebt.

Von besonderer Wichtigkeit war die Identifizierung verschiedener IL, die eine ausreichende Kompatibilität mit dem Biokatalysator aufweisen. Zu diesem Zweck wurde zunächst der Einfluss der verschiedenen IL auf die Kompatibilität mit einer Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus sp.* untersucht. Dabei wurden Imidazolium-, Pyridinium- und hydroxyfunktionalisierte tertiäre Ammoniumkationen in Kombination mit organischen und anorganischen Anionen verwendet. Besonders die hydroxyfunktionalisierten tertiären Ammoniumverbindungen zeigten gute Ergebnisse bezüglich Aktivität und Stabilität der ADH. Die meisten dieser IL sind - bei einer Dosierung von 10 Vol% im Reaktionsmedium - in der Lage das Enzym in Lösung zu stabilisieren, ohne seine Aktivität negativ zu beeinflussen. Außerdem stabilisieren manche IL die reduzierten Cofaktoren NAD(P)H in Lösung.

Darüber hinaus wurden verschiedene Methoden zur Cofaktorregenerierung untersucht. Besonders ressourcenschonend wäre die elektrochemische Cofaktorregenerierung, bei der man sich zusätzlich die Leitfähigkeit steigernde Wirkung der IL zu nutze machen könnte. Untersuchungen zur elektrochemischen Reduktion von NADP⁺ zeigten auch eine deutlich Verbesserung der Raum-Zeit-Ausbeute und der Wechselzahl des eingesetzten Rhodiummediators in Gegenwart von IL im Gegensatz zur Durchführung in reinem Puffer. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen diesen Prozesskennzahlen und dem Anteil an IL im Reaktionsmedium. Aufgrund einer gegenseitigen Desaktivierung des Mediators und der ADH ist es jedoch nicht möglich diese Synthese in einem einfachen Satzreaktor durchzuführen, weshalb ein neues Reaktorkonzept realisiert wurde, dass die räumliche Trennung von Biokatalysator und Rhodiumkomplex gewährleistet. Da die

so erreichten Produktivitäten verhältnismäßig gering sind wurde außerdem die enzymgekoppelte Cofaktorregenerierung mit Hilfe einer Glucosedehydrogenase bzw. einer Malatdehydrogenase untersucht. Für diese Enzyme wurden Versuche in Gegenwart der IL durchgeführt, die sich bei den Untersuchungen mit der ADH als besonders vorteilhaft heraus gestellt hatten. Bei den Experimenten zeigte sich, dass die GDH für unsere Zwecke besser geeignet ist, weshalb für die eigentlichen Synthesen die Cofaktorregenerierung über dieses Enzym ausgewählt wurde.

Anhand der Untersuchungen bezüglich des Einflusses der IL auf den Biokatalysator und die Versuche zur Auswahl einer geeigneten Cofaktorregeneriermethode wurde die Auswahl an möglichen IL reduziert. Für TRIS-(2-OH-Et)-MAM MeSO₄ wurden Synthesen mit 10, 25 und 50 Vol%-Anteile durchgeführt, bei denen sich jedoch im Vergleich zur Synthese in reinem Puffer keine Verbesserung der Produktivitäten zeigte. Detaillierte Kinetikuntersuchungen ergaben, dass für die ADH eine deutliche Produktinhibierung vorliegt, weshalb die Zugabe eines Lösungsvermittlers zur Verbesserung der Substratlöslichkeit nur dann vorteilhaft ist, wenn der Lösungsvermittler nicht auch die Produktlöslichkeit heraufsetzt. Da für das untersuchte Enzym die maximale Reaktionsgeschwindigkeit in Puffer schon bei einer Konzentration kleiner 8 mM (= maximale Löslichkeit im verwendeten Puffer) erreicht war, während gleichzeitig aufgrund der geringen Löslichkeit des Produktes zu hohe Konzentrationen dieses vermieden werden konnten, wurden zusätzlich Versuche in reinem Puffer und mit Substrat als zweiter Phase durchgeführt. In diesem Setup konnten folgende Ergebnisse realisiert werden: $STY = 800 \text{ mmolL}^{-1}\text{d}^{-1}$ (= $103 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$), $ee > 99,9 \%$, $TTN_{ADH} = 33300$, $TTN_{GDH} = 13100$, $TTN_{NADP^+} = 8000$. Obwohl eine selektive Extraktion des Produktes von der wässrigen Phase mittels überkritischem CO₂ möglich ist, ist das in bei dieser Reaktion nicht unbedingt nötig, das das Produkt noch vollständigem Umsatz als zweite Phase vorliegt. Das Konzept der Verwendung ionischer Flüssigkeiten als Löslichkeitsvermittler für die biokatalytische Synthese chiraler Verbindungen mit anschließender Produktextraktion mittels überkritischer Fluide soll deshalb in naher Zukunft für ein besser geeignetes Substrat-Produkt-Paar angewendet werden.

Mit Hilfe der Software Sabento wurde die ökonomische und ökologische Prozessbeurteilung durchgeführt. Sabento prognostiziert für die Herstellung der Enzyme einen Gewinn von ~ 60.000.000 € bei einer Amortisationszeit von 0,1 Jahren, während für die Synthese von 2-Octanol ein Gewinn von ~ 500.000.000 € bei einer

Amortisationszeit < 0,1 Jahren angenommen wird (selbst bei Annahme einer Reduzierung des Produktpreises auf 20 % des jetzigen Preises).

Bei der Herstellung der Enzyme werden aufgrund der verschiedenen, jedoch für die spätere Synthese benötigten, Aufreinigungsschritte verhältnismäßig große Mengen an Rohstoffen bzw. Energie benötigt. Für die Herstellung eines Kilos Enzym werden laut Sabento ein Input von ~ 3000 kg an Stoffen und 1000000 KJ Energie eingesetzt. Problematisch ist, dass die Herstellung relativ komplex ist und das ein erhöhtes Eutrophierungspotential besteht. Für die Synthese eines Kilos an 2-Octanol wird jedoch lediglich ein Input von ~ 10 kg an Stoffen und 2600 kJ Energie benötigt. Insgesamt ist der hier vorgestellte Prozess zur Herstellung von 2-Octanol sowohl unter ökonomischen als auch unter ökologischen Gesichtspunkten interessant. In Zukunft soll überprüft werden ob alle bei der Herstellung der isolierten Enzyme benötigten Aufreinigungsschritte nötig sind. Generell traten bei der Verwendung der Software einige Probleme auf, die durch den Support des Ifu leider nicht gelöst werden konnten.

5 Öffentlichkeitsarbeit

Die im Rahmen des DBU-Kooperationsprojektes gewonnenen Erkenntnisse wurden auf den Messveranstaltungen ChemSpec 2008 in München und CPhI 2008 in Frankfurt einem breiten Fachpublikum präsentiert. Des Weiteren wurden die Ergebnisse im Rahmen des Graduiertenkollegs „BioNoCo“ (= Biocatalysis in non-conventional media) vorgestellt. In naher Zukunft werden Teile dieses Projektes von den Projektpartnern der RWTH Aachen auf der ACHEMA 2009 in Frankfurt, auf der DECHEMA-Tagung „Biokatalyse: Neue Verfahren, neue Produkte“ in Bad Schandau, sowie auf der Biotrans 2009 in Bern präsentiert.

Die Ergebnisse der elektrochemischen Untersuchungen werden in F. Hildebrand, S. Lütz, Chem. Europ. J. **2009**, accepted. bzw. in C. Kohlmann, et al., J. Am. Chem. Soc. **2009**, submitted. veröffentlicht. Außerdem sollen auch die Ergebnisse der Enzymcharakterisierung in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten und die Erkenntnisse bezüglich der Synthese von 2-Octanol in einem wissenschaftlichen Artikel publiziert werden.

Für die Verwendung ionischer Flüssigkeiten als Stabilisatoren für Nicotinamid-cofaktoren wurde eine Patentanmeldung (Kohlmann C, Greiner L, Lütz S; DE 10 2008 061 866.7, 15.12.2008. Verwendung von ionischen Flüssigkeiten sowie Sensor. Germany.) eingereicht. Eine weitere Patentanmeldung bezüglich des Einsatzes ionischer Flüssigkeiten wird derzeit noch geprüft.

Aufbauend auf die bislang erzielten Ergebnisse sind weitere Versuche geplant. So soll das Konzept der Verwendung ionischer Flüssigkeiten als Löslichkeitsvermittler für die biokatalytische Synthese chiraler Verbindungen mit anschließender Produktextraktion mittels überkritischer Fluide für die Synthese weiterer chiraler Alkohole untersucht werden. Darüber hinaus soll die Synthese von 2-Octanol kontinuierlich durchgeführt werden.

6 Fazit

Ionische Flüssigkeiten stellen interessante Additive für die Biokatalyse dar. So können durch den Einsatz geeigneter IL die Enzym- und Cofaktorstabilitäten deutlich gesteigert oder auch verbesserte Substratlöslichkeiten realisiert werden.

Die Kombination dieser Additive mit einer selektiven Produktextraktion mit Hilfe von überkritischen Fluiden stellt eine umweltentlastende Alternative zur chemischen Darstellung enantiomerenreiner Alkohole dar. Im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung der Biokatalyse bei der Herstellung chiraler Verbindungen kann diese Ergänzung der konventionellen chemischen Verfahren als zukunftsweisend eingeschätzt werden und mit großer Wahrscheinlichkeit in die gängige Praxis biotechnologischer Produktionen integriert werden. Im Fall der enantioselektive Reduktion von 2-Octanon mit der verwendeten ADH ist allerdings kein Zusatz an IL nötig um prozessrelevante Produktivitäten zu erzielen. In diesem Fall scheint der Einsatz des Substrates als zweite Phase besonders viel versprechend. Das gebildete Produkt kann zwar durch Extraktion mit überkritischem CO₂ abgetrennt werden, da es sich jedoch bei Konzentrationen > 6 mM als separate Phase ausbildet, ist auch eine Abtrennung durch Phasentrennung möglich. So ist man in der Lage auf zusätzliche Additive und komplexe Reaktionsschritte zu verzichten, weshalb das Verfahren besonders umweltfreundlich und ressourcenschonend scheint. Das Konzept der Verwendung ionischer Flüssigkeiten als Löslichkeitsvermittler für die biokatalytische Synthese chiraler Verbindungen mit anschließender Produktextraktion mittels überkritischer Fluide wird derzeit für die Synthese weiterer chiraler Alkohole untersucht.

Die im Rahmen des Projektes erzielten Erkenntnisse werden zukünftig von der X-Zyme GmbH zur technischen Realisierung von Prozessen zur Herstellung chiraler Verbindungen genutzt. Somit liefern die Forschungsergebnisse einen wesentlichen Beitrag zur dauerhaften Etablierung des KMU X-Zyme als eines der führenden Unternehmen im Bereich der Biokatalysatoren zur Herstellung chiraler Produkte. Zu diesem Zeitpunkt liegen bereits Kundenanfragen vor, deren Beantwortung unter Verwendung der gewonnenen Erkenntnisse bewerkstelligt werden kann. Die Erweiterung des Produktportfolios und somit auch des Kundenkreises wirkt sich förderlich auf die weitere Positionssicherung des kommerziell-interessierten Unternehmens X-Zyme aus. So konnte im Rahmen der DBU-Förderung eine zusätzliche Stelle geschaffen werden.