

**Projektkennblatt**  
der  
**Deutschen Bundesstiftung Umwelt**



Az	<b>13268</b>	Referat	<b>32</b>	Fördersumme	<b>799.278 €</b>
----	--------------	---------	-----------	-------------	------------------

**Antragstitel** **Biotechnologische Herstellung von  $\epsilon$ -Caprolacton**

**Stichworte** Biokatalyse, Biotechnologie, Nachhaltige Synthese, Oxidation

Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)
<b>42 Monate</b>	<b>18.06.2012</b>	<b>31.12.2015</b>	<b>1</b>

Zwischenberichte

<b>Bewilligungsempfänger</b>	Universität Bielefeld	Tel	0521-106-2057
	Fakultät für Chemie	Fax	0521-106-6146
	Organische Chemie I	Projektleitung	
	Arbeitskreis Prof. Dr. Harald Gröger	Prof. Dr. Harald Gröger	
	Universitätsstr. 25	Bearbeiter	
	33615 Bielefeld		

**Kooperationspartner**

Universität Greifswald,  
Arbeitskreis Prof. Dr. Uwe Bornscheuer

Universität Rostock  
Arbeitskreis Prof. Dr. Udo Kragl

Technische Universität Hamburg-Harburg,  
Arbeitskreis Prof. Dr. Andreas Liese

Technische Universität Dortmund,  
Arbeitskreis Prof. Dr. Andreas Schmid

Enzymicals AG  
(CEO: Dr. Ulf Menyes)

### **Zielsetzung und Anlaß des Vorhabens**

Das Ziel dieses interdisziplinären Projektvorhabens bestand in der Entwicklung eines nachhaltigen, effizienten und technisch einsetzbaren biotechnologischen Syntheseverfahrens zur Herstellung der industriell wichtigen Bulkchemikalie  $\epsilon$ -Caprolacton, wobei die Herstellung des Zielprodukts aus Cyclohexanol auf dem Wege der „weißen Biotechnologie“ mit Hilfe einer Ganzzelltransformation angestrebt wurde. Das Synthesekonzept der in diesem Projektvorhaben angestrebten biokatalytischen oxidativen Umsetzung von Cyclohexanol in Gegenwart eines Ganzzellkatalysators beruht auf dem Zusammenspiel von geeigneten Redoxenzymen. Weitere Kennzeichen des Verfahrens sind neben der Verwendung eines rekombinanten Ganzzellkatalysators die Flexibilität und Modularität in Bezug auf den Zugang zum einzusetzenden Startmaterial Cyclohexanol. So sollten die Verfahrensvarianten sowohl geeignet sein für den Einsatz von Cyclohexanolvorstufen unter *in situ*-Bildung von Cyclohexanol als auch für den direkten Einsatz von Cyclohexanol-haltigen Ausgangslösungen.

Als KMU-Verbundpartner fungierte die Enzymicals AG, die über eine Lizenz für eine patentierte und ein Spektrum weiterer BVMOs verfügt und Enzyme bzw. Feinchemikalien (bis Kg-Maßstab) herstellt und vermarktet. Im Rahmen eines Unterauftrags war mit der „Polymaterials AG ein weiteres KMU eingebunden mit der Aufgabe, u.a. Produktanwendungen von biotechnologisch hergestelltem  $\epsilon$ -Caprolacton experimentell zu verifizieren. Bei den akademischen Verbundpartnern handelte es sich um die auf dem Gebiet der Biokatalyse tätigen Arbeitsgruppen AK Bornscheuer, Uni Greifswald (**UG**), AK Gröger, Uni Bielefeld (**UB**), AK Kragl, Uni Rostock (**UR**), AK Liese, TU Hamburg-Harburg (**TUHH**) und AK Schmid, TU Dortmund (**TUD**), deren Expertise sich für dieses Vorhaben in komplementärer Weise ergänzte. Über Enzymicals AG sollte das Verfahren im Hinblick auf den Produktionsmaßstab weiterentwickelt werden.

## Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden / Ergebnisse und Diskussion

Im Projektzeitraum konnte vom Projektteam eine Reihe von Forschungsfortschritten erzielt werden, von denen im Folgenden exemplarisch ausgewählte „Highlights“ beschrieben sind. Diese sollen den erzielten Forschungsfortschritt als auch die hohe Vernetzung und Interdisziplinarität verdeutlichen. Die Gebiete, auf denen diese „Highlights“ erzielt wurden, sind farblich zusammen mit einer graphischen Zusammenfassung der Projektstruktur in Abbildung 1 in blauer Farbe dargestellt.

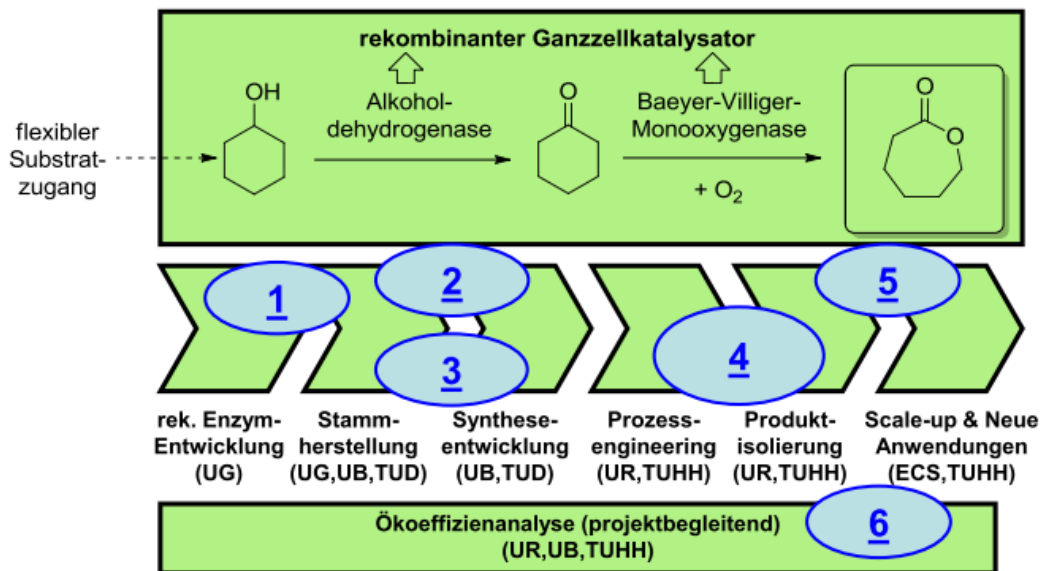


Abbildung 1. Projektkonzept und Zusammenarbeit der Projektpartner im Verbundvorhaben.

### Highlight 1 (UG):

Bei der Klonierung erwies sich die Herstellung der Baeyer-Villiger-Monooxygenase mit einem N-terminalem His-Tag als äußerst effizient, dazu gelang die Herstellung von Mutanten mit erhöhter Stabilität gegenüber Wasserstoffperoxid bzw. Temperaturstabilität durch rationales Proteindesign.

### Highlight 2 (UG, UB):

Für die „Doppeloxidation“ von Cyclohexanol zu Caprolacton unter Einsatz von Sauerstoff als Oxidationsmittel gelang die Konstruktion geeigneter Ganzzell-Katalysatoren als unter wirtschaftlichen Aspekten bevorzugte „Formulierung“ der Enzymkomponenten. Zudem wurden Biotransformationskonzepte unter Einsatz von 1- bzw. 2-Zell-Systemen etabliert. Darüber hinaus gelang die „Rückintegration“ des Biokatalyse-Verfahrens durch Verknüpfung mit einem Substratzugang zu Cyclohexanol *via* heterogenkatalytischer Hydrierung von Phenol.

### Highlight 3 (TUD):

Bei Integration der Hydroxylierung von Cyclohexan in die „Doppeloxidation“ wurden alle für die 3-Schritt Reaktionskette nötigen Enzyme in *Pseudomonas* kloniert. Die Aktivität für den ersten Schritt (Hydroxylierung von Cyclohexan) wurde um den Faktor 160 gesteigert. Im kontinuierlich laufenden Biofilm-Reaktor wurden auch die nachfolgenden 2 Schritte erfolgreich gekoppelt, das tubuläre System in den Monolit-Reaktor übertragen und der Maßstab um Faktor 100 vergrößert.

### Highlight 4 (UG, ECS, UB, TUHH):

Zur Überwindung der Produktinhibierung durch  $\epsilon$ -CL wurden zwei komplementäre, neuartige Konzepte erfolgreich etabliert, die die Gemeinsamkeit einer *in situ* erfolgenden „reaktiven Produktentfernung“ des gebildeten Caprolactons aufweisen. Dies erfolgte auf folgenden, sich in ergänzender Weise zu unterschiedlichen Produkten führenden Wegen: (1) Es wird die Aktivität der Lipase CAL-A zur *in situ*-Oligomerisation von  $\epsilon$ -CL in rein-wässrigem (!) Medium genutzt, wobei hier vorzugsweise Oligo- $\epsilon$ -CL gebildet wird. Das Verfahren wurde von der Universität Greifswald und Enzymicals AG zum Patent angemeldet; (2) Es wird die Aktivität der Lipase CAL-B in Kombination mit einer Kompartimentierung von wässriger und organischer Phase zur *in situ*-Polymerisation von  $\epsilon$ -CL genutzt, wobei hier Poly- $\epsilon$ -CL gebildet wird.

## **Fortsetzung zu:**

### ***Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden / Ergebnisse und Diskussion***

#### **Highlight 5 (TUHH, UR, UB, ECS):**

Verschiedene Strategien für die aufgrund der Produktinhibierung durch  $\epsilon$ -CL wünschenswerte *in situ*-Produktabtrennung wurden entwickelt (unter teilweiser Kompartimentierung), ebenso wie ein Membranbegasungssystem. Darüber hinaus wurde bereits die Herstellung erster Labormuster, so z.B. des Poly- $\epsilon$ -caprolactons *via* Enzymkatalyse realisiert, welches bei der Firma Polymaterials evaluiert wurde. Beim Vergleich mit kommerziell verfügbarem Polycaprolacton der Firma Perstorp zeigte sich eine erfreulich ähnliche Verteilung der Molmassen (angegeben im Polydispersitätsindex). Zudem wurde die BVMO-Fermentation im 20L-Fermenter durchgeführt und lieferte dabei 540 g Feuchtzellmasse.

#### **Highlight 6 (UR, ECS):**

Bereits während der ersten Projektphase erfolgte mit Hilfe der Software Umberto eine detaillierte Bearbeitung des Themas „Ökoeffizienzanalyse“, die sich Ökobilanzierung von Teilprozessen und Kostenanalyse zusammensetzt. Neben Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen des Verfahrens wurden auch Stoffstromanalysen durchgeführt.

## **Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation**

### **Publikationen**

Insgesamt sind bislang 11 aus diesem Projektvorhaben hervorgegangene Publikationen erschienen (für entsprechende Literaturstellen, siehe Abschlussbericht); zudem ist ein weiteres Manuskript zur Publikation angenommen und ein weiteres Manuskript befindet sich in Vorbereitung.

### **Patentanmeldung**

U. T. Bornscheuer, S. Schmidt, U. Menyes, R. Wardenga, S. Borchert,

Process for the production of polyesters using an enzyme cascade of alcohol dehydrogenase, cyclohexanone monooxygenase and lipase A

*Eur. Patent Applic.* EP2899280A1, **2015**.

### **Vorträge**

Insgesamt sind die Projektergebnisse bislang in 15 Fachvorträgen auf verschiedenen Tagungen / Symposien / Konferenzen, insbesondere internationalen Konferenzen, vorgestellt worden (für entsprechende Details zu den Vorträgen, siehe Abschlussbericht).

### **Posterbeiträge**

Insgesamt sind die Projektergebnisse bislang in 11 Posterbeiträgen auf verschiedenen Tagungen / Symposien / Konferenzen, insbesondere internationalen Konferenzen, vorgestellt worden (für entsprechende Details zu den Posterbeiträgen, siehe Abschlussbericht).

### **Abschlussarbeiten**

Insgesamt sind aus diesem Projektvorhaben bislang zwei Dissertationen hervorgegangen, zwei weitere Abschlussarbeiten (Dissertationen) sind derzeit in Vorbereitung (für Details, siehe Abschlussbericht).

## **Fazit**

Im Projektzeitraum konnten für dieses Vorhaben eine Reihe von Forschungsergebnissen mit vielversprechenden Ergebnissen erzielt werden. Ausgewählte „Highlights“ sind dabei im obigen Abschnitt „Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden / Ergebnisse und Diskussion“ beschrieben.

Zusätzlich zur Weiterentwicklung des Konzepts der „Doppeloxidation“ zur Umwandlung von Cyclohexanol in die gewünschte Bulkchemikalie  $\epsilon$ -Caprolacton unter Einsatz einer Baeyer-Villiger-Monooxygenase und Alkoholdehydrogenase sowie unter Verwendung von Luftsauerstoff als Oxidationsmittel ergaben sich neuartige Perspektiven im Hinblick auf die Herstellung von Oligo- bzw. Poly- $\epsilon$ -caprolacton infolge der erfolgreichen Arbeiten zur Lipase-katalysierten Oligo-/Polymerisierung von  $\epsilon$ -Caprolacton, bestehend aus einer Kopplung des „Doppeloxidation-Konzepts“ mit einem nachgeschalteten Polymerisationsverfahren unter Einsatz einer Lipase.

**Fortsetzung zu:  
Fazit**

Auch wurde erfolgreich eine Biokatalysemethode zur „Rückintegration“ entwickelt, bei dem das Substrat Cyclohexanol durch enzymatische Hydroxylierung ausgehend von der einfach zugänglichen Bulkchemikalie Cyclohexan unter Einsatz einer Monooxygenase hergestellt wird. Damit eröffnet sich auch eine Perspektive für einen komplett biotechnologischen Herstellungsweg sogar bis zum Polymer Poly- $\epsilon$ -caprolacton über  $\epsilon$ -Caprolacton als Zwischenstufe und ausgehend von der Industriechemikalie Cyclohexan. Eine alternative Methode zur „Rückintegrationsmethode“ stellt die Herstellung von Cyclohexanol durch Hydrierung von Phenol dar.

Abschlussbericht an die Deutsche Bundesstiftung Umwelt  
im März 2016 (Abschnitt 7 aktualisiert im März 2017)

**Förderschwerpunkt Biotechnologie: ChemBioTec:  
“Biotechnologische Herstellung von  $\epsilon$ -Caprolacton“**

AZ 13268

*Kurztitel*

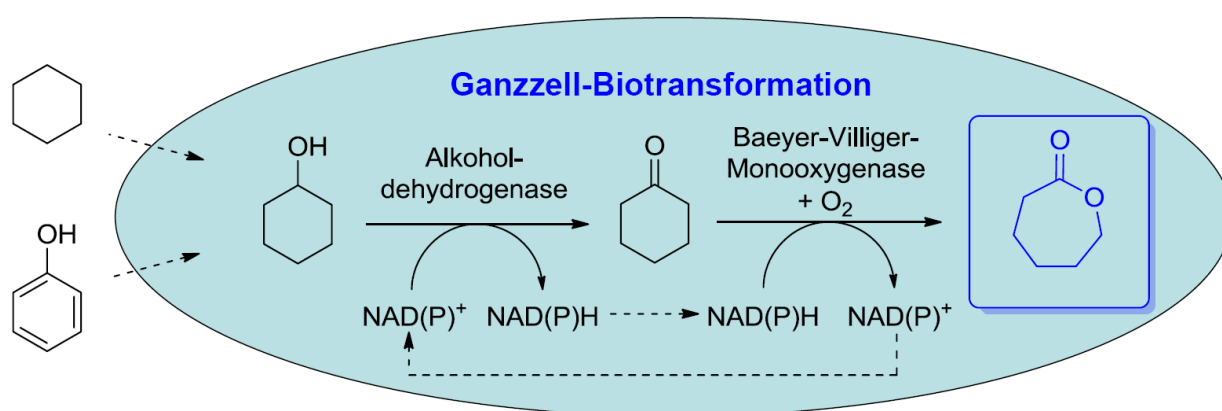
Nachhaltige  $\epsilon$ -Caprolactonsynthese

**Inhaltsverzeichnis:**

1. Kurvorstellung des Projektvorhabens
2. Übersicht der Projektpartner
3. „Highlights“ des Projektverlaufs
4. Ergebnisse und Diskussion
  - 4.1. Universität Greifswald, Institut für Biochemie (Prof. Bornscheuer)
  - 4.2. Universität Bielefeld, Organische Chemie I (Prof. Gröger)
  - 4.3. Technische Univ. Hamburg-Harburg, Institut für Technische Biokatalyse, (Prof. Liese)
  - 4.4. Universität Rostock, Institut für Chemie, Technische Chemie (Prof. Kragl)
  - 4.5. TU Dortmund, Lehrstuhl Biotechnik (Prof. Schmid)
  - 4.6. Enzymicals AG, Greifswald (Dr. Menyes)
5. Meilensteine
6. Organisatorisches (Projekttreffen)
7. Publikationen, Patentanmeldungen und Konferenzbeiträge

## 1. Kurzvorstellung des Projektvorhabens

Das Ziel dieses Vorhabens bestand in der Entwicklung eines effizienten, technisch einsetzbaren und wirtschaftlich kompetitiven biotechnologischen Herstellungsverfahrens für die Industriechemikalie  $\epsilon$ -Caprolacton, wobei dessen Herstellung ausgehend von Cyclohexanol in einer Ganzzelltransformation erfolgt (Abbildung 1). Zudem kommt als Oxidationsmittel molekularer Sauerstoff zum Einsatz im Gegensatz zur ökologisch problematischen Persäure als Oxidationsmittel der aktuell technisch relevanten chemischen Verfahren, die ebenfalls von Cyclohexanol (z.B. in Form des sogenannten „K/A-Oils“ ausgehen). Dieses Projektvorhaben baut auf den von der DBU geförderten ChemBioTec-Vorhaben AZ 13234-32 auf, in dessen Rahmen die Verbundpartner bereits eine Reihe von Vorarbeiten durchführen konnten.



**Abbildung 1.** Ganzzell-katalysierte Direktumwandlung von Cyclohexanol zu  $\epsilon$ -Caprolacton mit molekularem Sauerstoff sowie flexiblem Substratzugang

Das Konzept der angestrebten biokatalytischen Doppeloxidation mit einem Ganzzellkatalysator beruht auf dem Zusammenspiel zweier Enzyme, namentlich einer Alkoholdehydrogenase (ADH) und einer Baeyer-Villiger-Monooxygenase (BVMO aus *Acinetobacter calcoaceticus*). Die  $\text{NAD(P)}^+$ -abhängige ADH ist für die Oxidation von Cyclohexanol zu Cyclohexanon verantwortlich, während die BVMO die Oxidation des gebildeten Ketons zum  $\epsilon$ -Caprolacton katalysiert. Die Reaktionsanordnung unter Einsatz einer ADH und BVMO gewährleistet eine vorteilhafte Cosubstrat-freie Doppeloxidation, da das in katalytischen Mengen eingesetzte  $\text{NAD(P)}^+$  von der ADH zu  $\text{NAD(P)H}$  reduziert und von der BVMO wieder zu  $\text{NAD(P)}^+$  oxidiert wird. Weitere Kennzeichen des Verfahrens sind die Verwendung eines rekombinanten Ganzzellkatalysators, enthaltend eine überexprimierte ADH und BVMO, sowie die Flexibilität und Modularität in Bezug auf den Zugang zum Startmaterial Cyclohexanol. So soll der Ganzzellkatalysator (durch Integration der zusätzlichen Alkanmonooxygenase AlkB für die Hydroxylierung) sowohl geeignet sein für den Einsatz von Cyclohexan unter *in situ*-Bildung von Cyclohexanol als auch (ohne weitere überexprimierte Gene) für den Einsatz von Cyclohexanol-haltigen Ausgangslösungen, die beispielsweise durch Hydrierung von Phenol erhalten werden können.

## 2. Übersicht der Verbundpartner

Das auf 36 Monate Gesamtlaufzeit konzipierte interdisziplinäre Verbundprojekt beinhaltete nachfolgende Partner und die jeweils zu bearbeitenden Schwerpunkte:

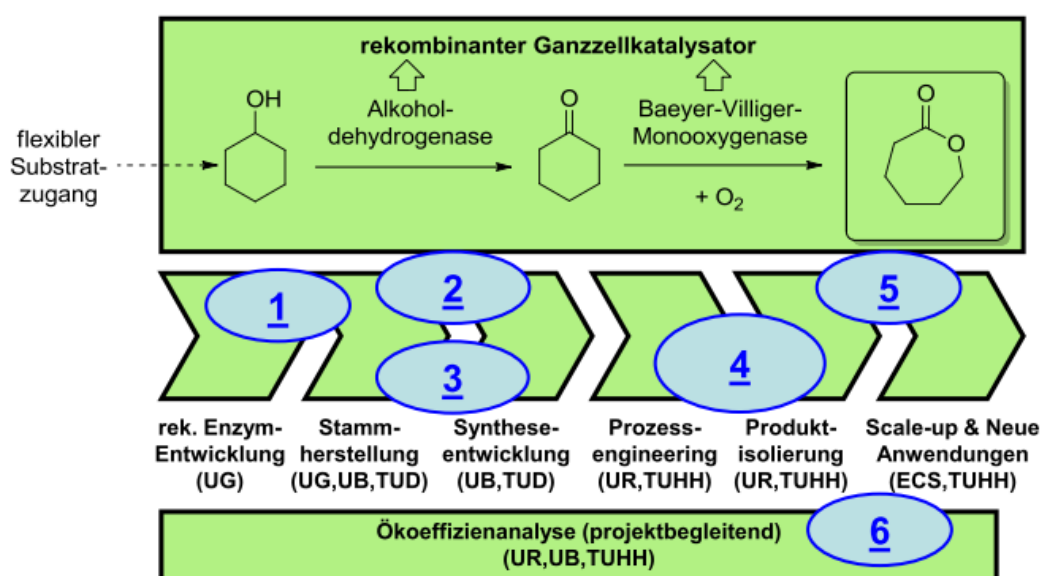
<b>Verbundpartner</b>	<b>Schwerpunkte</b>
(1) Prof. Gröger (Koordinator) Universität Bielefeld ( <b>UB</b> )	Organische/enzymatische Synthesen
(2) Prof. Kragl (stv. Koordinator) Universität Rostock ( <b>UR</b> )	Aufarbeitung
(3) Prof. Liese TU Hamburg-Harburg ( <b>TUHH</b> )	Bioverfahrenstechnik
(4) Prof. Bornscheuer Universität Greifswald ( <b>UG</b> )	Protein-Engineering/Expressionssysteme
(5) Prof. Schmid TU Dortmund ( <b>TUD</b> )	Ganzzellkatalyse/Reaktionstechnik
(6) Dr. Menyes Enzymicals AG, Greifswald ( <b>ECS</b> )	Biotechnologische Herstellung von $\epsilon$ -Caprolacton im Kilogramm-Maßstab, Lizenzierung, Vermarktung

Eine Übersicht über die Vernetzung in diesem in hohem Maße interdisziplinären Projekt gibt Abbildung 2 im nachfolgenden Kapitel 3 zu bereits erzielten „Forschungs-Highlights“.

Die Gesamtkoordination des Projektes erfolgte durch Prof. Harald Gröger, vertreten durch Prof. Udo Kragl.

### 3. „Highlights“ des Projektverlaufs

Vorab zu der in den Folgekapiteln dargestellten ausführlichen Zusammenfassung der Forschungsergebnisse im bisherigen Berichtszeitraum sei im Folgenden auf einige ausgewählte „Highlights“ aus den Forschungsarbeiten eingegangen. Diese verdeutlichen zum einen den erfolgreichen Projektverlauf und bereits erzielten erfreulichen Stand des Forschungsfortschritts, zum anderen aber auch die hohe Vernetzung und Interdisziplinarität (siehe diesbezüglich auch Kapitel 6 mit einer Aufstellung bisheriger Projekttreffen). Die Gebiete, auf denen diese „Highlights“ erzielt wurden, sind farblich in Abbildung 2 zudem in **blauer Farbe** dargestellt.



**Abbildung 2.** Projektkonzept und Zusammenarbeit der Projektpartner im Verbundvorhaben.

Im Nachfolgenden sind diese Highlights kurz zusammengefasst dargestellt:

#### Highlight 1 (UG):

Bei der Klonierung erwies sich die Herstellung der Baeyer-Villiger-Monooxygenase mit einem N-terminalem His-Tag als äußerst effizient, dazu gelang die Herstellung von Mutanten mit erhöhter Stabilität gegenüber Wasserstoffperoxid bzw. Temperaturstabilität durch rationales Proteindesign.

#### Highlight 2 (UG, UB):

Für die „Doppeloxidation“ von Cyclohexanol zu Caprolacton unter Einsatz von Sauerstoff als Oxidationsmittel gelang die Konstruktion geeigneter Ganzzell-Katalysatoren als unter wirtschaftlichen Aspekten bevorzugte „Formulierung“ der Enzymkomponenten. Zudem wurden Biotransformationskonzepte unter Einsatz von 1- bzw. 2-Zell-Systemen etabliert. Darüber hinaus gelang die „Rückintegration“ des Biokatalyse-Verfahrens durch Verknüpfung mit einem Substratzugang zu Cyclohexanol *via* heterogenkatalytischer Hydrierung von Phenol.



**Highlight 3 (TUD):**

Bei Integration der Hydroxylierung von Cyclohexan in die „Doppeloxidation“ wurden alle für die 3-Schritt Reaktionskette nötigen Enzyme in *Pseudomonas* kloniert. Die Aktivität für den ersten Schritt (Hydroxylierung von Cyclohexan) wurde um den Faktor 160 gesteigert. Im kontinuierlich laufenden Biofilm-Reaktor wurden auch die nachfolgenden 2 Schritte erfolgreich gekoppelt, das tubuläre System in den Monolit-Reaktor übertragen und der Maßstab um Faktor 100 vergrößert.

**Highlight 4 (UG, ECS, UB, TUHH):**

Zur Überwindung der Produktinhibierung durch  $\epsilon$ -CL wurden zwei komplementäre, neuartige Konzepte erfolgreich etabliert, die die Gemeinsamkeit einer *in situ* erfolgenden „reaktive Produktentfernung“ des gebildeten Caprolactons aufweisen. Dies erfolgte auf den beiden folgenden, in sich ergänzender Weise zu unterschiedlichen Produkten führenden Wegen: (1) Es wird die Aktivität der Lipase CAL-A zur *in situ*-Oligomerisation von  $\epsilon$ -CL in reinn-wässrigem (!) Medium genutzt, wobei hier vorzugsweise Oligo- $\epsilon$ -CL gebildet wird. Das Verfahren wurde von der Universität Greifswald und Enzymicals AG zum Patent angemeldet; (2) Es wird die Aktivität der Lipase CAL-B in Kombination mit einer Kompartimentierung von wässriger und organischer Phase zur *in situ*-Polymerisation von  $\epsilon$ -CL genutzt, wobei hier Poly- $\epsilon$ -CL gebildet wird.

**Highlight 5 (TUHH, UR, UB, ECS):**

Verschiedene Strategien für das aufgrund der Produktinhibierung durch  $\epsilon$ -CL wünschenswerte *in situ*-product removal wurden entwickelt (unter teilweise Kompartimentierung), ebenso wie ein Membranbegasungssystem. Darüber hinaus wurde bereits die Herstellung erster Labormuster, so z.B. des Poly- $\epsilon$ -caprolactons *via* Enzymkatalyse realisiert, welches bei der Firma Polymaterials evaluiert wurde. Beim Vergleich mit kommerziell verfügbarem Polycaprolacton der Firma Perstorp zeigte sich eine erfreulich ähnliche Verteilung der Molmassen (angegeben im Polydispersitätsindex). Zudem wurde die BVMO-Fermentation im 20L-Fermenter durchgeführt und lieferte dabei 540 g Feuchtzellmasse.

**Highlight 6 (UR, ECS):**

Bereits während der ersten Projektphase erfolgte mit Hilfe der Software Umberto eine detaillierte Bearbeitung des Themas „Ökoeffizienzanalyse“, die sich Ökobilanzierung von Teilprozessen und Kostenanalyse zusammensetzt. Neben Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen des Verfahrens wurden auch Stoffstromanalysen durchgeführt.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1. Universität Greifswald, Institut für Biochemie (Prof. Bornscheuer)

#### Zusammenfassung

Die zur biotechnologischen Herstellung von  $\epsilon$ -Caprolakton vorgeschlagene Enzymkaskade, welche zunächst aus einer Alkoholdehydrogenase (ADH) und einer Baeyer-Villiger Monooxygenase (BVMO) bestand, wurde vor allem im Hinblick auf die Bereitstellung eines einfach anwendbaren sowie effizienten Katalyse-Ansatzes untersucht und verbessert. Hierbei stand vor allem die Anwendbarkeit als Ganzellsystem im Vordergrund da dies für industrielle Zwecke sehr viel leichter umzusetzen ist. Außerdem wurde intensiv an der Stabilität der verwendeten BVMO mittels Protein Engineering gearbeitet. Hierbei wurden im Prinzip zwei Strategien verfolgt. Dies war zum einen das rationale Proteindesign mittels Einführung von Disulfidbrücken bzw. damit zusammenhängenden einzelnen Cystein-Mutationen sowie ein Zufallsmutagenese-Ansatz mittels *error-prone* PCR. Beide Strategien führten zum Erfolg, wobei vor allem durch den rationalen Ansatz eine Variante identifiziert werden konnte, welche eine um 14°C erhöhte Schmelztemperatur im Vergleich zum Wild-Typ Enzym und dadurch ebenfalls eine um 40% erhöhte Langzeitstabilität aufweist. Gleichzeitig zeigt diese Variante auch eine erhöhte Beständigkeit gegenüber Wasserstoffperoxid, wodurch dieses Enzym sehr gut für den Einsatz in einem industriellen Prozess geeignet ist. Zudem war es durch die Erweiterung der Kaskade mit einer Lipase (CAL-A) möglich, 0.2 mol L<sup>-1</sup> Cyclohexanol mit > 99% umzusetzen und dadurch gleichzeitig direkte Oligomer-Vorstufen für die Synthese von Poly- $\epsilon$ -Caprolakton bereit zu stellen. Durch die kontinuierliche Entfernung des  $\epsilon$ -Caprolakton durch Bildung der Oligomere mittels Lipase CAL-A gelang es die ausgeprägte Produktinhibierung elegant zu umgehen und signifikant höhere Produktivitäten im Gesamtsystem zu erzielen. Diese Erweiterung der Kaskade konnte außerdem erfolgreich auf die biokatalytische Synthese von optisch aktiven, chiralen Polyestern angewendet werden.

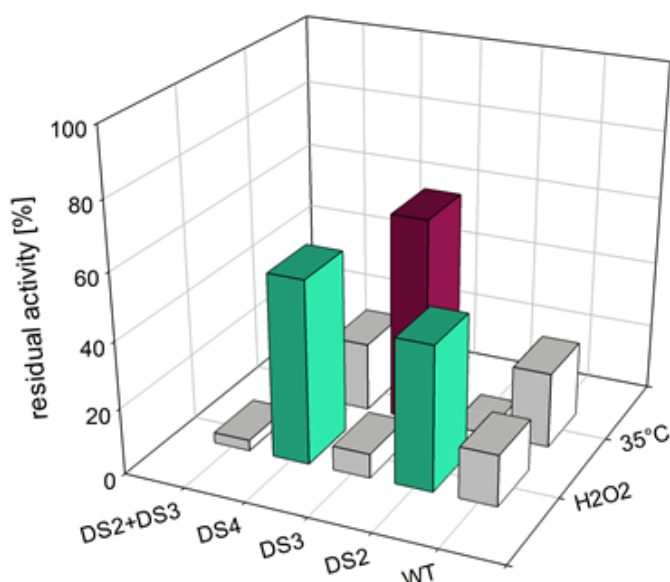
#### Rationales Proteindesign der Cyclohexanon-Monooxygenase CHMO<sub>Acinetobacter</sub>

Der Fokus lag auf der Einführung von ein oder mehreren Disulfidbrücken in das Wildtyp-Protein. Ein solcher Ansatz konnte bereits erfolgreich für andere Enzyme verfolgt werden, wobei neben einer erhöhten Temperaturstabilität auch eine erniedrigte pH-Sensitivität erzielt wurden. Mithilfe der Software Disulfide by Design™ ist es möglich, Vorhersagen zu treffen, welche Aminosäurereste in einem Protein aufgrund ihrer räumlichen Position zur Ausbildung von Disulfidbrücken geeignet sind. Die Voraussetzung für eine Analyse mit diesem Programm ist die Kenntnis der Proteinstruktur. Da von der CHMO<sub>Acinetobacter</sub> keine Struktur in der Proteindatenbank hinterlegt ist, wurde zunächst ein Homologiemodell mit YASARA auf Grundlage der in der Proteindatenbank hinterlegten Struktur der CHMO aus *Rhodococcus* sp. erstellt. Die

Sequenzidentität der CHMO aus *Rhodococcus* und der aus *Acinetobacter* sp. NCIMB 9871 beträgt 56.7%. Die Vorhersage möglicher Aminosäurereste, die für die Bildung einer Disulfidbrücke in Frage kommen, ergab insgesamt 70 Aminosäurepaare. Danach wurden die aussichtsreichsten Disulfidbrückenbildungen identifiziert und unter anderem drei potentielle Disulfidbrücken priorisiert: Pro254Cys - Asp286Cys (kurz: DS1), Asn290Cys - Ala293Cys (kurz: DS2) und Tyr411Cys - Ala463Cys (kurz: DS4). Außerdem wurde eine weitere Variante erzeugt (Thr415Cys -Ala463Cys), die zwar nicht von der Software vorhergesagt wurde, durch ihre räumliche Nähe und Orientierung aber auch als potentielle Disulfidbrücke in der Modellstruktur erkannt wurde. Zusätzlich wurden verschiedene Kombinationsmutanten, wie beispielsweise die Variante DS2+DS3 zur Generierung berücksichtigt. Zur Erzeugung aller Varianten wurde eine ortsspezifische Mutagenese mittels QuikChange™ PCR-Methode durchgeführt.

Nach Herstellung der jeweiligen gereinigten CHMO<sub>Acineto</sub>-Varianten zeigte sich, dass die Mutante DS3 mit 6.94 U/mg eine etwas höhere Aktivität im Vergleich zum Wildtyp (6.37 U/mg) aufweist, während sich für alle anderen Mutanten geringere spezifische Aktivitäten ergaben (der größte Aktivitätsverlust war trotzdem nur max. 50%). Die Untersuchungen zur Temperaturstabilität und oxidativen Stabilität gegenüber Wasserstoffperoxid ergaben beispielsweise für die Mutante DS3 eine signifikant erhöhte Langzeitstabilität (12% nach 24 Stunden) im Vergleich zum Wildtyp (nur noch 9% nach 8 Stunden). Bei den Versuchen zur Stabilität der Varianten gegenüber verschiedenen Wasserstoffperoxid-Konzentrationen wird ersichtlich, dass sowohl der CHMO<sub>Acineto</sub> Wildtyp, als auch u.a. die Variante DS3 sehr stark durch bereits geringe Konzentrationen an Wasserstoffperoxid inaktiviert werden. Im Gegensatz dazu zeigt die Mutante DS2 eine wesentlich höhere Stabilität und weist bei einer Wasserstoffperoxid-Konzentration von 25 mM noch eine Restaktivität von 46% auf. Im Gegensatz dazu zeigt der Wildtyp der CHMO<sub>Acineto</sub> bei dieser Wasserstoffperoxid-Konzentration nur noch sehr geringe Restaktivität.

Interessanterweise konnte durch Anwendung eines fluoreszenzbasierten Nachweises herausgefunden werden, dass die Disulfidbrücken in allen Varianten, bis auf Variante DS3, welche eine erhöhte Temperaturstabilität aufweist, tatsächlich auch ausgebildet werden. Um zu klären, warum die Variante DS3 trotzdem eine signifikant erhöhte Stabilität aufweist, wurden weitere Mutanten angefertigt und biochemisch charakterisiert. Hierbei zeigte sich, dass die Einzelmutante T415C die größte Langzeitstabilität im Vergleich zum CHMO<sub>Acineto</sub> Wildtyp, aber auch der Variante DS3, aufweist. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 25°C zeigt diese Variante immer noch eine Restaktivität von >40%.



**Abbildung 3.** Zusammenfassung der durchgeführten Stabilitätsstudien. Gezeigt sind die Effekte von 25 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 35°C auf die Stabilität der CHMO Varianten. Die größten Stabilisierungseffekte gegenüber 25 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sind als grüne Säulen gezeigt. Dagegen ist die größte Verbesserung in Bezug auf die Temperaturstabilität als rote Säule hervorgehoben. Die gereinigten Enzyme wurden für 10 min unter dem zu analysierenden Parameter inkubiert. Als Kontrollreaktion für jede Variante diente eine nicht-behandelte Probe (Inkubation bei 4°C für 10 min, schwarze Säulen), welche gemessen und auf 100% bezogen wurde.

Zusätzlich wurden die Mutationen der temperaturstabilsten Variante DS3 mit einer bereits publizierten CHMO-Variante, welche eine höhere oxidative Stabilität aufweist, kombiniert. Diese CHMO-“Supermutante” (CHMO-VM, beinhaltet vier Mutationen: C376L/M400I/T415C/A463C) vereint somit beide Stabilitätsparameter und ist die Variante mit den am meisten verbesserten Eigenschaften. Sie weist eine um 40% erhöhte Langzeitstabilität, eine bei 40°C um 40% höhere Stabilität als auch eine um 15°C (auf 45.1°C) erhöhte Schmelztemperatur auf.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Stabilität der CHMO<sub>Acinetobacter</sub> durch strukturgerichtete Mutagenese substantiell verbessert wurde. Die Einführung von Disulfidbrücken führte zur Identifizierung von zwei Varianten mit deutlich erhöhter Resistenz gegenüber Wasserstoffperoxid ohne die katalytische Effizienz deutlich zu mindern. Zusätzlich konnte ein einfacher und schneller fluoreszenzbasierter zum Nachweis der Disulfidbrückenbildung *in vivo* erfolgreich für diese spezielle Fragestellung etabliert und angewendet werden. Eine deutliche Erhöhung der Langzeitstabilität einer CHMO<sub>Acinetobacter</sub>-Variante konnte durch eine außergewöhnliche Cystein-Mutation erfolgreich generiert werden.

### **Zufallsmutagenese der Cyclohexanon-Monooxygenase CHMO<sub>Acineto</sub>**

Ein weiteres Ziel dieses Projektes bestand darin, CHMO<sub>Acineto</sub>-Varianten zu generieren, die gegenüber dem Produkt  $\epsilon$ -CL eine geringere, im besten Fall jedoch keine Inhibierung aufweisen. Dies sollte durch gerichtete Evolution mittels epPCR geschehen. Hierbei wurden insgesamt drei Bibliotheken erzeugt, die jeweils eine unterschiedliche Mutationsrate aufweisen. Nach Transformation konnten ca. 1.100 Klone je Bibliothek gewonnen werden. Alle Mutanten sollten hinsichtlich ihrer Aktivität sowie ihrer Stabilität durchmustert werden. Um eine schnelle und einfache Durchmusterung der Mutantenbibliotheken an der Roboter-Plattform der Arbeitsgruppe zu gewährleisten, wurde als Screening-Methode der NADPH-Assay zum spektrophotometrischen Nachweis von BVMO-Aktivität herangezogen da dieser die Durchmusterung sowohl bezüglich der CHMO<sub>Acineto</sub>-Aktivität (Inhibierung) als auch der Stabilität erlaubt.

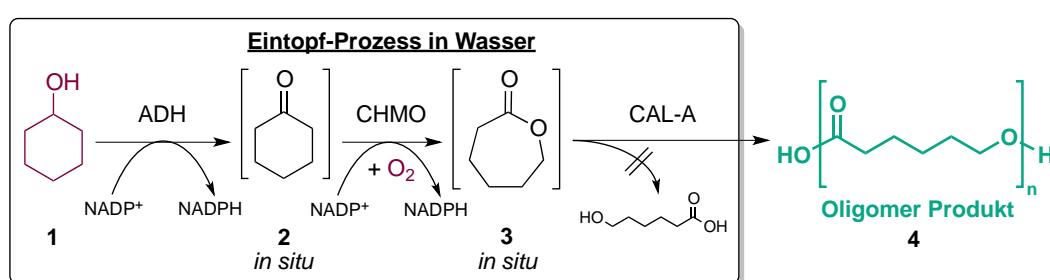
Nachdem das komplette Screening-Verfahren an der Roboter-Plattform erfolgreich implementiert werden konnte, konnte das komplette Screening, angefangen bei der Enzymexpression im 96er-Well-MTP-Format bis hin zur Zellyse erfolgreich mithilfe der Roboter-Plattform durchgeführt und verbessert werden. Im letzten Schritt wurde der NADPH-Assay ebenfalls erfolgreich an der Roboter-Plattform (<http://lara.uni-greifswald.de>) etabliert. Somit wurde zu einem großen Teil dazu beigetragen, dass solche Screenings nun mittels der Roboter-Plattform im AK Bornscheuer erfolgreich durchgeführt werden können und auch in Zukunft ein schnelles und einfaches durchmustern von Mutantenbibliotheken ermöglicht. Somit wurde ein Protokoll entwickelt, das generell für das Hochdurchsatz-Screening von Monooxygenasen angewendet werden kann und eine optimale und reproduzierbare Durchführbarkeit ermöglicht.

Alle Mutantenbibliotheken wurden anschließend erfolgreich durchmustert. Bezüglich des Screenings nach einer erhöhten Temperaturstabilität konnten insgesamt 10 potentiell verbesserte Varianten identifiziert werden, wohingegen die Durchmusterung nach reduzierter Produktinhibierung zunächst 56 „hits“ lieferte, welche in einem zweiten Screening-Verfahren auf 6 reduziert werden konnten. Eine genaue biochemische Charakterisierung dieser identifizierten verbesserten CHMO<sub>Acineto</sub>-Varianten ist Gegenstand zukünftiger Arbeiten.

### **Enzym-katalysierte $\epsilon$ -Caprolacton-Ring-Opening Polymerization (ROP)**

Ein weiteres Ziel dieses Projektes bestand darin, das Problem der Produktinhibierung der CHMO<sub>Acineto</sub> entweder durch Methoden des Protein-Engineering oder durch verfahrenstechnische Methoden zu lösen, um  $\epsilon$ -CL in hohen Raum-Zeit-Ausbeuten, Umsätzen sowie exzellenter Reinheit zu erhalten. Bisherige enzymatische Verfahren liefern maximal 60

mM  $\epsilon$ -CL und sind daher unwirtschaftlich. Ein völlig neuartiger Ansatz ist die Enzym-katalysierte Ringöffnungspolymerisation, bei der das Produkt  $\epsilon$ -Caprolacton unter Verwendung einer Lipase in ausschließlich wässriger Lösung zum Polyester Polycaprolacton (PCL) umgesetzt wird. Die durch Lipasen katalysierte enzymatische Ring-Opening Polymerization in organischen Lösungsmitteln sowie deren Mechanismus sind bereits literaturbekannt, wobei zahlreiche Lipasen unterschiedlicher Ursprungsorganismen untersucht wurden. Alle Reaktionen wurden in organischem Lösungsmittel mit einem sehr geringen Anteil der wässrigen Phase (typisch <5%), welcher für die Aufrechterhaltung der Lipase in ihrer aktiven Form nötig ist, durchgeführt. In diesen Fällen muss der Wassergehalt stark kontrolliert werden, da diese Lipasen ansonsten die Hydrolyse des Lactons anstatt der gewünschten Polymerbildung katalysieren.



**Abbildung 4.** Enzymkaskade zur Synthese von Oligo- $\epsilon$ -Caprolacton (oligo- $\epsilon$ -CL, 4). Im ersten Oxidationsschritt wird Cyclohexanol (1) durch eine Alkoholdehydrogenase (ADH) zu Cyclohexanon (2) als Intermediat und dem reduzierten Cofaktor NADPH umgesetzt gefolgt von einem zweiten Oxidationsschritt, in dem Cyclohexanon durch eine Cyclohexanon-Monooxygenase-katalysierte Reaktion zu  $\epsilon$ -Caprolacton ( $\epsilon$ ) umgesetzt und der Cofaktor NADP<sup>+</sup> zurück gewonnen wird. Eine Produktinhibierung wird verhindert und eine höhere Produktivität wird durch den Einsatz der Lipase (CAL-A) durch ihre Acyltransferase-Aktivität im wässrigen System erreicht. Dies resultiert in der Bildung von Oligo- $\epsilon$ -CL ohne nennenswerte Hydrolyse zu 6-Hydroxycapronsäure.

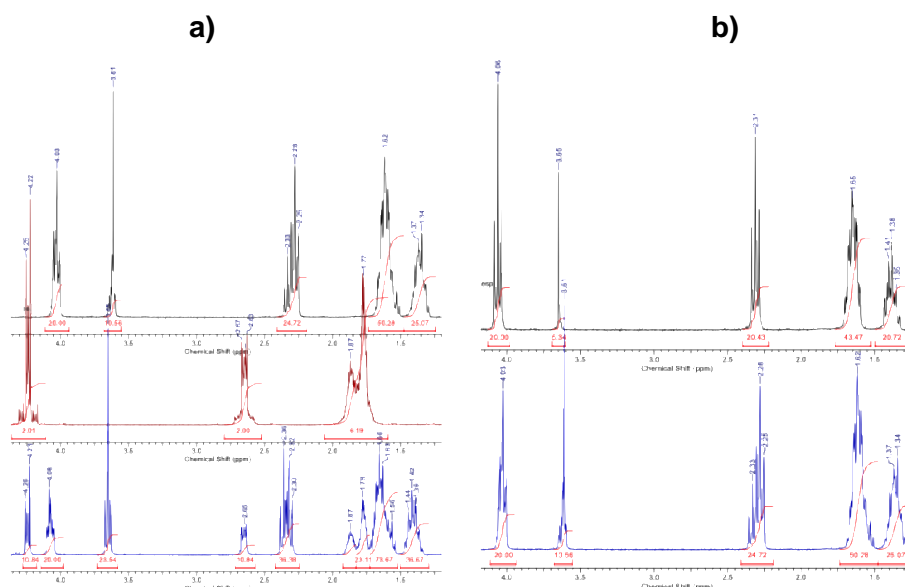
Für die hier gewünschte Doppeloxidation unter Nutzung der LK-ADH und der CHMOAcineto ausgehend von Cyclohexanol über Cyclohexanon hin zum gewünschten Produkt  $\epsilon$ -Caprolacton kann allerdings ausschließlich ein wässriges Medium verwendet werden. Überraschender Weise wurde beobachtet, dass die Lipase A aus *Candida antarctica* (CAL-A) im Gegensatz zu vielen anderen Lipasen wie CAL-B auch eine Acyltransferase-Aktivität in Gegenwart von Wasser besitzt. Diese Aktivität der CAL-A soll entsprechend genutzt werden, um das Produkt  $\epsilon$ -CL während des Prozesses kontinuierlich zu polymerisieren und somit die Produktinhibierung der CHMOAcineto zu umgehen (Abbildung 4). Dies würde zu höheren Raum- Zeit-Ausbeuten beitragen und zusätzlich direkt eine Vorstufe für die Polymerindustrie liefern. Die ersten Versuche bezüglich der Polymerisationsreaktion von  $\epsilon$ -CL katalysiert durch die Lipase CAL-A sollten zeigen, ob eine Autohydrolyse des Lactons zur freien Säure (6-Hydroxycapronsäure)

oder durch die CAL-A katalysierte Hydrolyse stattfindet. Hierzu wurden pH Stat-Messungen durchgeführt. Es konnte festgestellt werden, dass keine über dem Detektionslimit messbare Hydrolyse des Laktons durch die CAL-A stattfindet. Nach einigen Stunden Inkubation einer 1 mol L<sup>-1</sup>  $\epsilon$ -CL-Lösung konnte sogar die Bildung einer weißen Trübung der Reaktionslösung beobachtet werden. Nach Isolierung und Analyse mittels Gelpermeationschromatographie (GPC), konnte die Bildung von  $\epsilon$ -CL-Oligomeren mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 1200 g mol<sup>-1</sup> (11-mer) bewiesen werden.

**Tabelle 1.** Charakterisierung von Oligo- und Poly- $\epsilon$ -Caprolakton welche auf verschiedenen Wegen erhalten und mittels GPC analysiert wurde.

Produkt <sup>[a]</sup>	Peak-Retentions- volumen [mL]	M <sub>n</sub> [Da]	M <sub>w</sub> [Da]	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub>
PCL <sub>Chem</sub>	12.0	35.426	48.248	1.4
Oligo- $\epsilon$ -CL <sub>Kaskade</sub>	18.4	160	375	2.3
Oligo- $\epsilon$ -CL <sub>CAL-A</sub>	16.4	615	1154	1.8
Oligo- $\epsilon$ -CL <sub>Kond.</sub>	12.2	21.662	37.773	1.7

<sup>[a]</sup>PCL<sub>Chem</sub>: chemisch synthetisiert; Oligo- $\epsilon$ -CL<sub>Kaskade</sub>: erhalten durch den Einsatz aller drei Enzyme ausgehend von Cyclohexanol; Oligo- $\epsilon$ -CL<sub>CAL-A</sub>: erhalten durch lipase A ausgehend von 1 mol L<sup>-1</sup>  $\epsilon$ -CL; Oligo- $\epsilon$ -CL<sub>Kond.</sub>: chemisch polymerisiertes Oligo- $\epsilon$ -CL<sub>CAL-A</sub>.



**Abbildung 5.** Charakterisierung der erhaltenen Oligomere mittels <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopie. a) <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz) Spektrum in CDCl<sub>3</sub> einer Produktmischung bestehend aus  $\epsilon$ -CL und Oligo- $\epsilon$ -CL<sub>CAL-A</sub> extrahiert aus einer Biokatalyse (blau), das Monomer  $\epsilon$ -CL (rot) und Oligo- $\epsilon$ -CL<sub>CAL-A</sub> nach Abdestillation des Monomers (schwarz). b) <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz) Spektrum in CDCl<sub>3</sub> von Oligo- $\epsilon$ -CL<sub>CAL-A</sub> (blau) vor der Zugabe von Monobutyl-Zinn(II)-oxid und das erhaltene Kondensationsprodukt Oligo- $\epsilon$ -CL<sub>Kond.</sub> nach Addition des chemischen Katalysators (schwarz).

Dieses Oligomer (Oligo- $\epsilon$ -CL<sub>CAL-A</sub>, Tabelle 1) konnte vom Projektpartner Polymaterials durch herkömmliche chemische Polymerisation in ein hochmolekulares Polymer (Oligo- $\epsilon$ -CL<sub>Kond</sub>) umgewandelt werden, welches im Vergleich identische Eigenschaften zum rein-chemisch hergestellten Poly- $\epsilon$ -Caprolakton (PCL<sub>chem</sub>) aufweist. Dies konnte auch durch die zusätzlich durchgeführte <sup>1</sup>H-NMR spektroskopische Analyse bestätigt werden (Abbildung 5).

Die nächsten Untersuchungen fokussierten sich auf den Effekt von CAL-A in einer Eintopf-Reaktion zusammen mit ADH und CHMO bei unterschiedlichen Cyclohexanol-Konzentrationen. Hierbei wurden ADH und CHMO als Mischung von zwei *E. coli*-Zellsuspensionen (ruhende Zellen), welche die rekombinant exprimierten Enzyme enthielten, verwendet. Die Konzentration von  $\epsilon$ -CL fiel in den Reaktionen mit CAL-A-Zusatz sehr viel kleiner aus, was aus der Bildung der Oligomere resultierte (ebenfalls durch <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopie bestätigt). Diese Experimente demonstrierten erfolgreich, dass Ganzzellbiokatalysen mit allen drei Enzymen (ADH, CHMO und CAL-A) in einer Eintopf-Reaktion durchgeführt werden können und zur Bildung der gewünschten Oligomere führten. Parallel zur Stabilisierung der CHMO durch Einführung von Disulfidbrücken wurde eine bereits publizierte, stabilisierte Variante der CHMO näher untersucht.

Die literaturbekannte Doppelmutante C376L/M400I<sup>[1]</sup> wurde für weitere Experimente genutzt, da an diesem Punkt des Projektes unsere Studien bezüglich der Disulfidbrücken-Varianten noch nicht abgeschlossen waren.

In vorherigen Studien zeigte sich, dass die Nutzung von ADH und CHMO als Mischung zweier *E. coli*-Zellsuspensionen vorteilhafter im Vergleich zu deren Nutzung in einem einzigen Ganzzellkatalysator ist. Demzufolge wurden unterschiedliche Verhältnisse ganzer Zellen, welche die rekombinant exprimierte ADH bzw. CHMO C376L/M400I enthielten, für Biotransformationen von Cyclohexanol zu  $\epsilon$ -CL eingesetzt. Bei einer Substratkonzentration von 60 mmol L<sup>-1</sup> wurden die höchsten Umsätze mit einem ADH/CHMO-Verhältnis von 1:10 erzielt.

Obwohl das System im Prinzip selbstständig in Bezug auf die Cofaktor-Regenerierung ist, konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von Aceton und d-Glucose bei hohen Substratkonzentrationen zu einem effizienteren Cofaktor-Recycling führt, wenn beide Enzyme in getrennten *E. coli*-Zellen exprimiert werden. Eine stöchiometrische Menge an zugesetztem Aceton führte zu einem Umsatz von 95%.

---

<sup>1</sup> D. J. Opperman, M. T. Reetz, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2589-2596.



Außerdem wurden präparative Biotransformationen (unter Anwendung einer Substrat-Zufütterung mittels Pumpe) mit dem kombinierten System aus ADH, CHMO C376L/M400I und CAL-A durchgeführt, welche zur vollständigen Umsetzung von  $0.2 \text{ mol L}^{-1}$  Cyclohexanol nach 48 Stunden führten. Der Einsatz der gleichen Menge an Enzym führte zur Umsetzung von 74% und 43% bei einer eingesetzten Substratkonzentration von  $0.3 \text{ mol L}^{-1}$  beziehungsweise  $0.5 \text{ mol L}^{-1}$  Cyclohexanol. Die Extraktion der Reaktionslösung mit Dichlormethan ergab eine Mischung aus 25%  $\epsilon$ -CL und 75% oligo- $\epsilon$ -CL (durch  $^1\text{H-NMR}$  Spektroskopie und GPC bestätigt).

Zusammenfassend konnte durch diese attraktive biokatalytische Route gezeigt werden, dass die Produktion von  $\epsilon$ -CL durch die direkte *in situ*-Transformation zum entsprechenden Oligomer hohe Produktkonzentrationen bei über  $0.2 \text{ mol L}^{-1}$  Substratkonzentrationen erreicht werden konnten. Mit diesem Reaktionsaufbau konnten 6-fach höhere Substratkonzentrationen im Vergleich zu unseren früheren Studien umgesetzt werden. Weitere Verbesserungen zu höheren Produktkonzentrationen beispielsweise durch Prozesstechnik-Strategien sind Gegenstand laufender Untersuchungen beim Projektpartner Enzymicals AG.

### **Anwendung der Enzymkaskade zur Synthese von chiralen Polyestern**

Generell können chirale Polyester für vielseitige biomedizinische Anwendungen eingesetzt werden. Die Einführung von Chiralität in Polyester, welche zu den wichtigsten industriellen Polymeren zählen, ändert deren Eigenschaften und macht diese insbesondere interessant für die Anwendung des sogenannten *microsphere drug delivery*. Trotzdem wurde bis heute keine auf Mehr-Enzymreaktionen-beruhende biokatalytische Route zur Synthese dieser funktionalisierten und biologisch abbaubaren chiralen Polyester etabliert. In Bezug auf diese chiralen Polyester wurden bisher nur Beispiele publiziert, welche direkt von dem substituierten Laktone unterschiedlicher Ringgrößen ausgingen und unter Nutzung von Lipasen in reinem organischen Lösungsmittel und bei hohen Temperaturen durchgeführt wurden.

Die Erweiterung der Enzymkaskade bestehend aus ADH, CHMO und CAL-A wurde bezüglich der Synthese von chiralen, methyl-substituierten Oligo- $\epsilon$ -Caprolakton-Derivaten untersucht, um sowohl Chiralität in dem entsprechenden Monomer zu erzeugen, als auch eine direkte, nachfolgende Polymerisationsreaktion zu erzielen. In einer Eintopf-Reaktion bestehend aus drei enzymatischen Schritten in wässriger Lösung (komplett lösungsmittelfrei) wurden Methyl-substituierte  $\epsilon$ -CL-Derivate synthetisiert und nachfolgend der direkten Ring-Öffnungs-Oligomerisierung, katalysiert durch die CAL-A, unterzogen. Dies resultierte in der Bildung der entsprechenden chiralen Oligomere.

Ausgehend von einem Diastereomerengemisch (*cis/trans*) des 4-Methyl-Cyclohexanol wurde die Enzymkaskade zunächst etabliert und im Hinblick auf das Erzielen höherer Umsätze optimiert. Außerdem wurden weitere Methyl-substituierte und unsubstituierte Laktone bezüglich einer Oligomerisierung katalysiert durch die CAL-A getestet, um das Acyl-Transferase-Potential dieser Lipase näher zu untersuchen. Obwohl  $\gamma$ -Butyrolakton ( $\gamma$ -BL) und Oxacyclotridecan-2-on (OCTD-2-one) nicht-chirale Verbindungen sind, konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von  $1.0 \text{ mol L}^{-1}$  OCTD-2-one mit CAL-A in wässriger Lösung zur Oligomerisierung des C12-Laktons führt, was durch die Präzipitation eines weißen, festen Bodensatzes zunächst gezeigt, und nach Aufarbeitung auch durch  $^1\text{H-NMR}$ - und GPC-Analyse bestätigt werden konnte. Es konnten Oligomere mit einem maximalen Molekulargewicht von  $2500 \text{ g mol}^{-1}$ , was einem 13-mer entspricht, erhalten werden. Im Gegensatz dazu konnten aus dem kleineren C4-Lakton keine Oligomere erhalten werden. Die Oligomere, welche von den Methyl-substituierten Laktone gewonnen wurden, wurden ebenfalls mittels  $^1\text{H-NMR}$ - und GPC-Analyse näher charakterisiert. Ausgehend vom optisch reinen (*S*)-4-Methyl-Cyclohexanol konnte das höchste Molekulargewicht von 3523 Da und einem  $\overline{DP}_n$  von 9 für das entsprechende Oligomer erzielt werden. Für die Oligomere Oligo-(*S*)-4-Me-CL und Oligo-*rac*-4-Me-CL wurden außerdem die optischen Aktivitäten ermittelt. Diese zeigen, dass die erhaltenen Oligomere tatsächlich optisch aktiv, und damit chiral sind und dass die CAL-A sowohl die (*S*)- als auch die (*R*)-Enantiomere akzeptiert und diese statistisch zu den entsprechenden Oligomeren umsetzt.

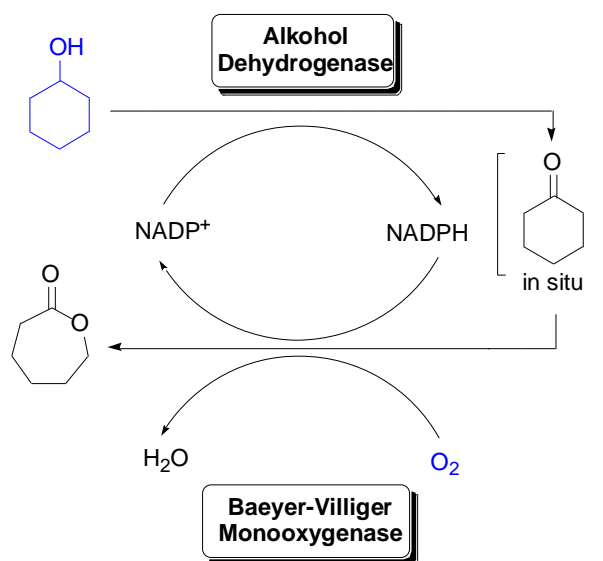
Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die vorgeschlagene Enzymkaskade bestehend aus ADH, CHMO und CAL-A den biokatalytischen Zugang zu optisch aktiven, chiralen Oligomeren ermöglicht.

Dieses neue Verfahren wurde durch die Universität Greifswald (AK Bornscheuer) in Zusammenarbeit mit der Enzymicals AG bereits als internationales Patent mit dem Titel „Process for the enzymatic production of oligo-/polyesters“ beim Europäischen Patentamt angemeldet.

## 4.2. Universität Bielefeld, Organische Chemie I (Prof. Gröger)

### Ausgangspunkt und Konzeption: Die biokatalytische Herstellung von $\epsilon$ -Caprolakton mittels Ganzzellkatalyse

In den vorangegangenen Arbeiten im AK Gröger wurde erfolgreich ein „proof of concept“ für das Prinzip der Doppeloxidation zur Direktumwandlung von Cyclohexanol in  $\epsilon$ -Caprolakton in einem Eintopfverfahren aufgezeigt. Hierbei wird lediglich molekularer Sauerstoff als weiteres Reagenz und Oxidationsmittel benötigt (Abbildung 6).



**Abbildung 6.** Konzept der Doppeloxidation von Cyclohexanol

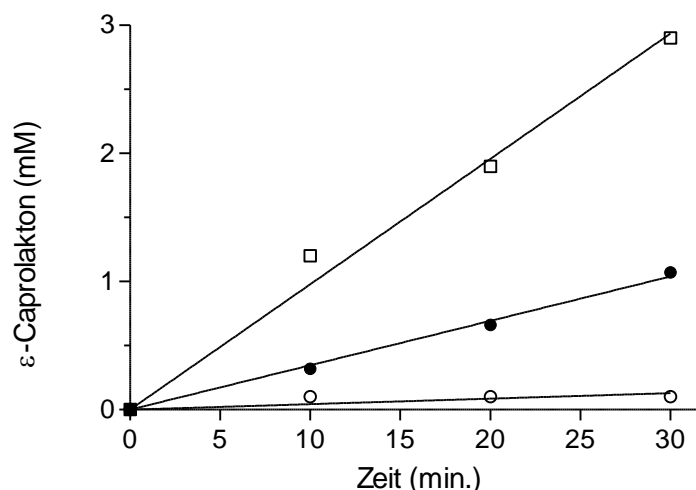
Diese mit isolierten Enzymen durchgeführten Arbeiten stellten die Basis für das aktuelle Projektvorhaben dar, in dem ein Ganzzell-Katalysator als ökonomisch attraktive „Biokatalysator-Formulierung“ eingesetzt werden soll. Durch den Einsatz von ganzen Zellen, sogenannten *designer bugs*, können ein Zellaufschluss und ggf. aufwändige anschließende Isolierungen oder Reinigungsschritte bei der Herstellung der Enzyme umgangen werden. Daneben zeigen viele Enzyme eine erhöhte Stabilität innerhalb der Zelle, außerdem können durch niedrigere intrazelluläre Substrat- und Produkt-Konzentrationen Inhibierungseffekte reduziert werden. Außerdem kann bei Einsatz von Ganzzellkatalysatoren auf die externe Zugabe von teuren Cofaktoren verzichtet werden. Ein weiterer Fokus lag auf der Prozessentwicklung unter Betrachtung eines „Solvens engineering“ sowie einer *in situ*-Produktentfernung als auch auf der Verknüpfung des Biotransformationsverfahrens mit der Folgechemie (Polymerbildung). Darüber hinaus sollte eine „Rückintegration“ des Biokatalyse-Verfahrens durch Verknüpfung mit einer Hydrierung von Phenol untersucht werden, das dann eine Perspektive für ein aus nachwachsenden Rohstoffen (Lignocellulose) chemoenzymatisch hergestelltes  $\epsilon$ -Caprolacton und dessen (heute auf Petrochemie-Basis hergestelltes) Polymer Poly- $\epsilon$ -caprolacton eröffnet.

## Konstruktion geeigneter Ganzzellkatalysatoren

Bei der Herstellung eines maßgeschneiderten Ganzzellkatalysators lag der Fokus zunächst auf der Entwicklung eines geeigneten Expressionssystems, in dem beide Enzyme löslich exprimiert werden. Für die Coexpression der Gene, die für die Baeyer-Villiger-Monooxygenase (Cyclohexanonmonooxygenase; CHMO) und die Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* (LK-ADH) codieren, wurde der Expressionsvektor pETDuet-1 von Novagen gewählt. Dieser Vektor trägt neben einem Ampicillin-Resistenzgen zwei multiple Klonierungsstellen (MCS), denen jeweils ein T7-Promotor sowie eine ribosomale Bindungsstelle vorausgehen. Hinter der zweiten Klonierungsstelle befindet sich der T7-Terminator. Daher ist der Vektor für die Coexpression zweier Gene geeignet. Die beiden Gene wurden in einer PCR-Reaktion mit spezifischen Primer amplifiziert, durch die den Genen die spezifischen Schnittstellen angefügt worden sind. Das Gen für die LK-ADH wurde über die Schnittstellen in die erste MCS sowie das Gen für die CHMO über die Schnittstellen *NdeI* und *BglII* in die zweite MCS eingefügt. Die fehlerfreie Amplifikation und Integration in den Expressionsvektor wurde durch Sequenzierung bestätigt. Für die Coexpression wurde das resultierende Plasmid in unterschiedliche Expressionsstämme transformiert. Interessanterweise konnte hierbei trotz umfassender Expressionsoptimierung (Expressionstemperatur, Expressionsdauer, unterschiedliche Medien) keine Bedingungen gefunden werden, unter denen beide Enzyme aktiv exprimiert wurden.

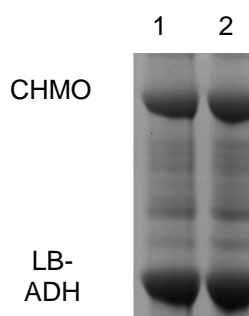
Daher wurde ein anderes Coexpressionssystem, bestehend aus zwei kompatiblen Plasmiden, gewählt. Für die Expression der CHMO wurde der auf dem kommerziell erhältlichen Plasmid pET28a basierende Expressionsvektor pCHMO verwendet, der vom AK Bornscheuer zur Verfügung gestellt wurde. Das Gen, das für die CHMO codiert, liegt auf diesem Plasmid als N-terminales Hexahistidin-Fusionskonstrukt vor, des Weiteren verfügt dieser Vektor über eine Kanamycin-Resistenz und den *ColE1* Replikationsursprung. Für die Expression der Alkoholdehydrogenase (hier: ADH aus *Lactobacillus brevis*; LB-ADH) wurde der früher bereits erfolgreich etablierte Vektor pKA1 (pACYC-basierter Vektor) verwendet. Dieser Vektor besitzt den p15A Replikationsursprung und trägt ein Chloramphenicol-Resistenzgen. Beide Plasmide verfügen über den T7 Promotor und sind somit durch IPTG induzierbar. Das LB-ADH Gen wurde mit spezifischen Primern amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *BamHI* in den Vektor pKA1 kloniert. Für die Coexpressionsexperimente wurden chemisch kompetente *E. coli* BL21(DE3)-Zellen hergestellt, die mit dem Expressionsvektor pLB-ADH transformiert wurden. Der Transformationsansatz wurde auf Selektivagar, der 20 µg/ml Chloramphenicol enthielt, ausplattiert. Aus den Transformanden wurden elektrokompetente Zellen hergestellt, die anschließend mittels Elektroporation mit dem Expressionsvektor pCHMO transformiert wurden. Die Transformationsansätze wurden auf Selektivagar ausplattiert, der 20 µg/ml Chloramphenicol und 40 µg/ml Kanamycin enthielt. So konnte eine hohe Zahl von Transformanden hergestellt werden, die beide Vektoren enthielten.

Um die optimalen Expressionsbedingungen für den Ganzzellkatalysator zu ermitteln, wurde eine Expressionsoptimierung durchgeführt, die sowohl Temperatur, Zeit und verschiedene Medien beinhaltete. Da aufgrund von Kreuzreaktionen der beiden Enzyme bei der Verwendung von Cyclohexanon und Cyclohexanol als Substrat kein photometrischer Assay durchgeführt werden kann, wurden die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten als aussagekräftige Größe zur Charakterisierung der Enzymaktivität mittels GC ermittelt (Abbildung 7).



**Abbildung 7.** Ermittlung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten des Ganzzellkatalysators, die bei verschiedenen Temperaturen in TB-Medium für 18 Stunden exprimiert wurden, mittels GC. (□) Expression bei 25 °C, (●) Expression bei 30 °C, (○) Expression bei 37 °C. Es wurden 20 mg Zellen (Feuchtgewicht) pro ml und 20 mM Cyclohexanol eingesetzt. Die Umsetzung erfolgte bei 25 °C in KPi (100 mM; pH 8.0; 0.25 mM NADP<sup>+</sup>).

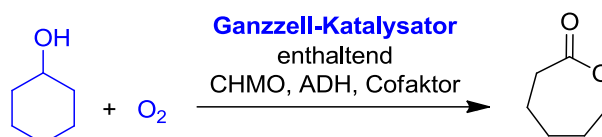
Die höchsten Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten konnten mit Zellen erzielt werden, die in TB Medium bei 25 °C für 18 Stunden unter Expressionsbedingungen angezogen worden sind. Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse der SDS-PAGE-Analyse dieses Ganzzellkatalysators der in TB-Medium bei 25 °C für 18 Stunden exprimiert wurde. Erfreulicherweise zeigte sich unter Verwendung dieses Expressionssystems die Expression beider Enzyme in löslicher Form.



**Abbildung 8.** SDS PAGE-Analyse des Ganzzellkatalysators BL21(DE3) pET28CHMO / pKA1LB-ADH (Anzucht bzw. Expression bei 25°C). Spur 1: Rohextrakt, Spur 2: lysierte Zellen

Dieser Ganzzellkatalysator wurde anschließend für die Doppeloxidation von Cyclohexanol zu  $\epsilon$ -Caprolakton eingesetzt, wobei dies mit und ohne Zusatz von NADP<sup>+</sup> durchgeführt wurde (Tabelle 2). Es zeigte sich, dass diese Synthese auch ohne Zugabe von externen NADP<sup>+</sup> durchgeführt werden kann, jedoch kommt es bei höheren Konzentrationen (60 mM) zu einer Erniedrigung des Umsatzes. Dieses Verhalten ist vermutlich durch den Verlust von zelleigenem Cofaktor infolge einer Schädigung der Zellen bei höheren Cyclohexanol-Konzentrationen. Durch Zusatz von NADP<sup>+</sup> konnte ein Cofaktor-Mangel kompensiert werden und man erreicht eine praktisch vollständige Umsetzung von 60 mM Cyclohexanol. Allerdings wird, in Analogie zu den Umsetzungen mit isolierten Enzymen, auch unter Einsatz von Ganzzellkatalysatoren bei einer Substratkonzentration von 100 mM Cyclohexanol nur ein niedriger Umsatz (16%) beobachtet.

**Tabelle 2.** Ganzzell-Katalysierte Herstellung von  $\epsilon$ -Caprolakton und Einfluss von zugesetztem Cofaktor NADP<sup>+</sup> sowie verschiedenen Cyclohexanol-Konzentrationen (Reaktionsbedingungen: 50 mg/ml *E. coli* pLB-ADH/pCHMO; 150 mM KPi, pH 8.0; 25 °C; 24 Stunden).



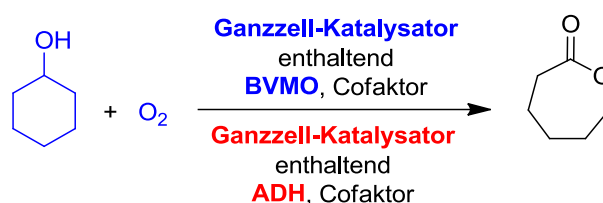
Nummer	Externer Cofaktor [mM]	(Cyclohexanol)[mM]	Umsatz (%)
1	0	20	97
2	0	40	98
3	0	60	38
4	0	100	5
5	0.25	20	99
6	0.25	40	97
7	0.25	60	97
8	0.25	100	16

### Biotransformationen unter Einsatz von Zwei-Zell-Systemen

Neben den Versuchen mit Ganzzellkatalysatoren, die beide Enzyme exprimieren, wurde ein weiteres katalytisches System, bestehend aus zwei Ganzzell-Katalysatoren, getestet. Ein Vorteil eines solchen Zwei-Zell-Systems besteht darin, dass benötigte Enzymaktivitäten sehr genau eingestellt und auch Deaktivierungseffekte durch spätere Zugabe der jeweils benötigten Enzymkomponente spezifisch adressiert werden können. Zur Untersuchung dieses Konzepts wurden Zellen, die die LK-ADH exprimieren und Zellen, die die CHMO exprimieren, gleichzeitig eingesetzt und getestet, ob diese zur Doppeloxidation von Cyclohexanol in der Lage sind.

Hierzu wurden die *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit dem Plasmid pCHMO transformiert, exprimiert und anschließend die Aktivität mittels Photometerassay bestimmt. Die rekombinanten Zellen zeigten eine Aktivität von 133 U/g Zellen (Feuchtgewicht) für die Oxidation von Cyclohexanon. Für die LK-ADH Komponente wurden aus einer Hochzelldichte-Fermentation stammende rekombinante *E. coli* Zellen verwendet, für die eine Aktivität von 492 U/g Zellen für die Oxidation von Cyclohexanol bestimmt wurden. Für die Biotransformationen wurden daraufhin 25 mg/mL LK-ADH Zellen und 50 mg/mL CHMO Zellen verwendet und unter variierender Substratkonzentration von Cyclohexanol im Bereich von 20 bis 100 mM untersucht. Nach dem Ablauf der Reaktionszeit von 24 Stunden wurden die Proben extrahiert und mittels GC der Umsatz bestimmt (Tabelle 3). Im Gegensatz zum Ganzzellkatalysator, der beide Enzyme exprimiert, zeigte sich, dass hier der externe Zusatz von Cofaktor unerlässlich ist. Mit der Zugabe von NADP<sup>+</sup> in einer Konzentration von 0.25 mM wurde bis zu einer Cyclohexanol-Konzentration von 60 mM ein nahezu vollständiger Umsatz erzielt im Gegensatz zu 20% Umsatz bei 100 mM.

**Tabelle 3.**  $\epsilon$ -Caprolakton-Bildung durch ein Ganzzell-System, bestehend aus zwei separaten Zellsystemen mit CHMO- bzw. ADH-Aktivität (Reaktionsbedingungen: 25 mg/ml *E. coli* pLK-ADH und 50 mg/ml *E. coli* pCHMO Zellen; 150 mM KPi, pH 8.0; 24 Stunden; 25 °C).



Nummer	Externer Cofaktor [mM]	(Cyclohexanol)[mM]	Umsatz (%)
1	0	20	12
2	0	40	8
3	0	60	7
4	0	100	0
5	0.25	20	99
6	0.25	40	97
7	0.25	60	99
8	0.25	100	35

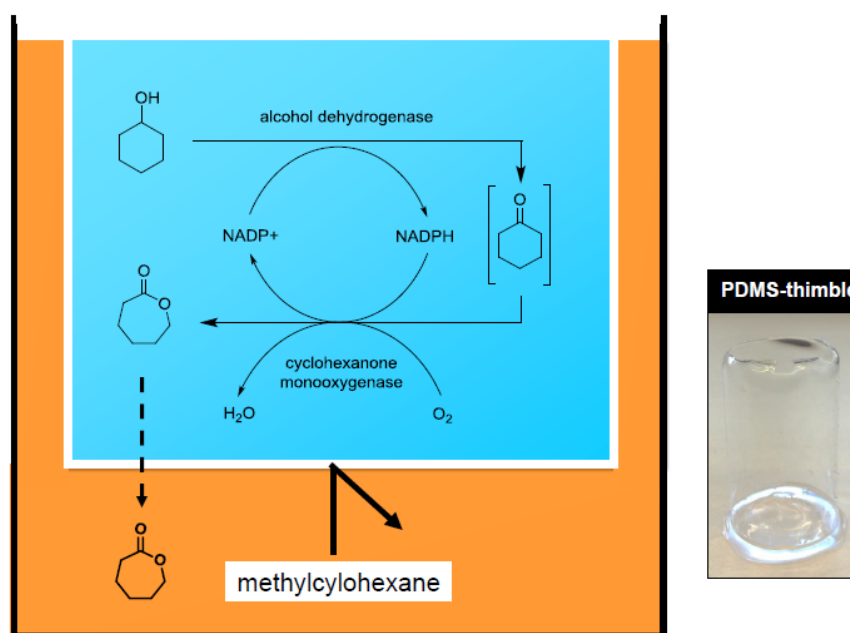
Darüber hinaus gelang durch Anwendung einer Substratfeed-Strategie auch bei höherer Substratkonzentration von 100 mM ein höherer, verbesserter Umsatz mit 66% Umsatz (bei einer Gesamtkonzentration von 100 mM). Entsprechend wurde die Substratdosierung auch in den späteren Versuchen zur Bioprozessentwicklung eingesetzt. Zudem wurden kürzlich auch molekularbiologischer Versuche zur Stabilisierung der CHMO *via* Cyclisierung durchgeführt.

## Solvens-Engineering

In einem weiteren Arbeitsabschnitt wurde der Einfluss von organischen Solventien auf die Biotransformation untersucht und ein „Solvens-Engineering“ durchgeführt. Hierbei zeigte sich Isooctan als geeignetes Co-Solvens. Unter Einsatz von Enzymrohextrakten führte der Zusatz von Isooctan, eingesetzt mit einem Volumenanteil von 10-30%(v/v), zu einer deutlichen Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit bei 40 mM als auch 80 mM Substratkonzentration. Isooctan könnte dabei als eine Art Reservoir für Cyclohexanol und/oder  $\epsilon$ -Caprolacton fungieren und dadurch deren destabilisierenden Effekt verringern. Dem entgegengesetzt ergab die Verwendung direkt aus der Fermentation erhaltener, nicht-permeabilisierter ganzer Zellen deutlich verminderte Umsätze, was auf Transportlimitierungseffekte hindeutet.

## Bioprozessentwicklung unter *in situ*-Produktentfernung und Kompartimentierung

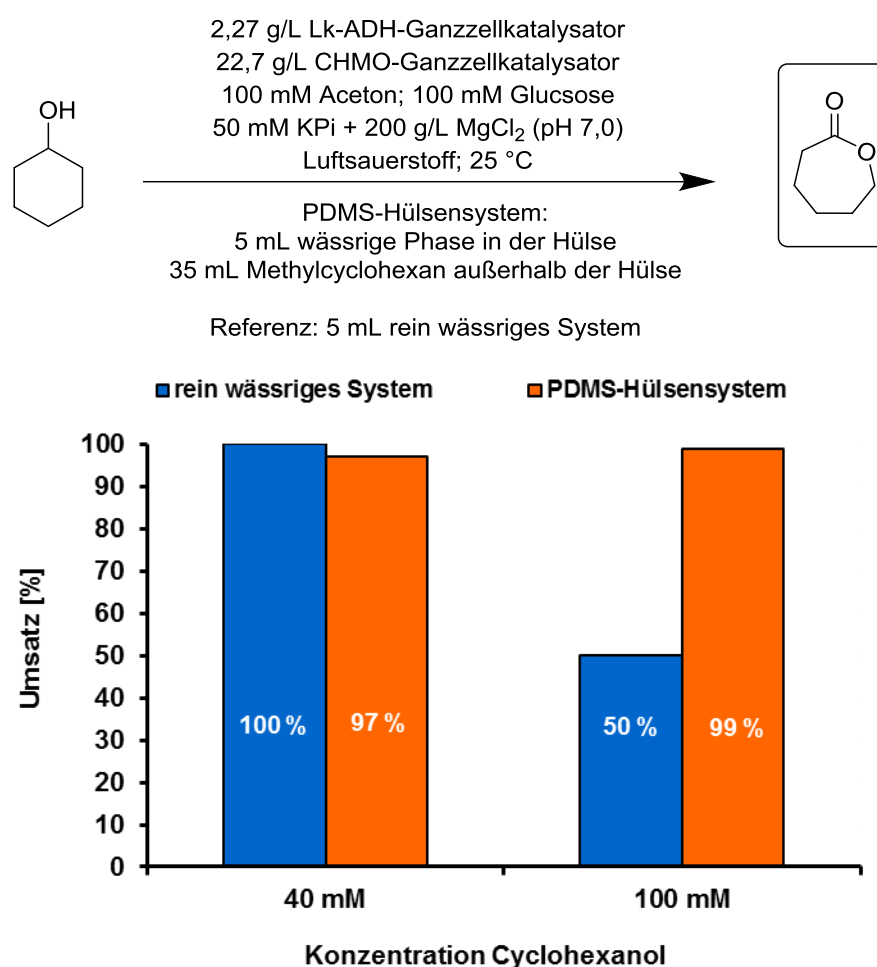
Komplementär und ergänzend zu dem im AK Bornscheuer entwickelten Lösungsansatz zur Überwindung des Problems der Produktinhibierung durch eine Reaktivextraktion *via in situ* Oligomerisation in der wässrigen Phase mittels Lipase A aus *Candida antarctica* (~ 20 g/L Oligo- $\epsilon$ -Caprolacton) wurde (1) eine extraktive Produktentfernung mittels eines organischen Lösungsmittels gekoppelt mit einer Kompartimentierung zur Separierung von wässriger und organischer Phase als auch (2) eine darauf aufbauende *in situ*-Reaktivproduktentfernung durch eine Kopplung mit einer enzymatischen Polymerisation zur Herstellung von Polycaprolacton in der organischen Phase mittels Lipase B aus *Candida antarctica* (CalB) entwickelt, wobei letzteres Verfahren zudem in enger Zusammenarbeit mit dem AK Liese erfolgte. Im Folgenden wird zunächst auf die unter (1) beschriebene Verfahrensweise eingegangen (Abbildung 9).



**Abbildung 9.** Konzept zur  $\epsilon$ -Caprolacton-Synthese durch Kombination von Biotransformation im wässrigen Medium mit *in situ* Extraktion durch ein organisches Solvens unter Kompartimentierung der Lösungsmittelsysteme



Zur Untersuchung der *in situ*-Extraktion unter Kompartimentierung wurde eine semipermeable Membran zur Trennung der wässrigen und organischen Phase verwendet, die ein Eindringen des organischen Solvenz in die wässrige Phase verhindert und gleichzeitig die Diffusion des Produktes  $\epsilon$ -Caprolacton aus dem wässrigen Kompartiment in das Organische ermöglicht. Für die semipermeable Kompartimentierung wurde die Methode der Verwendung von Polydimethylsiloxan (PDMS)-Hülsen aufgegriffen. Diffusionsversuche zeigten, dass die Membran für  $\epsilon$ -Caprolacton, Cyclohexanol und Cyclohexanon permeabel ist und sich somit prinzipiell zur *in situ* Extraktion eignet. Als Solvens der Wahl wurde auf Basis von Vorversuchen (unter Betrachtung u.a. des Einflusses auf die Enzymstabilität und der Nachhaltigkeit) Methylcyclohexan verwendet. Dieses PDMS-Hülsensystem (5 mL wässrige Phase in der PDMS-Hülse, 35 mL Methylcyclohexan außerhalb der PDMS-Hülse) wurde dann für eine Doppeloxidation von Cyclohexanol mit zunächst 40 mM Substratkonzentration herangezogen, wobei 97% Umsatz erzielt wurden (im Vergleich zu 100% im rein-wässrigen System). Hingegen konnte bei einer Substratkonzentration von 100 mM im PDMS-Hülsensystem der limitierte Umsatz von 50% im rein wässrigen System dann aber auf 99% (>10 g/L) gesteigert werden (Abbildung 10).



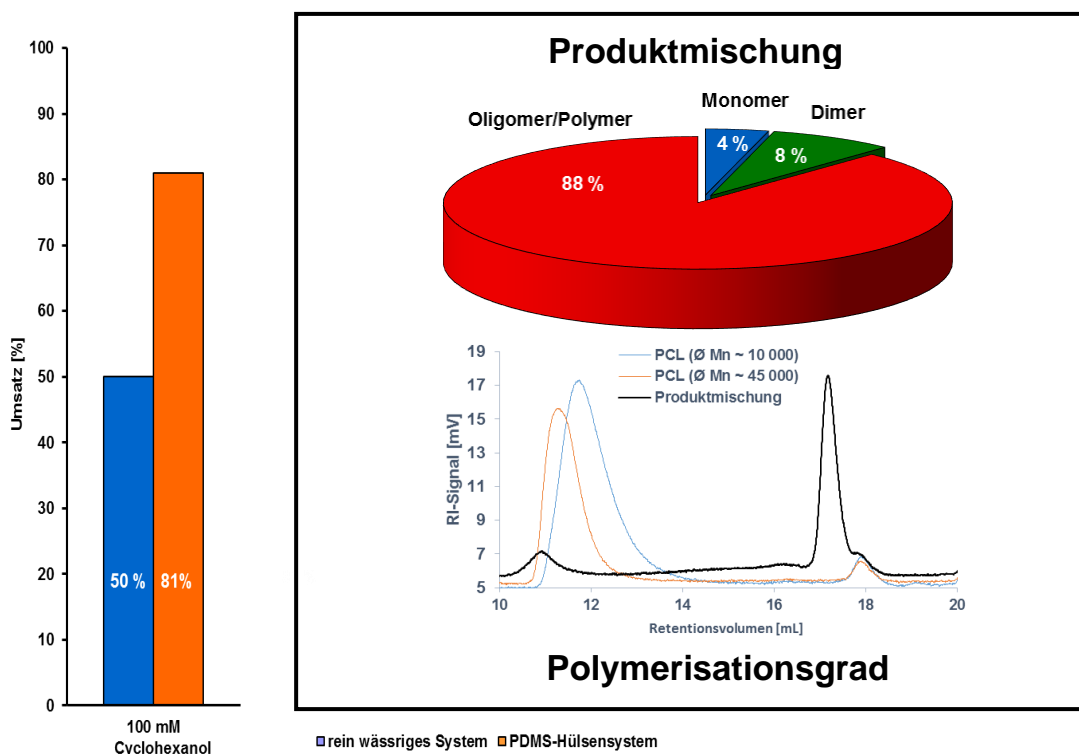
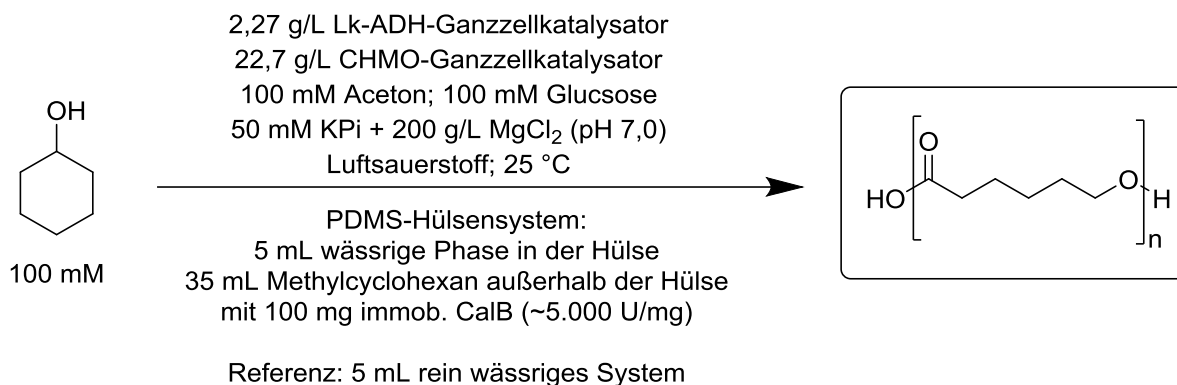
**Abbildung 10.** Vergleich der ganzzellkatalytischen Biotransformation im rein wässrigen System und im PDMS-Hülsensystem zur Herstellung von  $\epsilon$ -Caprolacton.

### **Bioprozessentwicklung unter *in situ*-Reaktivextraktion und Kompartimentierung**

Nachdem dieses Verfahrenskonzept der Kompartimentierung von wässriger und organischer Phase mittels PDMS-Hülsen erfolgreich für die Synthese von  $\epsilon$ -Caprolacton angewendet werden konnte, sollte es nun durch Zugabe der Lipase CalB in die organische Phase zur direkten Herstellung von Polycaprolacton erweitert werden. Hierbei wurde aufbauend auf Versuche im AK Liese die Polymerisation mittels Lipase CalB in Methylcyclohexan und bei Raumtemperatur durchgeführt.

Nachdem die Polymerisation unter diesen Bedingungen erfolgreich verlief, war es nun möglich die Biotransformation mit der *in situ* Extraktion sowie der *in situ* Polymerisation zu kombinieren. Hierbei wurden 100 mM Cyclohexanol zu 81% zu einer Mischung aus  $\epsilon$ -Caprolacton, Dimer sowie Oligo- und Polycaprolacton umgesetzt. Die mit diesen Proben im AK Liese durchgeführte Größenausschlusschromatographie zeigt, dass zwar überwiegend niedermolekulare Moleküle entstanden, aber bei Einsatz der Ganzzellkatalysatoren auch eine Fraktion mit hochmolekularem Polycaprolacton entstand, die vergleichbar ist mit der kommerziellen Referenzprobe (Sigma Aldrich: Polycaprolacton durchschnittliche  $M_n \sim 45.000$ ) ist (Abbildung 11). Weitere Versuche deuten darauf hin, dass die Konzentration des  $\epsilon$ -Caprolactons – steuerbar über die Menge des Lösungsmittels – sowie die Temperatur „Stellschrauben“ für die Erhöhung des Anteils an hochmolekularem Polycaprolactons sind.

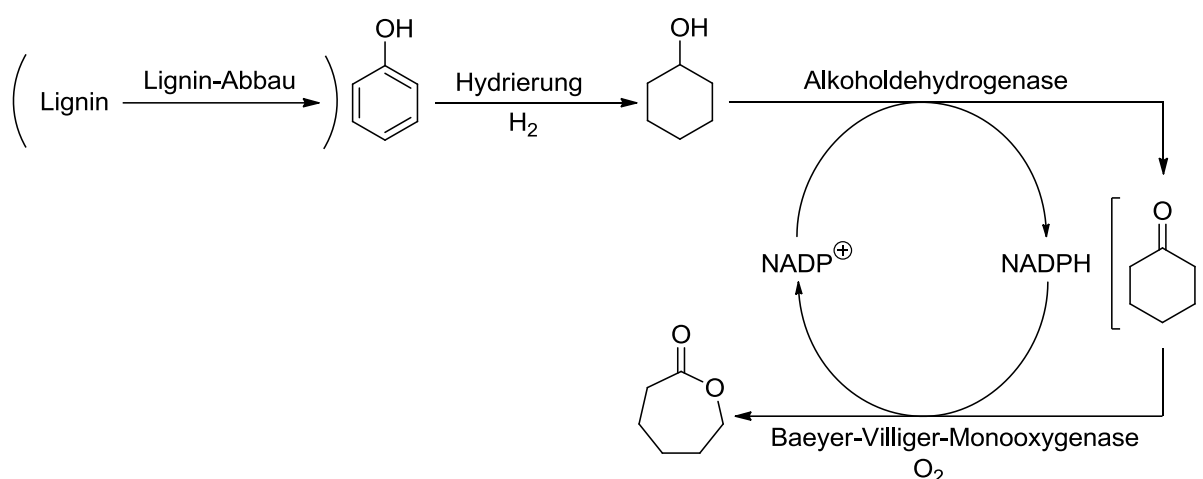
Zur Vermeidung der Produktinhibierung zeigt der Ansatz des PDMS-Hülsensystems für die Herstellung von  $\epsilon$ -Caprolacton als auch Polycaprolacton somit ein vielversprechendes Potential. Im Satzverfahren mit 100 mM Substratkonzentration konnte  $\epsilon$ -Caprolacton in mehr als 10 g/L sowie unter Zusatz der Lipase CalB eine Mischung aus Oligo- und Polycaprolacton synthetisiert werden, die z.T. auch eine hochmolekulare Fraktion vergleichbar mit kommerziellem Polycaprolacton enthält. Im Zulaufverfahren sollten höhere Produktkonzentrationen erzielt werden können. Außerdem ist zukünftig denkbar, dass das zur *in situ* Extraktion genutzte Methylcyclohexan über einen „by-pass“ über einen CalB-Festbettreaktor (60 °C) zu leiten, um den Anteil an hochmolekularem Polycaprolacton zu erhöhen.



**Abbildung 11.** Vergleich der ganzzellkatalytischen Biotransformation im rein wässrigen System zur Herstellung von  $\epsilon$ -Caprolacton und im PDMS-Hülsensystem zur Herstellung von Polycaprolacton. Die im PDMS-System erhaltene Produktmischung enthält laut NMR 4%  $\epsilon$ -Caprolacton, 8% Dimer und 88% Oligomere und Polymere. Die Verteilung der Kettenlänge der unaufgereinigten Produktmischung wurde mit kommerziellem Polycaprolacton unterschiedlicher Kettenlänge ( $\text{ØMn} \sim 10.000$  bzw.  $\text{ØMn} \sim 45.000$ ) mittels GPC verglichen. Hierbei wird deutlich, dass die Produktmischung eine hochmolekulare Polycaprolacton-Fraktion ähnlich des kommerziellen Polycaprolactons enthält.

### Rückintegration des Biotransformationsverfahrens auf nachwachsende Rohstoffbasis

Da  $\epsilon$ -Caprolacton als Plattformchemikalie im großtechnischen Maßstab vielseitige Verwendung findet, stellt die „Rückintegration“ des Prozesses auf einen Cyclohexanol-Zugang ausgehend von einer erneuerbaren, nachwachsenden Rohstoffquelle einen reizvollen Ansatz dar. Während der heutige petrochemische Reaktionspfad ausgehend von Benzol über Cyclohexan zu Cyclohexanol führt, wäre eine alternative Syntheseroute ausgehend von Lignin als Biomasse über Phenol zu Cyclohexanol als bisherigen Startpunkt der enzymatischen  $\epsilon$ -Caprolacton-Synthese gemäß Abbildung 12 denkbar. Interessanterweise wurde beispielsweise in kürzlichen Publikationen der pyrolytische Abbau von Lignin aus Lärchenrinde im Fließbettreaktor unter Gewinnung eines Bio-Öls mit einem Anteil von 30% Phenol<sup>[2]</sup> sowie eine Mikrowellen-Pyrolyse von Lignin aus der Douglasie unter Erhalt eines Bio-Öls mit einem Anteil von fast 39% Phenol beschrieben.<sup>[3]</sup> Dieser publizierte Zugang zu Phenol aus einem nachhaltigen Rohstoff stellte wiederum für uns den Ausgangspunkt dar, uns mit der Phenol-Hydrierung und dem direkten Einsatz des hergestellten Cyclohexanols in der Biotransformation zu beschäftigen.



**Abbildung 12.** Rückintegration des Doppeloxidationsverfahrens zur Synthese von  $\epsilon$ -Caprolacton mit neuem Startpunkt Lignin bzw. Phenol.

Die Hydrierung von aromatischen Systemen ist in der Literatur auf vielfältige Weise mit den unterschiedlichsten Katalysatoren beschrieben. Heterogene Hydrierkatalysatoren zeichnen sich dabei durch eine gute Abtrennbarkeit vom Produkt und durch ein hohes Recycling-Potential aus. Diese Kriterien erfüllt grundsätzlich auch der von *Bhorali* und *Ganguli* beschriebene Hydrierkatalysator Rh(0)-SBA-15.<sup>[4]</sup> Der Katalysator Rh(0)-SBA-15 besteht aus Rhodium-Nanopartikeln, die in den Hohlräumen von mesoporösem Kieselgel eingebettet sind. Die Synthese des Katalysators erfolgte analog zur Literaturvorschrift durch Reduktion von Rhodium(III)-chlorid mit Natriumborhydrid in Anwesenheit des mesoporösen Kieselgels

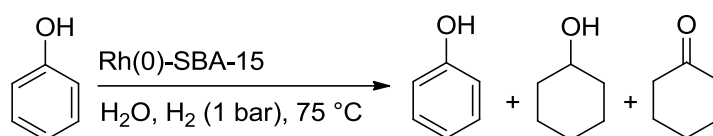
<sup>2</sup> X. Ren, J. Gou, W. Wang, Q. Li, J. Chang, B. Li, *BioResources* **2013**, *8*, 6481-6492.

<sup>3</sup> Q. Bu, H. Lei, S. Ren, L. Wang, J. Holladay, Q. Zhang, J. Tang, R. Ruan, *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 7004-7007.

<sup>4</sup> N. Bhorali, J. N. Ganguli, *Catal. Lett.* **2013**, *143*, 276-281.

SBA-15.<sup>[4]</sup> Anschließend wurden die Reaktionsbedingungen für eine selektive Hydrierung von Phenol zu Cyclohexanol unter Einsatz möglichst geringer Katalysatormenge optimiert (Tabelle 4). Die Reaktionen wurden in einem Schlenkcolben, verbunden mit einem Gas-Ballon als Wasserstoffquelle, durchgeführt. Ein 98%iger Umsatz zu Cyclohexanol wurde mit einer wässrigen 1M Phenol-Lösung und einer entsprechenden Menge des Katalysators, die 1 mol% des aktiven Rh(0) enthält, unter 1 bar Wasserstoff bei 75 °C Reaktionstemperatur und einer Reaktionszeit von 24 h erzielt. Dies entspricht einer katalytischen Produktivität von TON = 98. Durch Filtration der Produktmischung konnte der Katalysator zurückgewonnen und nach Trocknung erneut für den Hydrierprozess verwendet werden. Nach einem Recycling-Zyklus nahm der Umsatz zu Cyclohexanol mit 97% unwesentlich ab. Erst bei der dritten Wiederverwendung des recycelten Katalysators sank der Umsatz zu Cyclohexanol auf 24%.

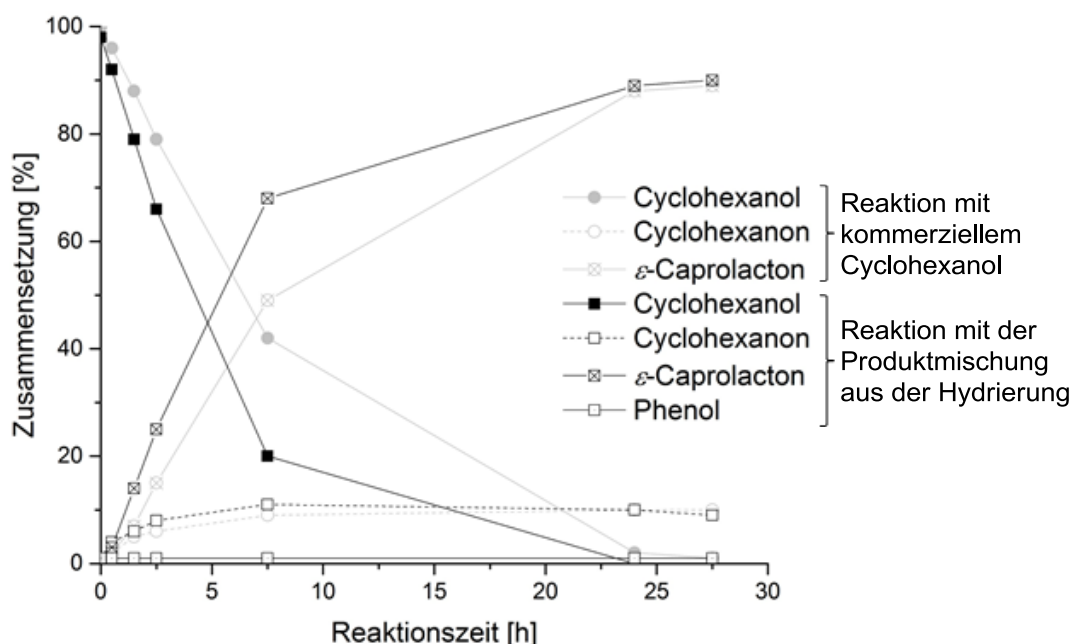
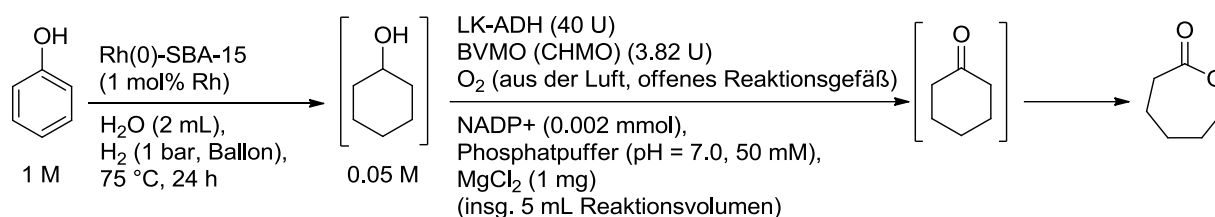
**Tabelle 4.** Hydrierung von Phenol mit dem heterogenen Katalysator Rh(0)-SBA-15.



Eintrag	c(Phenol) [M]	Rh-SBA-15 [mol% Rh]	Reaktionszeit [h]	$\omega$ (Phenol) [%]	$\omega$ (Cyclohexan- anon) [%]	$\omega$ (Cyclohex- anol) [%]
1	0.5	1.9	24	1	0	99
2	0.5	1.0	20	1	0	99
3	1.0	0.5	17	1	0	99
4	2.0	0.5	19	57	29	14
5	1.0	0.5	24	57	27	16
6	1.0	1.0	24	1	1	98
7	1.0	~ 1.0 (1xrecycelt)	24	1	2	97
8	1.0	~ 1.0 (2xrecycelt)	24	57	19	24

Nach der Optimierung der Reduktion von Phenol zu Cyclohexanol in Wasser mit dem Katalysator Rh(0)-SBA-15 wurde dieser Prozess mit der enzymatischen Doppeloxidationskaskade kombiniert, um die Kompatibilität der Biotransformation mit dem im Hydrierverfahren hergestellten Cyclohexanol als Rohprodukt (ohne Aufarbeitung / Isolierung) zu überprüfen (Abbildung 13). Dazu wurde zunächst die Hydrierung unter den optimierten Bedingungen durchgeführt. Der Katalysator wurde durch Filtration von der Reaktionsmischung abgetrennt, sodass eine wässrige Lösung von Cyclohexanol mit Spuren von Cyclohexanon und Phenol zurück blieb. Dieses Filtrat wurde durch Zugabe von Phosphatpuffer auf eine Pufferkonzentration von 50 mM und einem pH-Wert von 7 eingestellt. Die Biotransformation

wurde analog zu dem entwickelten Prozess mit einer Substratkonzentration von 50 mM durchgeführt. Der Vergleich der Biotransformation von Cyclohexanol aus der Hydrierung mit der parallel dazu durchgeführten Biotransformation von kommerziell erhaltenem Cyclohexanol zeigt ähnliche Ergebnisse (Abbildung 13). In beiden Fällen wurde nach einer Reaktionszeit von 24 h ein Umsatz von 90% bezogen auf die Bildung von  $\epsilon$ -Caprolacton erreicht (Cyclohexanon: ca. 10%). Weiterhin deuten die Ergebnisse darauf hin, dass eine Spur des nicht hydrierten Phenols (1%) offenbar keinen negativen Einfluss auf die Aktivität der Enzyme nimmt.



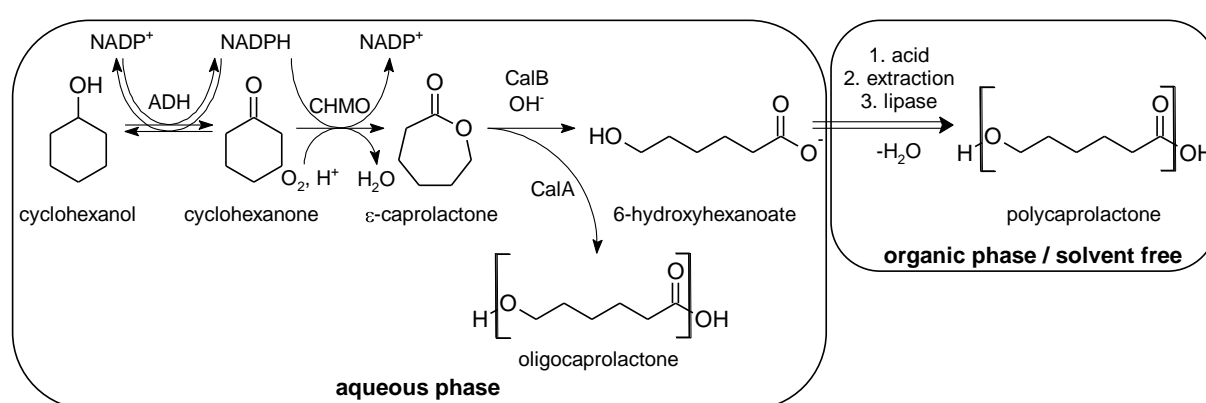
**Abbildung 13.** Kombination von Phenolhydrierung und Biotransformation zur Synthese von  $\epsilon$ -Caprolacton. Zusammensetzung der Reaktionsmischung (per GC bestimmt); grau: Messwerte der Reaktion mit kommerziell erhaltenem Cyclohexanol; schwarz: Messwerte der Reaktion mit Cyclohexanol aus der Hydrierung).

Dieses Experiment zeigt, dass die Rückintegration der  $\epsilon$ -Caprolacton-Synthese mit vorangestellter Phenol-Hydrierung keinen negativen Effekt auf die enzymatische Oxidationskaskade ausübt. Wenn auch die Integration des Lignin-Abbaus in die Syntheseroute zu  $\epsilon$ -Caprolacton noch zu zeigen ist, so konnte mit der erfolgreichen Kombination der beiden Prozesse – Aromaten-Reduktion und Doppeloxidation – im Hinblick auf einen zukünftigen alternativen Weg der heute petrochemisch hergestellten Chemikalien  $\epsilon$ -Caprolacton und dessen Polymer ausgehend von nachwachsender Biomasse ein „proof of concept“ nun bereits geleistet werden.

### 4.3. Technische Universität Hamburg-Harburg, Institut für Technische Biokatalyse, (Prof. Liese)

#### Zusammenfassung der Arbeiten

Die Arbeiten zum Projekt an der Technischen Universität Hamburg-Harburg am Institut für Technische Biokatalyse befassten sich mit der verfahrenstechnischen Umsetzung zur biotechnologischen Synthese von  $\epsilon$ -Caprolacton. Im Fokus stand dabei der Einsatz von freiem Enzym. Limitierungen, die sich aufgrund verschiedener Enzymeigenschaften ergeben sowie die Produktaufarbeitung sollen über verfahrenstechnische Konzepte überwunden und umgesetzt werden. Die enzymatische Synthese erfolgt in zwei konsekutiven Schritten (Abbildung 14). Im ersten Schritt wird mit Hilfe einer Alkoholdehydrogenase (ADH) Cyclohexanol zu Cyclohexanon oxidiert, welches durch eine Baeyer-Villiger-Monooxygenase (CHMO, BVMO) weiter zu  $\epsilon$ -Caprolacton umgesetzt wird. Für beide Reaktionsschritte ist ein Cofaktor notwendig, der während der kompletten Reaktion wieder regeneriert wird. Für den zweiten Oxidationsschritt ist zusätzlich Sauerstoff erforderlich, der dem System kontinuierlich zugeführt werden muss. Durch die Einführung eines dritten enzymatischen Schrittes erfolgt eine Hydrolyse von  $\epsilon$ -Caprolacton zu 6-Hydroxyhexansäure, katalysiert durch eine Lipase (CALB). Dieser Schritt ist notwendig, um im fortgeschrittenen Verlauf der Reaktionssequenz eine Produktinhibierung zu umgehen und damit wertvolle Enzymaktivität zu erhalten. Am Ende erfolgt die Extraktion von 6-Hydroxyhexansäure, welche mittels der wiedergewonnenen Lipase polymerisiert werden kann. Alternativ zur Hydrolyse wurde parallel der Ansatz zur *in situ* Polymerisierung in Wasser mittels einer anderen Lipase (CALA) im Arbeitskreis von Prof. Bornscheuer verfolgt. Hierzu konnten durch ergänzende Arbeiten und gegenseitigen Austausch zwei Publikationen angefertigt werden.



**Abbildung 14.** Reaktionsschema zur enzymatischen Reaktionssequenz von Cyclohexanol über  $\epsilon$ -Caprolacton zu Polycaprolacton.

## Enzymkinetik, Inhibierung und Deaktivierung

Die Wahl eines geeigneten Reaktorkonzeptes wird u. a. durch bestimmte Enzymeigenschaften wie Substrat-/Produktinhibierung, Stabilität und Substrataffinität (Michaelis-Menten-Konstante,  $K_M$ ) bestimmt. Durch Aktivitätsbestimmungen der einzelnen Enzyme unter variierenden Reaktionsbedingungen können jene Eigenschaften festgestellt und kinetische Konstanten bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden für die ADH und die detaillierte Messreihen zur Kinetik aufgenommen. Aus der Literatur war bereits bekannt, dass die CHMO ab bestimmten Substrat- und Produktkonzentrationen signifikant inhibiert wird. Die ADH ist in der Literatur als ein relativ robustes Enzym beschrieben und seither zur Reduktion eines breiten Spektrums an aliphatischen und aromatischen Ketonen eingesetzt worden. Mit Hilfe der Untersuchungen zur Kinetik der beiden Enzyme konnten die Erwartungen eingehend dargestellt und nötige Konstanten bestimmt sowie jeweilige Geschwindigkeitsgleichungen bestimmt werden (Tabelle 5). Dabei wurde für den ADH katalysierten Schritt eine reversible Doppel-Substrat-Kinetik angenommen. Für den zweiten BVMO-katalysierten Schritt wurde ebenfalls eine Doppel-Substrat-Kinetik eingesetzt, in der zusätzlich eine Substratüberschuss-Inhibierung und jeweils eine kompetitive Inhibierung seitens Cyclohexanol und  $\epsilon$ -Caprolacton berücksichtigt wurde.

$$v_{ADH}^{ox} = v_{max}^{ox} \cdot \frac{CHol}{K_M^{CHol} \cdot CHol} \cdot \frac{NADP^+}{K_M^{NADP^+} + NADP^+}$$

$$v_{ADH}^{red} = v_{max}^{red} \cdot \frac{CHon}{K_M^{CHon} \cdot CHon} \cdot \frac{NADPH}{K_M^{NADPH} + NADPH}$$

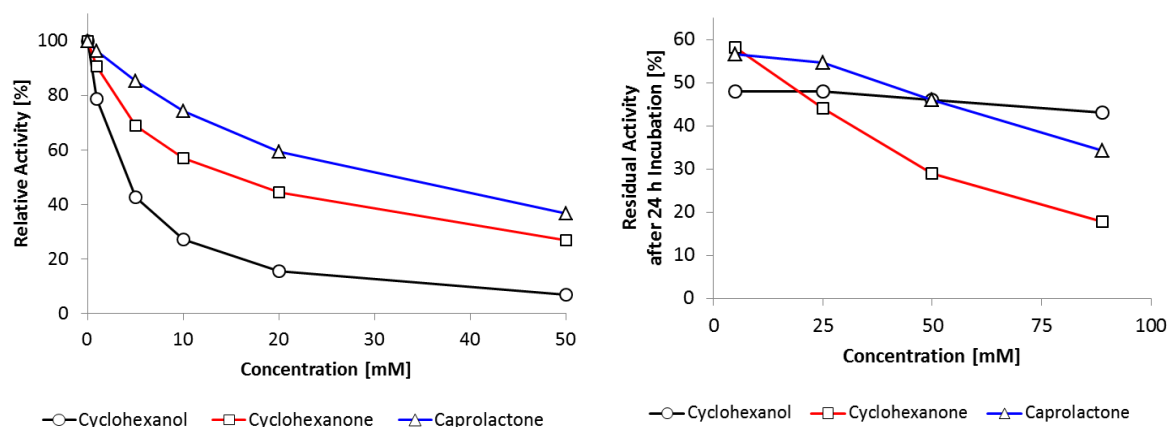
$$v_{BVMO} = v_{max}^{BVMO} \cdot \frac{CHon}{K_M^{CHon} + CHon \cdot \left(1 + \frac{CHon}{K_i^{CHon}}\right) \cdot \left(1 + \frac{CHol}{K_i^{CHol}}\right) \cdot \left(1 + \frac{ECL}{K_i^{ECL}}\right)} \cdot \frac{NADPH}{K_M^{NADPH} + NADPH}$$

**Tabelle 5.** Kinetische Konstanten.

Verbindung	Alkoholdehydrogenase (ADH)	Cyclohexanon-Monooxygenase (CHMO)	
	Michaelis-Menten-Konstante ( $K_M$ )	Michaelis-Menten-Konstante ( $K_M$ )	Inhibierungskonstante ( $K_i$ )
Cyclohexanol (CHol)	10.1 ± 0.9 mM	-	8.0 ± 0.4 mM
Cyclohexanon (CHon)	3.6 ± 0.4 mM	0.003 ± 0.001 mM	34.8 ± 7.9 mM
$\epsilon$ -Caprolacton (ECL)	-	-	442 ± 49 mM
NADP <sup>+</sup>	0.051 ± 0.003 mM	-	-
NADPH	0.09 ± 0.01 mM	0.006 ± 0.001 mM	-

Um die jeweilige Inhibierung auf die BVMO zu verdeutlichen ist in Abbildung 15 die Abnahme der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der einzelnen Verbindungen dargestellt. Da Cyclohexanon im Reaktionssystem lediglich als Zwischenprodukt in geringeren Konzentrationen vorliegt, ist diese Inhibierung zu vernachlässigen. Zudem begünstigt der sehr niedrige  $K_M$ -Wert für Cyclohexanon die Reaktion zu  $\epsilon$ -Caprolacton. Das bedeutet, dass die CHMO schon bei einer geringen Konzentration von Cyclohexanon eine hohe Affinität hat und einen Enzym-Substrat-Komplex bildet.



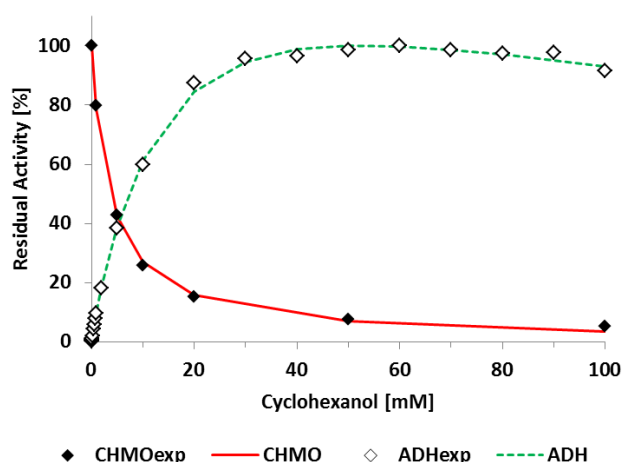


**Abbildung 15.** Inhibierung (*links*) und Deaktivierung (*rechts*) der CHMO durch Cyclohexanol, Cyclohexanon und  $\epsilon$ -Caprolacton. 0.2 mM NADPH, 1 mM Cyclohexanon, 25 °C, pH 8.

Cyclohexanol, das zur Synthese von  $\epsilon$ -Caprolacton als Ausgangsverbindung eingesetzt werden soll, wirkt auf die CHMO stark inhibierend. Des Weiteren stellt  $\epsilon$ -Caprolacton einen weiteren Inhibitor dar, dessen auf die CHMO-Aktivität hemmende Wirkung jedoch geringer ist als die durch Cyclohexanol. Für die drei an der Reaktion teilnehmenden Verbindungen wurde ebenfalls die deaktivierende Wirkung untersucht. Dabei hat sich herausgestellt, dass Cyclohexanol nicht deaktivierend auf die CHMO wirkt. Cyclohexanon hat mit steigender Konzentration den höchsten deaktivierenden Effekt. Da Cyclohexanon als Zwischenprodukt in geringer Konzentration während des Prozesses entsteht, kann die Deaktivierung vernachlässigt werden. Eine Deaktivierung durch das Produkt  $\epsilon$ -Caprolacton wirkt sich innerhalb von 24 h Inkubation erst ab einer Konzentration von 50 mM signifikant aus. Nach 24 h Inkubation der CHMO in Phosphatpuffer (100 mM, pH 8.0) bei 25 °C ohne weitere Zusätze ist eine Restaktivität von 60-70 % zu erwarten. Durch die Erstellung von Mutantenbibliotheken konnte im Arbeitskreis von Prof. Bornscheuer eine stabilere CHMO-Variante generiert werden, welche für weitere Untersuchungen eingesetzt wurde.

Für die ADH wurde im Gegensatz zur CHMO keine vergleichbare Inhibierung oder Deaktivierung festgestellt. Der Vergleich der beiden Enzyme macht deutlich, dass gegensätzliche Kinetiken vorliegen (Abbildung 16). Hohe Konzentrationen an Cyclohexanol steigern die ADH-Aktivität, wobei die höchste Aktivität im Bereich von 60 mM liegt. Die CHMO wird bereits bei niedrigen Konzentrationen an Cyclohexanol stark inhibiert. Die ADH katalysiert sowohl die Oxidation von Cyclohexanol zu Cyclohexanon als auch die Reduktion in die entgegengesetzte Richtung. Da die reversible ADH-Reaktion über das chemische Gleichgewicht reguliert werden kann und die zweite Oxidation zu  $\epsilon$ -Caprolacton irreversibel ist, wird das Gleichgewicht in Richtung des Produktes verschoben. Die Reduktion sollte daher kaum Einfluss auf die Reaktionsfolge haben, da keine Akkumulation von Cyclohexanon als Zwischenprodukt stattfindet.

Die Bestimmung der kinetischen Konstanten ist nicht allein für die Einordnung in ein geeignetes Reaktorkonzept von Vorteil, sondern dient auch der Erstellung eines Modells zur Computersimulation, das im weiteren Verlauf der Arbeiten realisiert werden soll.



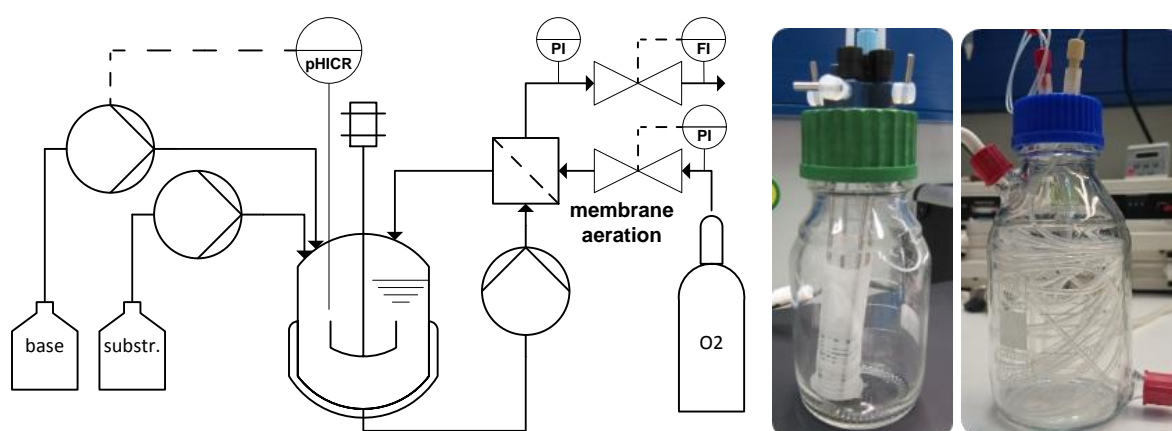
**Abbildung 16.** Gegenüberstellung der kinetischen Daten der beiden Enzyme CHMO und ADH.

### Prozessentwicklung und Reaktorkonzept

Aus den Untersuchungen der Kinetik ergibt sich ein Prozessfenster, in dem Limitierungen hinsichtlich Substrat- und Produktinhibierung zu überwinden sind. Grundsätzlich ist die Akkumulationen von Cyclohexanol als Substrat und  $\epsilon$ -Caprolacton als Produkt einzuschränken. Das bedeutet, dass ein herkömmlicher Satzreaktor (*Batch*), bei dem eine definierte Menge einer Verbindung im Reaktor vorgelegt und schließlich zum Produkt umgesetzt wird, nicht zu empfehlen, da eine hohe Konzentration an Cyclohexanol die CHMO-Aktivität stark beeinträchtigt. Um dennoch hohe Aktivitäten erzielen zu können, müsste die Menge an CHMO um ein Vielfaches erhöht werden, was die Wirtschaftlichkeit des Konzepts beeinträchtigt. Die elegantere Methode ist das Zulaufverfahren (*Fed-Batch*), das sich dann anbietet, wenn es darum geht, die Konzentration einer umzusetzenden Ausgangsverbindung im Reaktor niedrig zu halten. Dadurch kann die Substratinhibierung umgangen werden. Des Weiteren wird im *Fed-Batch* dem Verlust an flüchtigen Verbindungen entgegengewirkt, da sie unmittelbar umgesetzt werden.

In Abbildung 17 ist der experimentelle Aufbau des Prozesses in Form eines Fließschemas dargestellt. Die Reaktionslösung, in der die Biokatalysatoren gelöst in Puffer vorliegen, wird mit einer Pumpe aus dem Reaktor durch ein Begasungsmodul wieder zurück in den Reaktor gepumpt. In diesem Kreislauf soll die Sauerstoffversorgung sichergestellt und die Konzentration in einer Durchflusszelle gemessen werden. Hierbei wird eine Membranbegasung in Form eines gaspermeablen Silikonschlauches eingesetzt, der sich in einem mit  $O_2$  begasten Gefäß

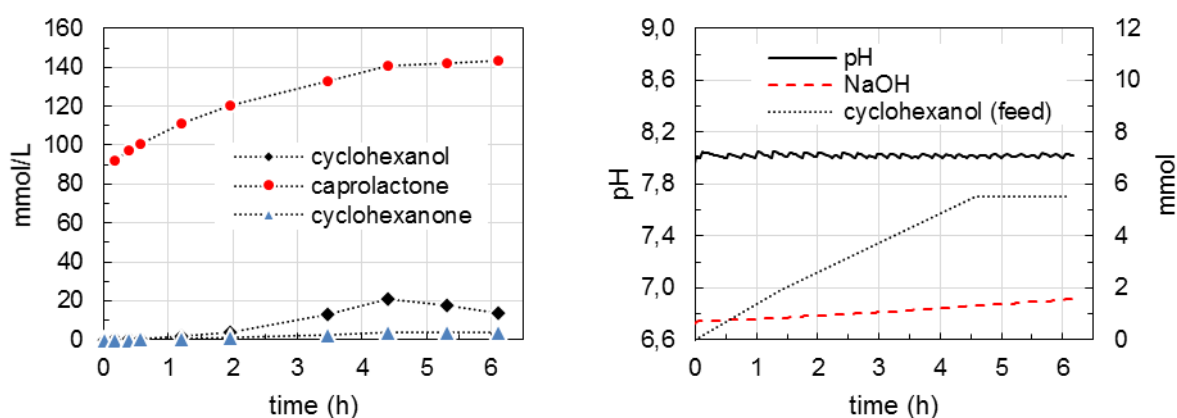
befindet. Auf diese Weise wird eine Schaumbildung und Enzymschädigung wie sie durch Blasenbegasung eintritt vermieden.  $O_2$  fungiert in dem Prozess als zentrales Oxidationsmittel und ist für die Produktbildung durch die CHMO essentiell. Über eine zweite Pumpe wird das Substrat unverdünnt als Reinstoff über eine feine Kapillare in den Reaktor gefördert. Dies hat den großen Vorteil, dass eine Verdünnung der Reaktionslösung auf ein Minimum reduziert wird und damit keine weitere Verdünnung der Katalysatoren stattfindet. Durch Variation des Volumenstroms kann die Substratzufuhr der Enzymaktivität im Reaktor angepasst werden. Der pH wird während der Reaktion durch die Zufuhr von NaOH konstant gehalten. Dies ist notwendig, da eine Autohydrolyse von  $\epsilon$ -Caprolacton stattfindet und die Aktivität der Enzyme stark pH abhängig ist.



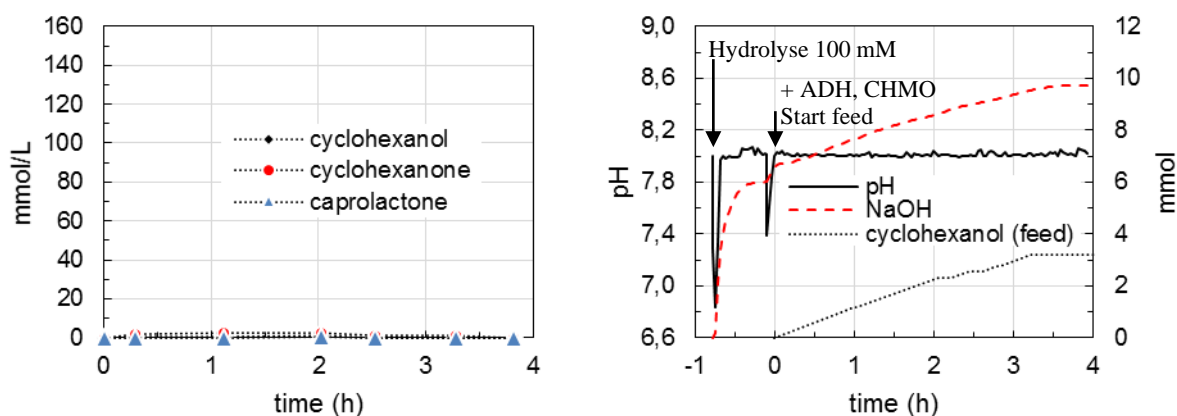
**Abbildung 17.** Fließschema zur Doppeloxidation von Cyclohexanol zu  $\epsilon$ -Caprolacton im *Fed-Batch* und eingesetzte Begasungseinheiten.

Um die Inhibierung durch  $\epsilon$ -Caprolacton zu überwinden, wurde eine Lipase eingesetzt, die den cyclischen Ester komplett zu 6-Hydroxyhexansäure hydrolysiert. Vergleicht man einen *Fed-Batch*, in dem bereits ca. 100 mM  $\epsilon$ -Caprolacton vorliegen, akkumuliert das zugeführte Cyclohexanol nach einer gewissen Zeit in Folge der Produktinhibierung. Die Akkumulation von Cyclohexanol inhibiert zudem verstärkt, wodurch der Prozess allmählich zum Erliegen kommt (Abbildung 18).

Im Gegensatz dazu verläuft die Reaktion, bei der 100 mM 6-Hydroxyhexansäure als Hydrolyseprodukt vorliegt, mit ähnlicher Substratzufuhr konsequent weiter, ohne, dass eine Akkumulation des Substrates zu beobachten ist (Abbildung 19). Die Hydrolyse kann während des Versuchs über die Titration verfolgt werden. Dabei korreliert im Versuch mit Lipase die Menge an zugeführtem Substrat mit der titrierten Menge an NaOH überein.



**Abbildung 18.** Fed-batch ohne Lipase und mit erhöhter Konzentration an  $\epsilon$ -Caprolacton zu Beginn zur Verdeutlichung der Produktinhibierung. 60 ml, 60 U CHMO, 66 U ADH, 5 mM  $MgCl_2$ , 0.2 mM  $NADP^+$ , 5.68 mmol ECL, 19-23  $\mu\text{mol}/\text{min}$  Cyclohexanol, Titration mit 5 N NaOH, pH 8, 25 °C.



**Abbildung 19.** Fed-batch mit Lipase und erhöhter Konzentration an 6-Hydroxyhexansäure als Hydrolyseprodukt von  $\epsilon$ -Caprolacton. Mittels Hydrolyse findet keine Produktinhibierung statt und es kann eine höhere Produktkonzentration erreicht werden. 60 ml, 60 U CHMO, 66 U ADH, 1.6 g CALB, 5 mM  $MgCl_2$ , 0.2 mM  $NADP^+$ , 5.68 mmol ECL, 19-23  $\mu\text{mol}/\text{min}$  Cyclohexanol, Titration mit 5 N NaOH, pH 8, 25 °C.

Durch den Einsatz der Lipase, die  $\epsilon$ -Caprolacton *in situ* hydrolysiert, konnte gezeigt werden, dass damit höhere Produktkonzentrationen erzielt werden können. Der Vergleich eines einfachen Batch mit einem Fed-Batch mit und ohne Lipase macht ebenfalls deutlich, dass der Prozess hinsichtlich Produktkonzentration, Umsatz, Enzymverbrauch (Units pro g Enzym) sowie Nutzbarkeit des Cofaktors (*turn over number*, TON, mol Cofaktor pro mol Produkt) bzgl. der Reaktionszeit gesteigert werden konnte (Tabelle 6). Sofern eine Vergrößerung des Maßstabs stattgefunden hat, so dass eine entsprechende Menge an Produkt hergestellt werden kann, soll dies auch bei Enzymicals umgesetzt werden.

**Tabelle 6.** Vergleich von Batch und Fed-Batch ohne Lipase und Fed-Batch mit Lipase. Alle Ansätze wurden bis auf die Substratzugabe in gleicher Weise durchgeführt.

	Batch (ohne Lipase)	Fed-Batch (ohne Lipase)	Fed-Batch (mit Lipase)
Zeit	2 h	22 h	20 h
TON <sub>NADP</sub>	64	504	748
U <sub>CHMO/gCL</sub>	305	44	29
U <sub>ADH/gCL</sub>	336	48	32
Endumsatz	>99 %	44 %	99 %
Endkonz. Produkt	29 mM	187 mM	283 mM

### Produktisolierung und Polymerisation

Am Ende muss 6-Hydroxyhexansäure aus dem wässrigen Reaktionsansatz isoliert werden. Dies konnte erfolgreich mittels organischer Lösungsmittelextraktion mit Methyl-*tert*-butylether (MTBE) umgesetzt werden. Dazu wurde der Ansatz zunächst angesäuert und dann 3- bis 4-mal zu gleichen Volumenanteilen im Scheidetrichter extrahiert. Unter reduziertem Druck wurde das Extraktionsmittel entfernt, wodurch ein gelber zähflüssiger Rückstand gewonnen wurde (Abbildung 20). Dieser Rückstand konnte anschließend lösungsmittelfrei mittels CALB bei 70 °C erfolgreich polymerisiert werden. Zur Darstellung eines anwendungsorientierten Endproduktes wurde eine präparative CALB katalysierte Polymerisation von  $\epsilon$ -Caprolacton basierend auf den Kenntnissen der Literatur erfolgreich durchgeführt.



**Abbildung 20.** Isolierte 6-Hydroxyhexansäure hergestellt aus Cyclohexanol über die lineare Enzymkaskade nach Entfernung des Extraktionsmittels (links). Polymerisierter Rückstand (rechts).

Das im Vergleich von Polymaterials chemisch polymerisierte Produkt wies dabei eine ähnliche Molekulargewichtsverteilung auf. Aus dem erhaltenen Material der chemischen und enzymatischen Polymerisation wurden bei Polymaterials Zugstäbe hergestellt (Abbildung 21), deren Materialeigenschaften an der TUHH mittels einer technischen Belastungsuntersuchung verglichen werden sollen. Dies erfolgt in naher Zukunft, sobald entsprechende Mengen für Zugstäbe aus der gesamten Kaskade gewonnen und ein *Scale-up* erfolgreich umgesetzt werden konnte.



**Abbildung 21.** Polycaprolacton im präparativen Maßstab und daraus hergestellte Zugstäbe. Die Polymerisation von  $\epsilon$ -Caprolacton erfolgte enzymatisch.

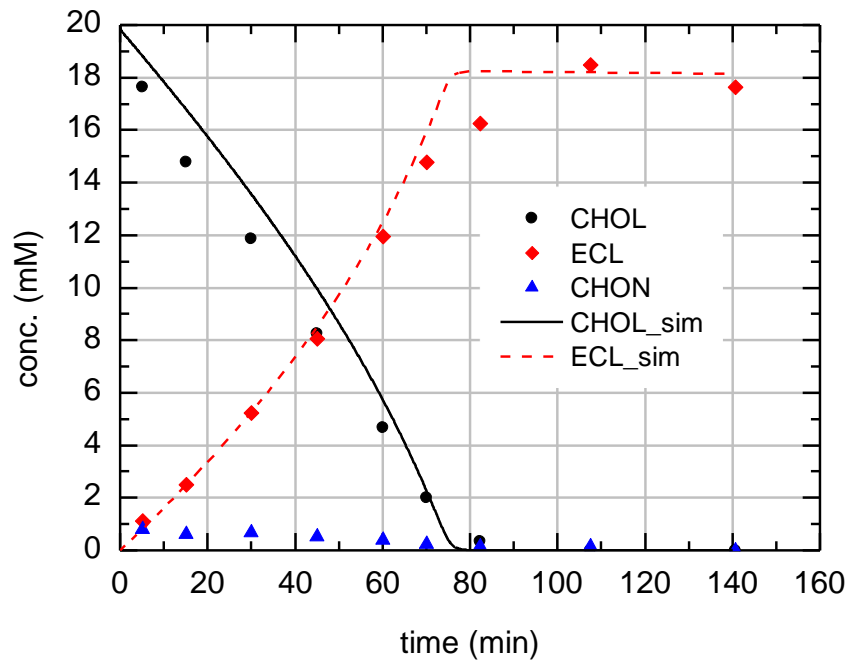
Die Produktisolierung kann im größeren Maßstab über eine kontinuierliche Extraktion im Gegenstromprinzip durchgeführt werden wie sie bereits im Arbeitskreis von Prof. Kragl eingesetzt wurde.

### Computer-Simulation

Mit Hilfe der kinetischen Parameter, die eingangs bestimmt wurden, ist es möglich geeignete Differentialgleichungen zu formulieren und diese mittels einer Software lösen zu lassen. Für den aktuellen Prozess wurden entsprechend der einzelnen Reaktionsschritte jeweilige Reaktionsgeschwindigkeitsgleichungen aufgestellt und miteinander verknüpft. Mit dem daraus resultierenden kinetischen Modell können Versuche und Konzentrationsverläufe simuliert und Reaktionsverläufe vorausgesagt werden (Abbildung 22).

Die Simulation macht es schließlich möglich, den Prozess besser steuern und jeweilige Parameter wie Substratzufuhr oder Enzymaktivität zu einem bestimmten Zeitpunkt variieren zu können und erlaubt es bestimmte Szenarien prinzipiell vorherzusagen. Dadurch können Limitierungen des Systems ohne experimentelle Versuche untersucht werden. Mit der Software

MATLAB konnte ein kinetisches Modell erstellt und erfolgreich mit experimentellen Daten abgeglichen werden. Damit konnte gezeigt werden, dass das Reaktionssystem mit seinen konstanten beschrieben werden kann.

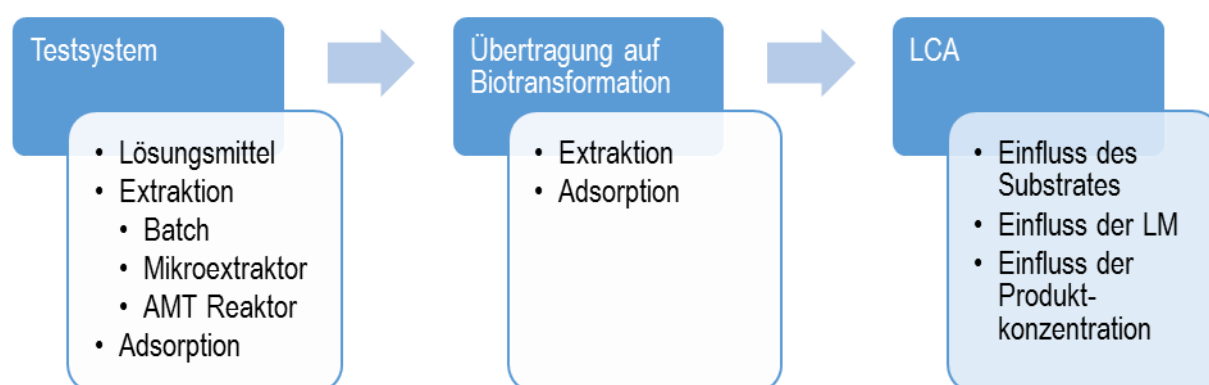


**Abbildung 22.** Vergleich experimenteller Daten mit Computer-Simulation. 50 ml Phosphatpuffer (100 mM, pH 8), 0.5 U/ml CHMO, 0.55 U/ml ADH, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM NADP<sup>+</sup>, 20 mM Cyclohexanol, pH kontrolliert und konstant gehalten mit NaOH (1 N).

#### 4.4. Universität Rostock, Institut für Chemie, Technische Chemie (Prof. Kragl)

##### Einleitung und Kurzbeschreibung der Zielsetzung der Arbeiten

Im Rahmen des Projektes wurden an der Universität Rostock geeignete Verfahren für das Downstream Processing von  $\epsilon$ -Caprolacton entwickelt und optimiert. Die Biotransformation erfolgt üblicherweise im wässrigen Medium, sodass eine Destillation bzw. Rektifikation hinsichtlich energieschonender Prozessführung ausgeschlossen wurde. Als Trennverfahren wurden die Flüssig-flüssig-Extraktion und die Adsorption untersucht.



**Abbildung 23.** Arbeitspakete der Universität Rostock im Überblick

Da  $\epsilon$ -Caprolacton sehr gut in Wasser löslich ist, erfolgte zunächst das Lösungsmittel-Screening für die Extraktion im Testsystem. Anschließend wurde das Verfahren mit geeigneten Lösungsmitteln in verschiedenen Extraktoren optimiert. Für die Adsorption als mögliche Alternative wurden ebenfalls verschiedene Adsorberharze getestet. Nach der Parameteroptimierung erfolgte die Produktisolierung in der Biotransformation. Es konnte gezeigt werden, dass auch die Extraktion der Fermentationslösung mit Ethylacetat ähnliche Ergebnisse erzielte, trotz eines möglichen Einflusses von Puffersalzen, Co-Substraten und Biokatalysator. Jedoch ist die geringe Produktkonzentration aufgrund des geringen Umsatzes für reproduzierbare Ergebnisse problematisch. Im dritten Arbeitspaket sollte abschließend ein ökologischer Vergleich (LCA) zum bestehenden chemischen Prozess erfolgen.

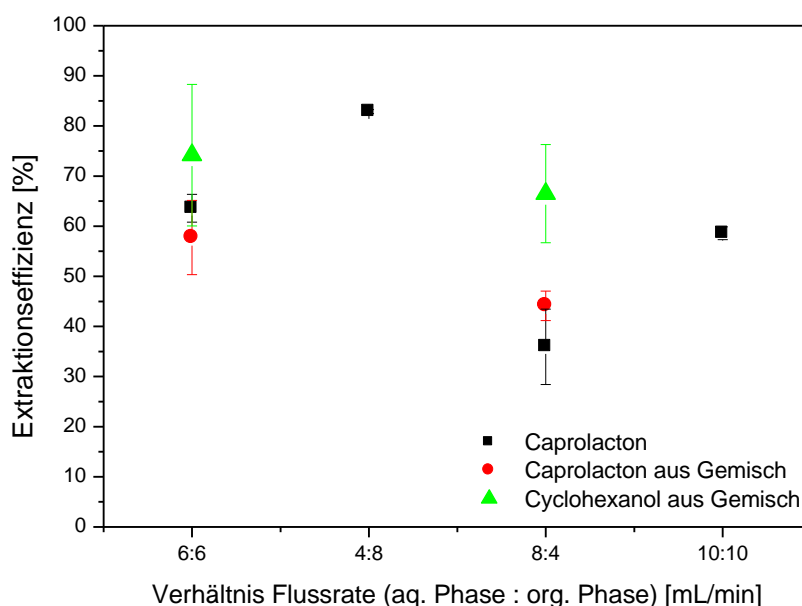
##### Aufarbeitungsstrategie I: Extraktion

In Vorarbeiten konnten bereits verschiedene organische Lösungsmittel für die Extraktion von  $\epsilon$ -Caprolacton getestet werden, wobei chlorierte Kohlenwasserstoffe die besten Verteilungskoeffizienten zeigten hinsichtlich ihrer Kapazität das Produkt zu lösen. Aufgrund ihrer Umweltschädlichkeit wurden sie jedoch nicht weiter berücksichtigt. Mit Hilfe von COSMO-RS-Rechnungen wurde ein breites Spektrum zusätzlicher Lösungsmittel abgedeckt, um geeignete Kandidaten zu identifizieren. Auch die Möglichkeit Tenside hinzuzugeben, wurde in Betracht gezogen, jedoch



verschlechterten sich die Extraktionseigenschaften. Als Kompromiss aus Umweltverträglichkeit, Verteilungskoeffizient und Kosten zeigte sich Ethylacetat als beste Alternative.

Für die Optimierung der Extraktion wurde zunächst von 100 % Umsatz von Cyclohexanol zum  $\epsilon$ -Caprolacton ausgegangen. Für das Testsystem Wasser ( $\epsilon$ -Caprolacton)/ Ethylacetat wurden verschiedene Phasenverhältnisse und Volumenströme im einstufigen Mikromischer-Settler-System gewählt (Abbildung 24).



**Abbildung 24.** Extraktion von Caprolacton bzw. Cyclohexanol und Caprolacton aus Wasser mit Ethylacetat

Bei einem Verhältnis von wässriger zu organischer Phase von 1:1 wurden 64%  $\epsilon$ -Caprolacton extrahiert. Die Extraktionseffizienz konnte durch Überschuss an Lösungsmittel auf 83 % gesteigert werden. Unter Berücksichtigung eines minimalen Lösungsmiteleinsatzes wurde die Extraktion mit Ethylacetat im Unterschuss durchgeführt, wobei 35%  $\epsilon$ -Caprolacton isoliert wurde. Die Flussrate der Phasen hatte auf die Extraktionseffizienz keinen Einfluss. Bei unvollständiger Umsetzung wird die Aufarbeitung durch die Anwesenheit von Cyclohexanol erschwert. Ausgehend von einem Umsatz von 50% wurde als Testsystem Wasser (Cyclohexanol,  $\epsilon$ -Caprolacton) / Ethylacetat untersucht (Abbildung 24).

Die Extraktionseffizienz blieb für  $\epsilon$ -Caprolacton bei gegebenen Parametern konstant, jedoch konnte mit Ethylacetat keine selektive Trennung vom Cyclohexanol erfolgen, da dieses eine noch größere Affinität zum Lösungsmittel aufwies. An dieser Stelle ist momentan ein zusätzlicher destillativer Schritt zur Trennung von Edukt und Produkt unumgänglich. Durch eine

zweistufige Gleichstromextraktion konnte die Extraktionseffizienz von  $\epsilon$ -Caprolacton von 63% auf 85% gesteigert werden, wobei die Extraktion auf der zweiten Stufe mit Lösungsmittel im Unterschuss erfolgte. Diese Variante ist ressourcenschonender bezüglich des Lösungsmittels verglichen mit der einstufigen Extraktion im Verhältnis 1:2.

Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Extraktion einer Biotransformationslösung mit Ethylacetat ähnliche Ergebnisse ergibt. Beim Vorliegen von Biotransformationslösungen mit höheren Produktkonzentrationen sollen auch diese zukünftig untersucht werden.

### Aufarbeitungsstrategie //I: Adsorption

Im zweiten Arbeitspaket wurde der adsorptive Prozess als Trennungsmöglichkeit von Cyclohexanol und  $\epsilon$ -Caprolacton aus der wässrigen Phase bzw. Reaktionslösung bei geringem und hohem Volumen-Adsorber-Verhältnis untersucht, wobei drei verschiedene Adsorber bei zwei Konzentrationsverhältnissen getestet wurden: Lewatit, Dowex Optipore® und Sepabeads™. Da die höchste Produktkonzentration der Biotransformationen bislang bei 60 mM Cyclohexanol lag, wurde für das Testsystem 60 mM Cyclohexanol und 100 mM Caprolacton eingesetzt und für 30 min mit jeweils 0.5 g Adsorber in 4 mL bzw. 20 mL-Vials inkubiert (Tabelle 7).

**Tabelle 7.** Übersicht zur Adsorption von 60 mM Cyclohexanol und 100 mM  $\epsilon$ -Caprolacton

Adsorber	Cyclohexanol			$\epsilon$ -Caprolacton	
	Volumen [mL]	Beladung [g/ g <sub>Adsorber</sub> ]	Adsorbierter Anteil [%]	Beladung [g/ g <sub>Adsorber</sub> ]	Adsorbierter Anteil [%]
Lewatit®	4	0.037	75.2	0.054	59.7
	20	0.086	31.7	0.075	16.1
Optipore®	4	0.044	86.4	0.072	78.2
	20	0.112	44.1	0.128	27.6
Sepabeads™	4	0.043	86.3	0.064	69.9
	20	0.118	46.2	0.110	23.6

Wird die Eduktkonzentration erhöht, so zeigen die derzeitigen Ergebnisse, dass die Enzymaktivität stark abnimmt. Um dem entgegenzuwirken, kann der Adsorber in die Reaktionslösung eingebracht werden, um die Konzentration an Substrat in Lösung z.B. bei 60 mM zu halten, und durch das Gleichgewicht von Lösung und Adsorber neues Substrat zur Verfügung zu stellen. Tabelle 8 zeigt die Resultate für die Adsorption von 100 mM Cyclohexanol und 60 mM  $\epsilon$ -Caprolacton.

**Tabelle 8.** Übersicht zur Adsorption von 100 mM Cyclohexanol und 60 mM  $\epsilon$ -Caprolacton

Adsorber	Cyclohexanol			$\epsilon$ -Caprolacton	
	Volumen [mL]	Beladung [g/ g <sub>Adsorber</sub> ]	Adsorbierter Anteil [%]	Beladung [g/ g <sub>Adsorber</sub> ]	Adsorbierter Anteil [%]
Lewatit®	4	0.057	75.5	0.034	57.8
	20	0.087	22.8	0.051	17.0
Optipore®	4	0.066	87.3	0.045	75.6
	20	0.145	37.8	0.082	27.2
Sepabeads™	4	0.063	84.1	0.041	69.6
	20	0.146	38.0	0.074	24.4

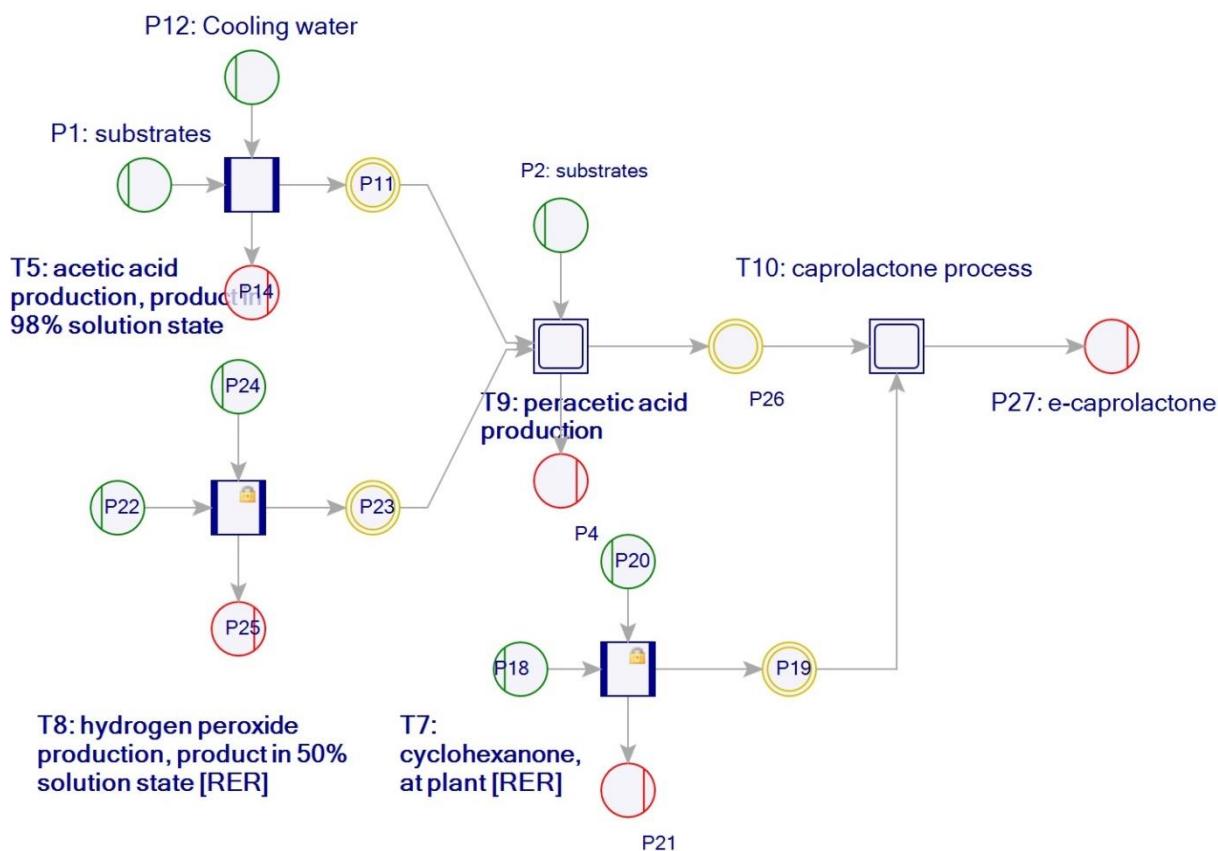
Die Ergebnisse zeigen, dass Dowex® Optipore® und Sepabeads™ sowohl Cyclohexanol als auch  $\epsilon$ -Caprolacton adsorbieren. Bei einem kleinen Volumen und dementsprechend kleiner Stoffmenge in Lösung ist es möglich, über 80 % des Eduktes zu adsorbieren. Bei Erhöhung des Volumen-Adsorber-Verhältnisses erreicht die Beladung ( $>0.1 \text{ g} / \text{g}_{\text{Adsorber}}$ ) den Sättigungsbereich und es werden nur knapp 40% Cyclohexanol bzw. ca. 25%  $\epsilon$ -Caprolacton adsorbiert.

Das Konzentrationsverhältnis von Edukt und Produkt hat keinen Einfluss auf den prozentualen, adsorbierten Anteil. Die Rückgewinnung der Komponenten erfolgte durch Extraktion mit Ethylacetat. Auch beim Adsorptionsprozess zeigt das Cyclohexanol analog zur Extraktion eine höhere Affinität zum Adsorber. Mit den getesteten Adsorberharzen ist eine selektive Trennung von Cyclohexanol und  $\epsilon$ -Caprolacton derzeit nicht möglich. Die Konzentration an  $\epsilon$ -Caprolacton in den Reaktionslösungen lag bislang bei lediglich 4.6 mM bzw. 7.9 mM. Ausgehend von einer Menge von 0.5 g des Adsorbers Lewatit® konnten 89% des Produktes aus 4 mL der Lösung adsorbiert werden.

### Ökobilanzierung

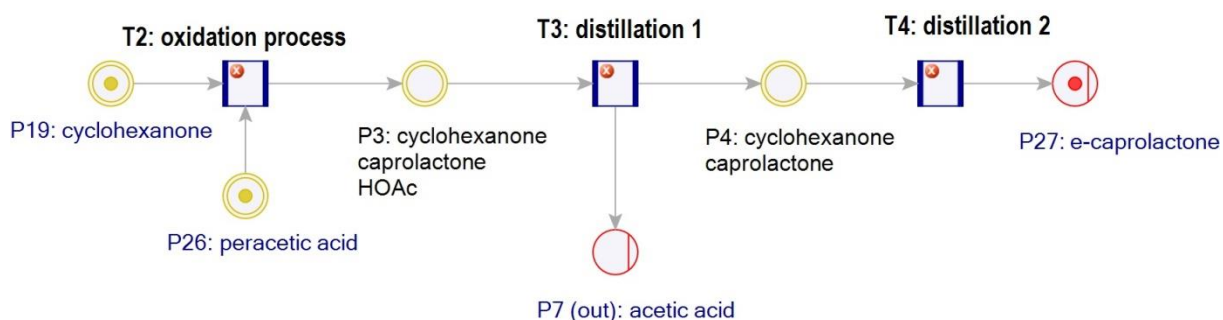
Mit Hilfe der Software Umberto NXT LCA wurde das chemische Verfahren basierend auf der Patentschrift DE 1258858 der Degussa abgebildet. Zur Dokumentation fließen hier Parameter wie Zusammensetzung im Reaktor, Kühlwasser, thermische und elektrische Energie ein. Die Datenbank verfügt nur über eine begrenzte Anzahl an Datensätzen für die Herstellung von Chemikalien, z.B. kann bei der Betrachtung für die chemische Route auf die Produktion von Cyclohexanon (T7), Wasserstoffperoxid (T8) und Essigsäure (T5) zurückgegriffen werden. Nur wenn wirklich die Datensätze im Programm implementiert sind, sind LCIA Berechnungen (Life Cycle Inventory Analysis) für verschiedene Wirkungskategorien möglich. Eine Neueinpflege von Materialien wie z.B.  $\epsilon$ -Caprolacton wird hinsichtlich der Wirkungskategorien nicht berücksichtigt. Es sollte ein Update des Programms der Firma ifu GmbH geben, in dem aufgrund der Struktur

der chemischen Verbindung Abschätzungen für die Ökobilanz getroffen werden können. Dies konnte jedoch nicht im Projektzeitraum realisiert werden.



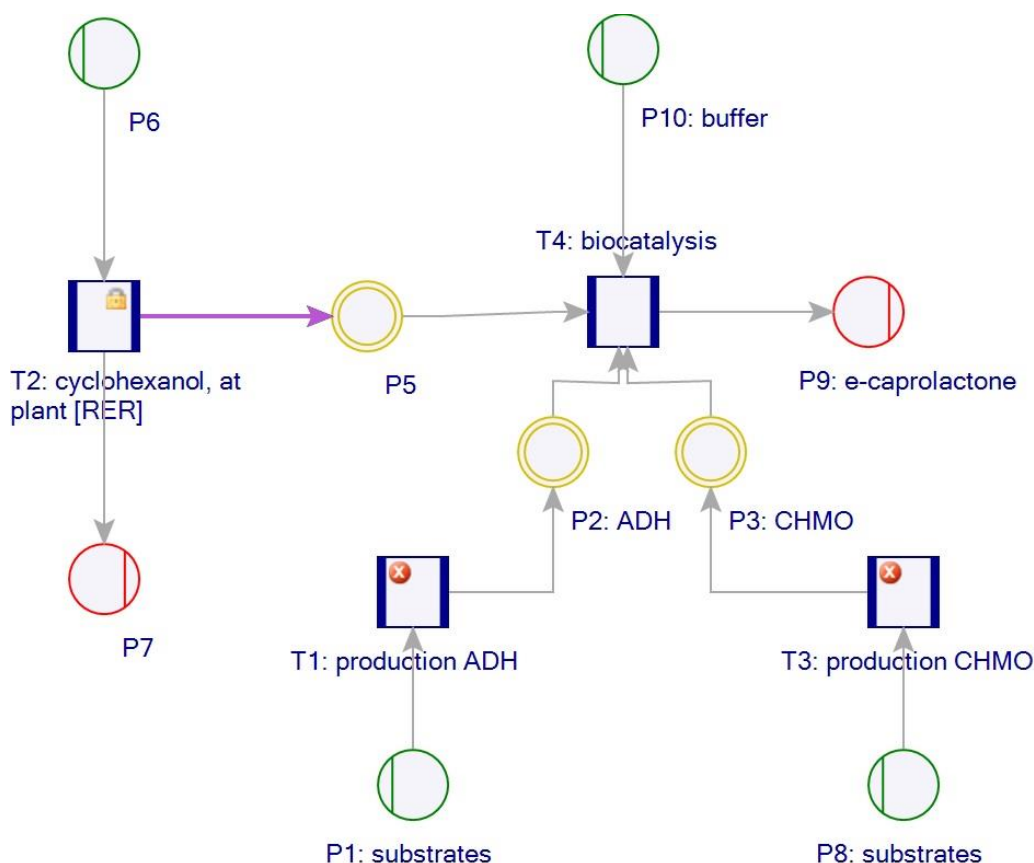
**Abbildung 15.** Verfahrensfließbild für die klassische Synthese von ε-Caprolacton mit Umberto NXT LCA

Die tatsächliche Oxidation zum Caprolacton wurde im Subnetz (T10) beschrieben. Die Berechnung ist noch nicht abgeschlossen, da sie sehr komplex ist. Zum einen muss der Mittelweg aus den verschiedenen Patentschriften gefunden werden. Das Patent DE 1258858 beschreibt nur die Umsetzung im kleinen Rohrreaktor, jedoch nicht das großtechnische Verfahren. Um die Energieeinträge mit der Software abbilden zu können, muss parallel der Energiebedarf für Destillationskolonnen, Pumpen und Wärmetauscher berechnet werden.



**Abbildung 26.** Subnetz für die Oxidation von Cyclohexanon zu Caprolacton

Der biotechnologische Prozess (Abbildung 27) unterteilt sich in die Bereitstellung des Substrats Cyclohexanol (T2), die Gewinnung der ADH (T1) und CHMO (T3) sowie die Biokatalyse (T4). Am Ende wird eine Fermentationslösung mit dem Produkt  $\epsilon$ -Caprolacton (P9) erhalten, die durch Extraktion (Abbildung 28) aufgearbeitet wird.

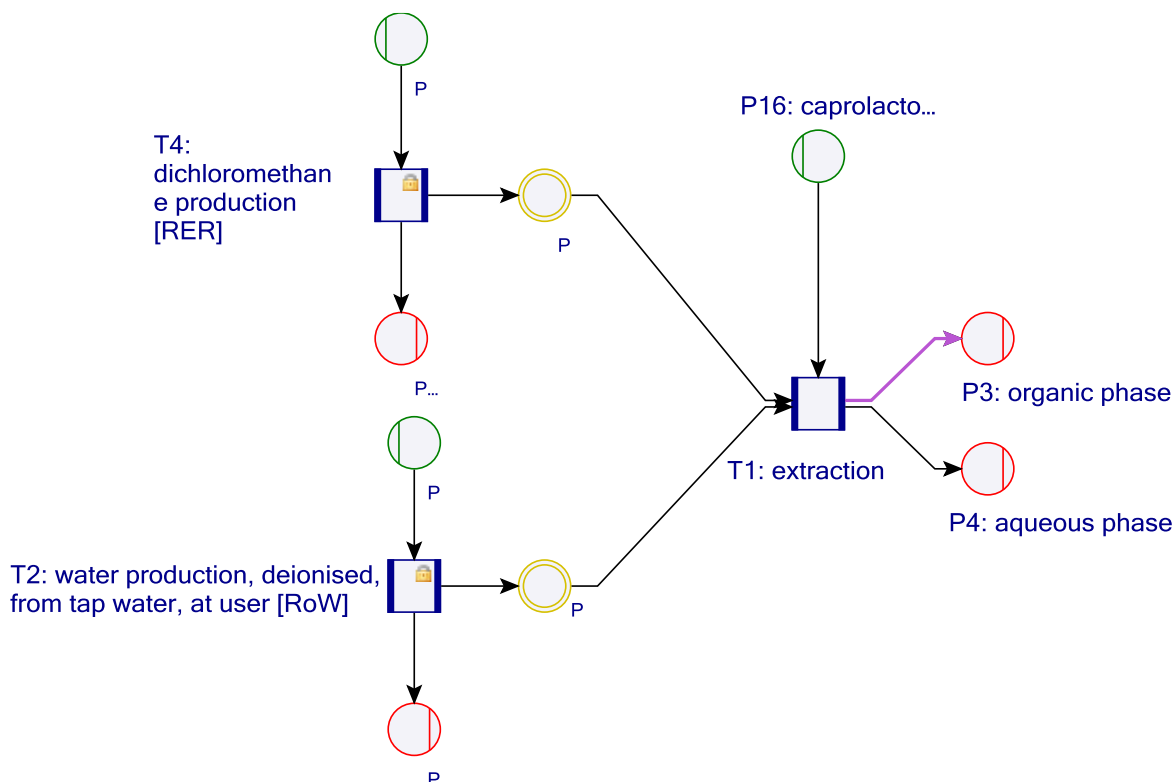


**Abbildung 27.** Verfahrensfliessbild für die biotechnologische Herstellung von  $\epsilon$ -Caprolacton mit Umberto NXT LCA

Wünschenswert für einen Vergleich mit dem chemischen Prozess wäre eine genaue Betrachtung der Produktion rekombinanter Zellen in den Transitionen T1 und T3, die alle Substanzen sowie Reaktionsdauern berücksichtigt. An dieser Stelle ist eine Berechnung nur bedingt sinnvoll, da nur Daten für die Reaktion im Labormaßstab vorliegen, jedoch nicht für beispielsweise einen 10l-Fermenter. Wie bereits erwähnt würde sich allerdings der Einfluss von der Verwendung von Plasmiden, *E. coli* Bakterien, Medien, Ampicillin, IPTG etc. nicht direkt in der LCIA-Berechnung widerspiegeln, da diese Komponenten nicht in der Datenbank eingepflegt sind. Es lässt sich nur eine Abschätzung hinsichtlich Energie- und Wasserverbrauch für den Prozess machen. Die Vorkulturherstellung wurde zur Vereinfachung außer Betracht gelassen.

## Einfluss der Lösungsmittel und der Produktkonzentration für die Extraktion

Die Berechnung der Wirkungsfaktoren für die Extraktion ist aufgrund der begrenzten Reaktionsteilnehmer wesentlich einfacher. Unter Berücksichtigung der experimentellen Daten für die Verteilungskoeffizienten für  $\epsilon$ -Caprolacton im Zweiphasen-System wurde dieser Prozess abgebildet (Abbildung 28).



**Abbildung 28.** Extraktionsprozess von  $\epsilon$ -Caprolacton mit Dichlormethan

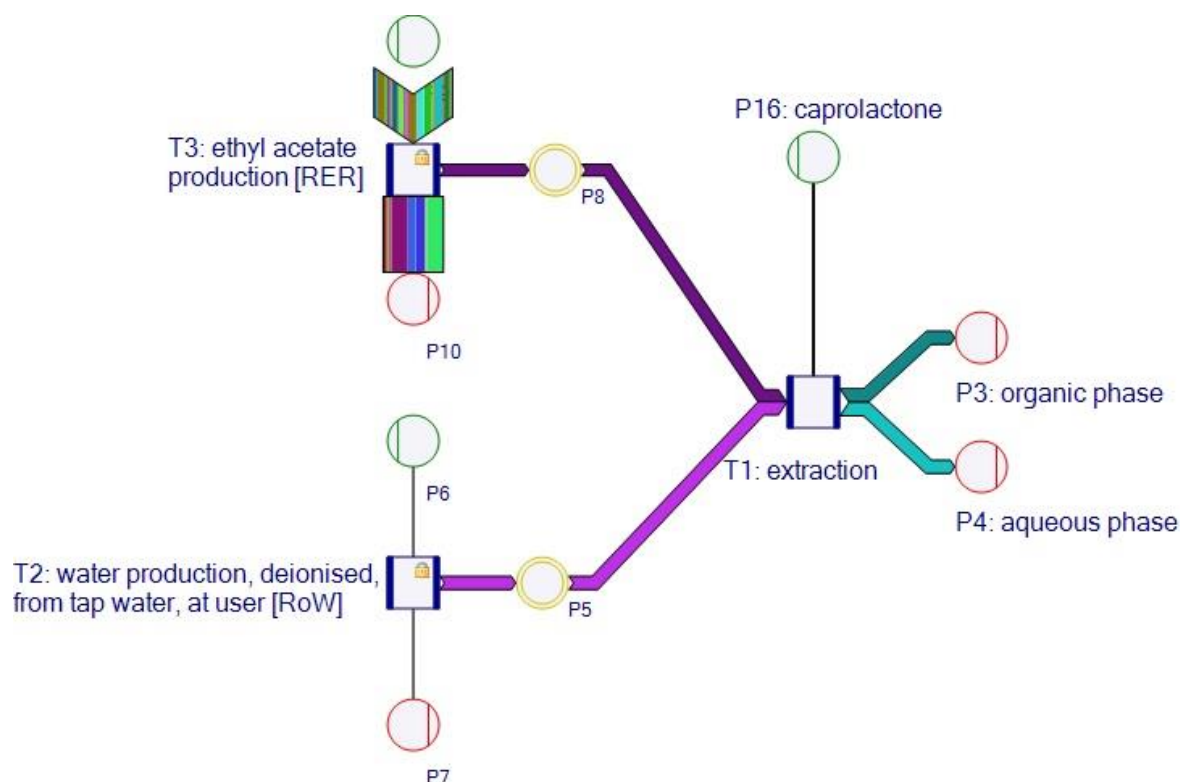
Dabei wurden die Wirkungsfaktoren für die Extraktion mit den beiden unterschiedlichen Lösungsmitteln Dichlormethan (DCM) und Ethylacetat, die für die Optimierung eingesetzt und untersucht wurden, berechnet. Der Ausgangspunkt für die Betrachtung ist die Gewinnung von 1 kg Produkt in der organischen Phase bei unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen (60 mM, 200 mM und 780 mM  $\epsilon$ -Caprolacton) in der wässrigen Phase.

In Tabelle 9 sind die Ergebnisse abhängig von Lösungsmittel und Produktkonzentration hinsichtlich Verbrauch und Einfluss auf die Umwelt zusammengefasst. Je höher die Konzentration ist, umso geringer ist die Umweltauswirkung. Dies gilt für alle gewählten Kenngrößen gebildete  $\text{CO}_2$ -Äquivalente, Verbrauch an fossilen Brennstoffen sowie dem Potential zur Ozonschädigung. Bei der letzten Größe schneidet erwartungsgemäß Ethylacetat um Größenordnungen besser ab als Dichlormethan, bei den anderen Kennzahlen ist der Unterschied geringer.

**Tabelle 9.** Einfluss der Produktkonzentration auf LCIA Berechnung für die Extraktion

Wirkungs- kategorie	DCM (60 mM)	DCM (200 mM)	DCM (780 mM)	Ethyl- acatat (60 mM)	Ethyl- acatat (200 mM)	Ethyl- acatat (780 mM)
Caprolacton – org. Phase [kg]	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Caprolacton – aq. Phase [kg]	0.06	0.23	0.05	0.23	0.33	0.32
Solvent [kg]	204.9	60.5	14.0	11.1	51.2	11.8
[L]	(154.1)	(45.5)	(10.6)	(12.3)	(57.1)	(13.2)
GWP [kg CO <sub>2</sub> -eq]	681.6	207.6	48.0	451.3	135.2	31.2
Fossile Brennstoffe [kg oil-eq]	133.2	40.6	9.4	261.5	78.3	18.1
Ozonabbau [kg 11-CFC-eq]	0.02	5.32 E-3	1.2 E-3	3.2 E-5	9.6 E-6	2.21 E-6

Im folgenden Sankey-Diagramm sind die Gesamtstoffströme für die Extraktion mit Ethylacetat dargestellt. Die Breite der Pfeile zeigt die relative Menge zum Gesamtstoffstrom an. Die Bezugsgröße ist 1 kg Produkt in der organischen Phase.

**Abbildung 29.** Gesamtstoffstrom für die Extraktion von 1 kg ε-Caprolacton

### **Einfluss des Substrats**

Die Möglichkeit Cyclohexanol als Ausgangssubstrat für die Biotransformation verwenden zu können, bringt nur bedingt Verbesserung. Cyclohexanol zeigt zwar bessere Ergebnisse nach LCA (Tabelle 10), jedoch ist trotz allem eine Destillation bzw. Rektifikation des KA-Gemisches nach der Oxidation von Cyclohexan erforderlich. Es gibt derzeit kein Verfahren, in dem selektiv nur Cyclohexanol entsteht.

**Tabelle 10.** Ökologischer Vergleich der Edukte Cyclohexanol und Cyclohexanon für die Synthese von  $\epsilon$ -Caprolacton

<b>Einflussfaktor</b>	<b>Cyclohexanol</b>	<b>Cyclohexanon</b>
<b>GWP</b>		
<b>[CO<sub>2</sub>-eq]</b>	3,49	4,36
<b>Verbrauch fossiler Ressourcen</b>		
<b>[Öl-eq]</b>	2,1	2,22
<b>Humantoxizität</b>		
<b>[1,42-DCB-eq]</b>	1,2	1,4
<b>Metallverbrauch</b>		
<b>[Fe-eq]</b>	0,15	0,18
<b>Terrestrische Versauerung</b>		
<b>[SO<sub>2</sub>-eq]</b>	0,01	0,02
<b>Preis</b>		
<b>[€/kg]</b>	16,60	22,20

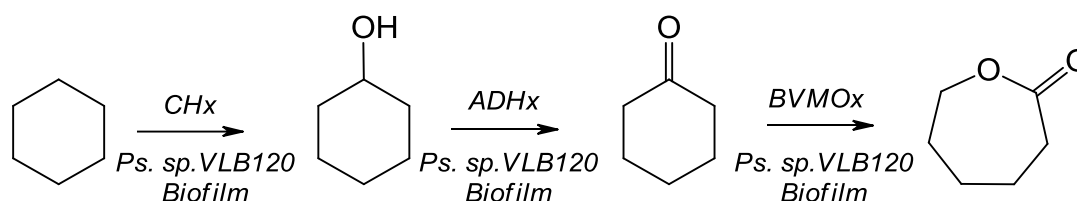
Eine weitere Analyse, inwiefern die Polymerisation mittels Cal A einen positiven Einfluss auf den Gesamtprozess hat, steht noch aus.



#### 4.5. TU Dortmund, Lehrstuhl Biotechnik (Prof. Schmid)

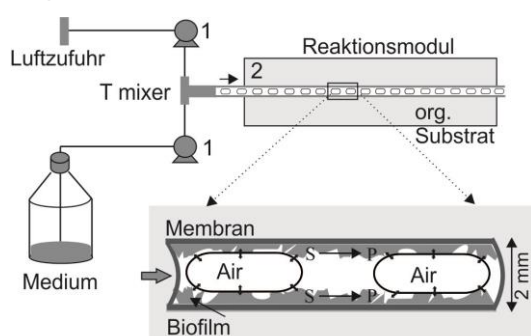
### Konzeption und apparativer Aufbau: Die biokatalytische Direktumwandlung von Cyclohexan in $\epsilon$ -Caprolakton mittels Biofilmen

In den vorangegangenen Arbeiten des AK Schmid / Bühler wurde erfolgreich ein „proof of concept“ für die Anwendung von Biofilmen zur Herstellung von  $\epsilon$ -Caprolakton ausgehend sogar direkt von Cyclohexan aufgezeigt. Das Konzept der Doppeloxidation wird hierbei erweitert durch eine zusätzliche einleitende Hydroxylierung von Cyclohexan, wodurch Cyclohexanol als Substrat der Doppeloxidation gebildet wird (Abbildung 30).



**Abbildung 30.** Enzymatische Dreifach-Oxidation

Nachfolgend sei der apparative Aufbau der Biofilm-Oxidationstechnologie am Beispiel des tubulären Schlauchreaktors erläutert (Abbildung 31). Mittels peristaltischer Pumpen (1) werden die Medien (Luft, Minimalmedium, entsprechende C-Quelle) in die Kapillaren ( $\varnothing$ : 2 mm) gepumpt. Organische Substrate diffundieren über die gesamte Länge der Membran in das Reaktionsmodul. Die Kapillaren bestehen aus Silikon. Die Flüsse werden über ein T-Stück in die Hauptkapillare gepumpt, wodurch die Segmente entstehen. Die Kapillaren laufen in einem temperierbaren Wasserbad zur Gewährleistung einer korrekten Wachstumstemperatur des



**Abbildung 31.** Betrieb des tubulären Mikroreaktorsystems

Katalysators. Die experimentelle Durchführung erfolgt gemäß folgender Teilschritte: 1) Sterilisation: Autoklavieren (121°C, 20 min), spülen mit sterilem Wasser (30 min; 1 mL/min), spülen mit sterilem M9 Minimalmedium (30 min; 1 mL/min). 2) Inokulation mit einer ü/N Kultur des Biokatalysators, 2 Stunden Ruhezustand, Start der Medienzufuhr mit 50  $\mu$ L/min für 24 Stunden. 3) Zuschalten von Luft mit definierter Flussrate.

Darüber hinaus wurde im Projektverlauf auch ein Monolit-Reaktor erfolgreich eingesetzt, dessen Aufbau nachfolgend bei der Beschreibung der Projektergebnisse dargestellt ist.

### Umsetzung von Cyclohexan zu Cyclohexanol in Biofilm-Reaktoren:

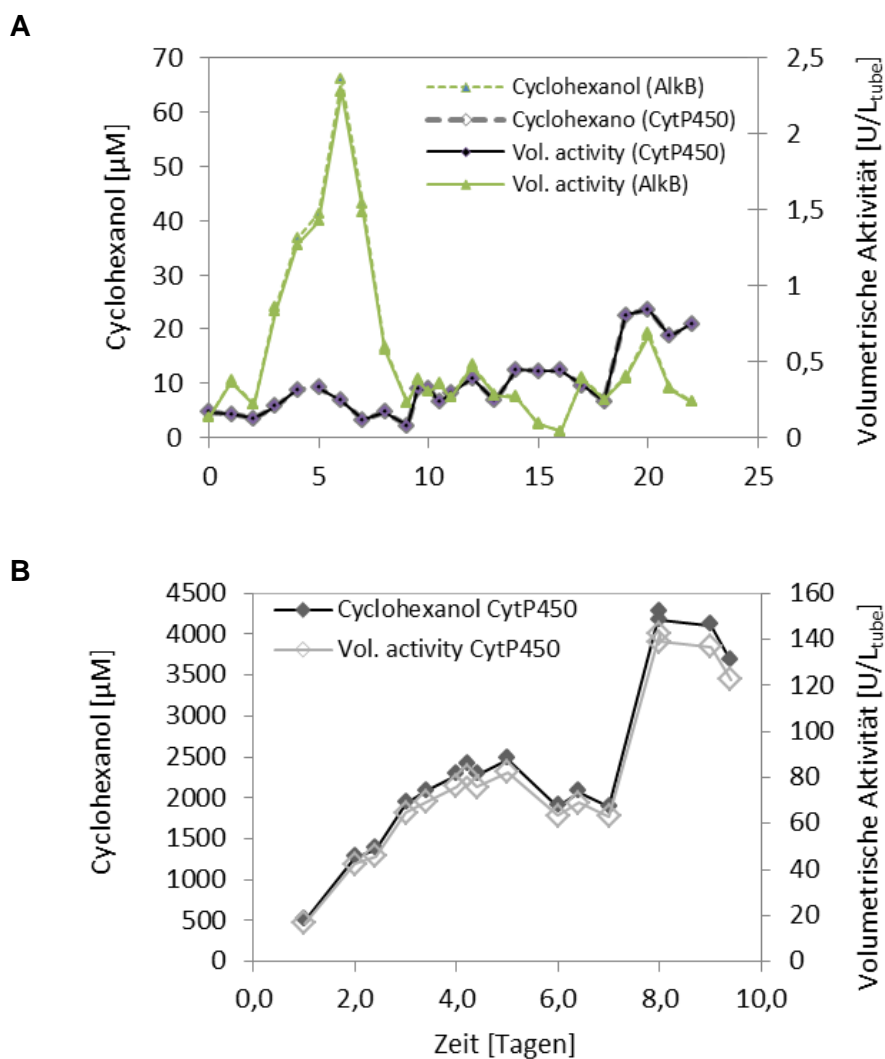
Der erste Schritt in der Reaktionskette ausgehend von Cyclohexan zum Endprodukt  $\epsilon$ -Caprolacton erwies sich in der Vergangenheit als wesentliche Herausforderung für eine effiziente Synthese, da die eingesetzten Enzyme in den Organismen zu geringe Aktivitäten aufwiesen. Erschwerend hinzukamen die geringe Wasserlöslichkeit des Cyclohexans (0,055 g/L) und die Toxizität dieses Substrats ( $\log P_{o/w}$  3,2). Aus diesem Grund wurden verschiedene Enzymsysteme und unterschiedliche biofilmbildende Organismen evaluiert, mit dem Ziel eine möglichst hohen Umsetzung vom Cyclohexan zum Zwischenprodukt Cyclohexanol zu erreichen, um die weiteren Reaktionsschritte („Doppeloxidation“) hier ankoppeln zu können. Alle in dieser Studie untersuchten Enzyme sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

**Tabelle 11.** Biokatalysatoren für die Hydroxylierung von Cyclohexan zu Cyclohexanol

Enzym	Ursprung der Enzyme	Eingesetzter Organismus	Aktivität in ruhenden Zellen oder im Rohextrakt	Max. Biofilm Aktivität* (kontinuierlich)
Alkan Monooxygenase (AlkBGT)	<i>P. putida</i> GPO1	<i>Ps. sp.</i> Stamm VLB120	10 U/g <sub>CDW</sub> Ruhende Zellen	4 U/L <sub>tube</sub>
CytP450 Monooxygenase	<i>Mycobacterium sp.</i> HXN1500	<i>Ps putida</i> KT2440	0.017 U/mg Rohextrakt	15 U/L <sub>tube</sub>
<b>CytP450 Monooxygenase</b>	<b><i>Acidovorax sp.</i></b>	<b><i>Pseudomonas sp.</i> Stamm VLB120</b>	<b>15-30 U/g<sub>CDW</sub> Ruhende Zellen</b>	<b>160 U/L<sub>tube</sub></b>

\*angegeben als Volumetrische Aktivität in Units / Schlauchvolumen; Laufzeiten zwischen 23 und 10 Tagen; Experimente aktiv abgebrochen

Hierbei zeigten sowohl die AlkBGT- als auch die CytP450-Monooxygenase eher geringe Aktivitäten sowie unzureichende Stabilitäten in Enzymassays basierend auf ruhenden Zellen. Die Applikation dieser Enzyme in Biofilm bildenden Organismen erhöhte zwar die Stabilität um ein Vielfaches, aber die Aktivitäten waren nicht zufriedenstellend (Abbildung 32). Dagegen konnte erfreulicherweise ein Durchbruch bei Verwendung der CytP450-Monooxygenase aus *Acidovorax sp.* (bereitgestellt von der Universität Stuttgart, Prof. Karl Engesser) erzielt werden. Die entsprechenden Gene wurden kloniert und werden nun in *Ps. sp.* VLB120 exprimiert.



**Abbildung 32.** Cyclohexanol Produktion in einem Biofilm Schlauch Reaktor, welcher mit einem segmentierten Fluss aus organisch/wässriger Phase betrieben wird (Silikon Schlauch,  $\varnothing$ : 2mm, l: 1000 mm, Flußrate Medium 0.1 mL/min und Luft 0.1 to 0.5 mL/min; organische Phase über äußere Membran); **A:** Biokatalysator: rekombinante *Pseudomonas* sp. VLB120 Biofilm mit AlkBGT und *Ps. putida* KT2440 mit CytP450. **B:** Biokatalysator: rekombinante *Pseudomonas* sp. VLB120 Biofilm mit CytP450 aus *Acidovorax* sp.

Der rekombinante Stamm zeigte stabile Aktivitäten in ruhenden Zellen von 15 bis 30 U/g<sub>ZTG</sub>. Durch die Messung von CO-Differenz Spektren konnte die Menge an CytP450 Enzym mit 153 nmol<sub>CytP450</sub> / g<sub>ZTG</sub> bestimmt werden. Dies ist eine wesentliche Verbesserung der Versuche mit der Monooxygenase aus *Mycobacterium* sp. HXN1500, welches größtenteils inaktiv in der Zelle vorlag. Im Biofilm-Reaktor konnten mit rekombinantem *Pseudomonas* sp. VLB120 und CytP450 aus *Acidovorax* Aktivitäten von 160 U/L<sub>Schlauchvolumen</sub> erreicht werden, was einem kontinuierlichen Produktstrom von 4 mM und einer Steigerung um Faktor 160 entspricht. Das System lief 10 Tage stabil und war zum Zeitpunkt der Berichtserstellung noch nicht abgeschlossen. Damit ist der erste Schritt der Kaskadenreaktion gewährleistet und steht zur Ankopplung an die Folgereaktionen bereit.

## 2-Schrittreaktion Cyclohexanol zu $\epsilon$ -Caprolactone im Biofilm Reaktor

Für die anschließende 2-Schritt Reaktion vom Cyclohexanol zum Caprolacton standen zwei Enzymsysteme zur Verfügung. Die in den Assays gemessenen Aktivitäten mit ruhenden Zellen sowie im tubulären Biofilm-Reaktor sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Die gezeigten Aktivitäten waren in etwa vergleichbar. Allerdings wurden große Unterschiede im  $K_M$ -Wert für das Substrat Cyclohexanol beobachtet, welcher für die ADH aus *L. kefir* (bereitgestellt vom AK Bornscheuer) wesentlich höher lag als für die ADH aus *Acidovorax*. Da es in diesem Ansatz das Ziel ist, diese Reaktion an die Hydroxylierung von Cyclohexan zu koppeln und es nicht zu solch hohen Anreicherungen von Cyclohexanol in der Zelle kommen wird, haben wir uns entschlossen mit den Enzymen aus *Acidovorax* weiter zu arbeiten.

**Tabelle 12.** Biokatalysatoren für die 2-Schritt Reaktion Cyclohexanol zu  $\epsilon$ -Caprolacton

Enzyme	Ursprung der Enzyme	Eingesetzter Organismus	Aktivität in ruhende Zellen	Max. Biofilm Aktivität <sup>3)</sup> (kontinuierlich)
Alkohol Dehydrogenase (ADH) Cyclohexanon Monooxygenase	<i>Lactobacillus kefir</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>P. putida</i> KT2440	15-20 U/g <sub>CDW</sub> <sup>1)</sup>	25 U/L <sub>tube</sub>
Cyclopentanol Dehydrogenase Cyclohexanone Monooxygenase	<i>Acidovorax</i>	<i>Ps. sp.</i> Stamm VLB120	15-30 U/g <sub>CDW</sub> <sup>2)</sup>	17 U/L <sub>tube</sub>

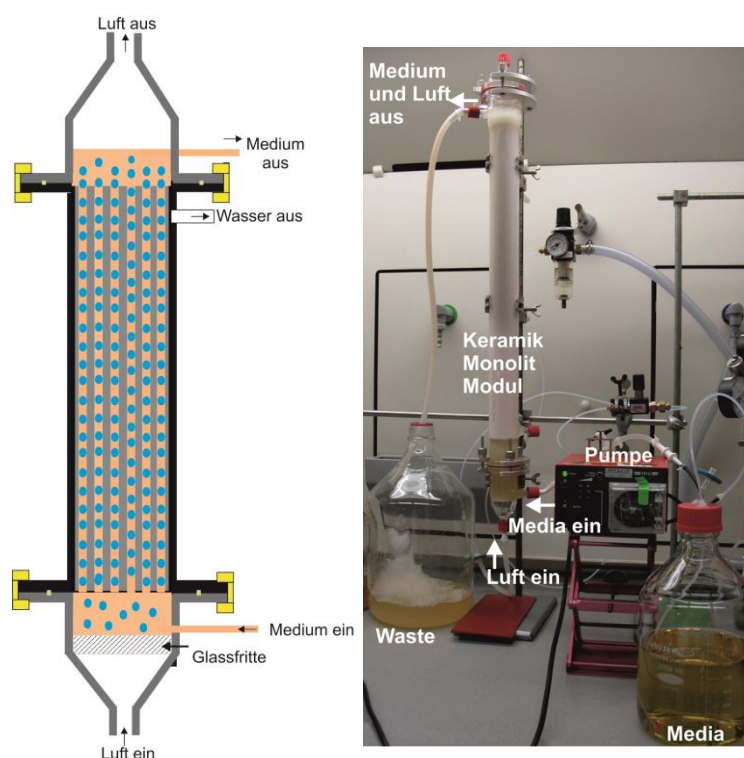
- 1) Eingesetzte Substratkonzentration 50 mM Cyclohexanol / keine Aktivität bei geringeren Konzentrationen
- 2) Eingesetzte Substratkonzentration 1 mM Cyclohexanol / keine Aktivität bei hohen Konzentrationen
- 3) angegeben als Volumetrische Aktivität in Units / Schlauchvolumen; 10 Tage, Experimente noch aktiv

### Scale-up des tubulären Biofilm Reaktor Systems:

Bislang wurden alle Reaktionen lediglich in kleinem Maßstab in einzelnen Schlauchsystemen mit maximal 3.5 mL Volumen durchgeführt. Um die technische Umsetzung dieser Reaktion mittels Biofilmen zu evaluieren, wurde eine Maßstabsvergrößerung auf zunächst 400 mL durchgeführt. Das „Herzstück“ des Reaktors bildet dabei ein Monolit-Modul, welches als Aufwuchsfläche für den Biofilm dient (Abbildung 33). Das Monolit Modul besteht aus 61 Kanälen mit à 2.5 mm Durchmesser und 500 mm Höhe. Das Volumen des Moduls beträgt 150 mL und das Arbeitsvolumen des gesamten Reaktors liegt bei 400 mL. Der Mediumsfluss wird derzeit ständig verändert, um den Einfluss auf das System zu untersuchen und lag beispielsweise bei

1.8 mL / min bei einem Luftdruck von 1 atm. Die dadurch zur Verfügung stehende aktive Oberfläche beträgt 0.239 m<sup>2</sup>. Das Substrat ist wasserlöslich und wird mit dem Medium zugegeben, während das Modul zentral von unten begast wird.

In einem ersten Versuch wurde das System mit rekombinanten *Pseudomonas* sp. VLB120 beimpft, welcher die Cyclopentanol-Dehydrogenase, sowie die Cyclohexanon-Monooxygenase aus *Acidovorax* herstellt. Das System läuft bislang 5 Tage und produziert dabei aktuell 0.5 g  $\epsilon$ -Caprolacton täglich. Der Fokus liegt nun auf der Optimierung der Reaktorparameter und der Erhöhung des Produkttiters. Ein weiteres Reaktormodul ist vorhanden und sobald alle Parameter optimiert sind, wird das Arbeitsvolumen nochmals verdoppelt.



**Abbildung 33.** Aufbau und Betrieb des Monolit Biofilm-Reaktors.

### Diskussion / Ausblick

Dem Ziel,  $\epsilon$ -Caprolacton direkt aus Cyclohexan zu synthetisieren, wurde ein großes Stück näher gekommen. Der Organismus *Acidovorax* sp. hat hier den entscheidenden Durchbruch gebracht. Im Rahmen des Projekts konnten wir den Stamm sequenzieren lassen, und die entsprechende Gensequenz für die Cyclohexan Monooxygenase in *Pseudomonas* VLB120 klonieren. Bei dem Enzym handelt es sich um ein P450 Monooxygenase. Erfreulicherweise konnten wir dieses Enzym auch rekombinant in *Pseudomonas* produzieren, was bei P450-Enzymen aufgrund der inkorporierten Häm-Gruppe nicht selbstverständlich ist. Die mit diesem Enzym erreichten Aktivitäten für die Umsetzung von Cyclohexan zu Cyclohexanol sind mit die höchsten, welche bislang publiziert wurden. Damit ist dieses Enzym CHx auch für andere Anwendungen außerhalb dieses Projekts sehr interessant. Ein weiterer Meilenstein war die Lösung der  $K_M$

Wert Problematik für den zweiten Schritt in der Reaktionskette. Die ursprünglich eingesetzte Alkohol Dehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* zeigte in ruhenden Zellen erst ab 50 mM Substratkonzentration akzeptable Aktivitäten. Da diese hohen Substratkonzentrationen bei einer intrazellulären Kopplung an die Alkanmonooxygenase nicht erreicht werden können, stellte dies ein großes Problem dar. Mit den Enzymen ebenfalls aus *Acidovorax*, ist diese Schwierigkeit nun gelöst. Die Aktivitäten im Biofilmreaktor sind zwar im Vergleich etwas tiefer, dafür haben wir nun die Voraussetzung für eine erfolgreiche Kopplung dieser 2-Schritt Reaktion an die Alkanmonooxygenase geschaffen, welche in der nächsten Projektperiode angegangen wird.

Erwähnenswert ist hier auch die Leistung des Monolit Reaktors, welcher im ersten Experiment bereits 0,5 g  $\epsilon$ -Caprolacton / Tag herstellt. Dieses System wird zukünftig optimiert. Ziel ist es in erster Linie die Produktkonzentrationen im Bleedstream signifikant zu erhöhen, um eine effiziente *in situ*-Produktextraktion zu ermöglichen (Zusammenarbeit mit dem AK Kragl, Rostock).

## 4.6. Enzymicals AG, Greifswald (Dr. Menyes)

### Enzymproduktion

#### CHMO-Ac (*Acinetobacter calcoaceticus*)

Die rekombinante Produktion der CHMO-Ac wurde bei der Enzymicals AG mit Hinblick auf die Aktivitätsausbeute pro Liter Kulturvolumen optimiert. Hierzu wurde das bestehende Expressionsprotokoll für den Wildtyp und verschiedene Varianten der CHMO angepasst und optimiert. Da die Optimierung einer Multiparameterbetrachtung bedarf, wurde diese mit Hilfe der sequenziellen Simplex Analyse durchgeführt. Tabelle 13 fasst die erzielten Ergebnisse zusammen.

**Tabelle 13.** Vergleich der durch sequenzielle Simplex Analyse erreichten Expressionsprotokolle für die CHMO-Ac und deren Aktivitätsausbeuten.

Variable	<i>E.coli</i> BL21 + Wild typ CHMO	<i>E.coli</i> SHuffle Express + Mutant CHMO
Expressions Temperatur (°C)	30	33
DOT (%)	20	13
OD bei Induktion	1.2	1.8-2.2
IPTG Konzentration (mM)	0.4	0.4
Normalisierte Aktivität (U/L)	900	1830.16

Mit Hilfe dieser Optimierungsstrategie konnte eine durchschnittliche Aktivitätsausbeute des CHMO Wildtyps von 900 U/L erreicht werden. Die für den angestrebten Prozess verbesserten CHMO-Varianten (zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Bornscheuer) konnten dagegen sogar mit einer Ausbeute von bis zu 1830 U/L produziert werden. Eine weitere Strategie zur Erhöhung der Wirtschaftlichkeit der Enzymproduktion ist die Hochzelldichtefermentation. Hierbei sollen möglichst hohe Zelltiter im Bioreaktor erreicht werden um eine maximale Zelldichte zu generieren. Die Einführung dieses Verfahrens für rekombinante Baeyer Villiger Monooxygenasen wurde für die beste Variante der CHMO in *E.coli* Shuffle Express® getestet. Die Zellausbeute konnte mit Hilfe eines angepassten Protokolls und einer Feeding-Strategie von 27 g/L Zellen auf 60 g/L verdoppelt werden. Die Optimierte Fermentationsprotokolle wurden bis in den 20 L Maßstab überführt.

Die untersuchte Lagerstabilität der CHMO als Glycerol-Stock ist herausragend. Über mehr als 2 Jahre ist dieses Enzym ohne signifikanten Aktivitätsverlust bei -20 °C lagerbar.

Die Immobilisierung der CHMO in PVA-Gel oder Alginat wurde durchgeführt, konnte jedoch in der Anwendung im Gesamtprozess nicht erfolgreich eingeführt werden. Der Grund dafür ist wahrscheinlich ein limitierter Massentransfer durch die Immobilisierungsmatrix. Um diese Systeme erfolgreich anwenden zu können, muss eine detaillierte Untersuchung zum Stofftransport und eine Reaktorequipmentmodifizierung durchgeführt werden.

#### CHMO-Cyl (*Cylindrocarpon radiciola*, CAMO)

Eine im Projektverlauf aufgezeigte Alternative zur CHMO-Ac stellt die CAMO aus *Cylindrocarpon radiciola* dar, welche ein anderes Substratspektrum gegenüber der CHMO-Ac aufweist. Die CAMO konnte erfolgreich bei der Enzymicals AG im Liter-Maßstab produziert werden. Sie wurde in den bestehenden Prozess zur Herstellung von oligo-Caprolacton eingeführt, konnte aber die mit der CHMO-Ac erreichten Umsätze nicht erreichen. Somit wurde dieses Enzym im späteren Verlauf des Projekts nicht weiter betrachtet. Neben der Oxidation von Cyclohexanon bietet die CAMO jedoch großes Anwendungspotential zur Herstellung optisch reiner Lactone.

#### Lk-ADH (*Lactobacillus kefir*)

Die für den Gesamtprozess ausgewählte Alkohol-Dehydrogenase (ADH) aus *Lactobacillus kefir* konnte erfolgreich im 20 L Maßstab rekombinant in *E.coli* hergestellt werden. Die sukzessive Optimierung des Fermentationsprotokolls führte zu einer finalen Ausbeute von 32 g Zellen pro Liter Fermentationsvolumen und einer Aktivitätsausbeute von 25 kU/L. Die Lk-ADH konnte als zellfreier Rohextrakt bei -20 °C über mehrere Monate ohne signifikanten Aktivitätsverlust gelagert werden.

#### Cal-A (*Candida antarctica*)

Die hochaktive Lipase A aus *Candida antarctica* (CalA) wird zur in-situ Produktentfernung und Oligomerisierung des gebildeten Caprolacton eingesetzt. Um unabhängig von anderen Enzymherstellern agieren zu können, wurde bei der Enzymicals AG ein Fermentationsprotokoll zur Produktion der CalA eingeführt. Die Expression der CalA und einiger Mutanten wurde in dem Produktionsorganismus *Pichia pastoris* durchgeführt. Dieser Organismus bietet einige Vorteile gegenüber *E .coli* bei der Herstellung großer Enzymmengen. Es können wesentlich höhere Zelltiters erreicht werden und *P. pastoris* ist in der Lage die zu produzierenden Enzyme in das Fermentationsmedium zu sekretieren, was die finale Aufarbeitung um einige Prozessschritte verkürzt.

Die Produktion der CalA in *P. pastoris* wurde erfolgreich bis in den 20 L Maßstab überführt. Dabei konnten Aktivitäten im Kulturüberstand von bis zu 400 kU/L erreicht werden. Durch die Konzentration dieser Lösung mittels Tangentialstromfiltration konnte die Volumetrische Aktivität



auf bis zu 16 MU/L erhöht werden. Die Konzentrate waren als Glycerol-Stock lagerstabil bei -20 °C. Neben der Flüssigformulierung wurden Verfahren zur Trockenformulierung getestet. Zum einen wurde das Material lyophilisiert und zum anderen im Sprühtrockner zu einem feinen Pulver umgewandelt. Es hat sich gezeigt, dass bei den verschiedenen Formulierungen der CalA sehr schwankende Aktivitätsverluste von 30 % bis zu 90 % zu beobachten waren. Daher wurde die CalA im Rahmen des Projektes als stabile Flüssigformulierung verwendet.

## **Validierung und Scale-Up der Biokatalysen**

### Doppeloxidation mit ADH/CHMO

Bei der Enzymicals AG wurden intensive Bemühungen unternommen die Protokolle der Projektpartner zu bündeln, zu reproduzieren und zu validieren. Die bereitgestellten Protokolle wurden im kleinen Maßstab reproduziert und zeigten bereits hier deutliche Schwankungsbreiten in Bezug auf den Gesamtumsatz des Prozesses.

Der Einsatz von Enzym Rohextrakten der ADH und CHMO erbrachte in unseren Untersuchungen die vielversprechendsten Ergebnisse für die Doppeloxidation und eine deutliche Bildung von Caprolacton ausgehend von Cyclohexanol. Aufgrund der Verbesserung der Wirtschaftlichkeit des Gesamtprozesses, wurde in diesem Stadium bereits versucht die Synthesen mit Hilfe von Ganzzellkatalysatoren zu realisieren. Die Übertragbarkeit der Protokolle für die Anwendung der Ganzzellkatalysatoren erwies sich als sehr schwierig und zeigte auf, dass auf die Beschreibung der Robustheit solcher Prozesse besonderen Wert gelegt werden muss. Die Schwierigkeiten der Übertragbarkeit der Protokolle aller Partner resultierten dabei wahrscheinlich aus a) dem sehr diversen und unterschiedlichen technischen Equipment der Arbeitsgruppen, b) der verschiedenen, am Anfang des Projekts noch nicht vereinheitlichten analytischen Methoden (Aktivitäts-Assays, chromatographische Methoden, etc.) und Protokolle und c) bei Anwendungen mit Ganzzellsystemen einer starken Beeinflussung des Prozesses durch die diversen Prozessparameter (Energieeintrag bei der Durchmischung, definierte Kultivierungszeiten, Erntestrategien, Aufarbeitungsstrategien, uvm.).

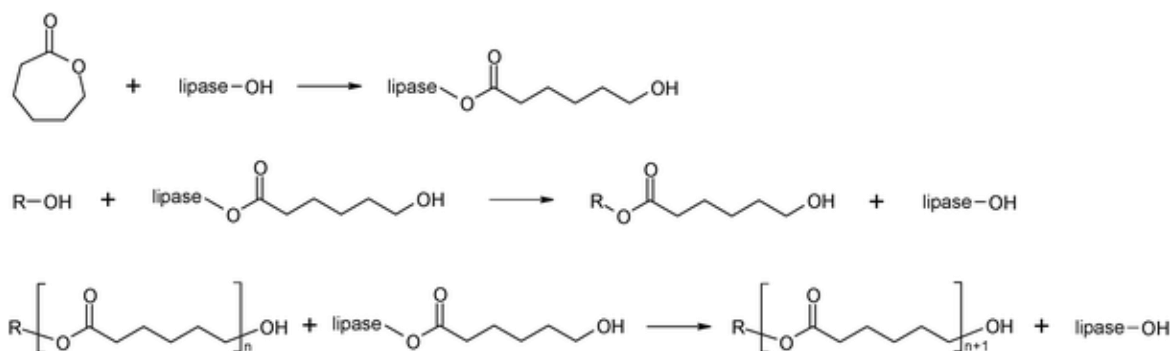
Aufgrund der Fülle der Einflussfaktoren, die im kleinen Maßstab nur marginale bis kleine Schwankungen in den Ergebnissen verursachen, konnten keine robusten Protokolle für die Maßstabsvergrößerung erstellt werden, da die Einflüsse dieser Faktoren mit dem up-scaling potenzieren. Daher muss bereits schon im kleinen Maßstab intensiv untersucht werden, welches die kritischen Einflussfaktoren auf den Gesamtprozess sind und in welchen Parameterbereichen die Umsetzung ohne signifikante Störungen abläuft. Die notwendigen Arbeiten zur Erstellung von Protokollgrundlagen, einer Parameterliste und deren

Operationsgrenzen sind Teil zukünftiger Arbeiten der Enzymicals AG zur Etablierung eines robusten und reproduzierbaren Prozessprotokolls von der Fermentation der Katalysatoren über die Umsetzung von Cyclohexanol zu oligo-Caprolacton, bis hin zur Aufarbeitung, Reinigung und finalen Polymerisation zum Polycaprolacton.

Für zukünftige Projekte sollte verstärkt schon zu Beginn auf eine einheitliche Dokumentation sowie eine gemeinschaftlich erarbeitete Protokollgrundlage für den Technologietransfer zwischen den Projektpartnern geachtet werden. Dazu kommt, auch die Diversität der vorhandenen Technik in den Arbeitsgruppen aufzuzeigen und die möglichen Einflussfaktoren, welche von den Unterschieden in den Geräten betroffen sein können, zu erfassen.

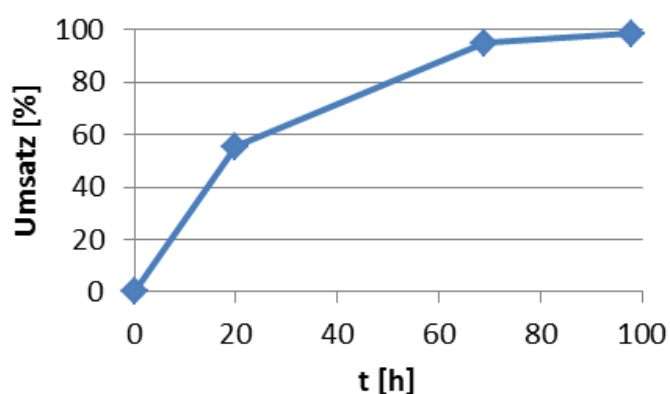
#### Oligomerisierung von Caprolacton mit der CalA im wässrigen Medium

Ein Schlüsselschritt im Prozess zur Herstellung von oligo-Caprolacton ist die Umsetzung von Caprolacton zum Oligomer im wässrigen Medium (Abbildung 34). Hierfür wurde die CalA als geeignete Lipase identifiziert. Neben der Bereitstellung von Enzymkatalysatoren und Implementierung der diversen Protokolle zur Doppeloxidation war es die Aufgabe der Enzymicals AG die Reaktion der CalA zu reproduzieren und Oligomer im Gramm Maßstab bereit zu stellen, um weiterführende Reaktionsschritte sowie die Beurteilung des finalen Polymers durchführen zu können.



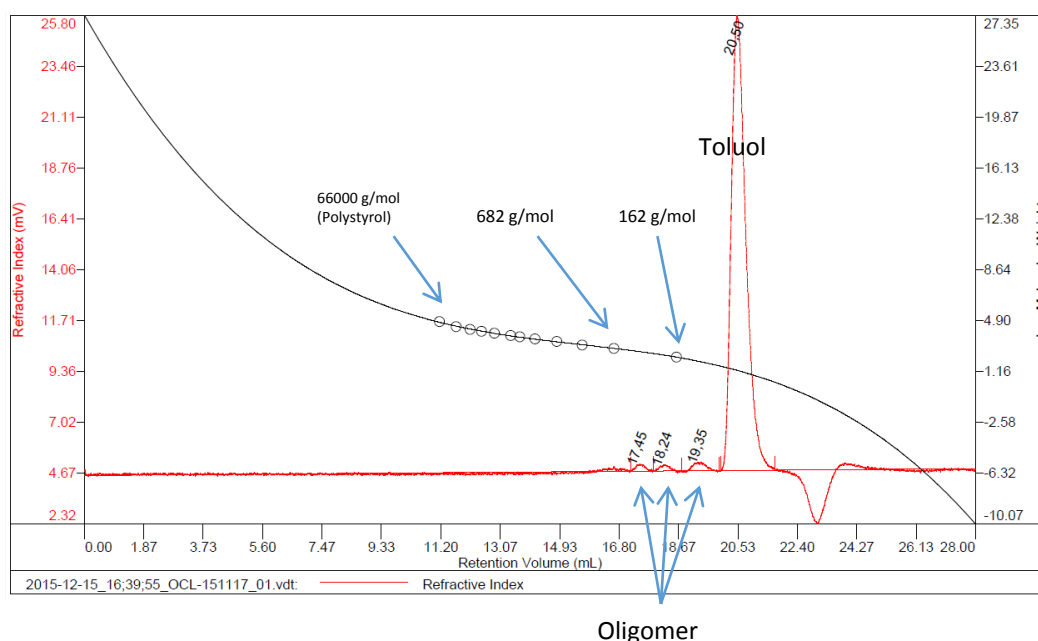
**Abbildung 34.** Schematische Darstellung der Reaktionssequenz zur Herstellung von oligo-Caprolacton.

Die Oligomerisierung des Caprolactons wurde bei der Enzymicals AG bis in den Liter Maßstab vergrößert und es konnte erfolgreich oligo-Caprolacton isoliert werden. Beispielhaft ist eine Umsatzkurve einer Reaktion dargestellt (Abbildung 35). Mit der Anwendung eines alternativen Rührsystems (ViscoJet), das für eine bessere Durchmischung angeschafft wurde, konnte oligo-Caprolacton im 20 g Maßstab hergestellt werden.



**Abbildung 35.** Links: Umsetzung von Caprolacton mit der CaIA im Wässrigen Reaktionssystem; rechts: synthetisiertes oligo-Caprolacton.

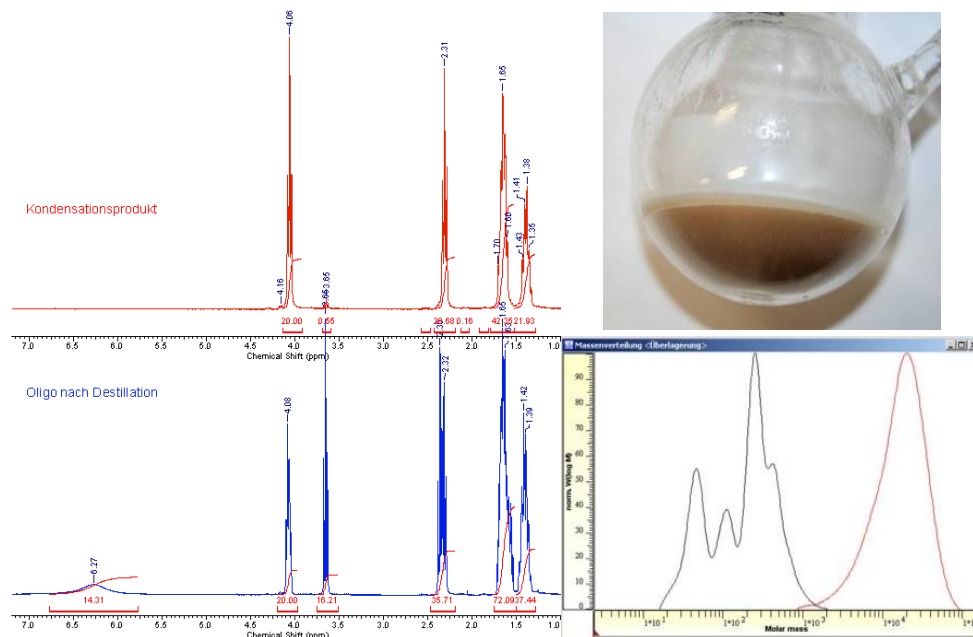
Das erhaltene Oligomer wurde an die Projektpartner zur Untersuchung und zur Polymerisation weitergeleitet. Anhand der GPC-Ergebnisse der AG Prof. Liese konnte gezeigt werden, dass die Oligomerisierung nur einen niedrigen Grad erreichte (Abbildung 36).



Oligomer

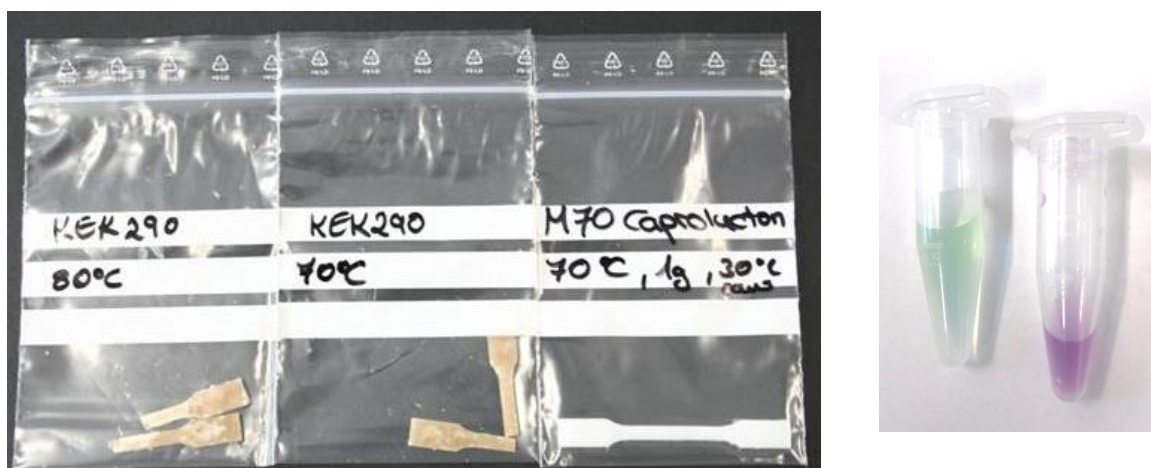
**Abbildung 36.** GPC-Chromatogramm von biokatalytisch hergestelltem oligo-Caprolacton mit integrierter Standardkurve (Polystyrol). Die drei Hauptfraktionen des Oligomers eluieren bei 17,4 VE, 18,2 VE und 19,4 VE (VE = Volumeneinheit).

Dennoch konnte durch den Projektpartner Polymaterials eine chemische Polymerisation des zuvor destillierten Oligomers durchführen. Das Material verfärbte sich bei diesem Schritt zu einer braunen Farbe, was auf unerwünschte Nebenreaktionen schließen lässt. Die NMR-Analyse zeigt eine vielversprechende Polymerisation (Abbildung 37).



**Abbildung 37.** Links: NMR-Spektrum des Oligomers nach der Destillation (blau) und nach der Polymerisation (rot). Rechts oben: bräunliche Verfärbung des Polymers. Rechts unten: Größenverteilung des Oligomers (schwarz) und des Polymers (rot).

Das aufpolymerisierte Material wurde genutzt um Zugstäbchen für die Polymeranalyse herzustellen. Der Versuch der Herstellung misslang, da die Stäbchen eine brüchige inhomogene Struktur aufwiesen und daher nicht für weitere Untersuchungen genutzt werden konnten. Eine Nachuntersuchung des Oligomers bei der Enzymicals AG zeigte, dass dieses mit Proteinrückständen verunreinigt war, welche durch die Aufarbeitung nicht vollständig entfernt wurden (Abbildung 38).



**Abbildung 38.** Links: Hergestellte Zugstäbchen (Polymaterials) aus dem biokatalytisch gewonnenen Polycaprolacton (KEK290) und aus kommerziell erhältlichem Polycaprolacton (M70). Rechts: Proteinnachweis im oligo-Caprolacton (lila Verfärbung) mit Kontrollreaktion ohne Protein (grün).

Zusammenfassend hat sich gezeigt, dass noch erheblicher Optimierungsbedarf mit Hinblick auf die Aufarbeitung der Biokatalysen besteht, dass aber dennoch eine erfolgreiche Herstellung und Polymerisierung eines biokatalytisch hergestellten oligo-Caprolactons möglich ist. Die weitere Optimierung und Maßstabsvergrößerung ist Teil der zukünftigen Arbeiten der Enzymicals AG.

### **Zusammenfassung**

Bei der Enzymicals AG fanden umfangreiche Arbeiten zur Enzymexpression und deren Optimierung statt, sodass alle Projektpartner mit Biokatalysatoren ausgestattet werden konnten. Die Produktion der Enzyme wurde bis in den 20 L Maßstab überführt und konnte die prinzipielle industrielle Relevanz der Fermentationsprozesse aufzeigen.

Die diversen Protokolle der Projektpartner zur Etablierung der verschiedenen Biokatalysatoren in die Kaskade des Gesamtprozesses konnte in Teilen erfolgreich durchgeführt werden. Die CalA katalysierte Oligomerisierung des Caprolacton konnte bereits in den Liter Maßstab überführt werden, wobei sich hier gezeigt hat, dass noch Optimierungsbedarf bei der Aufarbeitung und Aufreinigung besteht.

Die Implementierung der ADH und CHMO als Ganzzellsystem konnte im kleinen Maßstab etabliert werden, jedoch zeigten die Experimente starke Schwankungen der Produktausbeuten auf. Dies ist zum Großteil auf die sehr unterschiedlich genutzte technische Ausstattung bei den Projektpartnern zurückzuführen. Prozessparameter, die im kleinen Maßstab nur kleine Schwankungen hervorrufen, können sich in der Maßstabsvergrößerung potenzieren und den gesamten Prozess sehr stark beeinflussen. Die Operationsfenster der Parameter, die im kleinen Maßstab oft vernachlässigt werden (z.B. Exothermie, Energieeintrag der Durchmischung, Wärmeübertragung, Durchmischungseffekte), die während der Maßstabsvergrößerung einen großen Einfluss haben können, in denen der Prozess stabil und robust durchführbar ist, sind Teil der zukünftigen Arbeiten der Enzymicals AG.

Es konnten erfolgreich Muster von biokatalytisch hergestelltem Polycaprolacton synthetisiert werden und zur Analyse an die Projektpartner übergeben werden.

## 5. Meilensteine und Zeitplan

Innerhalb der Projektlaufzeit von 36 Monaten waren gemäß Projektantrag folgende Meilensteine und damit verbundene Zeitpläne vorgesehen (Tabelle 14).

Im Nachfolgenden sind unter der Angabe der Beschreibung der Arbeitspakete jeweils Kommentare in verkleinerter Schriftgröße und farblich hinterlegt zu den entweder bereits vollständig erfolgreich bearbeiteten Arbeitspaketen (in **GRÜN**) bzw. zu den noch ausstehenden oder noch in Bearbeitung befindlichen Arbeitspaketen (in **GELB**) dargestellt.

Bei den bereits abgeschlossenen Arbeitspaketen (in **GRÜN** dargestellt) wurden diese entweder exakt gemäß Projektplan abgeschlossen oder hierbei alternative Lösungswege realisiert, die sich im Projektverlauf ergaben (wobei dies dann jeweils bei den Kommentaren zur Bearbeitung der Arbeitspakete vermerkt ist).

**Tabelle 14.** Meilensteinplanung zum Projektvorhaben und aktueller Stand.

Kürzel	Meilenstein	Erreicht nach (Mon.)
<b>UB: AP1-M1</b>	Die von Bornscheuer und Enzymicals erhaltenen neuen und verbesserten Enzyme werden für das Doppeloxidationsverfahren unter Prozessbedingungen eingesetzt, eingehend biochemisch charakterisiert sowie anschließend priorisiert ( <b>UB</b> ): Der Fokus lag hier nicht auf den (bislang nur mit leichten Aktivitätsverbesserungen verbundenen Mutanten), sondern auf dem Einsatz der im AK Bornscheuer entwickelten und sich als sehr gut exprimierbar erwiesenen His-Tag-BVMO. Entsprechend wurde dieses Enzym priorisiert und hiermit die Biokatalyse-Arbeiten bislang durchgeführt.	<b>12</b>
<b>UB: AP1-M2</b>	Direktsynthese von $\epsilon$ -Caprolacton aus Cyclohexanol durch Doppeloxidation mit einem Umsatz von mindestens 80% bei einer Gesamtproduktkonzentration von 100 g/L ( <b>UB</b> ): Bereits zum jetzigen Zeitpunkt gelangen Ganzzell-Biotransformationen mit >90% Umsatz und mit Hilfe der in situ-Produktentfernung beispielsweise unter Einsatz der PDMS-Hülsen gelang eine deutliche Verbesserung der Gesamtproduktkonzentration. So wurde die Substratkonzentration deutlich auf 100 mM sowie bei einer zusätzlichen Substratdosierungsstrategie auf bis zu 300 mM gesteigert werden. Das Erreichen einer Substratkonzentration von ca. 1 M zum Erzielen (bei entsprechend hohen Umsätzen) von einer Gesamtproduktkonzentration von 100 g/L steht allerdings noch aus. Zugleich eröffnen die bisherigen Strategien eine Perspektive zum Erreichen dieser Gesamtproduktkonzentration nach weiterer Prozessoptimierung.	<b>24</b>
<b>UB: AP2-M1</b>	Entwicklung eines Syntheseprozesses unter Einsatz eines rekombinanten Ganzzellkatalysators (in dem die von der AG Prof. Bornscheuer und Enzymicals entwickelte, verbesserte Baeyer-Villiger-Monooxygenase wird mit einer Alkoholdehydrogenase co-exprimiert vorliegt) und anschließende Evaluierung des Synthesepotenzials sowie Vergleich mit enzymatischem Verfahren aus Arbeitspaket 1; Priorisierung der Verfahren (Synthese mit isolierten Enzymen versus Ganzzellkatalyse) ( <b>UB</b> ): Verschiedene Varianten der Ganzzell-katalysierten Doppeloxidation von Cyclohexanol wurden entwickelt, wobei insbesondere die Verknüpfung der Ganzzell-Katalyse mit der in situ-Produktentfernung eine vielversprechende Option darstellt und entsprechende Perspektiven für weitere Verbesserungen eröffnet; siehe auch AP1-M2. Ausstehend ist noch die Generierung neuer Ganzzellkatalysatoren mit den optimierten Mutanten.	<b>30</b>

<b>UB: AP3-M1</b>	Vorliegen eines Synthesekonzepts zur Doppeloxidation zur Integration in die Projektabschnitte im AK Prof. Schmid ( <b>UB</b> ): Das Synthesekonzept und der „proof of concept“ für eine Doppeloxidation auf Basis Ganzzellkatalyse liegt vor.	18
<b>UB: AP4-M1</b>	Vorliegen eines „Proof of Concept“ für die Kopplung eines chemokatalytischen Hydrierverfahrens zur Herstellung von Cyclohexanol aus Phenol mit der nachgeschalteten biotechnologischen Doppeloxidation zur Synthese von $\epsilon$ -Caprolacton (mit >20 g/L Produktkonzentration), dadurch gekennzeichnet, dass das Cyclohexanol aus der ersten Stufe ohne Aufarbeitung direkt als Rohprodukt eingesetzt werden kann ( <b>UB</b> ) Basierend auf einer etablierten Hydrierung von Phenol gelang die gewünschte Kombination dieser Reaktion unter Ausbildung von Cyclohexanol als Rohprodukt mit einer direkt (nach Katalysatorabtrennung, aber ohne weitere Aufarbeitung, insbesondere Produktreinigung) erfolgenden Biotransformation. Entsprechend wurde der gewünschte „proof of concept“ erfolgreich realisiert. Ausstehend ist noch die Erhöhung der Produktkonzentration (auf >20 g/L), die bislang bei ca. 5 g/L liegt.	33
<b>UB: AP5-M1</b>	Erfolgreiche Durchführung eines ersten Scale-up der enzymatischen Doppeloxidation im >5L-Maßstab und Prozess-Evaluierung des entwickelten biokatalytischen Prozesses mit alternativen Verfahren im Hinblick auf Prozessökonomie und Nachhaltigkeit (Ökoeffizienzanalyse) ( <b>UB</b> ) Der Fokus der Arbeiten lag bislang auf der Ausarbeitung der unterschiedlichen Synthesekonzepte, wobei deren Übertragung in den und Durchführung im vergrößerten Labormaßstab noch aussteht und Gegenstand der weiteren, nun anstehenden Arbeiten bildet.	36
<b>TUHH: AP1-M1</b>	Etablierung einer gekoppelten Doppeloxidation zu $\epsilon$ -Caprolacton im Batchbetrieb ( <b>TUHH</b> ): Die Doppeloxidation im Batchbetrieb konnte erfolgreich etabliert werden.	12
<b>TUHH: AP1-M2</b>	Adaption/Design eines Reaktorkonzeptes mit einem Hohlfasermodul zur Integration der Doppeloxidation zu $\epsilon$ -Caprolacton ( <b>TUHH</b> ): Dieser Arbeitsabschnitt wurde ebenfalls erfolgreich abgeschlossen, wobei die Einführung eines zweiten membran-getrennten Kreislaufs zur Enzymretention erst später für den kontinuierlichen Betrieb relevant ist.	18
<b>TUHH: AP2-M1</b>	Entwicklung/Optimierung eines Membranreaktors zur Doppeloxidation mit freiem Enzym zur Synthese von $\epsilon$ -Caprolacton im Konzentrationsbereich bis 1M ( <b>TUHH</b> ): Bislang wurde der Prozess noch nicht bis zu einer Konzentration von 1 M durchgeführt. Es wurde jedoch gezeigt, dass eine Synthese von über 280 mM Produkt erfolgreich durchgeführt werden konnte. Daher sind theoretisch noch höhere Konzentrationen zu erreichen. Die Limitation besteht derzeit noch in der Vergrößerung des Maßstabs, welches im Konsortium derzeit adressiert wird. Dies betrifft eine ausreichende Menge an Katalysator und eine Anpassung der Membranbegasung. Durch die Kombination von Fed-Batch und Rezyklierung der Katalysatoren können ebenfalls hohe Produktivitäten erzielt werden.	30
<b>TUHH: AP3-M1</b>	Kopplung/Integration von Ganzzell- und Enzymkatalyse unter Immobilisierung/Fixierung beteiligter Komponenten ( <b>TUHH</b> ) Da in der zuletzt veröffentlichten Literatur keine Steigerung der Stabilität durch Koimmobilisierung der ADH und CHMO gezeigt werden konnte, wurde dieses nicht durchgeführt. In Folge dessen lag der Fokus auf der Prozessentwicklung. Als immobilisierte Präparation wurde CALB eingesetzt, die nach der Reaktion einfach abgetrennt und so recycelt werden konnte.	36
<b>TUHH: AP4-M1</b>	Etablierung eines Reaktors für den kontinuierlichen Betrieb zur Doppeloxidation von Cyclohexanol zu $\epsilon$ -Caprolacton im kg-Maßstab ( <b>TUHH</b> ) Hierfür wurden die Voraussetzungen in AP2-M1 erfüllt. Ein kontinuierlicher Betrieb wird an der Stelle durch einen besser geeigneten Fed-Batch ersetzt, der durch stetige Zugabe von Enzym und Substrat bis zur gewünschten Produktkonzentration durchgeführt werden kann.	36
<b>TUHH: AP5-M1</b>	Synthese von Polycaprolacton via chemischen und biokatalytischen Verfahren und Vergleich der physikochemischen Eigenschaften ( <b>TUHH</b> ):	36

	Polycaprolacton wurde enzymatisch und chemisch ausgehend von $\epsilon$ -Caprolacton präparativ hergestellt. Daraus wurden bereits Zugstäbe gefertigt. Zusätzlich werden in Kürze Zugstäbe aus Polycaprolacton hergestellt, das ausschließlich aus Cyclohexanol mittels Enzymkaskade stammt. Dieses werden dann in den kommenden Wochen vergleichend physikochemisch charakterisiert werden.	
<b>UR: AP1-M1</b>	Extraktion als Aufarbeitungsmethode etabliert ( <b>UR</b> ): Das Verfahren gemäß dieses Meilensteins AP1-M1 ist entwickelt und steht zur Verfügung.	12
<b>UR: AP2-M2</b>	Adsorption zur integrierten Abtrennung von $\epsilon$ -Caprolacton getestet und bewertet ( <b>UR</b> ): Die Verfahren gemäß dieses Meilensteins AP2-M2 ist entwickelt und steht zur Verfügung.	18
<b>UR: AP3-M3</b>	Daten zur Ökoeffizienzanalyse zusammengestellt und erste Bewertungen vorgenommen ( <b>UR</b> ): Diese Arbeiten wurden wie geplant durchgeführt und der Meilenstein entsprechend erfüllt.	24
<b>TUD: AP1-M1</b>	Stabile Plasmid basierte Expression von <i>alkB</i> und <i>cyp153/A6</i> in rekombinanten <i>P. putida</i> VLB120 Biofilmen. Ggf. chromosomale Integration der entsprechenden Gene ( <b>TUD</b> ): Dieser Arbeitsabschnitt wurde ebenfalls erfolgreich abgeschlossen. Aufgrund besserer Aktivitäten wurden andere Enzyme eingesetzt (siehe Tabelle12). Chromosomale Expression ist nicht nötig, da die Plasmidstabilität ausreichend ist.	6
<b>TUD: AP1-M2</b>	Charakterisierung und Optimierung der Umsetzung Cyclohexan zu Cyclohexanol im 3 Phasen (flüssig:flüssig:gas) SFBR im kontinuierlichen Betrieb ( <b>TUD</b> ): Dieser Arbeitsabschnitt wurde ebenfalls erfolgreich abgeschlossen.	12
<b>TUB / UB: AP2-M3</b>	Übergabe der entsprechenden Konstrukte Bielefeld -> Dortmund für Coexpressionen ( <b>TUD / UB</b> ): Die entsprechenden Plasmide wurden der TUD zugesandt.	12
<b>TUD: AP2-M4</b>	Coexpression von <i>adh</i> und <i>bvmo</i> in <i>Ps. sp. VLB120</i> Biofilmen ( <b>TUD</b> ): Dieser Arbeitsabschnitt wurde ebenfalls erfolgreich abgeschlossen.	18
<b>TUD / UR: AP2-M5</b>	<i>in situ</i> Produktextraktion von $\epsilon$ -Caprolacton aus der wässrigen Phase; Integration dieses Konzepts in den SFBR ( <b>TUD, UR</b> ) Der Biofilmreaktor (Monolithkonzept) ist etabliert, allerdings ist die Produktkonzentration noch zu gering, so dass die Kopplung nicht abschließend durchgeführt werden konnte.	20
<b>TUD: AP2-M6</b>	Umsetzung von Cyclohexanol zu $\epsilon$ -Caprolacton im Mehrphasen SFBR im kontinuierlichen Betrieb ( <b>TUD</b> ): Dieser Arbeitsabschnitt wurde ebenfalls erfolgreich abgeschlossen und eine Maßstabsvergrößerung um Faktor 100 erfolgreich umgesetzt.	24
<b>TUD: AP3-M7</b>	Stabile Coexpression von <i>alkB / cyp153/A6, adh</i> und <i>chmo</i> in <i>P. putida</i> VLB120 Biofilmen ( <b>TUD</b> ) Aufgrund besserer Aktivitäten werden andere Enzyme eingesetzt (siehe Tabelle12). Die Kopplung von Schritt 2 und 3 ist bereits erfolgt.	30
<b>TUD: AP3-M8</b>	Alternativ Multispezies Biofilm; Populationsdynamik ( <b>TUD</b> ) Dieses AP wird nicht angegangen. Es war als Alternative gedacht im Falle, dass es nicht gelingt, die enzymatischen Schritte in einer Zelle zu koppeln. Alles deutet darauf hin, dass dies funktionieren wird, so dass dieses AP überflüssig ist.	30
<b>TUD: AP3-M9</b>	Umsetzung von Cyclohexan zu $\epsilon$ -Caprolacton im Biofilm-Reaktor im kontinuierlichen Betrieb ( <b>TUD</b> ) Eine kontinuierliche Transformation von Cyclohexan via Hydroxylierung mit einer P450-Monooxygenase aus <i>Acidovorax</i> sp. in rekombinanten Biofilmen konnte erfolgreich etabliert werden, wobei noch die Kopplung mit einer BVMO und ADH aussteht.	36
<b>UG: TPI-M2</b>	BVMO-Mutantenbibliotheken generiert und Assaysysteme zur Durchmusterung der Varianten im Hochdurchsatz etabliert ( <b>UG</b> ): Innerhalb der ersten 12 Monate der Projektlaufzeit konnten mithilfe des error-prone PCR-Ansatzes erfolgreich mehrere Mutantenbibliotheken mit jeweils unterschiedlichen Mutationsraten generiert werden. Außerdem wurden zwei unterschiedliche Assaysysteme bezüglich ihrer Eignung zur Durchmusterung im Hochdurchsatz überprüft. Hierbei wurde der NADPH-Assay dahingehend optimiert, ein Screening	12



	mithilfe der Roboter-Plattform erfolgreich durchzuführen.	
<b>UG: TPI- M11</b>	Verbesserte BVMO-Varianten identifiziert ( <b>UG</b> ): Außer den ep-Mutantenbibliotheken wurde ein weiterer Ansatz verfolgt, neue verbesserte Mutanten zu generieren. Die Einführung einer zusätzlichen Disulfidbrücke in die Proteinstruktur der WT-CHMO <sub>Acinetobacter</sub> führte zu einer Variante, die im Vergleich zum Wildtyp eine wesentlich höhere Temperaturstabilität sowie eine leicht erhöhte spezifische Aktivität aufweist.	18
<b>UG: TPI- M19</b>	Positionen für Mutagenesen gemäß AP1 ausgewählt, erste Bibliotheken erstellt, Assay optimiert und Bibliotheken durchmustert. Erste verbesserte Varianten identifiziert ( <b>UG</b> ): Insgesamt wurden acht verschiedene Mutanten mit einer oder mehreren Disulfidbrücken generiert, deren Expression in einem dafür geeigneten <i>E. coli</i> -Stamm optimiert sowie mittels Äkta®-Purifier bzw. TALON cell thru aufgereinigt. Die anschließend durchgeführten Stabilitätstests führten zu einer Variante, welche bei höheren Temperaturen stabiler ist sowie zu einer Variante, welche eine erhöhte Toleranz gegenüber Wasserstoffperoxid besitzt. Des Weiteren wurden mehrere ep-Mutantenbibliotheken generiert, ein Protokoll zur Durchmusterung dieser mithilfe einer Roboter-Plattform etabliert sowie mit der Durchmusterung dieser begonnen.	18
<b>UG:</b>	Verbesserte BVMO-Varianten charakterisiert; ggf. weitere Mutageneserunden durchgeführt bzw. beste Varianten kombiniert, rekombinante Expression in geeignetem Wirt etabliert ( <b>UG</b> ): Mit der Charakterisierung der Disulfidbrücken-Varianten wurde sich bereits eingehend beschäftigt. Eine eingehende Bestimmung der reaktionskinetischen Parameter sowie weiterer enzymespezifischer Eigenschaften war Gegenstand der weiteren experimentellen Arbeiten. Die rekombinante Expression in einem geeigneten Wirt konnte für die Varianten mit zusätzlichen Disulfidbrücken bereits erfolgreich etabliert werden.	24
<b>UG:</b>	Anwendung der besten optimierten BVMO-Variante in größerem Maßstab unter Berücksichtigung der Anforderungen der technischen Produktion von $\epsilon$ -Caprolacton ( <b>UG</b> ): Optimierte BVMO-Varianten wurden generiert, deren Evaluierung im technischen Maßstab steht allerdings noch aus und ist für zukünftige Arbeiten angedacht.	36
<b>ECS: M1</b>	Prozess im 20L-Maßstab validiert ( <b>ECS</b> ): Die Produktion der Enzyme wurde bis in den 20 L Maßstab überführt und konnte die prinzipielle industrielle Relevanz der Fermentationsprozesse aufzeigen. Auch wurde erfolgreich die CalA katalysierte Oligomerisierung des Caprolacton bereits in den Liter Maßstab überführt, wobei sich hier gezeigt hat, dass noch Optimierungsbedarf bei der Aufarbeitung und Aufreinigung besteht. Die Implementierung der ADH und CHMO als Ganzellsystem konnte im kleinen Maßstab etabliert werden, jedoch zeigten die Experimente starke Schwankungen der Produktausbeuten auf. Dies ist zum Großteil auf die sehr unterschiedlich genutzte technische Ausstattung bei den Projektpartnern zurückzuführen. Prozessparameter, die im kleinen Maßstab nur kleine Schwankungen hervorrufen, können sich in der Maßstabvergrößerung potenzieren und den gesamten Prozess sehr stark beeinflussen. Die Operationsfenster der Parameter, die im kleinen Maßstab oft vernachlässigt werden (z.B. Exothermie, Energieeintrag der Durchmischung, Wärmeübertragung, Durchmischungseffekte), die während der Maßstabsvergrößerung einen großen Einfluss haben können, in denen der Prozess stabil und robust durchführbar ist, sind Teil der zukünftigen Arbeiten der Enzymicals AG. Es konnten erfolgreich Muster von biokatalytisch hergestelltem Polycaprolacton synthetisiert werden.	06
<b>ECS: M2</b>	Biokatalysator immobilisiert ( <b>ECS</b> ): Die Immobilisierung der CHMO in PVA-Gel oder Alginat wurde durchgeführt, konnte jedoch in der Anwendung im Gesamtprozess nicht erfolgreich eingeführt werden. Der Grund dafür ist wahrscheinlich ein limitierter Massentransfer durch die Immobilisierungsmatrix.	18
<b>ECS: M3</b>	Methoden zur Qualitätskontrolle etabliert ( <b>ECS</b> ): Die Entwicklung und Übertragung der Qualitätskontrollmethoden wird einhergehen mit der Übertragung der erfolgreichen biokatalytischen Prozessstrategie zu Enzymicals im Rahmen des Up-scaling der Synthese und Aufarbeitungsprozesse.	*

\* 3 Monate nach Übergabe der vollständigen Prozessbeschreibungen durch Partner

## **6. Organisatorisches (Projekttreffen)**

### **Projekttreffen der Projektpartner**

**(= Projekttreffen der Arbeitsgruppenleiter und Mitarbeiter):**

28.11.2012: ChemBioTec-Kick-Off Meeting sowie anschließendes Projekttreffen (Dortmund)

05.04.2013: Projekttreffen (Bielefeld)

21.10.2013: Projekttreffen (Hamburg)

18.03.2014: Projekttreffen in Berlin (im Rahmen der Zwischenbegutachtung)

Darüber hinaus erfolgten auch spezielle gesonderte Treffen der Doktoranden, so am 03.05.2013 in Hamburg-Harburg, 05.07.2013: Doktoranden-Treffen in Greifswald und 20.09.2013: Doktoranden-Treffen in Dortmund.

## 7. Publikationen, Patentanmeldungen und Konferenzbeiträge

### Publikationen

R. Karande, B. Halan, A. Schmid, K. Buehler

Segmented flow is controlling growth of catalytic biofilms in continuous multiphase microreactors

*Biotechnol. Bioengin.* **2014**, *111*, 1831-1840.

S. Schmidt, C. Scherkus, J. Muschiol, U. Menyes, T. Winkler, W. Hummel, H. Gröger, A. Liese, H.-G. Herz, U. T. Bornscheuer

An enzyme cascade synthesis of  $\epsilon$ -caprolactone and its oligomers

*Angew. Chem.* **2015**, *127*, 2825-2828; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 2784-2787.

S. Schmidt, M. Genz, K. Balke, U. T. Bornscheuer

The effect of disulfide bond introduction and related single Cys/Ser mutations on the stability of cyclohexanone monooxygenase

*J. Biotechnol.* **2015**, *214*, 199-211.

S. Schmidt, H. C. Büchenschütz, C. Scherkus, A. Liese, H. Gröger, U. T. Bornscheuer, Biocatalytic access to chiral polyesters by an artificial enzyme cascade synthesis

*ChemCatChem.* **2015**, *7*, 3951-3955.

R. Karande, A. Schmid, K. Buehler

Applications of multiphase microreactors for biocatalytic reactions

*Org. Process Res. Developm.* **2016**, *20*, 361-370.

R. Karande, L. Debor, D. Salamanca, F. Bogdahn, K.-H. Engesser, K. Buehler, A. Schmid

Continuous cyclohexane oxidation to cyclohexanol using a novel cytochrome P450 monooxygenase from *Acidovorax* sp. CHX100 in recombinant *P. taiwanensis* VLB120 biofilms

*Biotechnol. Bioengin.* **2016**, *113*, 52-61.

K. Balke, S. Schmidt, M. Genz, U. T. Bornscheuer

Switching the regioselectivity of cyclohexanone monooxygenase towards (+)-*trans*-dihydrocarvone by rational protein design

*ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 38-43.

C. Scherkus, S. Schmidt, U. T. Bornscheuer, H. Gröger, S. Kara, A. Liese  
A Fed-Batch Synthetic Strategy for a Three-Step Enzymatic Synthesis of Poly- $\epsilon$ -caprolactone  
*ChemCatChem* **2016**, *8*, 3446-3452.

M. Dörr, M. P. Fibinger, D. Last, S. Schmidt, J. Santos-Aberturas, D. Böttcher, A. Hummel, C. Vickers, M. Voss, U. T. Bornscheuer  
Fully automatized high-throughput enzyme library screening using a robotic platform  
*Biotechnol. Bioeng.* **2016**, *113*, 1421-1432.

A. Reimer, S. Wedde, S. Staudt, S. Schmidt, D. Höffer, W. Hummel, U. Kragl, U. T. Bornscheuer, H. Gröger  
Process Development through Solvent Engineering in the Biocatalytic Synthesis of the Heterocyclic Bulk Chemical  $\epsilon$ -Caprolactone  
*J. Heterocycl. Chem.* **2017**, *54*, 391-396.

S. Wedde, P. Rommelmann, C. Scherkus, S. Schmidt, U. T. Bornscheuer, A. Liese, H. Gröger  
An alternative approach towards poly- $\epsilon$ -caprolactone through a chemoenzymatic synthesis: combined hydrogenation, bio-oxidations and polymerization without the isolation of intermediates  
*Green Chem.* **2017**, *19*, 1286-1290.

C. Scherkus, S. Schmidt, U. T. Bornscheuer, H. Gröger, S. Kara, A. Liese  
Kinetic insights into  $\epsilon$ -caprolactone synthesis: improvement of an enzymatic cascade reaction  
*Biotechnol. Bioengin.* **2017**, angenommen zur Publikation (DOI: 10.1002/bit.26258).

S. Schmidt

Protocols for optimal and reproducible MTP expression in *E. coli*

in:

Library growth and protein expression: methods and protocols (Höhne, M., Bornscheuer, U. T. Eds.), *Meth. Mol. Biol.*, in Vorbereitung.

## Patentanmeldungen

U. T. Bornscheuer, S. Schmidt, U. Menyes, R. Wardenga, S. Borchert,  
Process for the production of polyesters using an enzyme cascade of alcohol dehydrogenase, cyclohexanone monooxygenase and lipase A  
*Eur. Patent Applic.* EP2899280A1, **2015**.

## Vorträge

R. Karande, K. Buehler, A. Schmid

Segmented flow microreactors.

*ESBES*, 23.-26.9.2012, Istanbul, Türkei.

R. Karande, A. Schmid, K. Buehler

Segmented flow biofilm membrane microreactor-A new reactor concept

*IMTB*, 05-08.05.2013, Cavtat, Kroatien.

A. Liese

Sustainable Chemical Synthesis by Means of Biocatalysis – Impact of Reaction Engineering

*Molecular Frontier Science Conference for Humboltians*, 20.-22.9.2013, Shanghai, China.

A. Liese

Benefit of Reaction Engineering for Non-Conventional Biotransformations

*Enzyme Engineering Conference XXII*, 22.9.-26.9.2013, Toyama, Japan.

U. Kragl

Eco-efficiency analysis as a tool for process design of enzymatic biotransformations

*Enzyme Engineering Conference XXII*, 22.9.-26.9.2013, Toyama, Japan.

C. Scherkus

Process Development for Enzymatic Synthesis of a Biodegradable Polymer

*ProcessNet* (Posterworkshop), 30.09.-02.10.2014, Aachen.

A. Liese

Bioreaction Engineering: At the Interface of Biology, Chemistry and Engineering

*Fall Meeting of Korean Society for Biotechnology & Bioengineering*, 06.10.2014, Changwon, Korea.

A. Liese

Biocatalysis – Key Technology in Sustainable Synthesis of Chemicals

*PRAXISforum Enzymes for Industrial Applications*, DECHEMA, 04.-05.02.2015, Frankfurt/M.

R. Karande, A. Schmid, K. Buehler

Application of multiphasic microreactors for bioprocess intensification

*IMTB*, 10.-13.05.2015, Opatja, Kroatien.

S. Schmidt, A. Liese, U. Menyes, H. Gröger, H. G. Herz, U. T. Bornscheuer  
An enzyme cascade synthesis of  $\epsilon$ -caprolactone and its oligomers.  
*Biotrans (speed-talk)*, 26.-30.07.2015, Wien, Österreich.

S. Wedde, S. Staudt, S. Schmidt, C. Scherkus, T. Winkler, A. Liese, U. T. Bornscheuer, U. Menyes, W. Hummel, H. Gröger  
Towards a sustainable production of  $\epsilon$ -caprolactone via whole-cell catalyzed double oxidation of cyclohexanol  
*Biotrans*, 26.-30.07.2015, Wien, Österreich.

A. Liese  
Benefits of Reaction Engineering in Biocatalysis  
*ERATO Biotechnology Research Center*, 12.8.2015, Toyama Prefectural University, Japan.

S. Wedde, H. Gröger  
Redox Biotransformations Using Recombinant Whole-Cell Catalysis  
*2nd CeBiTec Retreat*, 20.-21.8.15, Loccum.

H. Gröger  
Development of Multi-Step Syntheses of Industrial Chemicals with Integrated Biocatalytic Key Steps  
*Regional Meeting of the Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry*, 19.-20.09.2015, Toyama, Japan.

A. Liese  
Biocatalysis Paired With Reaction Engineering Enables Industrial Applications.  
*acib workshop „Industrial Enzymes“*, 22.-23.9.2015, Pavia, Italien.

## Posterbeiträge

D. Höffer, U. Kragl  
Process development for downstream processing  $\epsilon$ -caprolactone in a biocatalytic reaction  
*Jahrestreffen der Fachgemeinschaft für Fluidodynamik und Trenntechnik*, 2013, Würzburg

R. Karande, B. Halan, A. Schmid, K. Buehler  
Segmented flow biofilm membrane microreactor (SFBMR): a new reactor concept  
*IWA Biofilm*, 28.-31.05.2013, Paris, Frankreich.

C. Scherkus, H. Gröger, U. Kragl, U. Bornscheuer, A. Schmid, U. Menyes, A. Liese  
Biotechnological Synthesis of  $\epsilon$ -Caprolactone  
*Biomaterials*, Mai 2014, Dortmund.

S. Schmidt, A. Liese, H. Gröger, U. Menyes, U. T. Bornscheuer  
An enzyme cascade synthesis with direct polymerization to oligo-/polycaprolactone  
*Biocat*, 31.8.-04.09.2014, Hamburg.

C. Scherkus, H. Gröger, U. T. Bornscheuer, S. Schmidt, S. Borchert, U. Menyes, A. Liese  
Enzymatic reaction sequence towards  $\epsilon$ -caprolactone synthesis and polymerization  
*Biocat*, 31.8.-04.09.2014, Hamburg.

C. Scherkus, H. Gröger, U. Bornscheuer, S. Schmidt, S. Borchert, U. Menyes, A. Liese  
Process development for enzymatic synthesis of a biodegradable polymer  
*ProcessNet / 31. Jahrestagung der Biotechnologen*, September 2014, Aachen.

S. Wedde  
Nachhaltige Produktion des Polymerbausteins  $\epsilon$ -Caprolacton  
*Bielefelder Nachwuchswettbewerb [sciencefair]*, 26.3.15, Bielefeld.  
[2. Preis, gesponsort von Evonik Industries AG]

S. Schmidt, A. Liese, U. Menyes, H. Gröger, H. G. Herz, U. T. Bornscheuer  
An enzyme cascade synthesis of  $\epsilon$ -caprolactone and its oligomers  
*Biotrans*, 26.-30.07.2015, Wien, Österreich.

J. Muschiol, C. Peters, N. Oberleitner, S. Schmidt, C. Scherkus, E. Byström, F. Rudroff, A. Liese, M. Mihovilovic, U. T. Bornscheuer  
Production of chiral lactones and oligomers thereof by enzyme cascades and application of a rotating flow cell  
*Biotrans*, 26.-30.07.2015, Wien, Österreich.

S. Wedde, H. Sato, S. Staudt, S. Schmidt, C. Scherkus, T. Winkler, A. Liese, U. T. Bornscheuer, U. Menyes, W. Hummel, H. Gröger  
Nachhaltige Produktion von Epsilon-Caprolacton mittels Ganzzellkatalyse  
*Design von Biosystemen*, 22.-23.9.2015, Berlin.

S. Wedde, H. Gröger

In vivo protein circularization as a strategie for improving enzyme characteristic for industrial biotransformations

67. Mosbacher Kolloquium, 31.3.-2.4.2016, Mosbach.

### Abschlussarbeiten

S. Schmidt

An artificial enzyme cascade for the biocatalytic synthesis of polymer building blocks

Dissertation, Universität Greifswald, Greifswald, **2015**.

A. Reimer

Biokatalytische Synthesen von  $\epsilon$ -Caprolacton und chiralen Aminen

Dissertation, Universität Bielefeld, Bielefeld, **2015**.

D. Höffer

Prozessentwicklung für die biokatalysierte Herstellung von  $\epsilon$ -Caprolacton

Dissertation, Universität Rostock, in Vorbereitung.

C. Scherkus

Reaktionstechnik der biokatalytischen Synthese von  $\epsilon$ -Caprolacton

Dissertation, Technische Universität Hamburg, in Vorbereitung.