

Stereoselektive Biohydrolyse von Epoxiden

- Analyse, Optimierung und Modellierung

Von dem Department Chemie
der Universität Paderborn genehmigte

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

von

Diplom-Chemiker

THORSTEN BRUSS
aus Jarlingen

Paderborn, März 2003

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1999 bis März 2003 im Fachgebiet für Technische Chemie und Chemische Verfahrenstechnik und im Fachgebiet für Organische Chemie im Department Chemie der Universität Paderborn angefertigt.

Referent: Prof. Dr.-Ing. H.-J. Warnecke
Universität Paderborn
Fachbereich Chemie und Chemietechnik
Technische Chemie und Chemische Verfahrenstechnik

Korreferent: Priv. Doz. Dr. rer. nat. B. Westermann
Universität Paderborn
Fachbereich Chemie und Chemietechnik
Organische Chemie

Datum der Abgabe: 12. März 2003
Datum der mündlichen Prüfung: 17. April 2003

Damit das Mögliche entsteht,
muss immer wieder das Unmögliche
versucht werden.

Hermann Hesse (1877-1962)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Stand des Wissens	1
1.2 Problemstellung	2
2 Theorie	4
2.1 Chiralität und Enantioselektivität	4
2.2 Gewinnung enantiomerenreiner Epoxide	5
2.2.1 Kinetische Racematspaltung mit Epoxidhydrolasen	6
2.2.2 Mikrobiologische Epoxidhydrolasen	8
2.2.3 Substrate filamentöser Pilz-Epoxidhydrolasen katalysierter Reaktionen	9
2.3 Chirale Analytik	11
2.3.1 Polarographie	12
2.3.2 Kernresonanzspektroskopie in der Stereoisomerenanalytik . .	12
2.3.3 Chromatographie an chiralen Phasen	13
2.4 Immobilisierung von Biokatalysatoren	13
2.4.1 Allgemeine Übersicht	13
2.4.2 Verkapselung von Biokatalysatoren	15
2.5 <i>Beauveria bassiana</i> und <i>Aspergillus niger</i> in der organischen Synthese	17
2.6 Modellierungsbeispiele in der Biokatalyse	18
3 Experimentelles	20
3.1 Analytik	20

3.1.1	Bestimmung der Styrolepoxid-Stereoisomeren	20
3.1.2	Bestimmung der 1,2-Phenylethandiol-Stereoisomeren	20
3.1.3	Messung der Phenylacetaldehydkonzentration	21
3.1.4	Messung des gesamten organischen Kohlenstoffgehaltes in Lösungen	21
3.1.5	Strukturbeweis der Produkte mittels NMR-Spektroskopie .	21
3.1.6	Messung der Kohlenwasserstoffkonzentration in der Gasphase	22
3.1.7	Messung der Biotrockenmasse	23
3.2	Biokatalyse	23
3.2.1	Pilzkulturen	23
3.2.2	Biomassenanzucht	23
3.2.3	Messung der Wachstumskurven	23
3.2.4	Biohydrolyse mit freiem Pilz	24
3.2.5	Biohydrolyse mit gefriergetrocknetem Pilz	25
3.2.6	Biohydrolyse in organischen Lösemitteln	26
3.2.7	Bestimmung der Autohydrolyse- und Folgereaktion	26
3.3	Immobilisierung	27
3.3.1	Verkapselung der Biokatalysatoren in eine Polyvinylalkoholmatrix	27
3.3.2	Biohydrolyse mit Immobilisaten	27
3.3.3	Bestimmung des Diffusionsmechanismus	27
3.3.4	Bestimmung der Diffusionskoeffizienten	28
3.4	Aufschluss der Pilzzellen	29
3.4.1	Aufschluss durch Gefrieretrocknung	29

3.4.2 Aufschluss mit dem Zellaufschlussgerät	29
3.4.3 Aufschluss mit Ultraschall	29
3.4.4 Aufschluss mit dem Ultraturrax	30
3.4.5 Aufschluss mit gekühlten Lösemitteln	30
3.4.6 Kombination der Aufschlussverfahren	30
3.4.7 Anreicherung der Enzymfraktion	30
3.4.8 Bestimmung der Substratbreite	30
4 Ergebnisse	32
4.1 Anzucht der Mikroorganismen	32
4.1.1 Wachstumskurve <i>Aspergillus niger</i>	32
4.1.2 Wachstumskurve <i>Beauveria bassiana</i>	34
4.1.3 Optimierung der Wachstumstemperatur	36
4.1.4 Zusammensetzung des Nährmediums	36
4.2 Analytik	39
4.2.1 Extraktion der Analyten	39
4.2.2 Enantiomerentrennung der Epoxide	39
4.2.3 Enantiomerentrennung der Diole mittels chiraler Hochleistungs- flüssigkeitschromatographie	40
4.3 Reaktionssystem	41
4.4 Reaktionsverlauf im Detail	41
4.4.1 Autohydrolyse	45
4.4.2 Folgereaktion	45
4.4.3 Racemaseren	47

4.4.4	Enzymatische Hauptreaktion	49
4.4.5	Enzymatische Nebenreaktion	49
4.4.6	Enzymatische Rückreaktion	50
4.4.7	Inhibition	51
4.4.8	Das Reaktionssystem für die Modellierung	52
4.5	Reaktion mit suspendiertem Pilz	53
4.5.1	Wahl des optimalen Reaktionsmediums	53
4.5.2	Reaktionsverlauf mit gefriergetrocknetem Pilz	54
4.5.3	Reaktion unter O ₂ -Atmosphäre	56
4.6	Reaktion in organischen Lösemittelsystemen	57
4.6.1	Wahl der geeigneten Lösemittel	57
4.6.2	Wahl des Konzentrationsbereiches der Lösemittel	60
4.6.3	Konzentrationssteigerung des Eduktes	60
4.7	Aufschluss der Pilzzellen	61
4.8	Immobilisierung der Biokatalysatoren	65
4.8.1	Reaktion mit PVA verkapselten Mikroorganismen	65
4.8.2	Wiederverwendung der PVA-Kapseln	66
4.8.3	Bestimmung des Diffusionskoeffizienten in den PVA-Immobilisaten	67
4.9	Bewertung der Substratbreite	70
5	Modellierungen der Biohydrolse	73
5.1	Reaktion mit suspendiertem Pilz	73
5.2	Eindimensionale Diffusion	76

5.3 Batch-Reaktionsansatz unter Berücksichtigung der Immobilisatgeometrie	79
6 Zusammenfassung und Ausblick	82
7 Anhang	85
Notation	85
7.1 Bestimmung des Diffusionskoeffizienten in PVA-Membranen	87
7.2 Anpassungsroutinen	90
7.2.1 Biohydrolyse mit Pilzsuspension	90
7.2.2 Eindimensionale Diffusion	90
7.2.3 Biohydrolyse mit Immobilisaten	93
Literatur	99
Dank	106
Abstract	107

1 Einleitung

1.1 Stand des Wissens

Synthese- und Trennschritte zu enantiomerenreinen Produkten sind in der chemischen und pharmazeutischen Industrie der Schlüssel zu einer hohen Wertschöpfung in einem Markt mit einer hohen Dynamik. Das Wachstum des Marktvolumens an enantiomerenreinen Feinchemikalien wird mit 13.2% jährlich bis 2007 prognostiziert [83] und ist so überdurchschnittlich hoch. Außerdem ist spätestens seit der Contergankatastrophe 1962 der Bedarf an enantiomerenreinen Wirkstoffen umstritten [66], [77]. Dieser führt in der Industrie zu einem starken Anstieg der eingesetzten

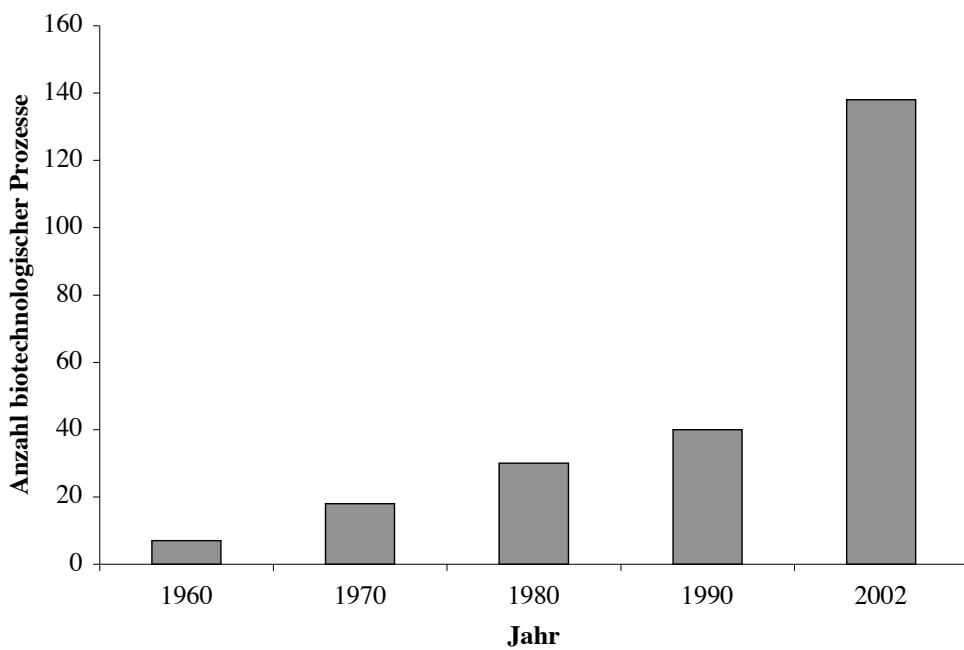


Abbildung 1.1: Anzahl der eingesetzten biotechnologischen industriellen Prozesse

biokatalytischen Prozesse zur Gewinnung von enantiomerenreinen Substanzen, der in Abbildung 1.1 dargestellt ist. Im Jahre 2002 wurden 138 großtechnische, biotechnologische Prozesse in Betrieb genommen [84]. Das wissenschaftliche Interesse an der Bereitstellung enantiomerenreiner Produkte wird besonders durch die Verlei-

hung des Nobelpreises für Chemie im Jahre 2001 an Knowles, Noyori und Sharpless für ihre Pionierarbeiten auf dem Gebiet dokumentiert [51]. Exemplarisch für dieses Forschungsgebiet ist die Konkurrenz bei der Herstellung von enantiomerenreinen Epoxiden und deren korrespondierenden Diolen, um diese sehr interessanten "building blocks" zur Verfügung zu stellen.

Einer der Nobellaureaten, Sharpless, entwickelte 1980 den nach ihm benannten Katalysator, um Allylalkohole enantioselektiv zu epoxidieren [81]. Die Entwicklung dieses Katalysators stellt einen Meilenstein in der Synthese enantiomerenreiner Epoxide dar. Allerdings wird man bedingt durch den Reaktionsmechanismus bei der Eduktwahl auf Allylalkohole beschränkt. Neben der asymmetrischen Synthese ist die kinetische Racematspaltung ein weiteres stark bearbeitetes Arbeitsgebiet. Bei den Epoxiden sind einige Beispiele für die Spaltung verschiedener Racemate mit Hilfe von Epoxidhydrolasen aus unterschiedlichen Zellen bekannt [3], [25], [26]. Besonders hervorzuheben sind die Hydrolasen aus filamentösen Pilzen [3], [45], da sie durch gezielte Anzucht der Mikroorganismen in ausreichenden Mengen zur Verfügung stehen. Als Beschränkungen der Reaktionsführung treten hier die für Ganzzellsysteme typischen Probleme [20], wie geringe Eduktkonzentration und die Wiederverwendbarkeit der Katalysatoren, auf. Von Bedeutung für pharmazeutische Produkte ist außerdem die vollständige Abtrennbarkeit der Mikroorganismen nach der Reaktion. In der Literatur ist eine hohe Anzahl von Substraten für diese Reaktion beschrieben [25], [42], [44], die allerdings alle unter den oben genannten Beschränkungen leiden, so dass eine Optimierung der Reaktionssführung zu einem technisch interessanten Prozess führen kann.

1.2 Problemstellung

Als Modellsystem wird in dieser Arbeit die enantioselektive Biohydrolyse von Styrolepoxid mit den filamentösen Pilzen *Aspergillus niger* und *Beauveria bassiana* untersucht (Abbildung 1.2). Beide enantiomerenreine Produkte sind interessante Zwischenprodukte in der chemischen und pharmazeutischen Industrie [25], [45], [61].

In der vorliegenden Arbeit soll mit verschiedenen Strategien die Reaktionsführung optimiert werden. Hierzu ist ein genaues Verständnis des Reaktionssystems notwendig, um Nebenreaktionen zu unterdrücken und die Enantiomerenüberschüsse anzuheben. Für die Verfolgung des Reaktionsverlaufes wird eine geeignete Analytik aller beteiligten Stoffe etabliert, die es erlaubt das Reaktionssystem vollständig zu erfassen.

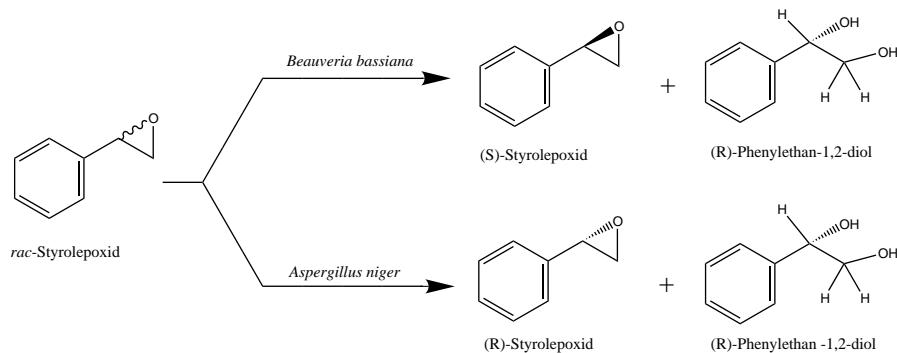


Abbildung 1.2: Stereoselektive Biohydrolyse von Styrolepoxid mit den filamentösen Pilzen *Beauveria bassiana* und *Aspergillus niger*

sen.

Zur Optimierung des Reaktionsverlaufes werden folgende Ansätze verfolgt und gegebenenfalls kombiniert:

- Variation des Reaktionsmediums
- Immobilisation des Biokatalysators
- Aufschluss der Mikroorganismen
- Modellierung des Reaktionsverlaufes

Durch die Verwendung von organischen Lösemitteln als Reaktionsmedium soll die Eduktkonzentration erhöht und gegebenenfalls Nebenreaktionen unterdrückt werden. Die geeignete Immobilisation des Biokatalysators soll eine Wiederverwendung und kontinuierliche Verfahrensweise ermöglichen. Parallel dazu kann ein Aufschluss des Biokatalysators mit anschließender Aufkonzentration des Enzyms und einer Immobilisation zu höherer Raum-Zeit-Ausbeute führen. Es soll mit einem einfachen, auch unter technischen Bedingungen handhabbaren Verfahren gearbeitet werden. Schließlich soll die Modellierung des Reaktionssystems und die Anpassung des Modells an Meßdaten die Modellvorstellung validieren und nicht experimentell zugängliche kinetische Daten liefern. Die Modellbildung soll aus den experimentell ermittelten kinetischen Daten in einem kommerziell erhältlichen Programm erfolgen.

2 Theorie

2.1 Chiralität und Enantioselektivität

Die 1848 von Pasteur entdeckte Stoffeigenschaft der Chiralität [68] tritt bei Molekülen auf, die sich nicht mit ihrem Spiegelbild in Deckung bringen lassen. Auf molekularer Ebene muss hierzu ein asymmetrisches Zentrum oder eine Symmetriearchse C_n vorhanden sein. Das Molekül darf hingegen keine Symmetrieebenen oder Drehspiegelachsen enthalten. Die beiden Moleküle mit spiegelbildlicher Topologie nennt man Enantiomere. Ihre physikalischen Eigenschaften stimmen bis auf die Ablenkung der Drehrichtung der Schwingungsebene von linear polarisiertem Licht überein. Große Unterschiede treten in der Pharmakokinetik und Toxizität der Enantiomeren auf, die mit ihrer verschiedenen Topologie und damit verbundener Wechselwirkungsfähigkeit mit Zellstrukturen zusammenhängen. Für die Verwendung von Wirkstoffen ist die enantiomerenreine Gewinnung und Quantifizierung der Reinheit von größter Bedeutung. Die Reinheit von stereogenen Substanzen wird durch den Enantiomerenüberschuss (ee-Wert) angegeben, der durch die Formel 2.1 definiert ist.

$$ee = \frac{(x_R) - (x_S)}{(x_R) + (x_S)} * 100\% \quad (2.1)$$

Der Enantiomerenüberschuss beträgt bei einem Racemat, einem äquimolaren Gemisch beider Enantiomere, 0% und bei einem rein vorliegenden Enantiomeren 100%.

Die im Verlauf der Reaktion umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Stoffmenge einer bestimmten Komponente wird in der Reaktionstechnik als Umsatzgrad (U oder kurz Umsatz) bezeichnet (Formel 2.2). Sie kann bei einer enantioselektiven Reaktion ebenfalls aus den Enantiomerenüberschüssen des Substrates (ee_s) und des Produktes (ee_p) berechnet werden. Der Umsatz steigt im Verlauf der Reaktion von 0, beim Reaktionsstart, bis auf 1 bei vollständiger Reaktion.

$$U \equiv \frac{n_{i0} - n_i}{n_{i0}} = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \quad (2.2)$$

Für die Bewertung enantioselektiver Reaktionen wird die Enantioselektivität (E-Wert, Formel 2.3) verwendet [28]. Die Enantioselektivität ist für die jeweilige Reaktion eine Konstante unabhängig von den Substratkonzentrationen und dem Umsatz. Sie quantifiziert die Fähigkeit des Katalysators zur Unterscheidung der beiden um einen Katalysatorenplatz konkurrierenden Enantiomeren. Ein E-Wert von 1 entspricht einer unselektiven Reaktion, ab einem Wert von 100 erhält man bei einem

Umsatz von 0,5 ein optisch reines Produkt. In diesem Fall spricht man von einer hochselektiven Reaktion.

$$E \equiv \frac{\left(\frac{V_{max}}{K_M}\right)_R}{\left(\frac{V_{max}}{K_M}\right)_S} = \frac{\ln[(1-U)(1-ee_s)]}{\ln[(1-U)(1+ee_s)]} = \frac{\ln[(1-U)(1-ee_P)]}{\ln[(1-U)(1+ee_P)]} \quad (2.3)$$

Ab einem E-Wert von 20 sind enantioselektive Reaktionen meist präparativ nutzbar, da sich bei einem bestimmten Umsatz ein stark enantiomerenangereichertes Produkt isolieren lässt.

2.2 Gewinnung enantiomerenreiner Epoxide

Enantiomerenreine Epoxide sind interessante Edukte in der organischen Synthese und "building blocks" in der Wirkstoffherstellung. Dank ihrer hohen Ringspannung stellen sie exzellente Reaktionspartner für fast alle Nukleophile dar. Als Strategie zu ihrer Darstellung wurden die asymmetrische Synthese und die kinetische Racematspaltung entwickelt.

Bei der asymmetrischen Synthese wird von einer prochiralen Verbindung ausgegangen. Mit Hilfe von chiralen Reagenzien (chirale Persäuren, chirale Dioxirane oder chirale Borate), chiralen Auxiliaren oder chiralen Katalysatoren gelangt man zu einem chiralen Epoxid [17]. Diese Verfahren sind nicht in allen Fällen hochselektiv. Bei der Reaktion einer chiralen Persäure mit einem trans-Alken ist das Stereozentrum zu weit von den neu zu bildenden Zentren entfernt für eine hochwirksame Wechselwirkung. Erst eine sterisch anspruchsvolle Seitengruppe an dem Alken, die einen der möglichen Übergangszustände stark bevorzugt, ermöglicht hohe Selektivitäten [47]. Die genauere Untersuchung des Mechanismus ergab, dass ein sterischer Einfluss nicht ausreicht, um die Ergebnisse der Reaktion zu erklären. Es wird ein Übergangszustand angenommen, bei dem die eingefügte Seitengruppe die Persäure in der richtigen Position fixiert. Diese Überlegung führte schließlich zu der Idee, Metallkatalysatoren für die Reaktion einzusetzen.

Die wohl bekannteste Reaktion zu einem enantiomerenreinen Epoxid ist die in den 1980er Jahren entwickelte Sharpless-Katsuki-Oxidation, die ausgehend von Allylalkoholen mit Hilfe von *tert*-Butylhydroperoxid und Titan-Tatrat-Komplexen zu den entsprechenden Glycidolen führt. Das bevorzugte Enantiomer kann hierbei über das am Katalysator gebundene Enantiomere des Tatrates bestimmt werden [80], [89].

Die Reaktion führt im Allgemeinen zu hohen Enantiomerenüberschüssen. Die allylische Hydroxidgruppe koordiniert das Substrat am Titanzentrum. Das Tatrat ist ebenfalls am Titan koordiniert und erzeugt eine chirale Umgebung. Die eigentliche Oxidation erfolgt über einen Übergangszustand, an dem das *tert*-Butylhydroperoxid ebenfalls am Titanzentrum koordiniert ist [17]. Die Limitierung des Substrates auf Allylalkohole wird durch den Mechanismus auch theoretisch einsichtig.

Eine Weiterentwicklung der enantioselektiven Epoxidation sind die Katalysatoren nach Jacobsen und Katsuki [35], die in den 1990er Jahren entwickelt wurden. Dabei handelt es sich um eine Katalysatorgruppe, in der ein C₂-symmetrisches Mn(III)-Salen-Zentrum unterschiedlich substituiert ist. In der Literatur wurden über 100 katalytisch aktive Komplexe dieses Types beschrieben [57], von denen der N,N-Bis(3,5-di-*t*-butylsalicylidene)-1,2-cyclohexandiaminomangan(III)chlorid, der sogenannte Jacobsen Katalysator, der effizienteste und meistgenutzte ist. Mittlerweile ist der luftstabile, lange lagerbare Komplex kommerziell erhältlich, was seine Verbreitung in präparativen Laboren weiter vorantreibt. Als Substrate eignen sich konjugierte *cis*-Alkene und di- und trisubstituierte Olefine. Die asymmetrische Epoxidation von *trans*-Alkenen stellt immer noch ein ungelöstes Problem dar.

2.2.1 Kinetische Racematspaltung mit Epoxidhydrolasen

Alternativ zur asymmetrischen Synthese bildet die kinetische Racematspaltung mit Epoxidhydrolasen einen interessanten Zugang zu enantiomerenreinen Epoxiden und deren korrespondierenden Diolen [6]. Nach der Internationalen Kommission für Enzyme werden Epoxidhydrolasen der Klasse EC 3.3.2.3 zugeordnet [48]. Diese spalten eine Etherbindung regio- und enantiospezifisch unter Anlagerung von Wasser. Vicinale *trans*-Diole (Abbildung 2.1) werden so durch eine S_N2 Reaktion gebildet.

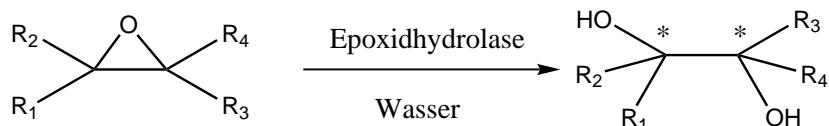


Abbildung 2.1: *Hydrolyse eines Epoxids durch Epoxidhydrolasen*

Epoxide haben einen stark elektrophilen Charakter und sind ein gutes Alkylierungsreagenz. Daraus resultiert ihr Vermögen, den Informations- und Strukturerhalt le-

bender Zellen zu stören [64]. Sie werden zum Beispiel bei dem Abbau von Aromaten über Monooxidasen gebildet [22]. Wegen ihrer Giftigkeit, Cancerogenität und Teratogenität besitzen alle Zellen zu ihrem Schutz Epoxidhydrolasen, die Epoxide zu biologisch weniger problematischen, wasserlöslichen und sehr gut sekretierbaren *trans*-1,2-Diolen umwandeln [25]. In höheren Organismen sind Epoxidhydrolasen daher verstärkt in katabolisch aktiven Organen, wie der Leber, zu finden. Eukaryonten, wie Mammalia- und Pilzzellen, weisen ebenfalls eine nachweisbare Hydrolaseaktivität auf [29]. Neuere Untersuchungen zeigen auch eine Verbreitung der Epoxidhydrolasen in Bakterienzellen [36].

Für die mit Epoxidhydrolasen katalysierte Reaktionen wurde ein Mechanismus vorgeschlagen, der die *trans*-antiperiplanare Addition von Wasser unter Inversion an dem angegriffenen Kohlenstoffatom erklärt (Abbildung 2.2) [25], [27]. An dieser Reaktion sind keine Cofaktoren und auch keine Metallzentren beteiligt.

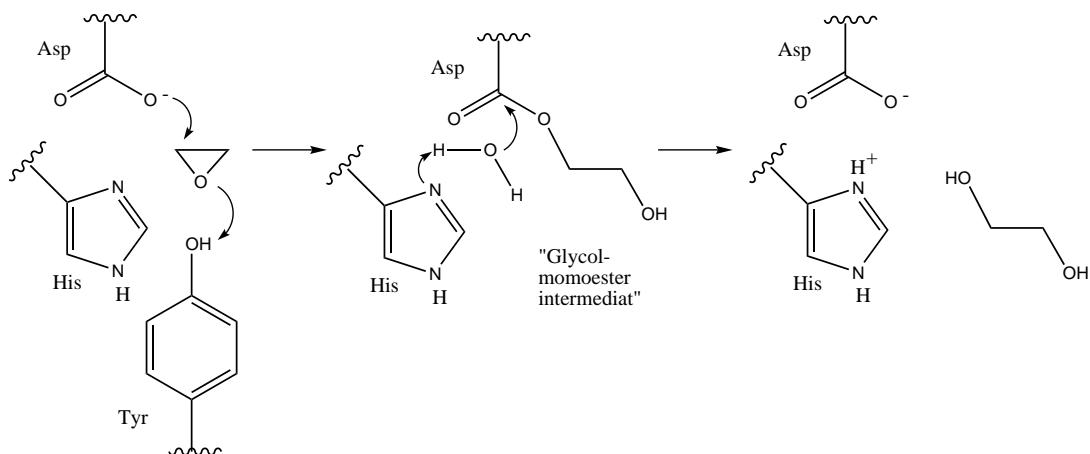


Abbildung 2.2: Mechanismus der Epoxidöffnung mit microsomaler Epoxidhydrolase

Die Carboxylatgruppe des Aspartatrestes der "active site" des Enzyms greift nukleophil den Oxiranring unter Bildung eines Glycolmonoesterintermediats an. Das benötigte Proton wird synchron hierzu von einem Tyrosin übertragen. Im darauf folgenden Schritt wird die Esterbindung des Glycomonoesters basenkatalysiert durch ein Histidinrest hydrolysiert und das Diol von der "active site" abgespalten.

2.2.2 Mikrobiologische Epoxidhydrolasen

Epoxidhydrolasen (EH) aus Mikroorganismen können nach ihrer Herkunft und gleichzeitig nach ihrem Substratmuster in drei Gruppen eingeteilt werden [25]:

- EH aus Rotalgen (Bsp. *Rhodotorula* und *Rhodosporidium* Spezies),
- EH aus Pilzzellen (Bsp. *Aspergillus* und *Beauveria* Spezies),
- EH aus Bakterien (Bsp. *Rhodococcus* und *Nocadia* Spezies).

Während die Epoxidhydrolasen aus Rotalgen die höchste Enantioselektivität mit monosubstituierten Epoxiden zeigen, werden die Epoxidhydrolasen aus Pilzzellen am erfolgreichsten für Styrolepoxid-Typ Substrate eingesetzt. Epoxidhydrolasen aus Bakterien zeigen ihr höchstes katalytisches Potential bei höhersubstituierten 2,2- und 2,3-disubstituierten Epoxiden.

Monosubstituierte Epoxide sind sehr flexibel und bieten wenig Oberfläche für eine chirale Erkennung. Daher sind die Reaktionen der Epoxidhydrolasen mit einer hohen Enantiomerenselektivität die Ausnahme. Die Ringöffnung erfolgt unter dem Angriff des sterisch weniger abgeschirmten Kohlenstoffatoms unter Bevorzugung des (S)-Enantiomeren. Styroloid-Typ Epoxide bilden aufgrund des benzylichen Kohlenstoffatoms eine spezielle Gruppe von Substraten. Durch den aromatischen Ring kann ein Carbeniumion sehr gut resonanzstabilisiert werden. Außerdem ist es sterisch gehindert, so dass mehrere Reaktionswege über Inversion und Retention des Kohlenstoffzentrums möglich sind. Eine klare Bevorzugung eines Enantiomeren ist in dieser Reaktion nicht feststellbar. Sterisch anspruchsvollere Substrate wie 2,2- und 2,3-disubstituierte Epoxide werden von Epoxidhydrolasen mit guten Enantiomerenüberschüssen unter Bevorzugung der (S)-Enantiomere hydrolysiert.

Die komplementäre Enantioselektivität bei der Hydrolyse von Styrolepoxid durch die Pilze *Beauveria bassiana* und *Aspergillus niger*, die in Abbildung 2.3 dargestellt ist, eröffnet die Möglichkeit aus einem racemischen Edukt mittels zweier Biokatalysatoren ein enantiomerenreines Diol zu gewinnen [45].

Für 2,2-substituierte Oxirane konnte ein solches Verfahren durch den Mangel an enantiokomplementär arbeitenden bakteriellen Enzymen nicht etabliert werden. Deshalb wurde auf ein Zwei-Schritt-Mechanismus mit der enzymatischen Öffnung und

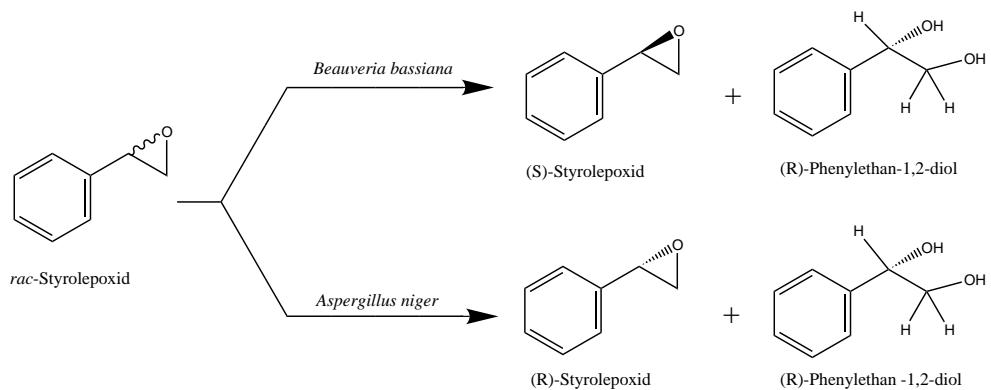


Abbildung 2.3: Enantiokomplementäre Epoxidhydrolyse durch *Beauveria bassiana* und *Aspergillus niger*

mild saurer chemischer Hydrolyse des enantiomerenreinen überbleibenden Epoxids unter Inversion ausgewichen [25].

2.2.3 Substrate filamentöser Pilz-Epoxidhydrolasen katalysierter Reaktionen

Für Reaktionen vom Eduktyp Styroloxid mit Epoxidhydrolasen aus Pilzen als Katalysator wurden verschiedene Substratmuster untersucht, um die Substratbreite zu ermitteln. Abbildung 2.4 zeigt das allgemeine Substitutionsmuster, während in Tabelle 2.2 die Substituenten und die in der Literatur beschriebenen Enantiomerenüberschüsse zusammengefasst sind [25].

Tabelle 2.1: Enantiomerenüberschüsse anderer Substrate

Substrat Nr.	Mikroorganismus	ee _E [%]	U _E [%]	ee _D [%]	U _D [%]	Lit.
1	<i>B. bassiana</i>	98	20	69	48	[44]
2	<i>B. bassiana</i>	98	38	77	49	[44]
3	<i>A. niger</i>	99	43	62	43	[38],[37]
4	<i>A. niger</i>	99	28	65	50	[40]
4	<i>B. bassiana</i>	98	34	83	45	[39]
5	<i>A. niger</i>	96	36	70	48	[4]
6	<i>A. niger</i>	99	40	92	42	[2]

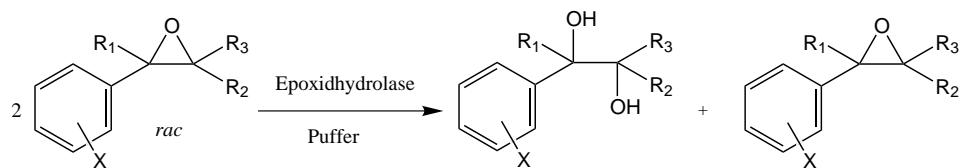


Abbildung 2.4: Reaktionsschema der literaturbeschriebenen Substrate

Tabelle 2.2: Substituenten und Selektivitäten der literaturbeschriebenen Styroloxidtyp-Substrate

R ₁	R ₂	R ₃	X	Mikroorganismus	ee _E [%]	U _E [%]	ee _D [%]	U _D [%]	Lit.
H	H	H	-	<i>A. niger</i>	99	28	65	50	[45]
H	H	H	-	<i>B. bassiana</i>	98	34	83	45	[45]
CH ₃	H	H	-	<i>A. niger</i>	73	13	32	60	[45]
CH ₃	H	H	-	<i>B. bassiana</i>	53	10	10	80	[45]
H	H	CH ₃	-	<i>A. niger</i>	-	-	-	-	[45]
H	H	CH ₃	-	<i>B. bassiana</i>	98	30	90	38	[45]
H	CH ₃	H	-	<i>A. niger</i>	-	-	-	-	[45]
H	CH ₃	H	-	<i>B. bassiana</i>	20	42	99	42	[45]
H	CH ₃	CH ₃	-	<i>A. niger</i>	-	-	-	-	[45]
H	CH ₃	CH ₃	-	<i>B. bassiana</i>	-	-	-	-	[45]
H	H	H	CH ₃	<i>A. niger</i>	95	34	66	-	[2]
H	H	H	CH ₃	<i>B. bassiana</i>	98	30	76	-	[2]
H	H	H	F	<i>A. niger</i>	98	35	81	-	[2]
H	H	H	F	<i>B. bassiana</i>	96	25	78	-	[2]
H	H	H	Br	<i>A. niger</i>	98	34	80	-	[2]
H	H	H	Br	<i>B. bassiana</i>	96	33	79	-	[2]
H	H	H	CN	<i>A. niger</i>	99	38	76	-	[2]
H	H	H	CN	<i>B. bassiana</i>	15	59	50	-	[2]
H	H	H	p-NO ₂	<i>A. niger</i>	98	37	70	-	[46]
H	H	H	p-NO ₂	<i>B. bassiana</i>	20	50	49	-	[46]

Weitere Substrate dieser Epoxidhydrolasenklasse sind bicyclische Systeme (1,2), Limonenenoxid (4), Bower's Reagenz (5) und Verbindungen mit heterocyclischen Aromaten (3), die in Abbildung 2.5 zusammengefasst sind. Die Selektivitäten dieser Reaktionen sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Interessant ist vor allem die Öffnung von Glycidylacetal-Derivaten (6), die zeigen, dass die Epoxidhydrolasen aus filamentösen Pilzen nicht ausschließlich auf Styrolepoxidderivate begrenzt sind.

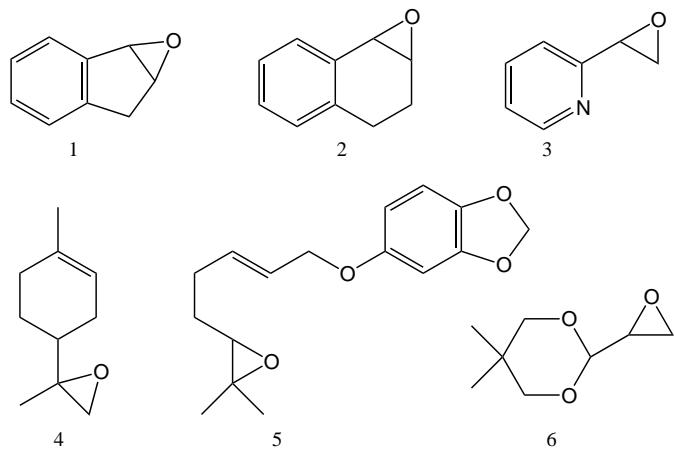


Abbildung 2.5: Weitere Substrate filamentöser Pilzepoxidhydrolasen

2.3 Chirale Analytik

Die Enantiomerenanalytik bildet einen zentralen Bestandteil der Synthese chiraler "building blocks". Aufgrund der wenigen physikalischen Eigenschaften, die bei Enantiomeren unterschiedlich sind, kommen nur recht wenige Verfahren für die Analytik in Frage. Neben der Derivatisierung der Enantiomeren zu Diastereoisomeren und anschließenden klassischen Analytik, z.B. durch HPLC, haben sich die Polarographie, die Kernresonanzspektroskopie und die Chromatographie an chiralen Phasen etabliert. Bei der Wahl des geeigneten Verfahrens müssen folgende Aspekte beachtet werden:

- Größe der verfügbaren Probenmenge
- Anzahl der Proben
- Art und Anzahl der Isomeren
- Art und Anzahl der funktionellen Gruppen für die Derivatisierung und für Wechselwirkungen mit chiralen Phasen
- Anwesenheit von Chromophoren
- Literaturwerte für den spezifischen Drehwert bzw. für die Elutionsreihe der Stereoisomere
- Notwendigkeit der Bestimmung der absolute Konfiguration

2.3.1 Polarographie

Das klassische Verfahren der Enantiomeranalytik beruht auf der Ablenkung der Schwingungsebene von linear polarisiertem Licht durch die Probe. Der Ablenkungsbetrag ist bei beiden Enantiomeren gleich, weist aber das entgegengesetzte Vorzeichen auf. Ein Racemat ergibt somit kein Signal. Hinweise auf die Enantiomerereinheit kann man daher nur bei Kenntnis der spezifischen Rotation der Substanz gewinnen. Eine Weiterentwicklung dieser Methode ist die Optische Rotationsdispersion (ORD) bei der die Ablenkung als Funktion der Wellenlänge gemessen wird. Bei dem Cirkulardichroismus (CD), einer weiteren optischen Methode, muss das Substrat ein Chromophores aufweisen, welches die Messwellenlänge absorbiert. Alle polarographischen Verfahren sind in der Regel nicht automatisierbar, was für ein hohes Probenaufkommen notwendig wäre. Da keine Konzentrationen mehrerer Stereoisomere in einer Messung bestimmt werden können, ist sie eher das Verfahren der Wahl bei Einzelmessungen zur Reproduktion der Literaturwerte und zur schnellen Kontrolle der Stereoisomerenanreicherung.

2.3.2 Kernresonanzspektroskopie in der Stereoisomeranalytik

Bei der Kernresonanzspektroskopie in der Stereoisomeranalytik werden die Enantiomeren der Probe derivatisiert oder solvatisiert, um separierte Signale im Spektrum zu erhalten. Für die Modifikation stehen folgende Methoden zur Verfügung:

- Chirale Derivatisierungsreagenzien (CDA's)
- Achirale Derivatisierungsreagenzien
- Chirale Shiftreagenzien (CSR)
- Chirale Lösemittel (CSA)

Die Vorteile der Verfahren sind die Bestimmung der relativen Konzentrationen der Enantiomeren und die Möglichkeit der Bestimmung der absoluten Konfiguration. Nachteilig ist der Verbrauch an chiralen Reagenzien und der apparative Aufwand. Eine Automation für ein hohes Probenaufkommen ist prinzipiell möglich, bis jetzt aber unüblich. Kernresonanzspektroskopie ist das Verfahren der Wahl für Einzelproben, bei denen die absolute Konfiguration der Stereoisomeren bestimmt werden soll.

2.3.3 Chromatographie an chiralen Phasen

Die Chromatographie an chiralen Phasen beruht auf der Bildung von temporären Diastereoisomeren, die eine unterschiedliche Stabilität und somit unterschiedliches Verweilzeitverhalten in der Säule aufweisen [86]. Die Enantiomeren werden mit der mobilen Phase an der chiralen stationären Phase entlang eluiert. Währenddessen bilden sie mit den funktionellen Gruppen der chiralen stationären Phase Diastereoisomere unterschiedlicher Stabilität (Abbildung 2.6).

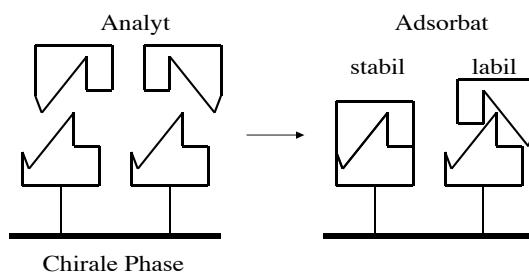


Abbildung 2.6: *Bildung von temporären Diastereoisomeren in der chiralen Chromatographie*

Da das stabile Adsorbat eine höhere Verweilzeit als das labile Adsorbat aufweist, kommt es zur Enantiomerentrennung. Die Konzentrationen der Enantiomeren werden über Verdünnungsreihen mit Standards ermittelt. Dabei können auch Einzelkonzentrationen in Mehrstoffgemischen bestimmt werden. Die Chromatographie an chiralen Phasen ist als gaschromatographisches und flüssigkeitschromatographisches Verfahren etabliert. Sie ist automatisierbar und somit auch für höhere Probenaufkommen das Verfahren der Wahl. Für die stationäre Phase werden in der Regel modifizierte Cyclodextrine, Mehrfachzucker und Peptidphasen verwendet.

2.4 Immobilisierung von Biokatalysatoren

2.4.1 Allgemeine Übersicht

Biokatalysatoren, speziell isolierte Enzyme, sind wasserlösliche globulare Proteine, deren Tertiär- und Quartärstruktur ausschlaggebend für ihre katalytische Aktivität

ist. Alle Enzyme weisen auf ihrer Oberfläche eine Reihe von katalytischen, regulatorischen und Substratbindungszentren auf. Aufgrund dessen sind sie in der Lage, bei moderaten Temperaturen und Drucken in einem neutralen pH-Bereich spezies-, regio- und stereoselektive Reaktionen zu katalysieren. Um diese Eigenschaften für technische Prozesse zu nutzen und energie- und resourcensparende Prozesse zu etablieren, ist es häufig sinnvoll, Biokatalysatoren einzusetzen. Die optimalen Prozessbedingungen liegen jedoch nicht immer im physiologischen Optimum des Enzymsystems. Daher ist es notwendig, Enzyme zum Schutz des Enzymsystems, zur Erhaltung der Aktivität, zur Rückgewinnung und zu örtlichem Zusammenhalt mit einem notwendigen Cofaktorregenerationssystems zu immobilisieren. Immobilisierte Enzyme sind solche, die unter Erhaltung ihrer katalytischen Aktivität physikalisch oder chemisch an Trägermaterialien gebunden sind, so dass sie wiederholt oder kontinuierlich genutzt werden können [48]. Nach dieser Definition lassen sich die Immobilisierungsarten wie in Abbildung 2.7 gliedern.

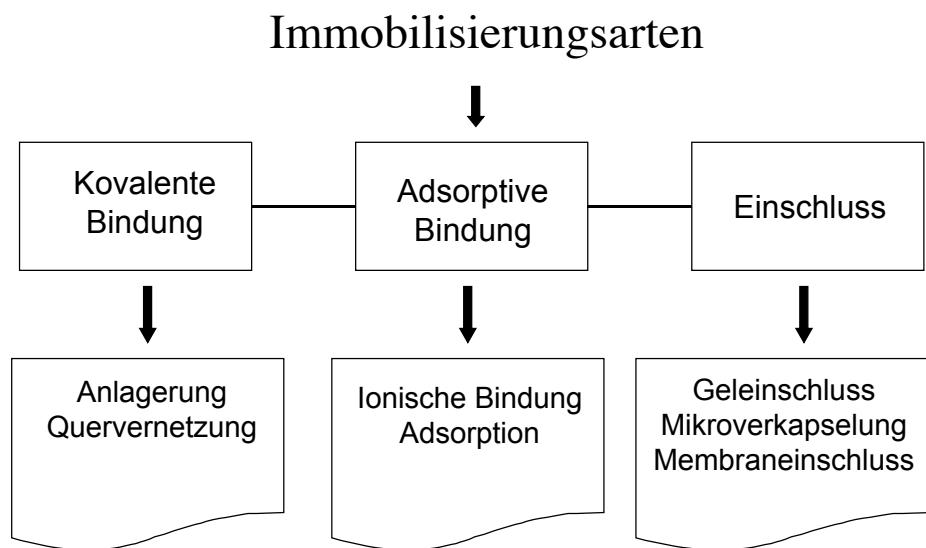


Abbildung 2.7: Gliederung der wichtigsten Immobilisierungsarten

Vorteile der Immobilisierung sind die gute Wiedergewinnbarkeit bzw. Zurückhaltbarkeit in kontinuierlichen Reaktoren, mechanische Stabilität und gute Dosierbarkeit der Biokatalysatoren. Weniger offensichtliche Vorteile sind die Trennung der Enzym-

proteine von der Produktphase, Schaffung einer Mikroumgebung mit optimaleren Reaktionsbedingungen für den Katalysator und gegebenenfalls der räumliche Zusammenhalt von Cofaktorregenerierung und cofaktorverbrauchender Reaktion. Die resultierenden Nachteile entsprechen denen der heterogenen Katalyse, wie teurer Katalysator durch den vorgeschalteten Immobilisierungsschritt und ein Stofftransportwiderstand an den aktiven Katalysezentren. In der Biokatalyse werden häufig die Quervernetzung von Enzymen mit Glutardialdehyd, die Bindung an Ionentauscherharzen und die Verkapselung von Enzymen und Zellsystemen in geeigneten Matrices angewandt [50].

2.4.2 Verkapselung von Biokatalysatoren

Der Einschluss oder die Umhüllung von Biokatalysatoren mit einer polymeren Matrix wird als Verkapselung bezeichnet. Hierfür sind vier Herstellungsprinzipien etabliert:

- Polyanionen-Polykationenkomplexe (Bsp. Sulfoethylcellulose, Chitosan),
- Fällung durch mehrwertige Ionen (Bsp. Alginat in Ca^{2+}),
- Sol-Gel-Verfahren (Bsp. Poly(alkoxysilanole)),
- Stabilisierung durch Trocknung und Zugabe mehrwertiger Ionen (Bsp. Polyvinylalkohole).

Zur Herstellung von Polyanionen-Polykationenkomplexen wird der Katalysator mit einer Polyanionenlösung vermischt und in die Polykationenlösung eingetropft. Durch Bildung einer Membran an der Oberfläche kommt es zur Ausbildung von Hohlkugeln mit einem Durchmesser von 1,5 bis 5 mm. Die Partikelgröße kann durch die Tropfengröße eingestellt werden.

Bei der Fällung von mehrwertigen Ionen wird die Katalysator-Polyanionenlösung in ein Fällbad mit mehrwertigen Kationen getropft. Die Partikelgröße wird ebenfalls durch die Tropfengröße bestimmt. Die Immobilisate können je nach Fällungsdauer eine Umhüllungsmembran aufweisen oder durchgeliert werden.

Monodisperse Tropfen für beide Immobilisierungsverfahren werden durch das Vibrating Nozzle-Verfahren oder durch einen Strahlschneider erzeugt [72]. Bei dem Vibrating Nozzle-Verfahren wird die Zubereitung durch eine schnell schwingende Düse

gedrückt. Durch die Schwingungen zerreißt der Flüssigkeitsstrom in monodisperse Tropfen, die durch eine elektrostatische Aufladung an der Integration in der Luft gehindert werden. Die Tropfengröße kann sowohl durch den Durchmesser als auch durch die Schwingungsfrequenz der Düse eingestellt werden. Dabei werden Tröpfchen von 0,1 bis 1,5 mm erzeugt. Bei der Strahlschneidung wird der Flüssigkeitsstrom durch ein rotierendes Rad mit Schneidelementen zerteilt. Hier wird die Tropfengröße ebenfalls durch die Düsengröße und zusätzlich durch die Geschwindigkeit des Schneiderades bestimmt. Dieses Verfahren ist für technische Einsatzgebiete für Teilchen mit einem Durchmesser von 150 nm bis 3 mm geeignet.

Die Sol-Gel-Verfahren zur Verkapselung von Biokatalysatoren beginnen wie das klassische Sol-Gel Verfahren mit der Herstellung eines Precursors [8]. Ein Alkylsilikat, ein Alkoximetallat oder ein Alkoxisilan wird zu Alkoxiderivaten hydrolysiert und in einer Kaskade von Kondensationsreaktionen zu einem wasserlöslichen kolloidalen phasenseparierten Polymer umgesetzt. Dieses Kolloid wird mit dem Katalysator vermischt und bildet die Matrix des Immobilisates. Es kann durch die verschiedenen Verfahren zu Immobilisaten geformt werden. Als letzter Schritt erfolgt die Sol-Gel-Umwandlung und gegebenenfalls Trocknung zum Xerogel.

Das in dieser Arbeit verwendete Verfahren basiert auf der Trocknung und anschließender Stabilisierung durch mehrwertige Ionen. Der Katalysator wird mit einer geschmolzenen Polyvinylzubereitung vermischt, auf eine Unterlage aufgetropft und die erzeugten Partikel anschließend getrocknet [49], [91]. Bei einem bestimmten Feuchtigkeitsgehalt konkurrieren zwei in der Zubereitung vorhandenen PVA-Phasen um die verbleibende Feuchtigkeit und es kommt zur Gelierung.

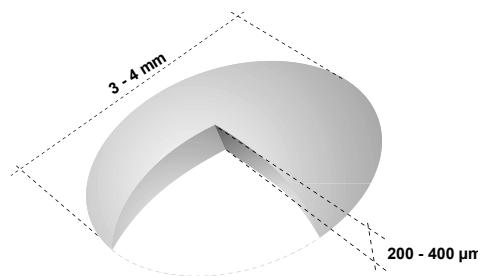


Abbildung 2.8: Schema eines Polyvinylalkoholimmobilisats

Die Partikel klären dabei sichtbar auf. Zur endgültigen Verfestigung werden die geätzten Partikel mit einer Salzlösung mehrwertiger Ionen stabilisiert. Der Katalysator ist in eine geätzte Matrix verkapselt. Durch die Verarbeitung resultiert eine Linsenform, die in Abbildung 2.8 dargestellt ist [92], [93]. Die Partikelbildung kann im Labor durch eine Spritze oder einen Stempel erfolgen. Technisch werden die Partikel mittels Düsen auf ein Trockenband abgelegt, welches in einem Fällbad endet. Erste technische Anwendungen zeigen eine sehr hohe Standzeit der Immobilisierungsmatrix. Immobilisierte Denitifizierer konnten 9 Monate in einer Klärstufe eingesetzt werden [19]. Für die Herstellung von Difructoseanhydrid (DFA III) aus Inulin als Waschmittelzusatz und Kuststoffweichmacher ist die Produktion über immobilisierte, genetisch veränderte Mikroorganismen in der Entwicklung [56].

2.5 *Beauveria bassiana* und *Aspergillus niger* in der organischen Synthese

Die in dieser Arbeit verwendeten Pilze *Beauveria bassiana* und *Aspergillus niger* werden neben der stereoselektiven Öffnung verschiedener Epoxide auch als Biokatalysatoren für einige andere Reaktionen verwendet [42], [45].

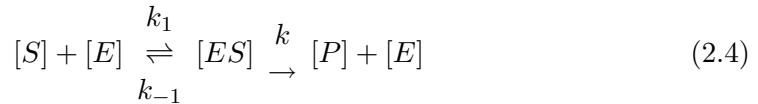
Aspergillus niger wird zur Fermentation von Rübenkraut zur Zitronensäuregewinnung in Submerskulturen eingesetzt [18]. Dieses Verfahren stellt eine Weiterentwicklung einer Oberflächenfermentation dar, bei der aus Kohlenhydratgemischen Zitronensäure gewonnen wird. Die hierbei auftretenden Störungen durch anorganische Verbindungen, die in dem als Rohstoff gewünschten Rübenkraut vorhanden sind, wurden durch gezielte Feed-Strategien umgangen. Großtechnisch wird *Aspergillus niger* samt Mutantenstämmen ebenfalls für die Fermentation von Glucose zu Gluconsäure in stark saurer Lösung eingesetzt [70]. Dieses Verfahren bietet einige Vorteile gegenüber bakteriellen Ansätzen, da bei diesen Biotransformationsbedingungen ein geringeres Kontaminationsrisiko durch Konkurrenten besteht.

Beauveria bassiana wurde von Petch 1914 als Parasit auf einer Seidenwurmlarve isoliert [85], [71]. Hieraus ergaben sich die Versuche, ihn zur biologischen Insektenvertilgung einzusetzen [31], [53]. In der Literatur der Biokatalyse sind die Reduktion von α, β -ungesättigten Ketonen [59], die Modifikation von Imipraminen mit polaren Gruppen [55], die Glycolisierung von phenolischen Hydroxylgruppen [60] und die Oxygenierung von Dialkylbenzen [88] mittels *Beauveria bassiana* als Katalysator beschrieben. Gerade bei der Reduktion von α, β -ungesättigten Ketonen wurde eine

Vielzahl von Verbindungen mit einer Cyclohex-2-en-1-on ähnlichen Struktur untersucht mit dem Ziel stereo-selektiv Carvone zu reduzieren. Dabei ergaben sich hohe Stereoselektivitäten bei den korrespondierenden gesättigten Ketonen, wenn ein asymmetrisches Kohlenstoffatom gebildet wird. Eine hohe katalytische Aktivität wurde ebenfalls bei der Reduktion strukturähnlicher α, β -ungesättigter Aldehyde beschrieben.

2.6 Modellierungsbeispiele in der Biokatalyse

In der Biokatalyse wurden bereits zahlreiche Prozesse modellhaft erfasst und optimiert. Im einfachsten Fall wird die Kinetik des Reaktionssystems ermittelt und an die gemessenen Reaktionsverläufe angepasst. Für Enzymsysteme wird dabei häufig die Michaelis-Menten-Kinetik oder von ihr abgeleitete Ansätze verwendet [13]. Ein vorgeschaltetes Gleichgewicht (Formel 2.4) zur Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes und eine anschließende irreversible Enzymreaktion bilden den Ausgangspunkt der Herleitung.



$$\frac{\delta c_S}{\delta t} = \frac{V[S]}{\frac{k_1}{k_1 + [S]} + [S]} = \frac{V[S]}{K_d} + [S] \quad (2.5)$$

In der Literatur wurden mehrere abgeleitete Ansätze für Gleichgewichtsenzymreaktionen oder Mehrsubstratreaktionen dargestellt [1]. Diese Ansätze können auch für freie Enzyme in homogenen Reaktionsmedien verwendet werden. Bei immobilisierten Enzymen muss zusätzlich der Stofftransport an den Katalysator beachtet werden. Meist sind die immobilisierte Biokatalysatoren an der Oberfläche der Immobilisatpartikel gebunden. Diese Partikel schwimmen in einer homogen durchmischten Bulkphase oder werden als Festbett-packing durchströmt. In diesen Verfahren wurden bisher ausschließlich kugelförmige Partikel modelliert, da sie sich mathematisch gut beschreiben lassen. Zur Vereinfachung wird nur ein Kugelsegment berechnet, was die Rechenzeiten begrenzt und ausreichende Informationen über die zu untersuchenden Partikel ergibt. Die Kerngleichungen der Modelle sind die Kinetiken der Hauptreaktion und ein Stofftransportterm an den Katalysator.

Hilker modellierte die Epoxidation von ungesättigten Pflanzenölen mittels oberflächenimmobilisierter Lipase B von *Candida antarctica* [54]. Das Enzym ist in diesem

Prozess auf der Oberfläche eines kugelförmigen Ionenaustauscherharzes immobilisiert. Das Reaktionssystem besteht aus der Bildung der Persäure aus Carbonsäuren und Wasserstoffperoxid und der eigentlichen enzymatischen Prileschajew-Reaktion. Vor der Persäurebildung ist eine Gleichgewichtseinstellung vorgeschaltet, bei der die organische Reaktionsphase aus einer wäßrigen Lösung mit Wasserstoffperoxid gesättigt wird. Die Deaktivierung der Enzyme bei bestimmten Reaktionsbedingungen wird ebenfalls in dem Modell berücksichtigt. Dieses "overall-kinetic" Modell beschreibt den untersuchten Prozess ausreichend für eine Simulation bei verschiedenen Reaktionsbedingungen.

Ein weiteres interessantes Modell für immobilisierte Biokatalysatoren ist das "dead core" Model [21]. Cruz modellierte die Cephalosporin C Bildung während einer speziellen Mangelwachstumsphase von *Cephalosporium acremonium* in kugelförmigen Alginatgelperlen. Die Modellbildung ergab, dass die aktiven Zellen in dieser speziellen Wachstumsphase nur in einer äußeren Hülle des Immobilisates vorliegen. Die berechneten Sauerstoffprofile zeigen deutlich, dass nur eine äußere Schale in dieser Wachstumsphase vorhanden ist. Die berechneten Profile konnten mittels Scanning Elektronenmikroskopie (SEM) bestätigt werden.

3 Experimentelles

3.1 Analytik

3.1.1 Bestimmung der Styrolepoxid-Stereoisomeren

Die Konzentrationen der Styrolepoxidenantiomeren wird mittels chiraler Gaschromatographie ermittelt. 2 mL der wässrigen Reaktionsbrühe werden mit demselben Volumen Hexan extrahiert. Das Extrakt wird über Natriumsulfat getrocknet und gaschromatographisch vermessen. Hierzu wird ein Chrompack CP 2002 Gaschromatograph mit einem Probenaufgabesystem Modell 911 genutzt. Als Trennsäule wird eine 12,5 m lange, modifizierte Cyclodextrinsäule [Heptakis-(6-O-butyldimethylsilyl-2,3-di-O-methyl)- β -cyclodextrin] verwendet. Helium mit einem Fluß von 20 mL/min, einem Druck von 100 kPa und einem Splitverhältnis 1:20 wird als mobile Phase verwendet. Es werden jeweils 5 μ L Probe bei einer Injektortemperatur von 230°C aufgegeben. Die getrennten Enantiomeren werden mit einem Flammenionisationsdetektor erfasst. Die Datenaufnahme und Auswertung erfolgt mit dem Programm Maitre Chromatography Data System Version 2.5 der Firma Chrompack. Bei der isothermen Analyse bei 90°C hat das (R)-Styrolepoxid eine Retentionszeit von 9,05 min und das (S)-Enantiomeres basisliniengrenzt eine Retentionszeit von 9,75 min. Die Integrale der Signale ergeben bei einem Racemat ein Verhältnis von 1:1. Die Bestimmung der Konzentrationen in den Proben erfolgt über die Aufnahme einer Kalibriergeraden bestehend aus drei Standards (0,25 g/L, 0,5 g/L und 1,0 g/L rac-Styrolepoxid mit den gleichen Konzentrationen Phenylacetaldehyd).

3.1.2 Bestimmung der 1,2-Phenylethandiol-Stereoisomeren

Die Konzentrationen der Enantiomeren des 1,2-Phenylethandiols werden mittels chiraler HPLC bestimmt. Es wird ein Merck-Hitachi Lachrom System mit folgenden Komponenten verwendet: Pumpe L7100, Degaser L7612, Autosampler L7200, UV-VIS Detektor L7420 und Interface D7000. Zur Trennung der Diole wird die Säule Chiracel OB-H der Firma Daicell verwendet. Es wird ein isokratischer Fluss von 0,6 mL/min bestehend aus 91% Hexan und 9% Isopropanol angelegt. Die Detektion findet bei einer Wellenlänge von 219 nm (Absorptionsmaximum) statt. Die Datenaufnahme und Auswertung erfolgt mit Hilfe der Software "HPLC System Manager 7000" der Firma Hitachi in der Version 4.0. Die Bestimmung ergibt eine Retentions-

zeit von 22,6 min für das (R)-Enantiomere und von 28,5 min für das (S)-Enantiomere. Styrolepoxid weist eine Retentionszeit von 15,8 min auf, wird aber nicht in die Enantiomeren getrennt. Die Bestimmung der Konzentrationen in den Proben erfolgt über die Aufnahme einer Kalibriergeraden bestehend aus drei Standards (0,25 g/L, 0,5 g/L und 1,0 g/L rac-1,2-Phenylethandiol).

3.1.3 Messung der Phenylacetaldehydkonzentration

Phenylacetaldehydkonzentrationen werden ebenfalls wie die Styrolepoxidkonzentrationen gaschromatographisch bestimmt. Die Retentionszeit in dem oben beschriebenen System beträgt 10,65 min.

3.1.4 Messung des gesamten organischen Kohlenstoffgehaltes in Lösungen

Der gesamte organische Kohlenstoffgehalt der Fermentationsbrühe wird als Maß der Glucosekonzentration in den Wachstumskurven verwendet. Er wird mittels eines Wasseranalysators Dimatoc100 (Dimatec Analysentechnik GmbH) ermittelt. Das Meßprinzip beruht auf der thermisch-katalytischen Oxidation von kohlenstoffhaltigen Verbindungen. Das entstehende Kohlenstoffdioxid wird mittels eines Infrarotdetektors quantitativ erfasst. Die Bestimmung des TC-Wertes erfolgt bei 850°C und 8 L/min Trägergasstrom mir dem TC-Kugelkatalysator (Nr.G3195, Dimatec) und Platinwolle. Der TIC Kanal arbeitet bei 160°C und mit dem TIC-Katalysator Nr. G3250 (Dimatec). Die Probe der Fermentationsbrühe wird mit VE Wasser 1:100 verdünnt (Meßbereich C-Konzentration kleiner 10 mg/L) und durch einen Faltenfilter partikelfrei filtriert. Die so vorbehandelte Probe wird mittels TC- (total carbon) und TIC-Kanal (total inorganic carbon) vermessen. Der TOC-Gehalt, der als Maß für den verstoffwechselbaren Glucosegehalt angenommen wird, ergibt sich aus der Differenz des TC- und TIC-Gehaltes.

3.1.5 Strukturbeweis der Produkte mittels NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren werden mit dem NMR-Spektrometer Bruker ARX 200 (200/50 MHz) gemessen. Als Lösemittel wird deuteriertes Chloroform verwendet. Es ergeben sich die in Tabelle 3.1 angegebenen Verschiebungen.

Tabelle 3.1: NMR Daten der Edukte und Produkte

Verschiebung	Signalart	Protonen
Styrolepoxid		
7,3 ppm	m	Aromatenprotonen
3,9 ppm	q	Protonen am sekundären Epoxidkohlenstoff
2,8 und 3,2 ppm	q	Protonen am primären Epoxidkohlenstoff
1,2-Phenylethandiol		
7,3 ppm	m	Aromatenprotonen
3,9 ppm	s	Protonen am sekundären Alkoholkohlenstoff
2,8 und 3,1 ppm	t	Protonen am primären Alkoholkohlenstoff
1,2 und 1,4 ppm	t	Alkoholprotonen
Phenylacetaldehyd		
7,3 ppm	m	Aromatenprotonen
3,7 ppm	d	Protonen am sekundären Seitenkettenkohlenstoff
9,8 ppm	t	Protonen am Aldehydkohlenstoff
Epoxypropyl-isopropylether		
3,5 ppm	d	Protonen am sekundären Seitenkettenkohlenstoff
3,19 ppm	m	Protonen am tert. i-Propylkohlenstoff
2,8 ppm	q	Protonen am sekundären Epoxidkohlenstoff
2,5 ppm	q	Protonen am primären Epoxidkohlenstoff
1,16 ppm	m	Protonen an den Methylgruppen des i-Propylrestes
Epoxypropyl-phenylether		
7,3 ppm	m	Aromatenprotonen
4,2 und 4,1 ppm	m	Protonen an der Kohlenstoffkette
3,9 ppm	q	Protonen am sekundären Epoxidkohlenstoff
2,8 ppm	q	Protonen am primären Epoxidkohlenstoff
Benzylloxiran		
7,3 ppm	m	Aromatenprotonen
2,68 ppm	m	Protonen an der Kohlenstoffkette
2,92 ppm	q	Protonen am sekundären Epoxidkohlenstoff
2,5 ppm	q	Protonen am primären Epoxidkohlenstoff

3.1.6 Messung der Kohlenwasserstoffkonzentration in der Gasphase

Zur Ermittlung der Kohlenwasserstoffkonzentration in der Gasphase wird ein Flammenionisationsdetektor (Bernath Atomic Modell 3006) eingesetzt. Als Umrechnungsfaktor wird der Strukturfaktor von Styrol verwendet. Bei Versuchen in Fermentern wird aus dem Volumenstrom der Begasung und dem Meßwert die ausgegaste Stoff-

menge berechnet.

3.1.7 Messung der Biotrockenmasse

Die Biotrockenmasse wird durch Einwaage von ca. 0,5 g der abgesaugten Pilzprobe, Trocknung bei 102°C bis zur Massenkonstanz (24 h) und Zurückwägung bestimmt. Es wird davon ausgegangen, dass die Trockenmasse des Pilzes bei identischen Anzucht- und Erntebedingungen als Maß für die Zellzahl verwendet werden kann.

3.2 Biokatalyse

3.2.1 Pilzkulturen

Es werden Pilzkulturen *Beauveria bassiana* (DSM 1344) und *Aspergillus niger* (DSM 823), die bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen hinterlegt sind, verwendet.

3.2.2 Biomassenanzucht

Die Biomasse wird in Fermentern (1-4,5 L Nutzvolumen) mit einer Nährlösung aus 20 g/L Corn Steep Liquor (Sigma C-4648) und 10 g/L Glucose herangezogen. Zur Verhinderung der Schaumbildung wird 1 mL Antischaummittel (Antifoam O-30, Sigma A-8082) hinzugegeben. Die hitzesterilisierte Suspension wird auf 27°C temperiert und mit sterilfiltrierter Luft (3 L/min) begast. Zum Animpfen wird pro Liter Nährlösung 1 cm² einer 7 Tage alten Pilzkultur auf Sabourand 2% Glucose Agar (Merck) hinzugegeben. Nach 72 h (*Beauveria bassiana*) und 66 h (*Aspergillus niger*) Inkubationszeit wird der Pilz durch Zentrifugation (5 min bei 10000 U/min) isoliert.

3.2.3 Messung der Wachstumskurven

Die Wachstumskurven der beiden Pilzkulturen werden in dem 4,5 L Nutzvolumenfermenter aufgenommen. 4,5 L der Standardnährösung (siehe 3.2.2) werden angeimpft und bei 27°C inkubiert. In regelmäßigen Abständen werden die Parameter pH- und

pO_2 mittels Elektroden bestimmt. In den gleichen Intervallen werden Kulturproben über das Heberohr gezogen und der TOC-Wert (siehe Abschnitt 3.1.4) und die Biotrockenmasse (siehe Abschnitt 3.1.7) bestimmt. Zum Ende der exponentiellen Phase, mehrfach in der stationären Phase und am Anfang der Absterbephase wird etwas Biomasse isoliert und auf Epoxidhydrolaseaktivität entsprechend Kapitel 3.2.4 beschrieben untersucht.

Die Optimierung der Wachstumstemperatur wird mittels eines temperierbaren Schüttelinkubators (IKA KS130) mit Thermoaufsatz durchgeführt. In Probenröhrchen mit 5 mL Standardnährlösung wird nach Animpfung mir einer Zellsuspension 2 Tage bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Anschließend wird die Biotrockenmasse wie in Kapitel 3.1.7 beschrieben bestimmt.

Zur Optimierung der Nährbodenkonzentration werden in 100 mL Erlenmeyerkolben jeweils 50 mL Nährlösung mit den im Ergebnisteil angegebenen Konzentrationen angesetzt. Die Animpfung erfolgt mit 100 μ L einer gut durchmischten Zellsuspension, die aus 1 mL Ringerlösung, 100 μ L SDS-Lösung und 2 Impfösen Pilzzellen einer 3 Tage alten Agarkultur besteht. Nach einer Inkubationsdauer von 3 Tagen wird die Biomasse isoliert und die Biotrockenmasse bestimmt. Die Hydrolyseaktivität wird durch Reaktion mit 1 g der Biofeuchtmasse in 20 mL Phosphatpuffer und 20 μ L Styrolepoxid untersucht.

3.2.4 Biohydroyse mit freiem Pilz

Generelle Vorgehensweise:

Die stereoselektiven Hydrolysen werden in 100 mL Erlenmeyerkolben in einem Schüttelinkubator (Braun B Biotech) bei 170 H/min und 27°C durchgeführt. Es werden, wenn nicht anders vermerkt, 50 mL eines 0,1 mol/L Phosphatpuffers pH 7 und 2 g Biofeuchtmasse eingesetzt. Zur Reaktionskontrolle werden je 2 Proben a 2 mL Reaktionsbrühe entnommen und mit 2 mL Hexan (Edukt) oder 2 mL Dichlormethan (Produkt) extrahiert.

Abweichungen für spezielle Fragestellungen:

Bei der Analyse des Reaktionssystems im Detail wird die Reaktion wie oben beschrieben durchgeführt. Als Edukt wird jedoch enantiomerenreines Styrolepoxid verwendet. Die Rückreaktion wird durch Verwendung von enantiomerenreinem 1,2-

Phenylethandiol untersucht.

Zur Messung der Inhibition der Reaktion wird zusätzlich zum Edukt 1,2-Phenylethandiol in den untersuchten Konzentrationen vorgelegt.

Die Wahl der geeignetesten Reaktionsmedien wird durch die Biohydrolyse, wie oben beschrieben, in verschiedenen Puffern bei verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Der Vergleich verschiedener Puffersysteme wird bei pH 8 vorgenommen. Es wird Kalium-, Natriumphosphatpuffer, TRIS-HCl-Puffer, Ringerlösung und VE-Wasser verwendet. Natriumphosphatpuffer wird in den Konzentrationen 1; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05 mol/L eingesetzt. Die Puffer werden aus laborhandelsüblichen Chemikalien in p.a. Qualität hergestellt.

Für die Messung der Reaktion im Detail wird in einem 1000 mL Erlenmeyerkolben 30 g Biofeuchtmasse in 500 mL Phosphatpuffer pH 8 suspendiert und zu Beginn der Reaktion mit 0,5 mL Styrolepoxid beschickt. Zur Reaktionskontrolle werden in dichten Abständen (zu Beginn alle 5 Minuten ansteigend auf 60 min Abstände) Proben, wie bereits oben beschrieben, entnommen, aufgearbeitet und vermessen. Die Ausgasung wird durch Messung der Kohlenwasserstoffkonzentration in der Gasphase mittels FID angenähert. Zur Verringerung des Eduktverlustes durch Ausgasung wird der Versuch zusätzlich in verschließbaren Flaschen durchgeführt. Für die Modellanpassung werden Meßkurven mit 200 mL Puffer pH 8 mit 12 g Biofeuchtmasse in einem verschlossenen Reaktionsgefäß aufgenommen. 160 μ L Styrolepoxid werden in dem gleichen Volumen Ethanol gelöst und kurz vor der Zugabe des Biokatalysators mittels Ultraturax in der Reaktionslösung vollständig gelöst. Die genaue Anfangskonzentration wird mittels GC und HPLC wie zuvor beschrieben bestimmt.

3.2.5 Biohydrolyse mit gefriergetrocknetem Pilz

Für die Gefriergetrocknungsversuche werden 3 g des abgesaugten Pilzes bei -20°C eingefroren und anschließend in der Gefriergetrocknung (Christ Alpha 1-2LD) am Ölpumpenvakuum bei 0,45 mbar über Nacht getrocknet. Das Gasbalastventil wird zur Endtrocknung für 30 min geschlossen und die Biomasse bei Maximalvakuum getrocknet. Anschließend wird die entsprechende Reaktionslösung nach Beendigung des Trocknungsvorganges schnell hinzugegeben.

Glycerin (10 mL Zellsuspension mit 3 g Biofeuchtmasse in Wasser mit 10% Glycerin)

wird bei der Gefrieretrocknung von *Beauveria bassiana* als Schutzstoff hinzugegeben und die Suspension 60 min auf dem Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wird die Zubereitung eingefroren und wie oben beschrieben gefriergetrocknet. Es wird ein Ansatz mit 0,5% Na-*L*-Ascorbat (Goldblume Handelsgesellschaft) als Antioxidans angesetzt. Als weitere Variante wird eine Zellsuspension in einer Lösung mit 20% Magermilchpulver (Sucofin Magermilchpulver) mit 0,5% Na-*L*-Ascorbat verwendet.

Zur Untersuchung der Lagerstabilität des gefriergetrockneten Pilzes wird 1 g Biotrockenmasse, die bei 20°C unter Luftabschluss gelagert wird, mit 2 mL Phosphatpuffer pH 8 analog der Reaktion mit freiem Pilz durchgeführt. Nach einer Stunde Reaktionszeit wird die Suspension in zwei Hälften geteilt und wie in Kapitel 3.1 beschrieben extrahiert und analysiert.

3.2.6 Biohydrolyse in organischen Lösemitteln

Die Biohydrolyse in organischen Lösemitteln wird wie unter 3.2.4 beschrieben durchgeführt. Statt Wasser wird das entsprechende Lösemittel in Synthesequalität oder ein Lösemittel-Wasser-Gemisch verwendet. Die Analytik der getrockneten Lösemittelproben erfolgt direkt, während die Untersuchung der Proben aus den Lösemittel-Wasser-Gemischen nach einer Extraktion stattfindet.

3.2.7 Bestimmung der Autohydrolyse- und Folgereaktion

Die Autohydrolyse wird durch Vorlage von Phosphatpuffern im pH-Bereich von 6,5-9 in verschließbaren Flaschen mit 100 mL Volumen gemessen. Nach Zugabe von 1 g/L Styrolepoxid wird der Reaktionsansatz auf einem Schüttelinkubator bei 170 H/min durchmischt. Die Reaktionskontrolle findet wie unter 3.1 beschrieben statt. Zur Untersuchung der Folgereaktion wird statt des Styrolepoxids zum Reaktionsstart 1 g/L 1,2-Phenylethandiol zu den pH-Puffern hinzugegeben. Die entnommenen Proben werden zur Reaktionskontrolle mit Dichlormethan extrahiert und mittels HPLC vermesssen.

3.3 Immobilisierung

3.3.1 Verkapselung der Biokatalysatoren in eine Polyvinylalkoholmatrix

Die Biokatalysatoren werden nach dem Verfahren der Firma GeniaLab (Braunschweig) in Polyvinylalkohol zu sog. LentiKats[®] verkapselt [49]. Hierzu wird eine Suspension von 3 g isolierter Biomassse in 20 mL Ringerlösung mit 80 mL PVA Zubereitung verarbeitet. Das PVA wird entsprechend der Herstellerangaben bei 80°C vollständig geschmolzen, auf 30°C temperiert, mit der Biokatalysatorsuspension vermischt und verarbeitet. Zur Bilanzierung wird die PVA/Biokatalysatorsuspension mittels einer Spritze mit Kanüle auf Polystyrolpetrischalen zu 3 mm großen Tropfen aufgegeben. Für größere Ansätze wird eine Stempelvorrichtung (LentiKatPrinter, GeniaLab, Braunschweig) verwendet. Hierbei wird mittels einer Stempelplatte mit 400 gleichmäßigen Metallstiften aus einem Bad PVA/Biokatalysatorsuspension entnommen und auf Polystyrolpetrischalen abgestreift. Die nach beiden Verfahren gewonnenen Partikeln werden in der Cleanbench auf 20% ihres Gewichtes getrocknet (ca. 90 min). Die linsenförmigen Partikel werden anschließend in einer mitgelieferten Salzlösung unter Rühren 2 h stabilisiert.

3.3.2 Biohydrolyse mit Immobilisaten

Die stereoselektiven Hydrolysen werden in 100 mL Erlenmeyerkolben in einem Schüttelkubator (Braun B Biotech) bei 170 H/min und 27°C durchgeführt. Es werden, wenn nicht anders vermerkt, 50 mL eines 0,1 mol/L Phosphatpuffers pH 7 und die oben gewonnene Masse an Immobilisat eingesetzt. Die Reaktionskontrolle wird analog der Biohydrolyse mit freiem Pilz durchgeführt.

3.3.3 Bestimmung des Diffusionsmechanismus

Die PVA-Oberfläche wurde mit einem Rasterelektronenmikroskop (Joel Typ 640F, Uni-Bielefeld) untersucht.

Die Untersuchung auf Poren im Bereich zwischen 2-100 nm wird nach dem Verfahren der Thermoporometrie [63], [69] mit dem Differential Scanning Calorimeter Pyris 1 der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Für die Bestimmung wurden 30 mg des PVA's in einen Aluminiumiegel (PE 0219-0041) gefüllt und ausreichend Überschusswasser

hinzugegeben. Zuvor wurde das PVA gründlich in VE-Wasser gewaschen. Die Probe wurde in dem Meßbereich von -30°C bis 2°C mit einer Aufheizrate von $0,5^{\circ}\text{C}$ vermessen.

3.3.4 Bestimmung der Diffusionskoeffizienten

Die Bestimmung der Diffusionskoeffizienten durch einen PVA-Film wurde in einer $2*120 \text{ mL}$ Meßzelle durchgeführt (Abbildung 3.1).

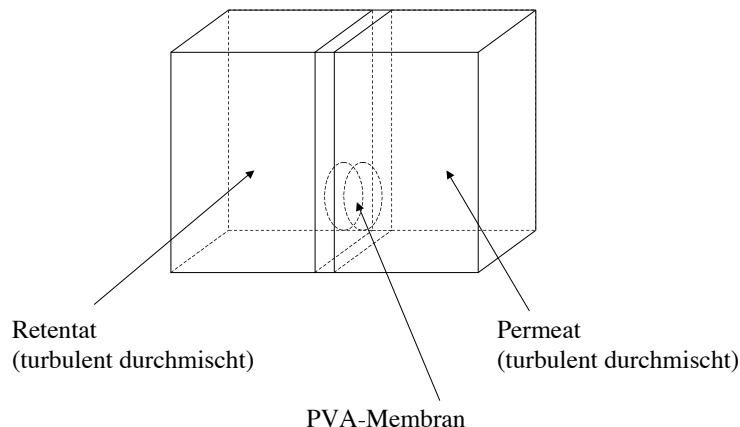


Abbildung 3.1: Schema der *Diffusionsmeßzelle*

Zur Membranherstellung wird in einer Petrischale eine ca. 5 mm dicke PVA-Schicht gegossen und entsprechend der Herstellungsanweisung der LentiKats[®] weiterverarbeitet. Die Membrandicke wird mit einem Mikrometerdickenmesser bestimmt (gemessene und gemittelte Dicke $V_1 = 0,45 \text{ mm}$, $V_2 = 0,43 \text{ mm}$, $V_3 = 0,46 \text{ mm}$). Aus der stabilisierten Membran wird ein gleichmässiges, blasenfreies $3*5 \text{ cm}$ großes Stück herausgeschnitten und in die Trennwand der Meßzelle eingebaut. Die Trennung der Meßzellen erfolgt durch ein freies kreisförmiges Membranstück von 2 cm Durchmesser. Die Einzelzellen werden mittels Magnetrührer turbulent durchmischt (200 U/min). Aus beiden Teilzellen ($V_P = V_B = 100 \text{ mL}$) werden in regelmäßigen Zeitabständen 2 mL Probe gezogen und wie in Kapitel 4.1.1 und 4.1.2 beschrieben aufgearbeitet und vermessen.

3.4 Aufschluss der Pilzzellen

Bei allen beschriebenen Aufschlussverfahren wird der abgenutzte Pilz mit ca. 20 mL Aufschlusspuffer in einem Mörser vordispersiert, um eine gleichmässige Behandlung im anschließenden Verfahren zu gewährleisten. Ziel ist es ein zellfreies Extrakt zu gewinnen, dessen Hydrolyseaktivität erhalten bleibt. Es wird jeweils ein Ausstrich auf einem Sabourand-2%-Glucose-Agar angelegt und 3 Tage bei 27°C inkubiert. Die katalytische Aktivität wird mittels Biohydrolyse wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben bestimmt.

Für alle Aufschlüsse wird folgender Puffer verwendet: 10 mM TRIS (Merck), 1 mM Cystein (Aldrich), 1 mM EDTA (Aldrich), 0,3 mM Phenylmethansulfonylfluorid (Fluka). Die Lösung wird mit Salzsäure auf pH 7,0 eingestellt.

3.4.1 Aufschluss durch Gefriertrocknung

3 g des abgesaugten Pilzes werden bei -20°C eingefroren und anschließend in der Gefriertrocknung (Gerstell Nimbus 2000) am Ölpumpenvakuum bei 0,45 mbar über Nacht getrocknet. Zur Endtrocknung wird für 30 min das Gasbalastventil geschlossen und die Biomasse bei Maximalvakuum getrocknet. Nach der Trocknung wird sofort der entsprechende Puffer hinzugegeben.

3.4.2 Aufschluss mit dem Zellaufschlussgerät

Für den Zellaufschluss durch Scheerung wird ein Zellaufschlussgerät (Braun BBio-tech) verwendet. Die Zellsuspension wird dabei auf Eis gekühlt und bei einer Drehzahl von 250 U/min für 5 bzw. 10 min. behandelt (vergl. [14]).

3.4.3 Aufschluss mit Ultraschall

Die entsprechende Pilzmenge wird in dem Aufschlusspuffer vorgelegt, suspendiert und mit Eis gekühlt. Die Ultraschallsonde des Aufschlussgerätes (Sonicator 6,7; Ultronoc Inc.) wird in die Mitte des Becherglases eingeführt, die Leistung des Gerätes auf 300 mW eingestellt und die Suspension 15 min beschallt.

3.4.4 Aufschluss mit dem Ultraturrax

Die Pilzsuspension in Aufschlusspuffer wird mit dem Ultraturrax unter Kühlung zerscheert. Zur Stabilisierung der Enzyme wird ein Zuschlag von 2,5% Paraffin und 2,5% Glycerin verwendet.

3.4.5 Aufschluss mit gekühlten Lösemitteln

3 g Biofeuchtmasse werden in 20 mL Aufschlusspuffer suspendiert, mit doppeltem Volumen gekühlten Aceton (-20°C) übergossen und durchmischt. Die Suspension wird 15 min gekühlt (-20°C) und alle 5 min erneut durchmischt. Anschließend wird der aufgeschlossene Pilz abgenutscht und zur Reakton eingesetzt. Das Verfahren wird ebenfalls mit Butylacetat durchgeführt.

3.4.6 Kombination der Aufschlussverfahren

Die aussichtsreichen Einzelaufschlussverfahren wurden miteinander kombiniert. Nach dem ersten Aufschlusssschritt wird die Biomasse ggf. abzentrifugiert, dem zweiten Verfahren zugeführt und anschließend auf Biohydrolyseaktivität untersucht.

3.4.7 Anreicherung der Enzymfraktion

Die katalytisch aktiven Zellbruchstücke werden durch Dialyse (vergl. [75], [14]) angereichert. Hierzu wird eine Dialysemembran (Medicell, 12-14 kDa cut-off) für 30 min in EDTA-Lösung ausgekocht, zweifach mit VE-Wasser gewaschen und mit der anzureicherenden Lösung gefüllt. Die Membran wird bei 2°C in Polyethylenglycol (PEG 200, Aldrich) gehängt und regelmäßig durchmischt. Nach der gewünschten Anreicherung wird das Retentat aus der Membran isoliert.

3.4.8 Bestimmung der Substratbreite

Für die Bestimmung der Substratbreite wird die Biohydrolyse in Erlenmeyerkolben wie oben beschrieben durchgeführt. Die Substrate werden in Ethanol (1:1) gelöst und in die Fermentationssuspension bis zur Endkonzentration von 1 g/L zugegeben. Es werden Epoxypropyl-phenylether, Epoxypropyl-isopropylether und Benzylloxiran

in purum-Qualität (Fluka) eingesetzt. 1,2-Indenepoxid wurde aus Inden mittels der Prileschajew-Reaktion mit m-Chlorbenzoësäure als Oxidationsmittel hergestellt. Die Synthese des 1,2-Dihydronaphtalinoxid erfolgte nach dem Bromhydrinverfahren [11].

4 Ergebnisse

4.1 Anzucht der Mikroorganismen

Die Mikroorganismen *Aspergillus niger* und *Beauveria bassina* werden in der Biokatalyse neben den in Kapitel 2.2.2 aufgeführten Anwendungen auch zur stereoselektiven Öffnung von Epoxiden verwendet. Hierzu werden sie als rastende Zellen (resting cells) eingesetzt. Die Zugabe von Epoxiden in eine Batchkultur in der logarithmischen Phase führt zu einer sofortigen Verstoffwechselung als Kohlenstoffquelle. Schon 30 min nach der Zugabe ist kein Styrolepoxid in der Fermentationsbrühe nachweisbar.

4.1.1 Wachstumskurve *Aspergillus niger*

Zur Bestimmung des optimalen Erntezeitpunktes einer Batchkultur ist eine Wachstumskurve für den eingesetzten Mikroorganismus ausschlaggebend. In Abbildung 4.1 werden die aufgenommenen Parameter pH-, pO₂-Wert, die Biotrockenmasse (BTM) und der gesammte organische Kohlenstoffgehalt (TOC-Wert) für eine *Aspergillus niger* Kultur dargestellt. Aus dem Verlauf der Biotrockenmasse sind bis Stunde 10 die lag-Phase, bis Stunde 27 die log-Phase, bis Stunde 50 die stationäre Phase und anschließend die Absterbephase zu erkennen. In dem Übergang aus der lag- in die log-Phase um die Stunde 10 der Biomassenanzucht beginnt der pO₂-Wert als Zeichen der einsetzenden katabolischen Aktivität zu sinken. Gleichzeitig sinkt der pH-Wert von pH 7 auf pH 6. In der logarithmischen Phase sinkt der TOC-Wert, der als einfache zu bestimmendes Summenmaß für die Kohlenstoffquellen verwendet wird. Der Übergang zu der stationären Phase ist gekennzeichnet durch die starke Abnahme des TOC-Wertes und den gleichzeitigen Anstieg des pH-Wertes. Der Übergang in die stationäre Phase wird durch eine Glucoselimitierung induziert. Im Laufe dieser Phase nimmt der TOC-Wert weiter ab. Gleichzeitig steigt der pO₂-Wert an. Der von Vermehrung auf Erhalt umgestellte Stoffwechsel der Pilze kommt nun mit weniger Glucose aus. Nach dem Durchlaufen des TOC-Wertminimums beginnt in der Sterbephase der Kultur eine Autolyse der Zellen, die zu dem leichten Wiederanstieg des TOC-Wertes führt. Gleichzeitig erreicht der pO₂-Wert wieder den Sättigungswert. Der pH-Wert der Kultur steigt während der gesamten stationären Phase bis auf pH 8 an. Zur einfachen Detektion der Wachstumsphasen der Batchkultur von *Aspergillus niger* scheiden die üblichen Verfahren, wie die Messung optischer Dichte, aufgrund der hohen Zelldichte und der starken Trübung des Mediums aus. Von den

untersuchten Parametern kann der

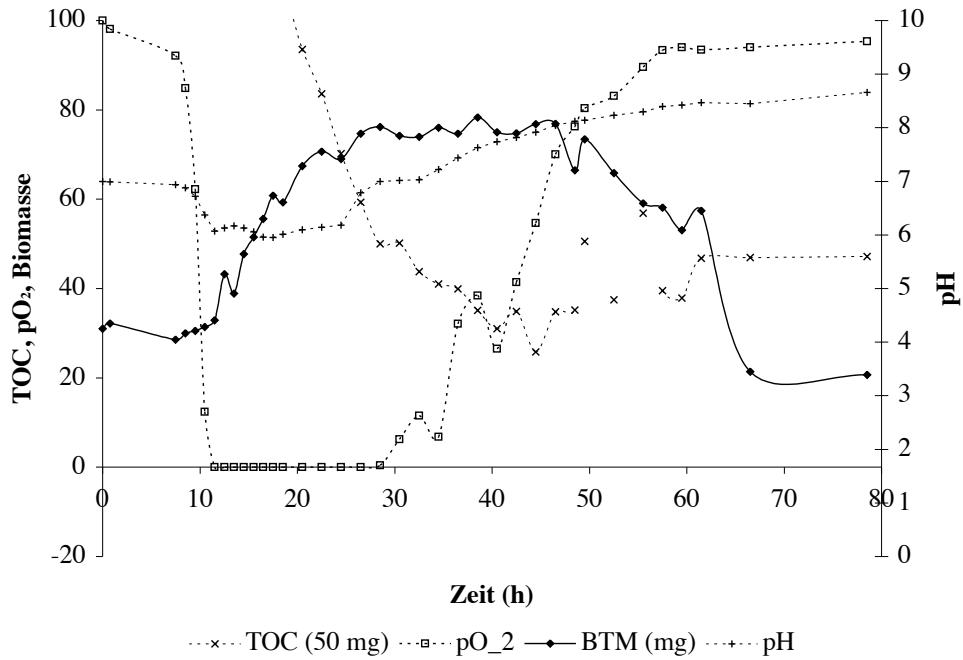


Abbildung 4.1: Wachstumskurve von *Aspergillus niger* (DSM 823)

pO_2 -Wert am besten zur Detektion der Wachstumsphase der untersuchten Kultur verwendet werden. Als Detektionskriterien werden folgende Punkte eingesetzt:

- erster Abfall des pO_2 -Wertes zum Minimum \Rightarrow Übergang aus der lag- in die log-Phase,
- Anstieg des pO_2 -Wertes aus dem Minimum \Rightarrow Übergang aus der log- in die stationäre Phase,
- 80% des Maximal- pO_2 -Wertes \Rightarrow Übergang aus der stationären in die Sterbe- phase.

In jeder detektierten Wachstumsphase werden mehrfach die katalytischen Aktivitäten bestimmt, welche in Tabelle 4.1 als ee-Wert des Styrolepoxids nach 1 h Reaktionszeit aufgeführt sind. Der optimale Erntezeitpunkt wird bei einer hohen Aktivität mit

einer hohen Selektivität und gleichzeitiger maximaler Biomasse im Anzuchtsreaktor erreicht. Für *Aspergillus niger* liegt er bei 49,5 h am Ende der stationären Phase.

Tabelle 4.1: Katalytische Aktivität von *Aspergillus niger*

Zeit (h)	BTM (g)	ee-Wert (Epoxid, %)	Umsatz (%)	Wachstums- phase
15,5	40	-	-	log-
20,5	70	-	-	Phase
28,5	80	4,8	0,37	
32,5	80	10,2	0,56	stationäre
40,5	80	20,5	0,68	Phase
45,0	80	42,7	0,51	
49,5	80	62,5	0,63	
55,5	65	8,8	0,61	Absterbephase

Während der stationären Phase wird bei Pilzen häufig das Enzymsystem stark umgebaut, um den veränderten Umweltbedingungen gerecht zu werden [85], [70]. Der Aufbau der stereoselektiven Epoxidhydrolasen in der stationären Phase lässt sich deutlich in der Tabelle 4.1 ablesen. Die katalytische Aktivität von *Aspergillus niger* nimmt im Verlauf der stationären Phase zu, um am Ende der Phase ein Maximum zu erreichen. In der Absterbephase nimmt das Vermögen die Epoxide enantioselektiv zu hydrolysern schnell ab.

4.1.2 Wachstumskurve *Beauveria bassiana*

Die Wachstumskurve von *Beauveria bassiana* ist in Abbildung 4.2 dargestellt. Die lag-Phase dieser Kultur dauert bis zu Stunde 7, wonach sich die log -Phase bis Stunde 31 anschließt. Die stationäre Phase dauert bis Stunde 62 an, um dann in die Absterbephase überzugehen. Der pH-Wertverlauf zeigt im ersten Drittel der log-Phase ein Minimum bei pH 5,8, gefolgt von einem Anstieg bis zum Ende der log-Phase auf pH 7,6. Während der stationären Phase steigt der pH-Wert gleichmäßig und erreicht in der Absterbephase den Wert pH 8,8. Nach dem der TOC-Wert um 74% gefallen ist, wechselt die Kultur in die stationäre Phase, in welcher der TOC-Wert auf sein Minimum sinkt. Er steigt erst wieder während der Sterbephase durch die Zellyse an. Der pO₂-Wert fällt zu Beginn der stationären Phase auf sein Minimum ab und steigt erst am Ende dieser Phase wieder an. Seinen Maximum erreicht er schon in der

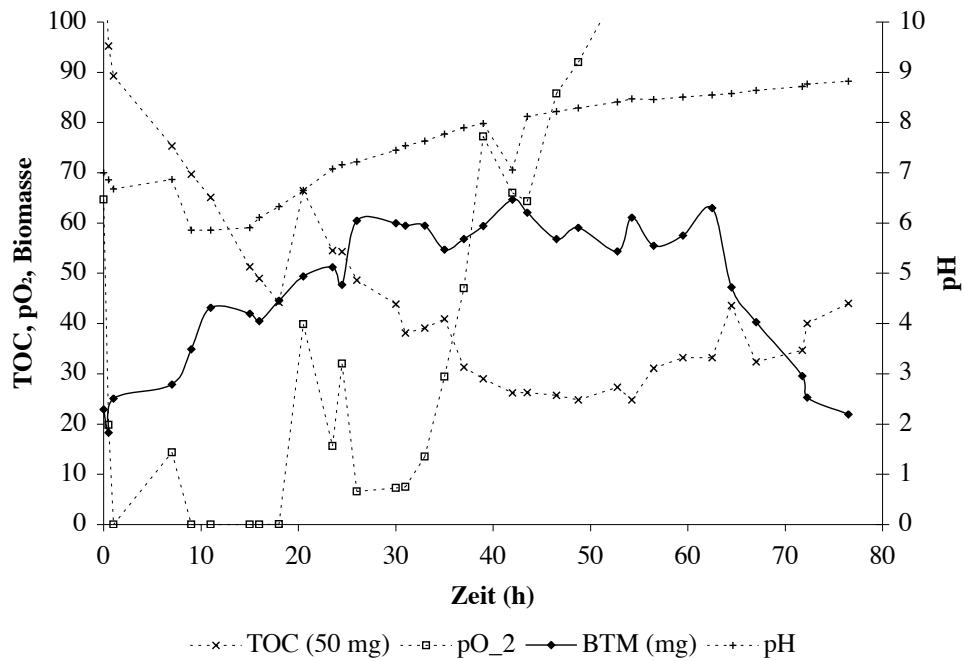


Abbildung 4.2: Wachstumskurve von *Beauveria bassiana* (DSM 1344)

Mitte der stationären Phase nach 40 h. Die Onlinedetektion der Wachstumsphasen erweist sich bei der Batchkultur von *Beauveria bassiana* als schwierig. Der Übergang der lag- in die log-Phase und der Übergang der log-Phase in die stationäre Phase erfolgen analog der *Aspergillus niger* Kultur durch den Abfall des pO₂-Wertes auf sein Minimum. Der pO₂-Wert erreicht jedoch schon zur Mitte der stationären Phase seinen Maximalwert und kann so nicht zur Detektion des Phasenüberganges eingesetzt werden. Als Indikator für das Ende der stationären Phase kann der erste Anstieg des TOC-Wertes genutzt werden. Die Werte für die stereoselektive Hydrolyseaktivität sind in Tabelle 4.2 aufgeführt. Die Enzyme werden analog denen des *Aspergillus niger* erst am Ende der stationären Phase aktiv. Der optimale Erntezeitpunkt liegt nach 54 h Anzucht.

Tabelle 4.2: Katalytische Aktivität von *Beauveria bassiana*

Zeit (h)	BTM (g)	ee-Wert (Epoxid, %)	Umsatz (%)	Wachstums- phase
16,5	35	-	-	log-
21,5	52	-	-	Phase
30,5	62	-	0,37	
40,5	62	29	0,56	stationäre
45,5	60	21	0,68	Phase
54,5	60	50	0,51	
65,5	50	1,7	0,63	Absterbe-
76,5	25	-	0,61	phase

4.1.3 Optimierung der Wachstumstemperatur

Für eine wirtschaftliche Biokatalysatorgewinnung ist die Anzucht der Mikroorganismen unter optimalen Bedingungen entscheidend. Dabei ist die maximale Biomassenausbeute bei maximaler katalytischer Aktivität erwünscht. In Abbildung 4.3 werden die Biotrockenmassen nach 50 h Wachstumszeit dargestellt. Daraus ergibt sich ein Maximum bei einer Wachstumstemperatur von 31°C für *Aspergillus niger* und von 29°C für *Beauveria bassiana*.

Die katalytische Aktivitäten lassen sich aus dem ee-Wert der Biohydrolyse mit dem Schimmelpilz, der bei den entsprechenden Temperaturen gewachsen ist, bewerten. Die ee-Werte des entstehenden 1,2-Phenylethandiols sind in Tabelle 4.3 aufgeführt. Die Enantiomerenüberschüsse in der Tabelle dienen nur der Abschätzung eines Trends, da für die Biohydrolyse mit *Beauveria bassiana* nur sehr wenig Biomasse verwendet werden kann. Es ist deutlich zu sehen, dass die Aktivität des *Beauveria bassiana*, der bei 29°C wuchs, am höchsten ist. Die Biomasse, die bei anderen Temperaturen gewachsen ist, zeigt keine signifikante Selektivität. Bei dem *Aspergillus niger* hingegen ist die Selektivität bei allen Wachstumstemperaturen hoch. Ein Maximum ergibt sich bei den Temperaturen zwischen 29°C und 31°C.

4.1.4 Zusammensetzung des Nährmediums

Die Konzentrationen der Nährmediumsbestandteile Glucose und Corn Steep Liquor wurden variiert und die nach 50 h nach Animpfung gebildete Biomasse nach Mas-

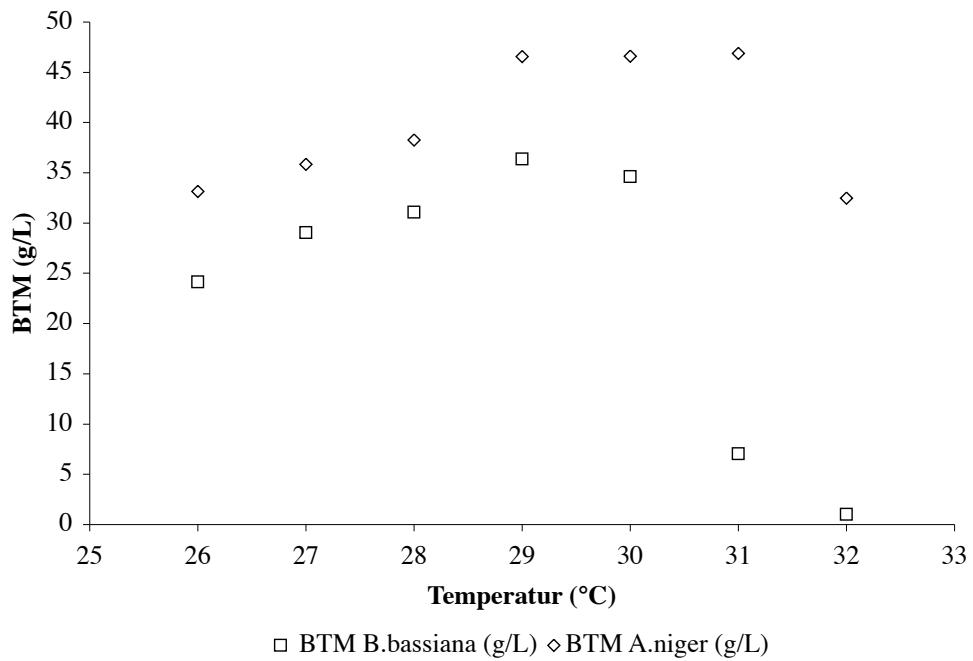


Abbildung 4.3: Biomassen von *Beauveria bassiana* und *Aspergillus niger* bei verschiedenen Wachstumstemperaturen

Tabelle 4.3: Hydrolyseselektivität bei verschiedenen Wachstumstemperaturen

Wachstumstemperatur (°C)	<i>Beauveria bassiana</i> ee-Wert in %	<i>Aspergillus niger</i> ee-Wert in %
26	-	60
27	10	61
29	26	62
31	7	62

se und Aktivität bewertet. Die Biomassenkonzentrationen sind in Tabelle 4.4 aufgeführt. Die optimalen Konzentrationen sind 10 g/L Glucose und 25 g/L Corn Steep Liquor für *Beauveria bassiana* und 30 g/L Glucose und 20 g/L Corn Steep Liquor für *Aspergillus niger*. Die Aktivität wird nach 2 h Reaktionszeit als ee-Wert des Sty-

rolepoxids und des entstehenden 1,2-Phenylethandiols gemessen. Die bestimmten Aktivitäten der Biomassen sind bei allen Chargen im Rahmen der Meßgenauigkeit gleich hoch.

Tabelle 4.4: Optimierung der Nährmedienzusammensetzung

Nährmedium CSL g/L	Glucose g/L	Masse	
		<i>B. bassiana</i> g/L	<i>A. niger</i> g/L
0	10	-	-
10	10	0,2	1,3
15	10	0,3	1
20	10	0,4	1,3
25	10	1,5	1,1
30	10	1,0	0,6
35	10	1,0	0,6
40	10	1,0	0,6
50	10	1,0	0,6
60	10	1,0	0,6
20	0	1,1	1,3
20	5	0,3	1,2
20	10	0,4	1,3
20	15	1,3	1,4
20	20	1,3	2,3
20	30	0,2	2,7
20	40	0,7	2,4

4.2 Analytik

4.2.1 Extraktion der Analyten

Die analytische Erfassung der Enantiomerenkonzentrationen der Edukte und der Produkte wird mit chiraler Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Gaschromatographie (GC) durchgeführt. Da die dazu eingesetzten Phasen hydrolyseempfindlich sind, müssen die Stoffe in ein nichtwässriges Lösemittel überführt werden. Für die Quantifizierung der Extraktion wird ein reproduzierbarer Verteilungskoeffizient bestimmt. Die in der Arbeit verwendeten Systeme sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst. Die Extraktionszeit muss auf der Stufe 8 eines Laborschüttlers mindestens 10 s betragen, um eine ausreichende Reproduzierbarkeit zu gewährleisten.

Tabelle 4.5: Extraktionssysteme

Analyt	Extraktions- mittel	Verteilungs- koeffizient	Standard- abweichung
1,2-Phenylethandiol	Dichlormethan	0,257	0,003
Styrolepoxid	n-Hexan	0,315	0,024
Phenylacetaldehyd	n-Hexan	0,083	0,078

4.2.2 Enantiomerentrennung der Epoxide

Die Optimierung der Enantiomerentrennung auf der Gaschromatographiesäule [Heptakis-(6-O-butylidimethylsilyl-2,3-di-O-methyl)- β -cyclodextrin] von Prof. König (Universität Hamburg) ergibt die in Tabelle 4.6 angegebenen Bedingungen. Die Signale der einzelnen Enantiomeren sind basisliniengetrennt und ausreichend reproduzierbar für eine Quantifizierung. Um die Reproduzierbarkeit der erhaltenen Werte zu verbessern, wird die Injektionstemperatur variiert. Es wird ein Optimum bei einer Injektortemperatur von 230°C gefunden, bei der die durchschnittliche Abweichung der Signalintensitäten unter 5% liegt.

Tabelle 4.6: Enantiomerentrennung der Epoxide mittels chiraler Gaschromatographie

Analyt	Retentions-zeit (R)	Retentions-zeit (S)	Temperatur-programm
Styrolepoxid	8,8 min	9,6 min	90° isotherm
α -Methylstyrolepoxid	58,1 min	58,7 min	45° ab 46 min 15°/min
α -Ethylstyrolepoxid	14,0 min	14,7 min	95° isotherm
Benzoxiran	32,7 min	33,8 min	82° isotherm
Epoxipropyl-isopropylether	6,5 min	6,8 min	60° isotherm
Epoxipropyl-phenylether	35,6 min	36,4 min	75° isotherm

4.2.3 Enantiomerentrennung der Diole mittels chiraler Hochleistungs-flüssigkeitschromatographie

Die Enantiomerentrennung der entstehenden Diole wird mittels chiraler HPLC durchgeführt. Es wird die Säule OB-H der Firma Daicel mit Hexan, Isopropanol und Ethanol als mobile Phase verwendet. Die Detektion erfolgt bei 219 nm. Die Bedingungen für die optimierten Trennungen sind in Tabelle 4.7 aufgeführt. Die Signale der Diole sind basisliniengetrennt und gut von einem Eduksignal, das bei 16 min auftritt, getrennt. Dieses Signal kann bei den Trennungsbedingungen der Diole nicht in die einzelnen Enantiomeren signale getrennt werden und ist somit nicht für die Eduktanalytik geeignet.

Tabelle 4.7: Enantiomerentrennung der Diole

Analyt	Retentions-zeit (R)	Retentions-zeit (S)	Eluent	Fluss (ml/min)
1,2-Phenylethandiol	20,3 min	25,5 min	91:9 a)	0,8
α -Methylphenylethan-1,2-diol	29,5 min	34,5 min	92:8 a)	0,75
α -Ethylphenylethan-1,2-diol	18,5 min	20,0 min	94:6 a)	0,8
Phenylpropan-1,2-diol	18,5 min	24,5 min	92:8 a)	0,75
Propyl-1,2-diol-phenylether	35,5 min	38,5 min	94:6 b)	0,75
a) Hexan:i-Propanol	b) Hexan:Ethanol			

4.3 Reaktionssystem

Die Analyse des Reaktionssystems mit Gaschromatographie und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie zur Trennung und mit der Kernresonanzspektroskopie zur Identifikation der Substanzen ergab, dass an dem System folgende Spezies beteiligt sind:

- (R)-Styrolepoxid,
- (S)-Styrolepoxid,
- (R)-1,2-Phenylethandiol,
- (S)-1,2-Phenylethandiol,
- Phenylacetaldehyd.

Die Konzentrationen dieser Substanzen werden während eines Versuchansatzes aufgenommen. Sie werden zur Aufklärung des vorliegenden Reaktionssystems in folgendem Kapitel diskutiert. In Abbildung 4.4 sind die chromatographischen Trennungen der beteiligen Substanzen exemplarisch abgebildet. Es sind deutlich voneinander basissliniengetrennte Signale sichtbar. Die Signale sind in dem Konzentrationsbereich bis 1 g/L proportional, so dass eine Kalibrierung möglich ist.

4.4 Reaktionsverlauf im Detail

In Abbildung 4.5 sind die Konzentrationsverläufe aller am Reaktionssystem beteiligten Stoffe über die Reaktionszeit aufgetragen. Hierbei wurde exemplarisch mit *Aspergillus niger* gearbeitet. Die Konzentrationskurven von *Beauveria bassiana* zeigen den gleichen Verlauf, sind aber zu höheren Reaktionszeiten verschoben. In der Darstellung ist erkennbar, dass die Schwankungen innerhalb der Konzentrationsverläufe ca. 5% betragen. Das Meßverfahren zeigt somit für die Modellbildung und Anpassung eine ausreichende Genauigkeit.

Der Enantiomerenüberschuß des 1,2-Phenylethandiols ist zu Beginn der Reaktion sehr hoch und nimmt über die Reaktionszeit langsam ab. Dies ist durch eine Autohydrolyse des Epoxids zu erklären. Zur Beginn der Reaktion dominiert die Bildung des (R)-1,2-Phenylethandiols durch die Biohydrolyse. Während des Reaktionsverlaufes

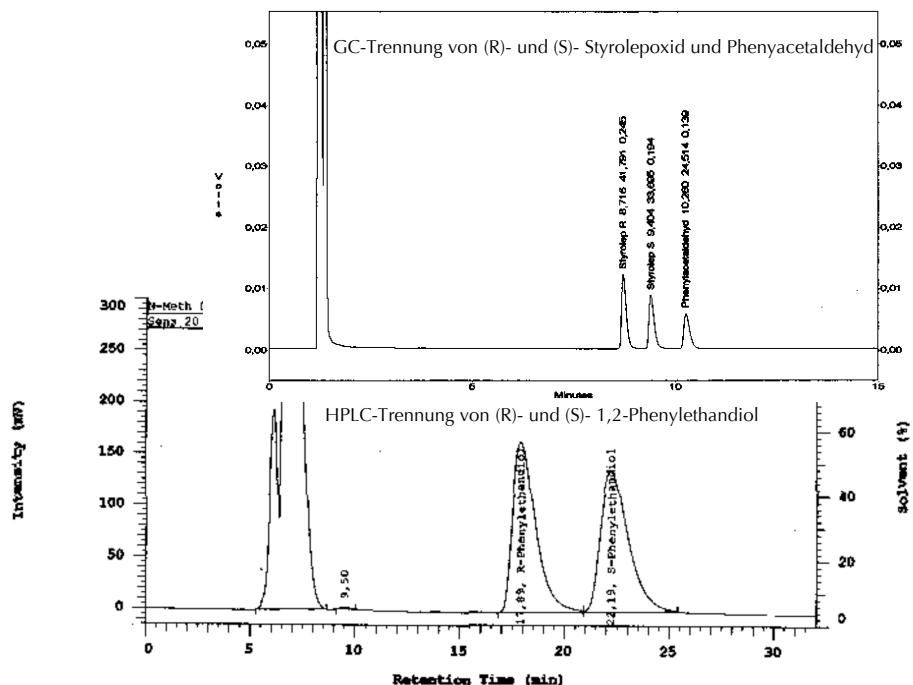


Abbildung 4.4: Chromatographische Trennung der beteiligten Komponenten

kommt das durch die unspezifische Autohydrolyse langsamer zu gleichen Teilen gebildete (R)-und (S)- 1,2-Phenylethanol hinzu. Hierdurch sinkt der Enantiomerenüberschuss des 1,2-Phenylethandiols langsam. Die Konzentration des (S)-Styrolepoxids sinkt ab dem Versuchsstart schnell ab. Das (R)-Enantiomere hingegen wird nur durch die Autohydrolyse oder eine langsame Nebenreaktion abgebaut, was durch die sehr viel langsamere Konzentrationsabnahme dokumentiert wird. Der Enantiomerenüberschuss des Styrolepoxids steigt gleichmäßig auf ein hohes Niveau um 90%. Bei dem durch die Folgereaktion aus dem 1,2-Phenylethanol gebildeten Phenylacetaldehyd steigt die Konzentration bei dem im Versuch gewählten pH-Wert von 8 nur sehr langsam an.

Die Summenkonzentration der fünf Komponenten sinkt mit dem Reaktionsverlauf, da Styrolepoxid über die Grenzfläche Reaktionsmedium-Luft entweicht. Dies kann mit Hilfe eines Flammenionisationsdetektors (FID) nachgewiesen werden. Da kein definierter Luftstrom durch den Kolbenhals strömt, ist eine exakte Bilanz nicht möglich. Die Konzentrationssumme sinkt nach 500 min auf 55%. Nach 24 h beträgt sie noch

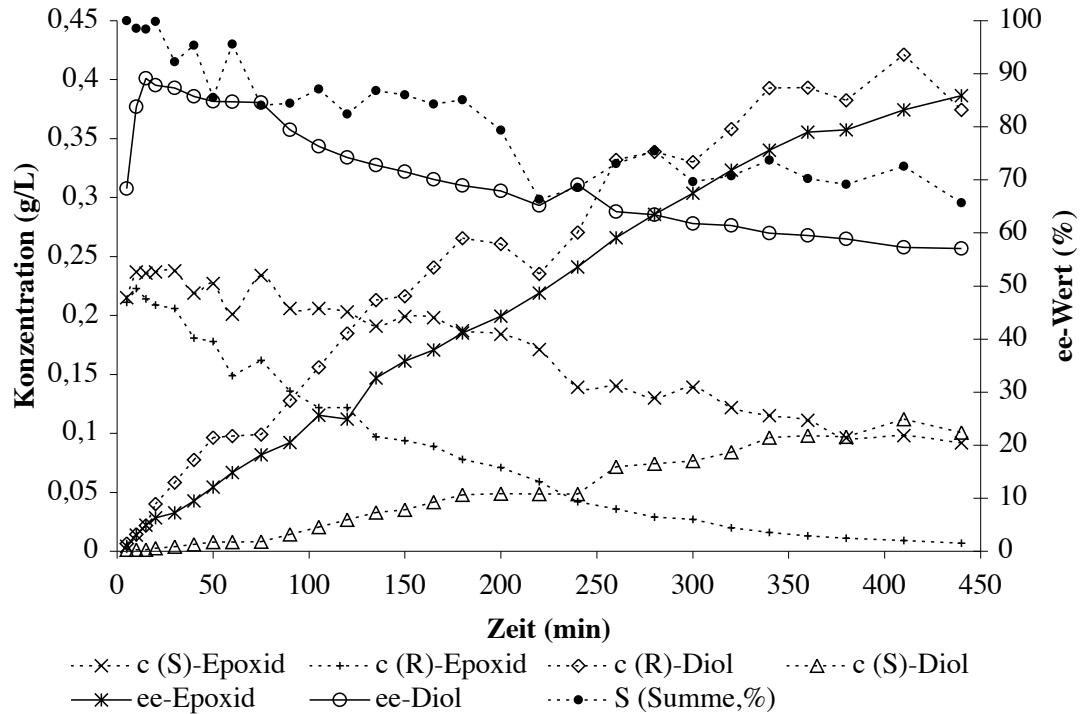


Abbildung 4.5: Konzentrationsverläufe aller beteiligten Stoffe bei der Biohydrolyse mit *Aspergillus niger*

45% des Anfangswertes.

Die Verluste über die Gasphase können durch ein geschlossenes Reaktionsgefäß minimiert werden. Da es sich bei dem Biokatalysator um rastende Zellen handelt, ist keine Begasung notwendig. Der Reaktionsverlauf in geschlossenen Reaktionsgefäßen ist in Abbildung 4.6 dargestellt. Die Summe der Konzentrationen beträgt nach 10 h Reaktionszeit über 90%. Das deutet darauf hin, dass in der Betrachtung keine gravierende Senke unerkannt geblieben ist.

Aus den Konzentrationsverläufen der Einzelsubstanzen sind die in Abbildung 4.7 dargestellten Reaktionswege möglich. Die enzymatische Hauptreaktion führt zu dem gewünschten Hauptprodukt (*R*)-1,2-Phenylethandiol und hinterlässt (*S*)-Styrolepoxid. Aus den beiden Styrolepoxidisomeren entsteht über eine statistische Autohydrolyse racemisches 1,2-Phenylethandiol. Ein Anhaltspunkt hierfür ist die Verringerung

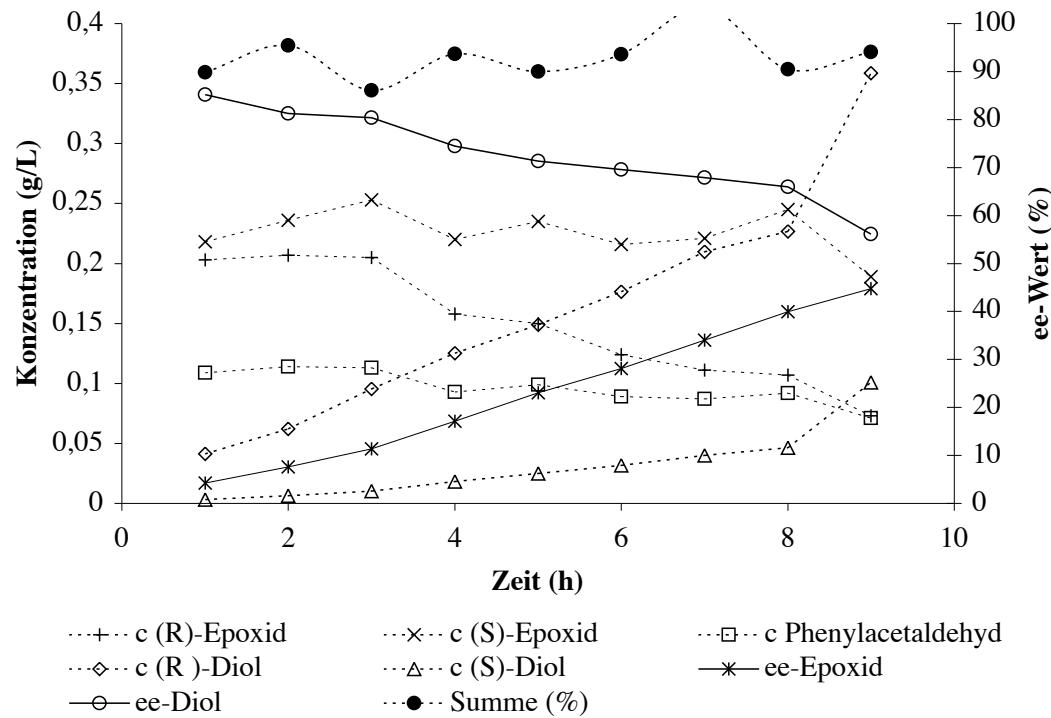


Abbildung 4.6: Konzentrationsverläufe aller beteiligten Stoffe bei der Biohydrolyse mit *Aspergillus niger* in einem geschlossenen Reaktionsgefäß

des Enantiomerenüberschusses des 1,2-Phenylethandiols. Eine Diolracemaseaktivität der Pilze kann ebenfalls für diesen Effekt verantwortlich sein. Der nicht 99%igen Enantiomerenüberschuss des Epoxids kann durch eine Racemaseaktivität des Pilzes für das Styrolepoxid hervorgerufen werden. Schließlich ist eine Folgereaktion des 1,2-Phenylethandiol zu dem Phenylacetaldehyd und Rückreaktionen möglich.

Im folgenden Abschnitt werden die möglichen Reaktionen einzeln untersucht, um ihre Verläufe durch geeignete Versuche direkt zugänglich zu machen. Die Relevanz für das Modell wird bestimmt und gegebenenfalls ihre Kinetik ermittelt.

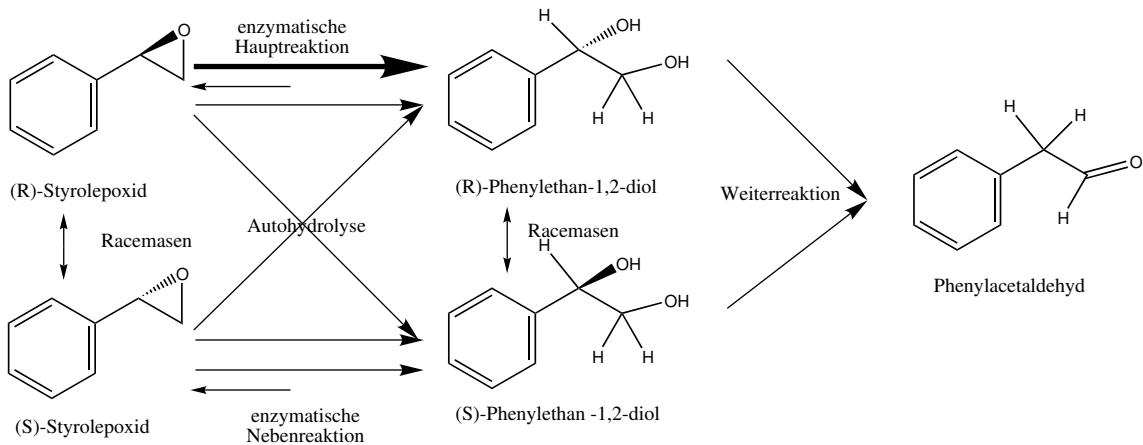


Abbildung 4.7: Stoffspezies und mögliche Reaktionen bei der Biohydrolyse mit *Beauveria bassiana*

4.4.1 Autohydrolyse

Die statistisch verlaufende Autohydrolyse läuft nach einem säure- oder basekatalysierten Mechanismus ab [87]. Dabei handelt es sich um eine Reaktion pseudo erster Ordnung bezogen auf die Styrolepoxidkonzentration (Formel 4.1).

$$\frac{\partial c_{E(R)}}{\partial t} = -k_{AH} * c_{(E)} \quad (4.1)$$

Die Kinetik dieser Umsetzung wird durch eine Reaktion ohne Biokatalysator bestimmt. Bei dem pH-Wert 9 liegt das Minimum der Reaktionsgeschwindigkeiten. Die Reaktionsverläufe bei verschiedenen pH-Werten sind in Abbildung 4.8 dargestellt.

Die nach der Methode der Anfangsgeschwindigkeit ermittelten kinetischen Konstanten sind in Tabelle 4.8 aufgeführt.

Die deutlich messbare Autohydrolyse ist aufgrund ihrer Geschwindigkeit für eine Modellierung des Reaktionssystems relevant.

4.4.2 Folgereaktion

Als Folgereaktion zur Autohydrolyse ist eine Eliminierung von Wasser und anschließende Keto-Enol-Tautomerie denkbar (Abbildung 4.9) [87]. Ebenfalls möglich ist

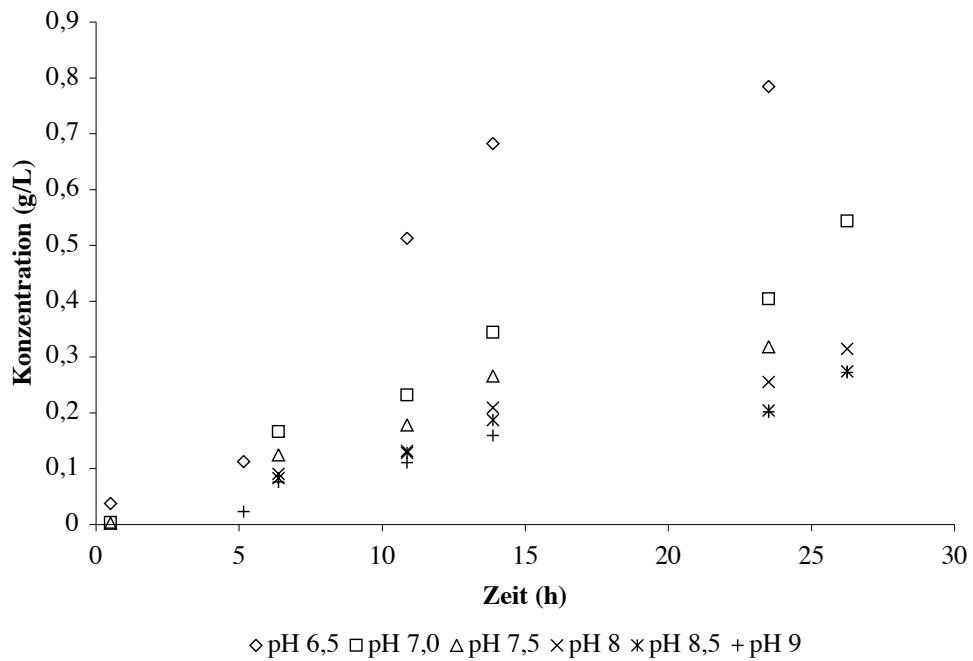


Abbildung 4.8: Reaktionsverläufe der Autohydrolysereaktion bei verschiedenen pH-Werten

Tabelle 4.8: Geschwindigkeit der Autohydrolyse

pH-Wert	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante (1/s)
6,5	$-1,930 \cdot 10^{-5}$
7,0	$-6,305 \cdot 10^{-6}$
7,5	$-4,666 \cdot 10^{-6}$
8,0	$-3,472 \cdot 10^{-6}$
8,5	$-2,722 \cdot 10^{-6}$
9,0	$-2,694 \cdot 10^{-6}$

auch eine anschließende Weiterreaktion des Ketons zu einem Oligomeren. Messungen in dem Konzentrationsbereich des Reaktionsmixes ergaben weder eine signifikante Zunahme der Phenylacetaldehyd- noch eine Abnahme der 1,2-Phenylethandiolkonzentration

im pH-Bereich 6,5 -9. Für die Modellierung der Bohydrolyse von Styrolepoxid spielt sie somit keine Rolle. Dieses Ergebnis kann nicht auf andere Styrolepoxidtyp-Substrate übertragen werden. Gerade die Substrate mit einem weiterem Ring weisen diese Nebenreaktion auf (Siehe auch Kapitel 4.9).

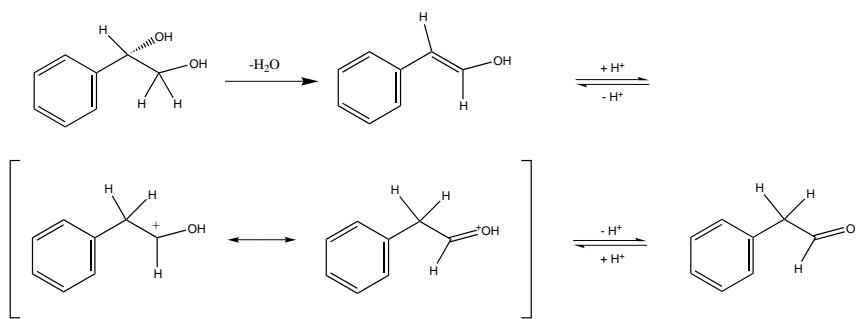


Abbildung 4.9: Reaktionsmechanismus der Folgereaktion mit Keto-Enol-Tautomerie

4.4.3 Racemaser

Die Aktivitäten der Racemaser für 1,2-Phenylethandiol und Styrolepoxid konnten nicht nachgewiesen werden. In Abbildung 4.10 sind die Reaktionsverläufe bei vorgelegtem enantiomerenreinem 1,2-Phenylethandiol dargestellt. Die Konzentration des entsprechenden Isomeren sinkt in den 24 Stunden Reaktionszeit nicht signifikant. Eine Racemaseraktivität für das 1,2-Phenylethandiol kann somit ausgeschlossen werden.

Um eine Racemaseraktivität für das Styrolepoxid festzustellen, wird das Enantiomere vorgelegt, welches von dem Pilz nicht umgesetzt wird. Bei der Bildung des komplimentären Epoxids liegt eine Racemaseraktivität vor. Ein weiterer Anhaltspunkt ist ein möglicher Anstieg der (*R*)-1,2-Phenylethandiolkonzentration. Das durch Racemaser entstehende Epoxid wird durch die Epoxidhydrolyse enantioselektiv geöffnet. Der Reaktionsverlauf mit (*S*)-Styrolepoxid und *Aspergillus niger* ist in Abbildung 4.11 dargestellt. Die Diolbildung ist racemisch und es findet keine signifikante (*S*)-Styrolepoxidbildung statt. Somit ist keine Epoxidracemaseraktivität feststellbar. Die Reaktion mit *Beauveria bassiana* unter Vorlage von (*R*)-Styrolepoxid liefert die gleichen Erkenntnisse.

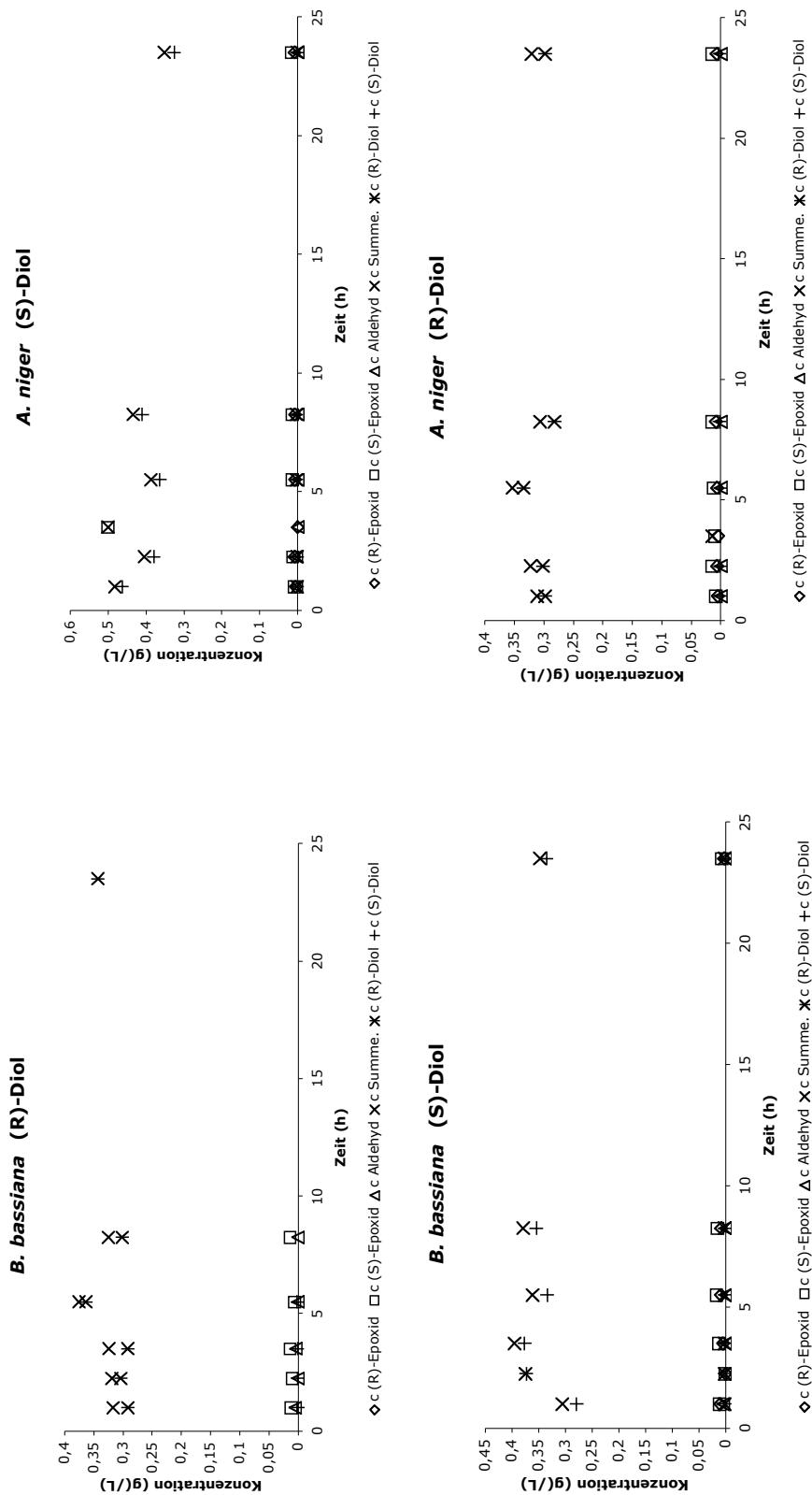


Abbildung 4.10: Konzentrationsverläufe mit enantiomerenrein vorgelegten 1,2-Phenylethandiolen zur Untersuchung auf Diol-Racemaseaktivität

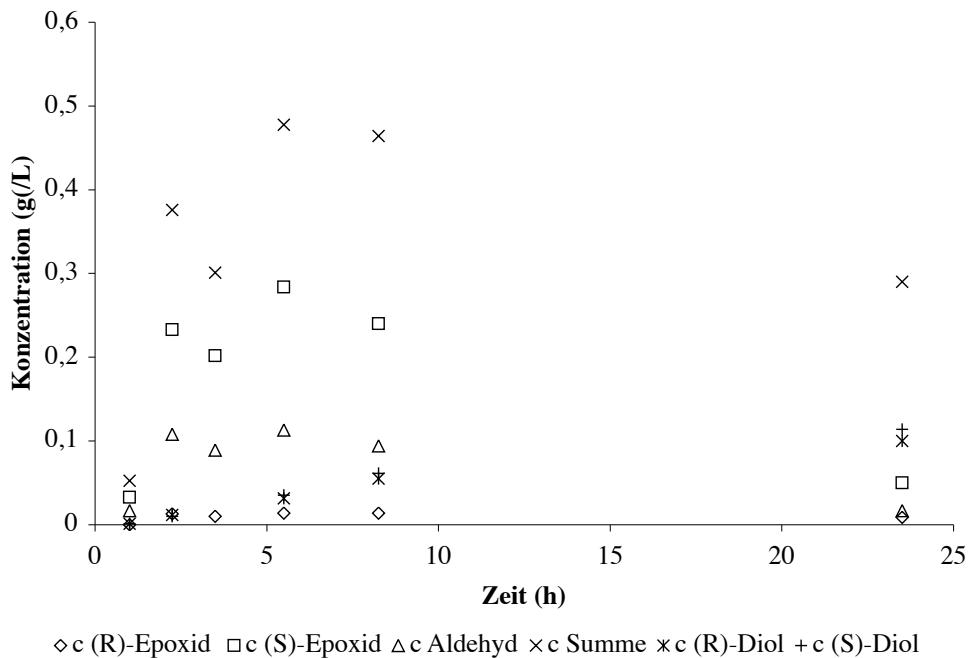


Abbildung 4.11: Konzentrationsverläufe einer Reaktion mit *Aspergillus niger* und (S)-Styrolepoxid zur Untersuchung der Epoxid-Racemasenaktivität

4.4.4 Enzymatische Hauptreaktion

Die enzymatische Hauptreaktion kann experimentell nicht getrennt von den oben genannten Reaktionen erfasst werden. Das Reaktionsgeschwindigkeitsgesetz und die dazugehörigen Konstanten können nur durch Anpassung verschiedener Gesetze unter Berücksichtigung der bereits erfassten Kinetiken ermittelt werden.

4.4.5 Enzymatische Nebenreaktion

Die Aussagen über eine mögliche enzymatische Nebenreaktion können nur über eine Gesamtstoffbilanz der Reaktion oder durch eine Reaktion mit dem entsprechenden reinen Enantiomeren getroffen werden. Bei der Reaktion des (S)-Styrolepoxid mit *Aspergillus niger* als Katalysator wurde der in Abbildung 4.11 dargestellte Verlauf gefunden. Darin ist kein signifikanter Anstieg der (R)-1,2-Phenylethandiolkonzentration,

wie bei einer enzymatischen Nebenreaktion zu erwarten wäre, erkennbar. Daraus folgt, dass eine solche Nebenreaktion für das Modell nicht signifikant ist.

4.4.6 Enzymatische Rückreaktion

Die Reversibilität der enzymatischen Reaktion wird durch Vorlage des 1,2-Phenylethandiols und Messung der Styrolepoxidkonzentration ermittelt. Auch nach einer 30-stündigen Reaktionszeit bei einer Ausgangskonzentration von 1g/L *rac*-1,2-Phenylethanol konnte keine Styrolepoxidbildung festgestellt werden. Dieses Verhalten ist in Abbildung 4.12 dargestellt. Die enzymatische Reaktion im gegebenen Konzentrationsbereich kann demzufolge für das Modell als irreversibel angenommen werden.

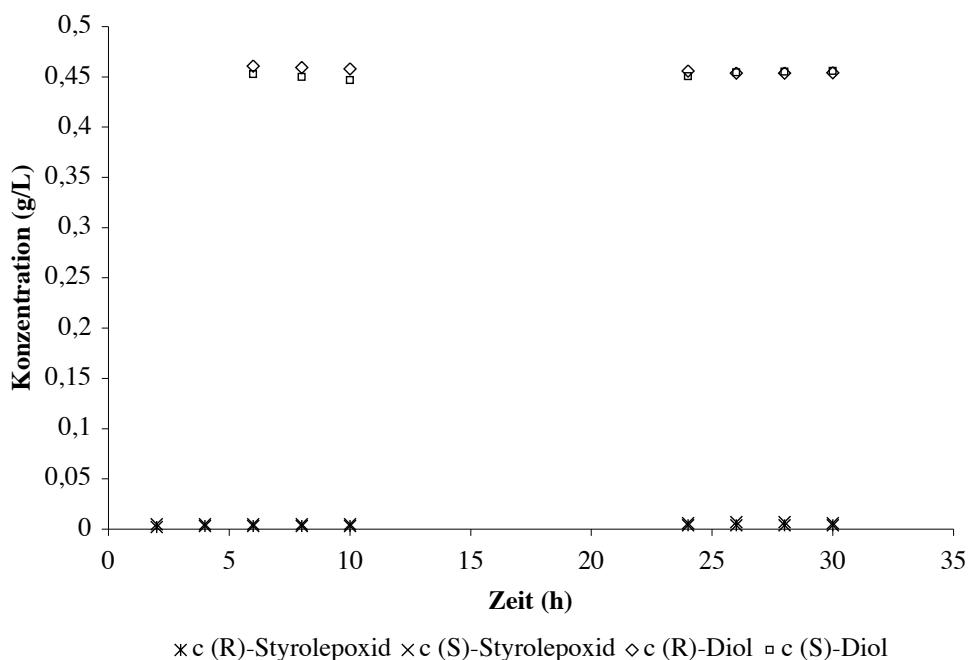


Abbildung 4.12: Konzentrationsverläufe bei der enzymatischen Rückreaktion

4.4.7 Inhibition

Mögliche Inhibitionen der Reaktion durch das Produkt wurden durch Vorlage des *rac*-1,2-Phenylethandiols untersucht. Das 1,2-Phenylethandiol wurde in der maximal zu erwartenden Produktkonzentration (1 g/l) und doppelt konzentriert eingesetzt. Wie in Abbildung 4.13 zu sehen ist, liegt dabei keine signifikante Produkthemmung vor.

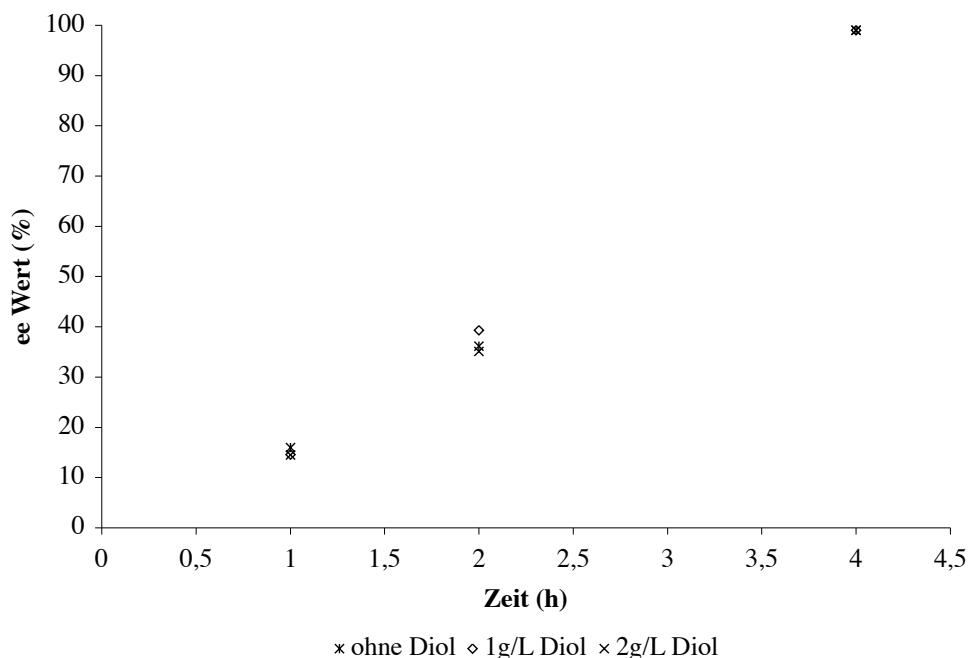


Abbildung 4.13: *Inhibition der Biohydrolyse durch 1,2-Phenylethandiol*

Eine mögliche Hemmung der Biohydrolyse durch Phenylacetaldehyd wird ebenfalls durch Vorlage der Substanz untersucht. Die Verläufe der Enantiomerenüberschüsse des Styrolepoxids sind in Abbildung 4.14 dargestellt. Bei beiden Pilzen ist keine signifikante Hemmung in dem Konzentrationsbereich bis 20 µg/L Phenylacetaldehyd, das der maximal zu erwartenden Nebenproduktkonzentration entspricht, feststellbar.

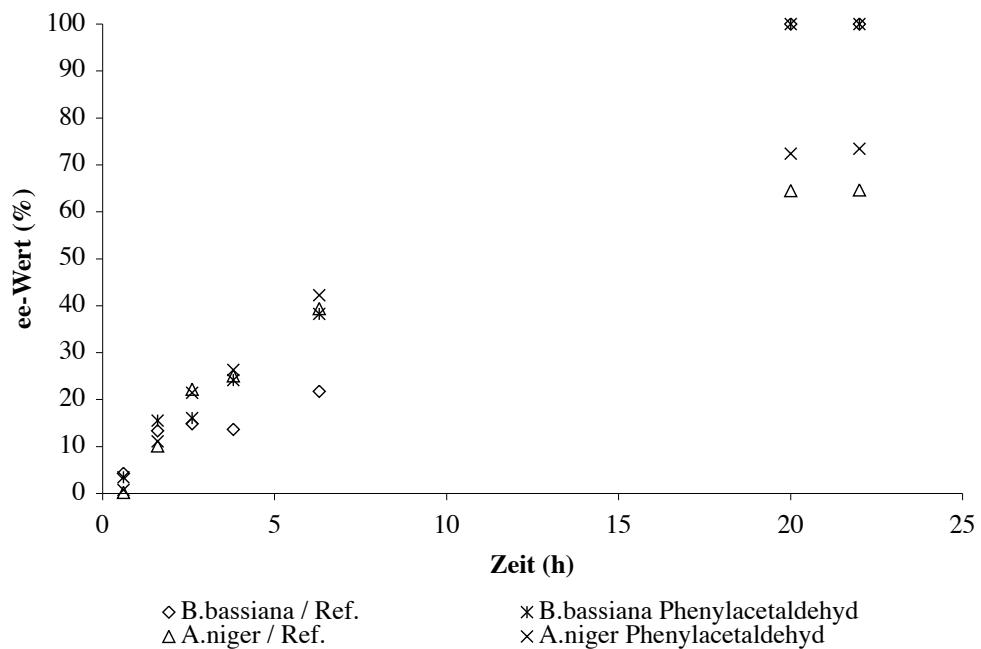


Abbildung 4.14: Inhibition der Biohydrolyse durch Phenylacetaldehyd

4.4.8 Das Reaktionssystem für die Modellierung

Durch die zuvor beschriebene Bestimmung der Einzelreaktionen wird für die Modellbildung das in Abbildung 4.15 dargestellte Reaktionssystem eingesetzt.

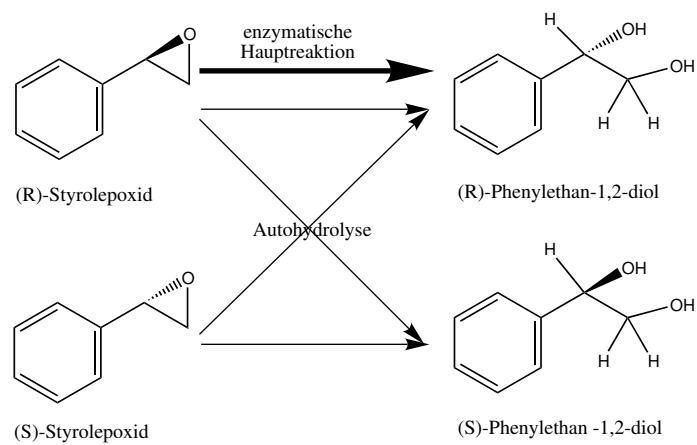


Abbildung 4.15: Experimentell erfasstes Reaktionssystem

4.5 Reaktion mit suspendiertem Pilz

4.5.1 Wahl des optimalen Reaktionsmediums

Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wurden folgende Reaktionslösungen verglichen:

- VE-Wasser, Na-Phosphatpuffer
- Ringer Lösung als Minimalmedium mit Na-Phosphatpuffer
- Na- und K-Phosphatpuffer
- Verschiedene Konzentrationen des Na-Puffers

Bei dem Vergleich der Reaktionsverläufe im Na- und K-Phosphatpuffer bei einer Konzentration von 0,1 mol/L kann kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Wahl des Puffers kann hier nach reinen Kostenkriterien erfolgen.

Der Vergleich der Reaktionen in VE-Wasser und Ringer Lösung mit Na-Phosphatpuffer ergab eine deutliche Reaktionsverlangsamung. Das Nährsalzangebot durch die Ringerlösung wird von dem Pilz in der stationären Phase nicht durch eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit honoriert. Den geringsten Umsatz erhält man bei dem Versuch mit VE-Wasser, wie man in Abbildung 4.16 für *Aspergillus niger* sehen kann. Somit ist eine Pufferung des Reaktionsmediums notwendig.

Die Pufferkonzentration ist wichtig für die Kapazität des Puffers und die osmotische Umgebung der Pilzzellen. Die Variation der Pufferkonzentration ergab, dass die optimale Konzentration 0,1 mol/L K-Phosphatpuffer beträgt. Der pH-Wert dieser Lösung bleibt während der gesamten Reaktionszeit konstant. Bis zu einer Konzentration von 0,05 mol/L ist keine verlässliche Pufferung des Mediums gewährleistet. Eine Erhöhung der Pufferkonzentration über 0,1 mol/L verschlechtert die Reaktionsgeschwindigkeit wieder.

Für *Beauveria bassiana* ergeben sich vergleichbare Effekte.

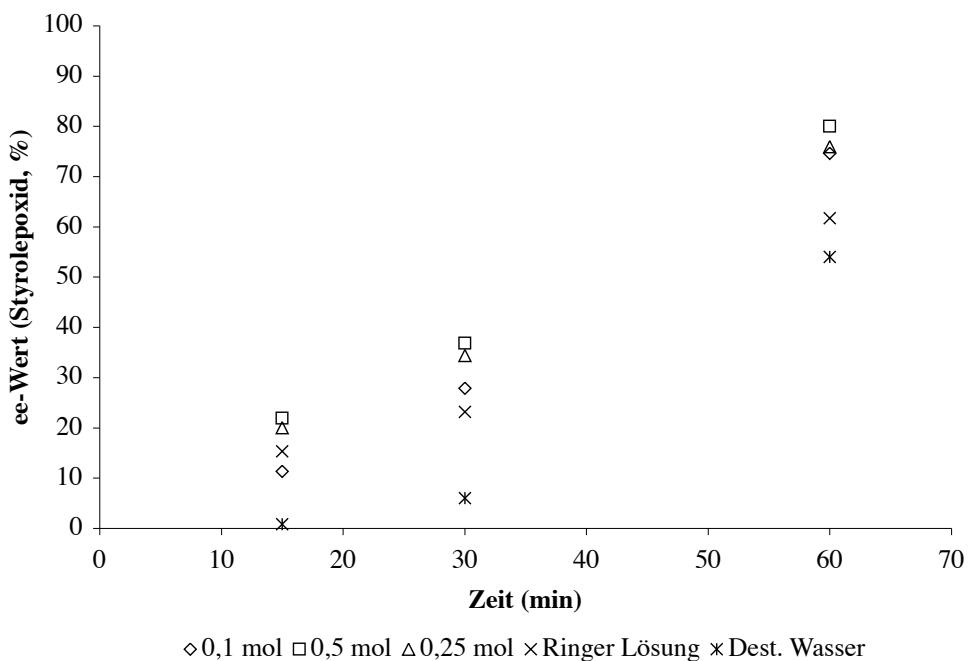


Abbildung 4.16: Variation der Pufferkonzentration bei der Biohydrolyse

4.5.2 Reaktionsverlauf mit gefriergetrocknetem Pilz

Für die Flexibilisierung der Reaktionsdurchführung ist eine stabile Lagerung des Biokatalysators von Vorteil. Die Lagerung von gefriergetrocknetem Pilz ist hierzu

ein gängiger Ansatz [14]. In Abbildung 4.17 ist eine Reaktion von freiem Pilz mit einer Reaktion der gleichen Menge Pilz, der gefriergetrocknet wurde, verglichen. Beide Reaktionen verlaufen mit dem Pilz *Aspergillus niger* im Rahmen der Meßgenauigkeit gleich schnell. Bei *Beauveria bassiana* lässt die Biohydrolyseaktivität nach der Gefriergetrocknung nach. Zur Gefriergetrocknung muss der Pilz zuvor mit Schutzstoffen behandelt werden, damit die Proteinausstattung intakt bleibt. Es wurde mit Glycerin (10%ig) und Magermilch gearbeitet. Beide Stoffe schützen die Pilzzellen während der Gefriergetrocknung vor der Denaturierung der Proteine [10]. Als Antioxidant wird Na-*L*-Ascorbat in einer Konzentration von 0,5 % hinzugegeben. Die

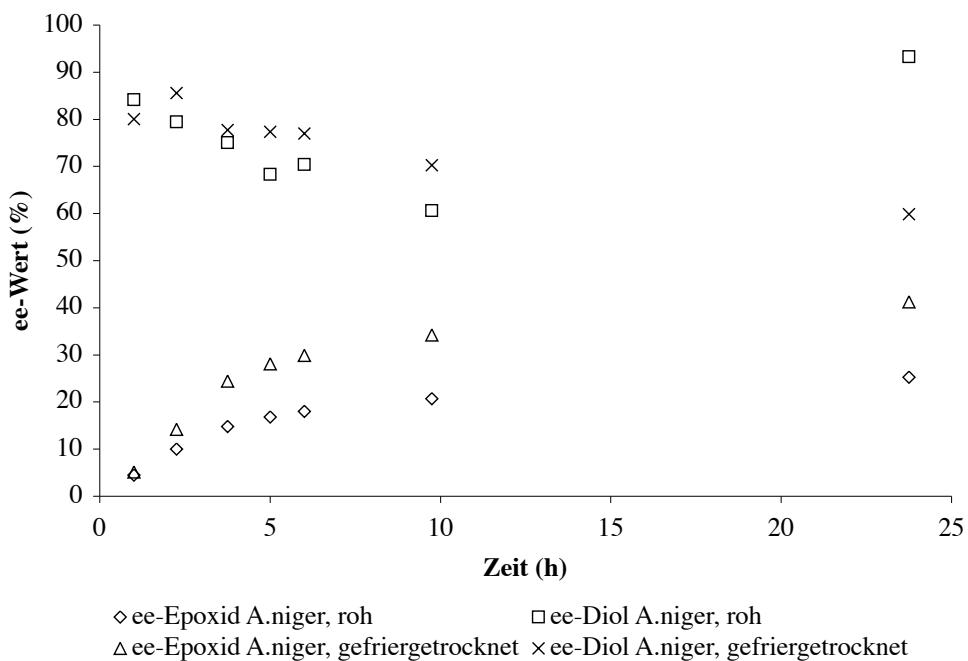


Abbildung 4.17: Vergleich der Reaktion mit frischem und gefriergetrocknetem Pilz

Ergebnisse der Reaktion mit gefriergetrocknetem Pilz und Zuschlagsstoffen nach 6 h Reaktionszeit sind in Tabelle 4.9 angegeben. Bei dem Pilz *Beauveria bassiana* zeigen die Zubereitungen geringere Aktivitäten als der herkömmlich gefriergetrocknete Pilz. Mit *Aspergillus niger* hingegen bleibt in der Zubereitung mit 20% Milchpulver und 0,5 % Ascorbinsäure die hydrolytische Aktivität vollständig erhalten.

Tabelle 4.9: Enantiomerenüberschuss der Gefriertrocknungszubereitungen nach 6 h Reaktionszeit

Zuschläge	<i>B. bassiana</i>	<i>A. niger</i>
	ee-Wert	Styrolepoxid
Referenz	68 %	45 %
Referenz, gefroren	23 %	12 %
10% Glycerin	23 %	12 %
10%Glycerin, 0,5%Ascorbinsäure	11 %	17 %
20% Milchpulver	36 %	25 %
20% Milchpulver, 0,5%Ascorbinsäure	40 %	100 %
10%Glycerin, 20% Milchpulver, 0,5%Ascorbinsäure	29 %	32 %
Massenanteil zu der Zellsuspension, 1 h Einwirkzeit		

Die Abbildung 4.18 zeigt den ee-Wert des Styrolepoxids nach einer Stunde Reaktion der Ansätze mit unterschiedlich lange bei 5°C gelagertem gefriergetrocknetem Pilz. Die Aktivität liegt nach 15 Tagen sowohl bei *Aspergillus niger* als auch bei *Beauveria bassiana* auf gleichbleibend hohem Niveau. Die Meßwerte weisen eine relativ hohe Schwankung auf, da nur mit einem geringen Reaktionsvolumen gearbeitet werden kann. Der Enantiomerenüberschuss des entstehenden 1,2-Phenylethandiols ist ebenfalls gleichmäßig hoch (nach 1 h Reaktionszeit bei allen Versuchen 80 %). Die Lagerung des gefriergetrockneten Pilzes ist unter diesen Bedingungen für 10 Tage unter Beibehaltung der katalytischen Aktivität möglich.

4.5.3 Reaktion unter O₂-Atmosphäre

Der Einfluss der Sauerstoffkonzentration in der Gasatmosphäre auf die Biohydrolyse wurde ebenfalls untersucht. Die Reaktionsgeschwindigkeit in einem geschlossenen Behälter wird mit der in einem Behälter, der mit O₂ beaufschlagt wird, verglichen. Die Verläufe der Enantiomerenüberschüsse des Styrolepoxids sind in Abbildung 4.19 dargestellt, wo ein deutlich schnellerer Anstieg des ee-Wertes feststellbar ist. Die Pilze befinden sich zwar am Ende der stationären Phase mit einem deutlich eingeschränkten und auf Zellerhalt eingestelltem Metabolismus [70], eine Erhöhung des Sauerstoffgehaltes erhöht trotzdem ihre katalytische Aktivität.

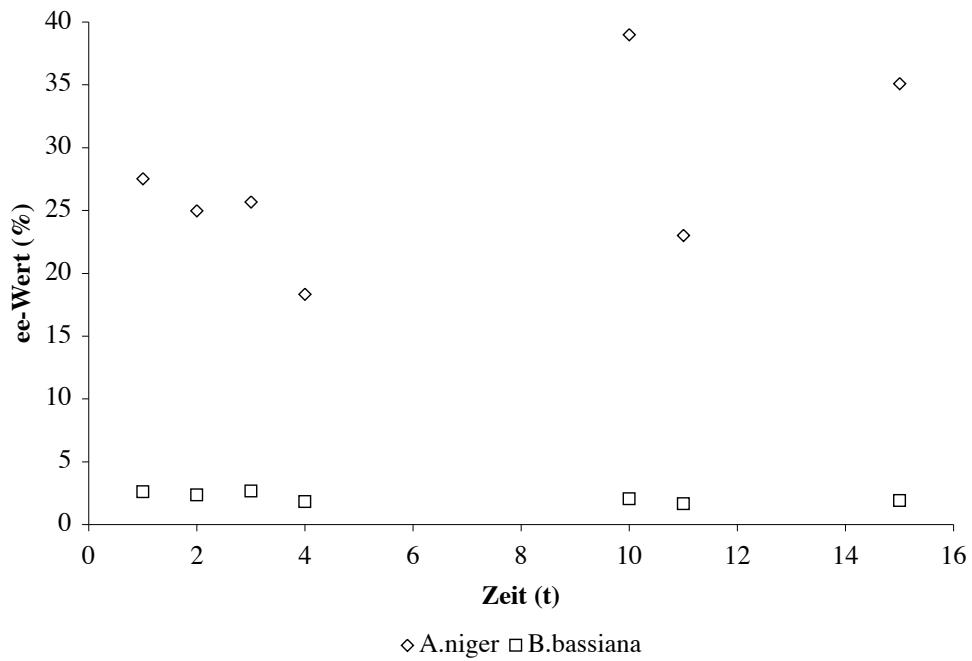


Abbildung 4.18: Aktivität des gefriergetrockneten Pilzes nach Lagerung

4.6 Reaktion in organischen Lösemittelsystemen

4.6.1 Wahl der geeigneten Lösemittel

Um die Löslichkeit der Edukte zu erhöhen und gegebenenfalls die Autohydrolyse durch Verringerung der Wasserkonzentration zu minimieren, wird ein geeignetes Cosolvens gesucht. Kriterien hierbei sind eine möglichst niedrige Verringerung der Hydrolyseaktivität der Biokatalysatoren, gutes Lösungsvermögen für die Epoxide und eine geringe Nucleophilie. Aliphatische Lösemittel, die zwei letzten Anforderungen sehr gut erfüllen, scheiden aus, da sie die Aktivität der Epoxidhydrolasen vollständig auf reduzieren. Vermutlich zerstören lipophile Lösemittel die für die Enzyme wichtigen Membranen. Diese Eigenschaft wird in der Analytik zum Abbruch der Reaktion während der Probenahme genutzt. Für biokatalytische Reaktionen werden häufig wasserähnliche Lösemittel, wie Dimethylsulfoxid und Dimethylformamid, als Cosol-

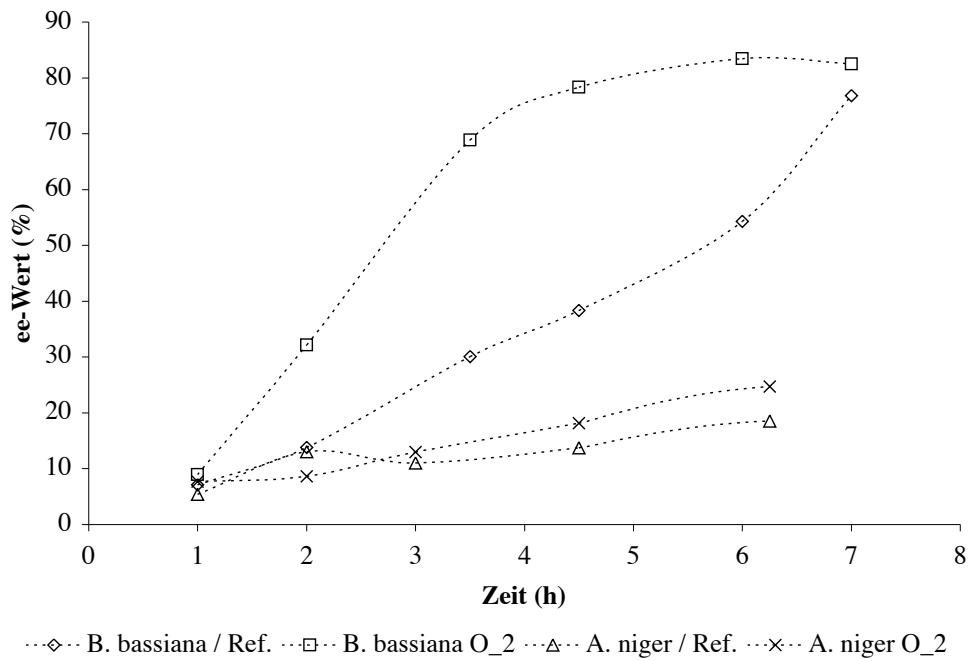


Abbildung 4.19: Vergleich des Enantiomerenüberschusses von Styroleoxid in einer Reaktion mit Luft und Sauerstoffatmosphäre

ventien genutzt [25]. In Abbildung 4.20 werden Reaktionsverläufe mit unterschiedlichen Lösemitteln gezeigt.

Die Reaktion mit *Aspergillus niger* als Katalysator führt mit Aceton und DMSO in einer Versuchszeit von 24 h zu hohen ee-Werten. Die Lösemittel Dioxan und t-Butanol ergeben mittlere Enantiomerenüberschüsse, die bei den anderen untersuchten Lösemitteln unter der 50%-Grenze verbleiben. Bei *Beauveria bassiana* hingegen ergeben nur DMSO und Aceton geringe Enantiomerenüberschüsse bei 20% Lösemittelanteil. Die anderen Lösemittel unterdrücken hingegen die Reaktion.

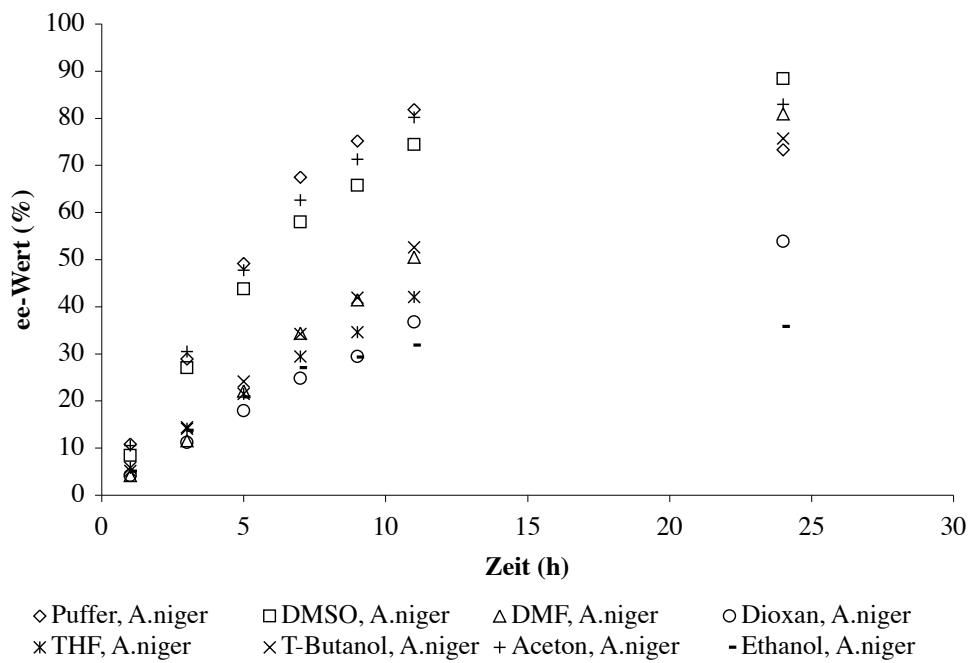


Abbildung 4.20: Biohydrolyse mit *A. niger* in 20% des angegebenen Lösemittels als Cosolvens

Tabelle 4.10: ee-Werte der Biohydrolyse nach 11 h Reaktionszeit und 20% Cosolvens

Cosolvens 20%	<i>A. niger</i>		<i>B. bassiana</i>	
	ee-Werte Epoxid	ee-Werte Diol	ee-Werte Epoxid	ee-Werte Diol
Wasser	82%	73%	66%	68%
Aceton	80%	72%	10%	55%
DMSO	74%	73%	14%	61%
t-Butanol	53%	68%	8%	26%
DMF	51%	68%	3%	12%
THF	42%	63%	2%	5%
Dioxan	37%	66%	2%	58%
Ethanol	32%	61%	2%	30%

4.6.2 Wahl des Konzentrationsbereiches der Lösemittel

Die Konzentration der interessanten Cosolventien wird variiert. Die dabei auftretenden Enantiomerenüberschüsse sind in Tabelle 4.11 zusammengefasst. Bei der Reaktion mit *Aspergillus niger* als Katalysator ist die Verwendung von 10% DMSO (E-Wert 48) und Aceton (E-Wert 35) am günstigsten. Die Reaktion wird durch die Lösemittelzugabe jedoch stark verlangsamt. Nach 9 Stunden ergibt sich ein Umsatz von nur 0,44 bzw. 0,35.

Bei dem Pilz *Beauveria bassiana* ergibt sich mit 10% Aceton im Reaktionsgemisch ein E-Wert von 45. Es wird ebenfalls ein Umsatz von 0,45 nach 9 Stunden erreicht. 10% Dioxan ergeben einen E-Wert von 56 bei einem Umsatz von 0,48. Für ein System mit beiden Biokatalysatoren ist Aceton mit einer Konzentration von 10% das Cosolvens der Wahl. Die Reaktion wird allerdings verlangsamt, was eine Aufkonzentrierung des Katalysators notwendig macht.

4.6.3 Konzentrationssteigerung des Eduktes

In Tabelle 4.12 werden Löslichkeiten von Styrolepoxid in verschiedenen Lösemittelgemischen aufgeführt. Im Gegensatz zu einer Löslichkeit von 1 g/L in reinem Wasser lässt sich die Eduktkonzentration mit einem Lösemittelgemisch steigern. Als Preis dafür erhält man aber eine geringere Aktivität des Biokatalysators.

In Tabelle 4.13 werden die gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten bei Eduktsteigerungen aufgetragen. Auch hier wird deutlich, dass eine Aufkonzentrierung des Katalysators die Reaktion in diesen Medien erst in einen interessanten Bereich bringen kann. Da die Geschwindigkeit der Autohydrolyse von der Katalysatormenge unabhängig ist, können so das Verhältnis Nebenreaktion zu Hauptreaktion zu günstigeren Werten verändert und der Enantiomerenüberschuss des Diols deutlich gesteigert werden.

Tabelle 4.11: ee-Wert nach 9 h bei einer Biohydrolyse mit verschiedenen Cosolvansanteilen

Pilz	Cosolvans	Anteil	ee-Wert	ee-Wert	E-Wert
			Epoxid	Diol	
<i>A. niger</i>	Aceton	5 %	66 %	87 %	29
	Aceton	10 %	53 %	91 %	35
	Aceton	20 %	71 %	74 %	15
	Aceton	30 %	7 %	80 %	10
<i>A. niger</i>	DMSO	5 %	72 %	84 %	25
	DMSO	10 %	72 %	91 %	48
	DMSO	20 %	66 %	71 %	11
	DMSO	30 %	40 %	94 %	44
<i>A. niger</i>	DMF	5 %	35 %	71 %	8
	DMF	10 %	19 %	70 %	7
	DMF	20 %	41 %	71 %	8
	DMF	30 %	5 %	-	-
<i>B. bassiana</i>	Aceton	5 %	51 %	58 %	7
	Aceton	10 %	45 %	93 %	45
	Aceton	20 %	10 %	54 %	5
	Aceton	30 %	2 %	35 %	3
<i>B. bassiana</i>	Dioxan	5 %	10 %	84 %	9
	Dioxan	10 %	85 %	91 %	56
	Dioxan	20 %	2 %	49 %	3
	Dioxan	30 %	5 %	70 %	5

Tabelle 4.12: Löslichkeit von Styrolepoxid in Lösemittelgemischen

Lösemittel	5 %	10 %	20 %
Aceton	2,0 g/L	3,0 g/L	4,0 g/L
Dioxan	2,2 g/L	3,0 g/L	4,0 g/L
DMSO	2,4 g/L	3,1 g/L	4,0 g/L

4.7 Aufschluss der Pilzzellen

Verschiedene Aufschluß- und Zellwandperforationsverfahren wurden für die untersuchten Pilze ausprobiert und anschließend ein Aktivitätstest für die Epoxidhydrolyse durchgeführt. Die Vitalität des Aufschlusses wird durch Auftragung auf eine Agarplatte und Inkubation über 3 Tage bestimmt. Das Ziel dieser Versuche ist einen

Tabelle 4.13: ee-Wert der Biohydrolysen mit verschiedenen Eduktkonzentrationen nach 8 h

Pilz	Cosolvens	Konzentration Styrolepoxyd	ee-Wert	ee-Wert	E-Wert
			Epoxid	Diol	
<i>A. niger</i>	Aceton	1 g/L	48 %	74 %	6
	Aceton	5 g/L	29 %	64 %	6
	Aceton	10 g/L	- %	36 %	-
<i>A. niger</i>	DMSO	1 g/L	75 %	85 %	28
	DMSO	5 g/L	72 %	76 %	15
	DMSO	10 g/L	- %	39 %	-
<i>B. bassiana</i>	Dioxan	1 g/L	33 %	98 %	1,3
	Dioxan	5 g/L	8 %	37 %	1,8
	Dioxan	10 g/L	- %	- %	-

möglichst vollständigen Zellaufschluss mit einer hohen Epoxidhydrolyseaktivität zu erhalten. In Tabelle 4.14 sind die dabei ermittelten Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 4.14: Aufschlussverfahren mit den resultierenden Aktivitäten und Vitalitäten

Aufschlussverfahren	<i>Aspergillus</i> <i>niger</i>		<i>Beauveria</i> <i>bassiana</i>	
	Hydolyse- aktivität	Vitalität	Hydolyse- aktivität	Vitalität
		%		
Gefrieretrocknung	100	hoch	50	hoch
Acetonaufschluss	0	nicht vorh.	0	nicht vorh.
Butylacetataufschluss	0	nicht vorh.	0	nicht vorh.
Zelldisruptor	40	halbiert	40	halbiert
Ultraschall	70	hoch	75	hoch
Lipaseaufschluss	100	hoch	100	hoch

Mit den hier verwendeten Aufschlussverfahren lassen sich Pilzzellen nicht unter Beibehaltung der hohen Epoxidhydrolaseaktivität aufschließen. Bei dem mechanischen Verfahren wird ein Teil der Zellen zerscheert, der Rest gut verteilt. Es verbleibt eine Hydrolaseaktivität, die aber von den erhaltenen Zellen herrühren kann. Auch eine Verlängerung der Aufschlusszeit verändert das Bild nicht. Nach den Lösemittelaufschlüssen sind die Pilzzellen nicht mehr vital, aber die Hydrolyseaktivität ist verloren gegangen. Ein vollständiger Aufschluss ist auch mit dem Ultraschallaufschluss nicht

möglich. Hier führt der Aufschluss einer sehr verdünnten Lösung und anschließende Aufkonzentration durch Umkehrosmose auch nicht zu einer aktiven Fraktion. Die Vitalität der Pilzzellen wurde auch durch den Aufschluss mit Lipasen nicht verändert.

Die verwendeten Aufschlussverfahren haben sich bei anderen Problemen bewährt [9]. Bakterien und Hefezellen wurden damit erfolgreich unter Beibehaltung ihrer Aktivitäten aufgeschlossen. Da die Zellwand der Schimmelpilze eine andere chemische Zusammensetzung und somit auch andere mechanische Eigenschaften aufweist, treten beim Aufschluss dieser Zellen zusätzliche Schwierigkeiten auf. Die Beibehaltung der Hydrolaseaktivität stellt bei den rabiateren Verfahren ein zusätzliches Problem dar. Der Einsatz von Proteaseinhibitoren zur Verhinderung des Abbaus der Epoxidhydrolasen durch eventuell vorhandene zelleigene Proteasen, führt zu dem Effekt, dass die Epoxidhydrolasen ebenfalls vollständig durch die Inhibitoren gehemmt werden. Die Hinzugabe von Proteaseinhibitoren sowohl zu dem ganzen Zellsystem als auch zu den Zellaufschlüssen resultiert in einem vollständigen Verlust der Epoxidhydrolaseaktivität.

Zur Stabilisierung und Vernetzung der Proteine können verschiedene Stoffe dem Aufschlusspuffer hinzugegeben werden. Die Salzkonzentration spielt dabei eine wichtige Rolle. Weiterhin können Paraffin und Glycerin membrangebundene Proteine stabilisieren während Glutardialdehyd häufig in der ist, Lage Proteine zu vernetzen. In Tabelle 4.15 werden die Auswirkungen der

Zuschlagsstoffe auf eine Reaktion mit einem mechanisch aufgeschlossenen Pilz bewertet. Hierzu wird die relative Hydrolyseaktivität mit einer ohne Zuschlagstoffen aufgeschlossenen Referenzreaktion verglichen.

Glycerin und Paraffin als Zuschlagsstoffe hemmen die Reaktion nicht, genau wie Glucose, die keinen Einfluß auf die Reaktion zeigt. Glutardialdehyd hemmt die Reaktion ebenfalls nicht, so dass eine Vernetzung einer angereicherten Enzymfraktion so möglich ist. Bei einer Natriumchloridkonzentration von 10 g/L ist eine Reaktionsbeschleunigung von 20% zu beobachten und demzufolge sollte der optimierte Aufschlusspuffer diese Salzkonzentration aufweisen. Die aussichtsreichen Aufschlussverfahren (Aktivität bei verbleibender Vitalität) wurden miteinander kombiniert. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 4.16 zusammengefasst.

Bei den Kombinationen der Aufschlussverfahren wird keine brauchbare Kombination aus einer geringen Vitalität bei hoher Aktivität erreicht. Mit den hier verwende-

Tabelle 4.15: Zuschlagsstoffe zu einem mechanischen Aufschluss und ee-Werte nach 8 h Biohydrolyse

Zuschlagsstoff	<i>Aspergillus niger</i>		
	Hydolyseaktivität		ee-Wert
	Epoxid	ee-Wert	
ohne Zuschlag		52	
1g/L NaCl		53	
5g/L NaCl		69	
10g/L NaCl		61	
15g/L NaCl		54	
1g/L Glucose		73	
Glycerin		51	
Paraffin		53	
Glutardialdehyd		50	

Tabelle 4.16: Kombinationen aussichtsreicher Aufschlussverfahren mit den resultierenden Aktivitäten und Vitalitäten

Aufschlussverfahren	<i>Aspergillus niger</i>	Vitalität	<i>Beauveria bassiana</i>	Vitalität
	Hydolyseaktivität		Hydolyseaktivität	
Gefrieretrocknung und Ultraschall	70%	hoch	-	nicht vorhanden
Gefrieretrocknung und Acetonaufschluss	69%	gering	-	nicht vorhanden
Gefrieretrocknung und Ultraschall	38%	mittel	-	nicht vorhanden

ten Methoden ist kein einfacher, technisch verwendbarer Aufschluss der Pilzzellen möglich. Demzufolge muss hier ein aufwendiges Laborverfahren eingesetzt werden.

4.8 Immobilisierung der Biokatalysatoren

4.8.1 Reaktion mit PVA verkapselten Mikroorganismen

Ein Einschluss von ganzen Zellen von *Beauveria bassiana* in Polyvinylalkohol ist unter Beibehaltung der Hydrolyseaktivität möglich. *Aspergillus niger* hingegen verliert die stereoselektive Hydrolyseaktivität vollständig. Der hierfür zuständige Bearbeitungsschritt konnte durch schrittweise Durchführung und anschließenden Aktivitätstest nicht identifiziert werden.

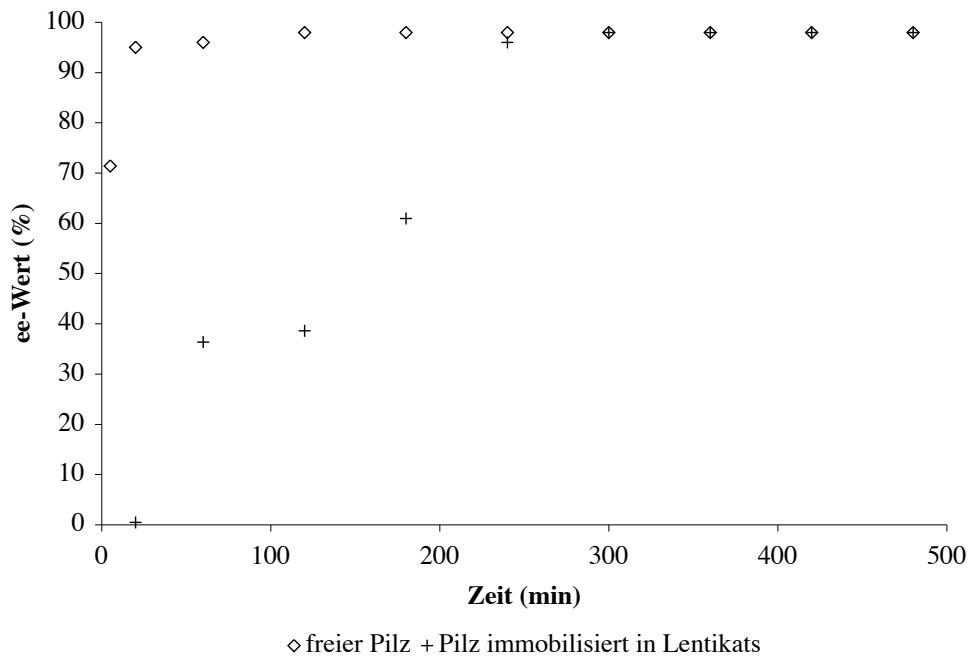


Abbildung 4.21: Reaktionsverlauf mit freiem und immobilisiertem *Beauveria bassiana*

Die PVA-Kapsel stellt eine Diffusionsbarriere dar, die vom Edukt und Produkt überwunden werden muß. Durch diesen zeitintensiven Schritt kommt es zu einer Verlangsamung der Gesamtreaktionsgeschwindigkeit, die in Abbildung 4.22 dargestellt ist. Hierdurch steigt die Konzentration des Nebenproduktes (*S*)-1,2-Phenylethandiol

durch die Autohydrolyse des Eduktes stärker als bei einer Reaktion mit freien Pilz-Zellen. Der Enantiomerenüberschuss des Produktes ist geringer, was auch aus der Abbildung 4.22 hervorgeht.

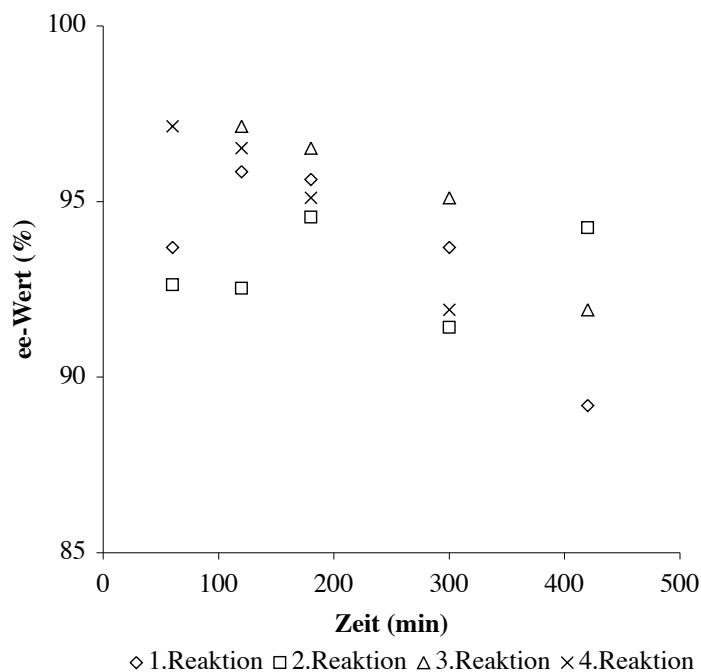


Abbildung 4.22: ee-Werte des 1,2-Phenylethandiols bei der Biohydrolyse mit Lenti-Kats unter Wiederverwendung des Immobilisates

4.8.2 Wiederverwendung der PVA-Kapseln

Die durch Filtration vollständig zurückgewonnenen PVA-Kapseln behalten eine Hydrolyseaktivität bei, die jedoch mit der Zeit abnimmt. Die Verläufe der Enantiomerenüberschüsse des Eduktes sind in Abbildung 4.23 für Reaktionen am Herstellungs- tag, nach einem Tag, sowie nach 5 und 6 Tagen aufgetragen. Nach dem 5. Tag ist eine deutliche Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit feststellbar. Die Selektivität nimmt im weiteren Verlauf zusätzlich ab und liegt nach 6 Tagen bei einer Reaktionszeit von 500 min unter 60%. Der Enantiomerenüberschuss des 1,2-Phenylethandiol

zeigt den typischen Verlauf mit einem hohen Wert von über 95 %, der über die Reaktionszeit auf ca. 90 % abnimmt. Mit steigender Umlaufzahl ist eine leichte Abnahme feststellbar, die aber im Rahmen der Meßgenauigkeit liegt.

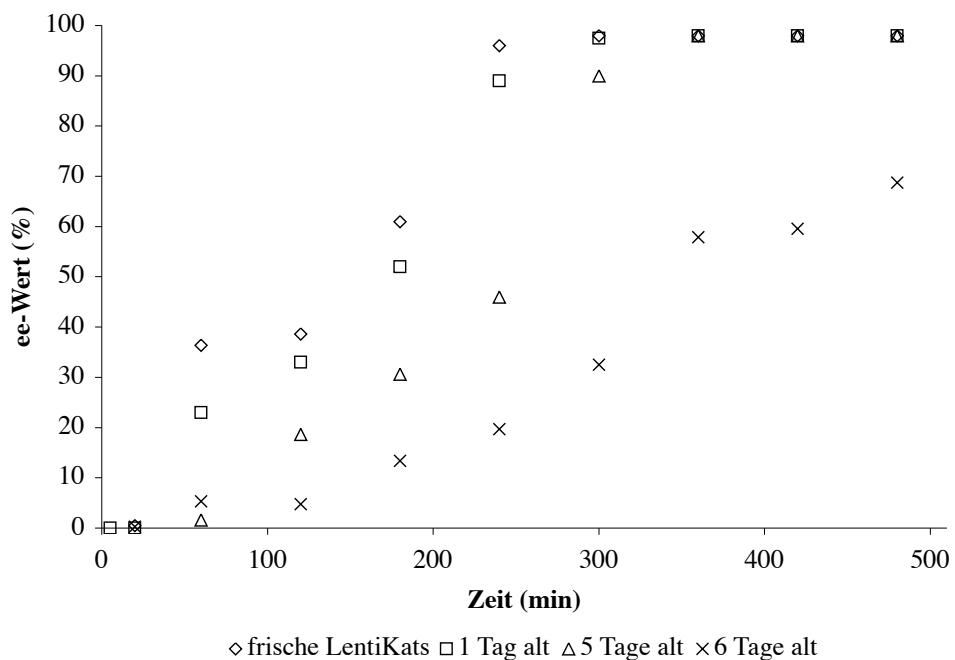


Abbildung 4.23: Enantiomerenüberschüsse von *Styrolepoxid* mit wiederverwendeten *LentiKats*

4.8.3 Bestimmung des Diffusionskoeffizienten in den PVA-Immobilisaten

Zur Festlegung des Diffusionsmechanismus muss entschieden werden, ob Porendiffusion oder ein Lösungs-Diffusionsmechanismus vorliegt. Hierzu wurde das PVA auf das Vorliegen einer Porenstruktur untersucht. In der REM Aufnahme konnte bis zu einer Vergrößerung von 100000 keine Oberflächenstruktur mit Porenmündern erkannt werden (Abbildung 4.24). Bei stärkeren Vergrößerungen (Beschleunigungsspannung von über 3 kV) wird die Oberfläche durch den Beschuß mit Elektronen beschädigt und quillt blumenkohlartig auf.

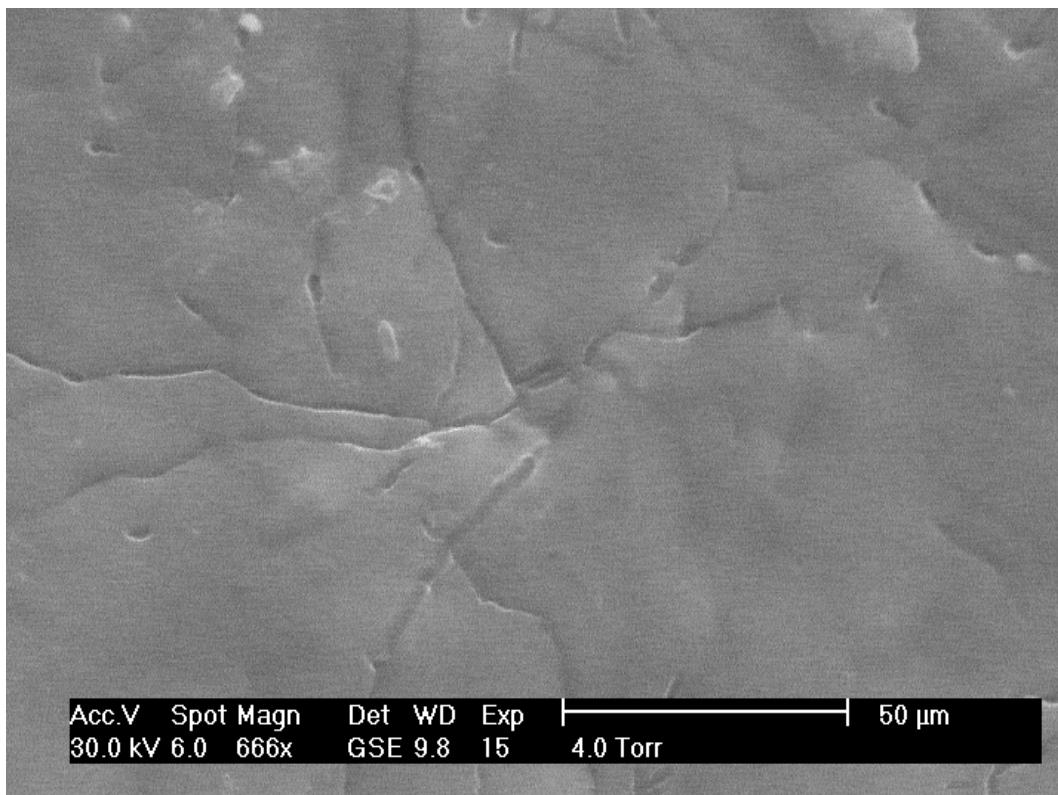


Abbildung 4.24: REM Aufnahme der Oberfläche eines LentiKats

Um in dem Bereich von 100 bis 2 nm Poren nachzuweisen bzw. auszuschließen, wurde das Verfahren der Thermoporometrie verwendet. Hierbei wird die Energiemenge und die Temperatur gemessen, die für einen flüssig-fest Phasenübergang von Wasser in dem Material gebraucht wird. Bei dem Vorhandensein der Poren sinkt die Schmelztemperatur von Wasser unter 0°C. Die Signalbreite und die Schmelztemperatur sind von dem Porendurchmesser und der Porenverteilung abhängig [69]. Mit diesem Verfahren konnte ebenfalls keine Porenstruktur nachgewiesen werden. Für das Modell wird daher ein Lösungs-Diffusionsansatz verwendet. Die Diffusion in den PVA-Immobilisaten wurde durch Messungen des Stofftransportes durch einen PVA-Film angenähert.

Die Konzentrationsverläufe für die turbulent durchmischten Bulk- und Permeatphasen sind in Abbildung 4.25 aufgetragen. Zur Auswertung der Konzentrationsverläufe in den beiden Phasen wurde das 1. Ficksche Gesetz (Formel 4.2)

$$J = -D \partial_x c \quad (4.2)$$

für die stationäre Diffusion zwischen zwei geschlossenen Halbräumen gelöst (Anhang 2) und die Konzentrationen der Bulkphase entsprechend der Geradengleichung 4.3 aufgetragen.

$$\ln\left(1 - \frac{c^p(t)}{c_\infty}\right) = -\alpha t \quad (4.3)$$

Der Diffusionskoeffizient lässt sich aus der Steigung der Geraden bestimmen.

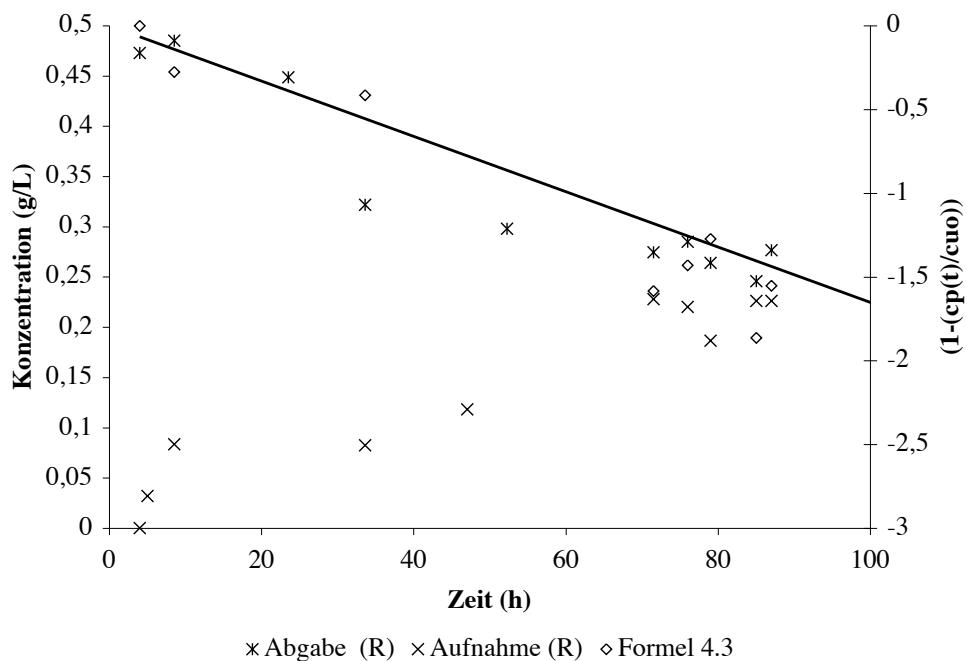


Abbildung 4.25: Konzentrationsverläufe von 1,2-Phenylethanol in der Bulk- und Permeatphase und die logarithmische Darstellung der Permeatphase nach Gleichung 4.3

Für Glucose und Styrolepoxid ergeben sich vergleichbare Verläufe. Die bestimmten Diffusionskoeffizienten in dem Polyvinylalkohol sind in Tabelle 4.17 angegeben.

Der Vergleich der Diffusionskoeffizienten mit Werten für Glucose im Wasser ergibt, dass die Diffusion in PVA um eine Größenordnung langsamer verläuft. Dies ist ein plausibles Ergebnis, da das PVA eine Matrix um das Wasser erzeugt, die die Mobilität des gelösten Stoffes verringert.

Tabelle 4.17: Gemessene Diffusionskoeffizienten

Substanz	Diffusionskoeffizient (m ² /s)	Lit:
1,2-Phenylethanol	5,897*10 ⁻¹⁰	-
Styrolepoxid	5,897*10 ⁻¹⁰	-
Glucose	3,538*10 ⁻¹⁰	-
Literaturdaten:		
Glucose in Wasser	0,521*10 ⁻⁹	[5]
Na ⁺ in Wasser	1,33*10 ⁻⁹	[5]
Cl ⁻ in Wasser	1,78*10 ⁻⁹	[94]

4.9 Bewertung der Substratbreite

Um die Substratbreite der Reaktion zu untersuchen, werden an den in Abbildung 4.26 gekennzeichneten Stellen Substituenten angebracht und deren Einfluß auf die Biohydrolyse untersucht. Ebenfalls werden eine Verlängerung der Verbindung zwischen dem Oxiranring und dem Benzolring, Substrate mit einer Ethergruppe (Abbildung 4.27) und kondensierte Ringsysteme, wie in Abbildung 4.28 dargestellt, untersucht.

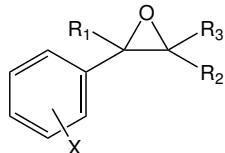


Abbildung 4.26: Styrolepoxidtypsubstrate

Durch das Hinzufügen von Substituenten an den Positionen R1-R3 wird im Vergleich zu Styrolepoxid die Reaktionsgeschwindigkeit verringert. Die Enantiomerenüberschüsse nach bestimmten Reaktionszeiten sind in Tabelle 2.2 aufgeführt und mit denen des Styrolepoxids verglichen. Die Quellen der Daten sind ebenfalls aufgeführt. Bei der Hydrolyse mit *Beauveria bassiana* lässt sich eine Verringerung der Hydrolyseaktivität in der Reihenfolge $R_3 > R_1 > R_2$ feststellen. Die Variation des Substituenten am Aromaten führt zu dem Ergebnis, dass die Reaktionsgeschwindigkeit herabgesetzt wird, aber hohe Enantiomerenüberschüsse für das Epoxid erzielt werden können. Bei *Beauveria bassiana* ergibt sich die Reihenfolge $\sim CH_3 \sim Br \sim F > CN > NO_2$. In diesem Fall scheint es elektronische Gründe für die Reihenfolge zu geben. CN und NO_2 haben einen elektronenziehenden Effekt (+M und +I), während die besser hy-

drolysbaren Verbindungen Substituenten mit eher elektronenlieferndem Charakter aufweisen. Besser hydrolysiert werden auch Verbindungen mit einem elektronenreichen Aromaten. Die hohen Umsätze mit geringer Selektivität der elektronenziehenden Substituenten weisen darauf hin, dass die elektronenärmeren Aromaten das Enzym blockieren und so die unselektive Autohydrolyse die Selektivität der Gesamtreaktion verringert. Der Unterschied im elektronischen Einfluß wird auch durch die Biohydrolyse des Pyridinderivates dokumentiert. Bei dem in dieser Hinsicht unempfindlicheren *Aspergillus niger* verläuft die Reaktion zu hohen Umsätzen bei hoher Selektivität, während die Reaktion mit *Beauveria bassiana* nicht abläuft.

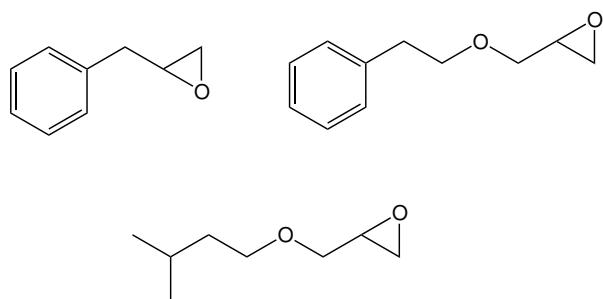


Abbildung 4.27: Die Substrate Benzylloxiran (K1), Epoxypropyl-phenylether (K2) und Epoxypropyl-isopropylether (K3)

Tabelle 4.18: Enantiomerenüberschüsse von Biohydrolysen der Substrate mit verlängerten Seitenketten

Substrat	Mikroorganismus	ee _E [%]	ee _D [%]	Reaktionszeit [h]
K1	<i>A. niger</i>	65	90	4
K1	<i>B. bassiana</i>	10	95	30
K2	<i>A. niger</i>	80	56	1
K2	<i>B. bassiana</i>	56	25	30
K3	<i>A. niger</i>	80	-	3
K3	<i>B. bassiana</i>	35	-	24

Die Verlängerung der Seitenkette führt zu einem Einbruch der Hydrolyseaktivität bei *Beauveria bassiana*, die bei der Verlängerung der Seitenkette um ein Kohlenstoffatom die stärkste Verringerung der Biohydrolyse zeigt. Nach 30 h Reaktionszeit ergibt sich ein Enantiomerenüberschuss des Edukts Benzylloxirans von 10%. Die flexible-

ren sauerstoffverbrückten Seitenketten der Substrate Epoxypropyl-phenylether (K2) und Epoxypropyl-isopropylether (K3) führen zu einer etwas höheren Selektivität, die aber weit unter der des Styrolepoxids liegt. Bei der Biohydrolyse mit *Aspergillus niger* sind generell höhere Selektivitäten und Reaktionsgeschwindigkeiten feststellbar. Die sauerstoffverbrückten Seitenketten der Substrate Epoxypropyl-phenylether und Epoxypropyl-isopropylether hindern nicht eine schnelle Biohydrolyse. Die bei der Variation der Substituenten am Aromaten festgestellten sterischen Einflüsse können durch die Flexibilität der Seitenkette offensichtlich umgangen werden. Die Verbindungen K1 bis K3 markieren den Übergang zu langkettigen Substraten, die in die Gruppe der monosubstituierten Epoxide einzuordnen sind. Für diese Substrate werden typischerweise Epoxidhydrolasen aus Rotalgen verwendet. Durch sie wird die Sonderstellung der Pilzepoxidhydrolasen unterstrichen.

Die Hydrolyse der kondensierten Ringsysteme 1,2-Indenepoxid und 1,4-Epoxy-1,2,3,4-Tetrahydro-Naphtalin verläuft mit *Beauveria bassiana* erwartungsgemäß langsamer als bei Styrolepoxid (siehe Tabelle 2.1). Die Biohydrolyse mit *Aspergillus niger* findet nicht statt. Das Ringsystem ist für das Enzym offensichtlich zu starr.

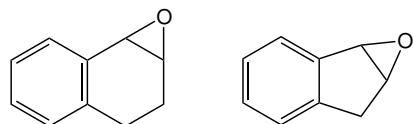


Abbildung 4.28: Ringförmige Substrate, 1,4-Epoxy-1,2,3,4-Tetrahydro-Naphtalin und 1,2-Indenepoxid

5 Modellierungen der Biohydrolyse

Die Modellierung der Biohydrolyse in dieser Arbeit gliedert sich in drei Schritte:

- Gewinnung einer geeigneten Beziehung für die Kinetik der enzymatischen Hauptreaktion durch Anpassung verschiedener Modellansätze an komplexe Meßwertsätze,
- Hinzufügen eines Stofftransportwiderstandes eindimensional,
- Übertragung des Modells auf eine 3D-Geometrie und Modellierung einer Batchreaktion mit LentiKats

Die ersten zwei Schritte werden in Matlab (R 13) aufgesetzt und berechnet. Die Geometrie und Diskretisierung für den dritten Schritt wird mit Hilfe des Programmepaketes Femlab durchgeführt und an Matlab übergeben, wo auch die anschließende numerische Berechnung durchgeführt wird. Im ersten Schritt ist eine analytische Lösung des Modells noch möglich, da es sich ausschließlich um einfache Differentialgleichungen handelt. Die Behandlung des Stofftransportwiderstandes erfordert das Aufstellen partieller Differentialgleichungen, die analytisch nicht mehr zu lösen sind [96]. In Matlab wird mit dem Solver ODE 45 gearbeitet, der das gewöhnliche Differentialgleichungssystem numerisch löst. Zuvor werden die partiellen Differentialgleichungen mittels der orthogonalen Translokation in ein System von gewöhnlichen Differentialgleichungen zerlegt.

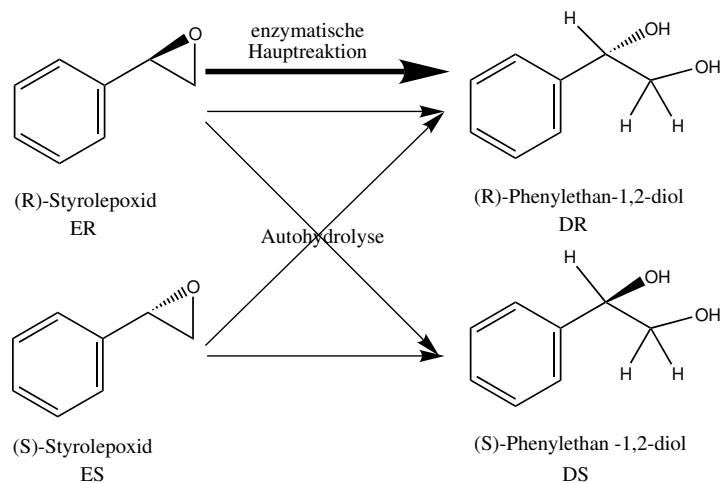
5.1 Reaktion mit suspendiertem Pilz

Das zu modellierende Reaktionssystem ist in Abbildung 5.1 dargestellt.

Der Bilanzraum ist eine vollständig durchmischte Phase. Zusätzlich werden die Annahmen getroffen, dass es keine Konzentrationsgradienten gibt, dass der Katalysator homogen verteilt ist und dass die Autohydrolyse und die enzymatischen Reaktionen ablaufen. Im Bilanzraum sind keine weiteren Quellen und Senken vorhanden. Die Bilanzen für die Stoffe ergeben sich wie folgt:

$$\frac{\partial c_{ER}}{\partial t} = -f_{(Enzymreaktion)} - f_{(Autohydrolyse)} \quad (5.1)$$

$$\frac{\partial c_{ES}}{\partial t} = -f_{(Autohydrolyse)} \quad (5.2)$$

Abbildung 5.1: Das Reaktionssystem für *Aspergillus niger* (DSM 823)

$$\frac{\partial c_{DR}}{\partial t} = f_{(Enzymreaktion)} + f_{(Autohydrolyse)} \quad (5.3)$$

$$\frac{\partial c_{DS}}{\partial t} = f_{(Autohydrolyse)} \quad (5.4)$$

Die Autohydrolyse konnte experimentell als Reaktion 1. Ordnung bezogen auf die Epoxidkonzentration bestimmt und ihre Reaktionsgeschwindigkeitskonstante ermittelt werden (siehe Kapitel 4.8). Die Kinetik der Enzymreaktion hingegen muss durch Anpassung ermittelt werden. Bei einem Ansatz mit c^n bezogen auf die Styrolepoxidkonzentration ist der Reaktionsverlauf für das Edukt für $n=1$ zu steil. Die Erhöhung von n führt zu einer starken Krümmung der Kurve, während sich n kleiner 1 anpassen lässt, aber keine sinnvolle theoretische Deutung der Daten ergibt. Das Einsetzen einer Michaelis-Menton-Kinetik [13] ergibt:

$$\frac{\partial c_{ER}}{\partial t} = 2 * (-k_{AH}^* * c_{H_2O} * c_{ER}) - \frac{k_{max}^* * c_{Enz} * c_{ER}}{k_d + c_{ER}} \quad (5.5)$$

$$\frac{\partial c_{ES}}{\partial t} = 2 * (-k_{AH}^* * c_{H_2O} * c_{ES}) \quad (5.6)$$

$$\frac{\partial c_{DR}}{\partial t} = k_{AH}^* * c_{H_2O} * c_{ER} + k_{AH}^* * c_{H_2O} * c_{ES} + \frac{k_{max}^* * c_{Enz} * c_{ER}}{k_d + c_{ER}} \quad (5.7)$$

$$\frac{\partial c_{DS}}{\partial t} = k_{AH}^* * c_{H_2O} * c_{ER} + k_{AH}^* * c_{H_2O} * c_{ES} \quad (5.8)$$

Da Wasser im Überschuss vorhanden ist, wird die Wasserkonzentration als konstant angenommen. Die Katalysatorkonzentration ist ebenfalls konstant. Daher werden die beiden Konzentrationen mit den Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten zusammengefasst. Es ergibt sich folgendes Gleichungssystem:

$$\frac{\partial c_{ER}}{\partial t} = 2 * (-k_{AH} * c_{ER}) - \frac{k_{max} * c_{ER}}{k_d + c_{ER}} \quad (5.9)$$

$$\frac{\partial c_{ES}}{\partial t} = 2 * (-k_{AH} * c_{ES}) \quad (5.10)$$

$$\frac{\partial c_{DR}}{\partial t} = k_{AH} * c_{ER} + k_{AH} * c_{ES} + \frac{k_{max} * c_{ER}}{k_d + c_{ER}} \quad (5.11)$$

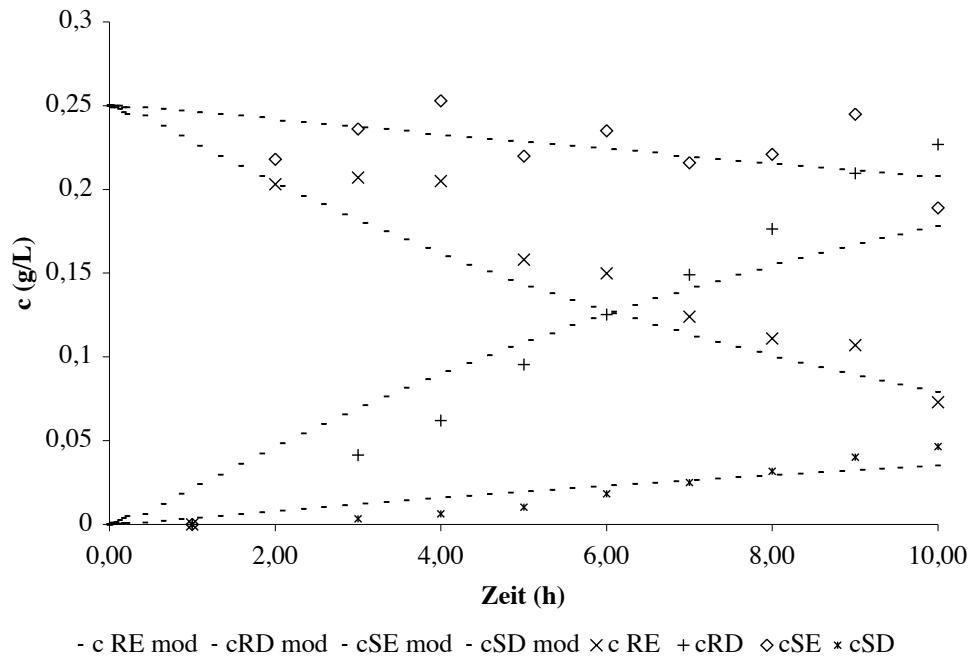
$$\frac{\partial c_{DS}}{\partial t} = k_{AH} * c_{ER} + k_{AH} * c_{ES} \quad (5.12)$$

Für die Anpassung des Modells an die Meßwerte wird ein Programm, das auf den Differentialgleichungen 5.9-5.12 beruht, verwendet (Kapitel 7.2.1). Das oben aufgestellte Gleichungssystem gilt für die Biohydrolyse mit dem Pilz *Beauveria bassiana*. Für eine Biohydrolyse mit *Aspergillus niger* müssen in den Bilanzgleichungen 5.9 und 5.10 die Konzentrationsbezeichnungen der beiden Epoxidenantiomeren miteinander vertauscht werden. Die Reaktionskonstanten für die Autohydrolyse sind in Tabelle 4.8 in Kapitel 4.8 aufgeführt.

Eine Meßkurve mit dem angepassten Modell für *Beauveria bassiana* bei einer Eduktanfangskonzentration von 0,5 g/L ist in Abbildung 5.2 dargestellt. Das Modell passt sich gut an die Meßdaten an und beschreibt im Rahmen der Meßgenauigkeit alle im System auftretenden Phänomene. Die ermittelten Konstanten der Michaelis-Menton-Kinetik für Anpassungen an Reaktionsverläufe mit unterschiedlichen Anfangskonzentrationen sind in Tabelle 5.1 aufgeführt. Bei allen Versuchen liegt die Geschwindigkeitskonstante in der Größenordnung um 0,37 1/s und das c_{max} bei 2 g/L.

Tabelle 5.1: Aus den Anpassungen des Modells ermittelten Konstanten

Anfangskonzentration (g/L)	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante (1/s)	v_{max} (g/L*s)
1	0,353	2,491
0,8	0,389	2,164
0,5	0,378	2,248
0,2	0,389	2,450

Abbildung 5.2: An die Meßdaten angepasstes Modell von *Beauveria bassiana*

5.2 Eindimensionale Diffusion

Bei der Betrachtung des Reaktionssystems mit immobilisierten Biokatalysatoren ergeben sich zwei Bilanzräume. Die vollständig durchmischte Bulkphase (b), in der die Autohydrolyse abläuft und die Immobilisatphase (i). Die Vorgänge in der Bulkphase

werden durch folgende Formeln beschrieben:

$$\frac{\partial c_{ER}^b}{\partial t} = -f_{c_{ER}^b \text{ Autohydrolyse}} - f_{c_{ER}^b \text{ Stoffuebergang-in-LK}}. \quad (5.13)$$

$$\frac{\partial c_{ES}^b}{\partial t} = -f_{c_{ES}^b \text{ Autohydrolyse}} - f_{c_{ES}^b \text{ Stoffuebergang-in-LK}}. \quad (5.14)$$

$$\frac{\partial c_{DR}^b}{\partial t} = +f_{c_{DR}^b \text{ Autohydrolyse}} + f_{c_{DR}^b \text{ Stoffuebergang-aus-LK}}. \quad (5.15)$$

$$\frac{\partial c_{DS}^b}{\partial t} = +f_{c_{DS}^b \text{ Autohydrolyse}} + f_{c_{DS}^b \text{ Stoffuebergang-aus-LK}}. \quad (5.16)$$

In der Immobilisatphase liegen Stofftransporthemmung, beschrieben durch das 2. Fick'sche Gesetz und die Autohydrolyse, die von der enzymatischen Reaktion überlagert wird, vor. Es ergibt sich folgendes Differentialgleichungssystem:

$$\frac{\partial c_{ER}^i}{\partial t} = -f_{c_{ER}^i \text{ Autohydrolyse}} - f_{c_{ER}^i \text{ Biohydrolyse}} - f_{c_{ER}^i \text{ Diffusion}} \quad (5.17)$$

$$\frac{\partial c_{ES}^i}{\partial t} = -f_{c_{ES}^i \text{ Autohydrolyse}} - f_{c_{ES}^i \text{ Diffusion}} \quad (5.18)$$

$$\frac{\partial c_{DR}^i}{\partial t} = +f_{c_{DR}^i \text{ Autohydrolyse}} + f_{c_{DR}^i \text{ Biohydrolyse}} - f_{c_{DR}^i \text{ Diffusion}} \quad (5.19)$$

$$\frac{\partial c_{DS}^i}{\partial t} = +f_{c_{DS}^i \text{ Autohydrolyse}} - f_{c_{DS}^i \text{ Diffusion}} \quad (5.20)$$

Die enzymatische Aktivität wird als ideal über das Immobilisat verteilt angenommen. Der Phasenanteil des Immobilisates ist 0,5. Die Oberfläche wird über zwei Kreise mit dem Radius der LentiKats (4mm) angenähert. Es liegen 204 LentiKats pro g Immobilisat vor. Die Kopplung der beiden Phasen erfolgt über die Formel 5.21, die den Stofftransport über die Phasengrenzfläche beschreibt. Da die Immobilisatphase ein Hydrogel ist, und als eine durch Matrix fixierte Wasserphase angesehen werden kann, wird ohne einen formalen Stoffübergangswiderstand gearbeitet. Es wird

an der Oberfläche der Immobilisatphase mit einer einsetzenden Diffusionshemmung modelliert.

$$\frac{\partial c_K}{\partial t} \Big|_{x=L} = D \frac{A}{V} \frac{\partial c_K}{\partial x} \Big|_{x=L} \quad (5.21)$$

Die Kopplung des Stofftransportwiderstandes mit der Reaktion im Immobilisat ergibt die Formel 5.22.

$$\frac{\partial c_K}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c_K}{\partial x^2} - f_{c_K} \quad (5.22)$$

Das Differentialgleichungssystem lautet:

$$\frac{\partial c_{ER}^b}{\partial t} = 2 * (-k_{AH} * c_{ER}) - D \frac{A}{V} \frac{\partial c_{ER}}{\partial x} \Big|_{x=L} \quad (5.23)$$

$$\frac{\partial c_{ES}^b}{\partial t} = 2 * (-k_{AH} * c_{ES}) - D \frac{A}{V} \frac{\partial c_{ES}}{\partial x} \Big|_{x=L} \quad (5.24)$$

$$\frac{\partial c_{DR}^b}{\partial t} = +k_{AH} * c_{ER} + k_{AH} * c_{ES} - D \frac{A}{V} \frac{\partial c_{DR}}{\partial x} \Big|_{x=L} \quad (5.25)$$

$$\frac{\partial c_{DS}^b}{\partial t} = k_{AH} * c_{ER} + k_{AH} * c_{ES} - D \frac{A}{V} \frac{\partial c_{DS}}{\partial x} \Big|_{x=L} \quad (5.26)$$

$$\frac{\partial c_{ER}^i}{\partial t} = 2 * (-k_{AH} * c_{ER}) - \frac{k_{max} * c_{ER}}{k_d + c_{ER}} - D \frac{\partial^2 c_{ER}}{\partial x^2} \quad (5.27)$$

$$\frac{\partial c_{ES}^i}{\partial t} = 2 * (-k_{AH} * c_{ES}) - D \frac{\partial^2 c_{ES}}{\partial x^2} \quad (5.28)$$

$$\frac{\partial c_{DR}^i}{\partial t} = k_{AH} * c_{ER} + k_{AH} * c_{ES} + \frac{k_{max} * c_{ER}}{k_d + c_{ER}} - D \frac{\partial^2 c_{DR}}{\partial x^2} \quad (5.29)$$

$$\frac{\partial c_{DS}^i}{\partial t} = +k_{AH} * c_{ER} + k_{AH} * c_{ES} - D \frac{\partial^2 c_{DS}}{\partial x^2} \quad (5.30)$$

Die Diskretisierung innerhalb der Immobilisatphase wird in Matlab mit dem Verfahren der orthogonalen Translokation durchgeführt. Dieses Verfahren ergibt bei vier Stützstellen gute Ergebnisse bei einem akzeptablen Rechenaufwand. Die für die Berechnungen notwendigen Daten sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst. Das verwendete Matlabprogramm ist in Kapitel 7.2.3 aufgeführt. Als typisches Ergebnis ist in Abbildung 5.3 die Anpassung an eine Biohydrolyse abgebildet.

Tabelle 5.2: Daten für die Anpassung des Immobilisatmodells

Konstante	Wert
Diffusionskonstante	$5,868 * 10e - 9 \frac{s}{m^2}$
$k_{Autohydrolyse}$	$1,033 * 10e - 9 \frac{1}{s}$
Dicke LentiKat	$1,50 * 10e - 8m$
Durchmesser LentiKat	$4,00 * 10e - 4m$
Phasenanteil LentiKat	0,5
Anzahl LentiKat pro mL Reaktionssuspension	204
Startkonzentration	0,5g/L

Das Modell kann gut an die Meßwerte angepasst werden. Es wurden Meßdaten mit einer geringen Startkonzentration von 0,225 g/L verwendet. Hierdurch wird vermieden, dass nicht gelöstes Edukt nachgelöst wird, und im Anfangsbereich der Meßdaten eine konstante Konzentration der Edukte vortäuscht. In den Meßkurven wie auch im Modell kann deutlich der Verdünnungsvorgang am Anfang des Prozesses abgelesen werden. Bis zur Minute 60 sinken beide Konzentrationen der Eduktenantiomeren gleich schnell ab. Beide Edukte diffundieren in die Immobilisatphase und reagieren erst dort enantioselektiv ab. Die kinetische Racematspaltung setzt auch erst dann ein. Die ermittelten Konstanten liegen mit 0,39 1/s und 2,4 g/L in dem Bereich der verteilten Reaktion.

5.3 Batch-Reaktionsansatz unter Berücksichtigung der Immobilisatgeometrie

Das Gleichungssystem 5.23 - 5.30 wird auf eine in Femlab aufgesetzte und diskretisierte Geometrie angewandt, welche die Linsenform der Immobilisate berücksichtigt. Die Geometrie mit dem Diskretisierungsgitter ist in Abbildung 5.4 dargestellt.

Um die Rechenzeit in einem akzeptablen Rahmen zu halten, wird die Linse um die Rotationsachse geteilt und die Randbedingung an dieser Grenze so gesetzt, dass

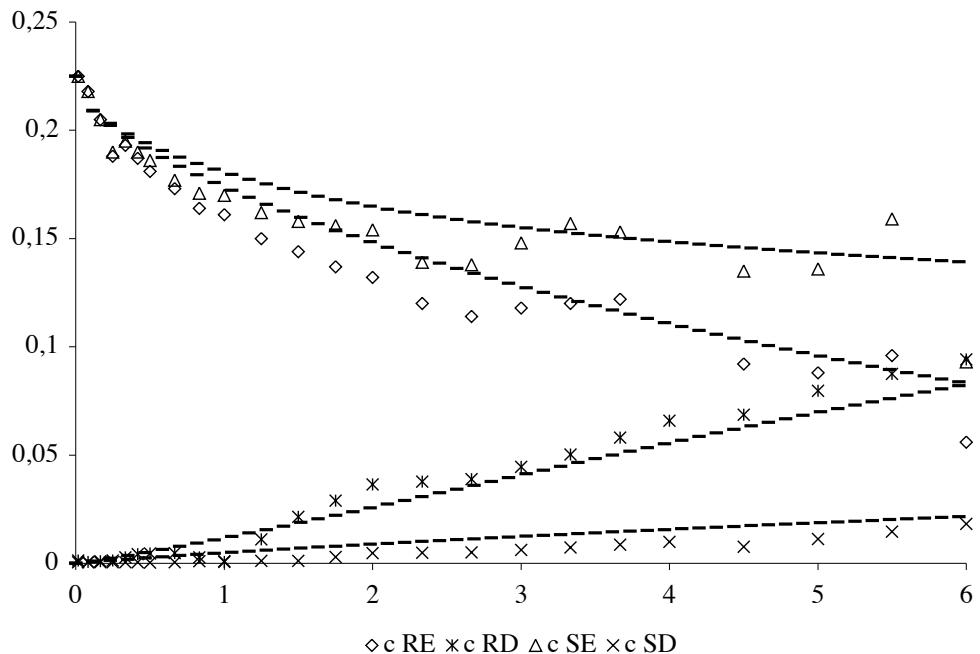


Abbildung 5.3: An die Meßdaten angepasstes Modell von *Beauveria bassiana* unter Berücksichtigung zweier Phasen

kein Stofftransport möglich ist. Über die gekrümmten Grenzflächen zu der Bulkphase ist, wie in Formel 5.21 beschrieben, ein Stofftransport möglich. Für die Anpassung werden ebenfalls die in Tabelle 5.2 aufgelisteten Parameter verwendet. Das Anpassungsergebnis ist in Abbildung 5.5 dargestellt.

Die Anpassung des 3D-Modells erfolgte an die gleichen Meßdaten wie unter 5.2. Dabei wird ebenfalls eine gute Anpassung an die Meßdaten erzielt. Die ermittelten Konstanten liegen mit 0,4 1/s und 2,5 g/L etwas höher als bei dem 2D-Modell. Dies kann durch die größere spezifische Stoffübergangsoberfläche bedingt durch die Berücksichtigung Linsengeometrie erklärt werden.

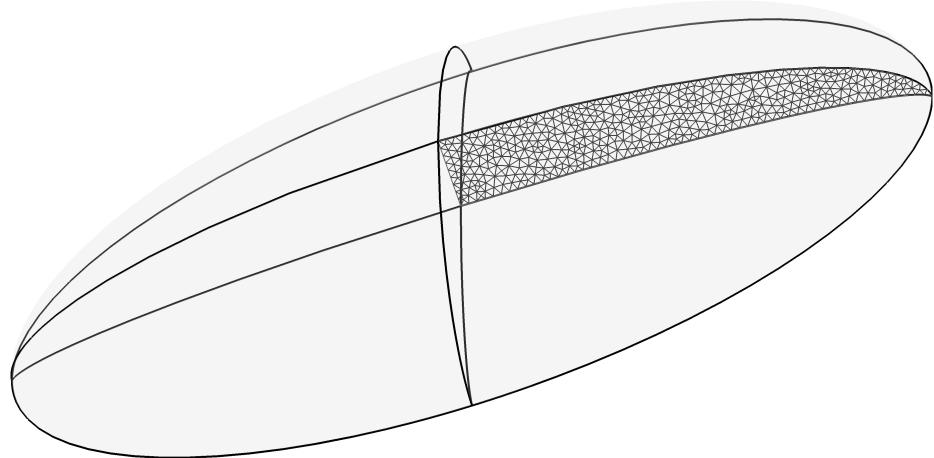


Abbildung 5.4: Gitter für das Modell unter Berücksichtigung der Immobilisatgeometrie

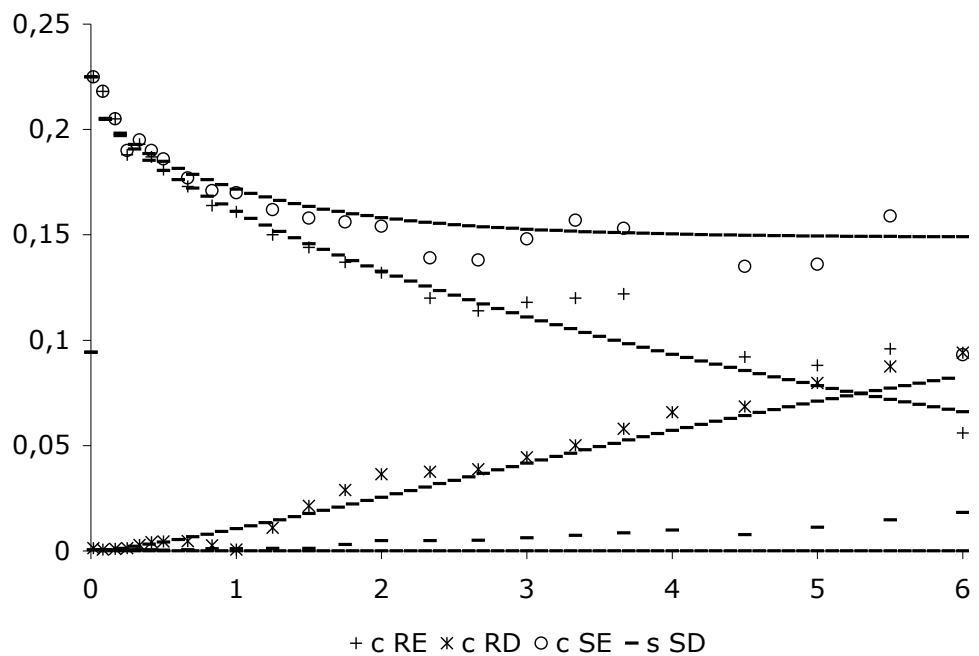


Abbildung 5.5: An die Meßdaten angepasstes Modell von *Beauveria bassiana* unter Berücksichtigung zweier Phasen und der Immobilisatgeometrie

6 Zusammenfassung und Ausblick

Enantiomerenreine Epoxide und ihre korrespondierenden Diole sind interessante Synthesebausteine in der chemischen und pharmazeutischen Industrie. Sie sind wichtige Zwischenprodukte bei der Herstellung heterogener Katalysatoren und Wirkstoffe, z.B. Indinavir zur HIV Behandlung. Zu ihrer Gewinnung bieten sich biotechnologische Verfahren an. In der vorliegenden Arbeit wurde die stereoselektive Biohydrolyse von Styrolepoxid und seinen Derivaten als Modellsystem mit Epoxidhydrolasen aus *Aspergillus niger* (DSM 823) und *Beauveria bassiana* (DSM 1344) untersucht (siehe Abbildung 6.1).

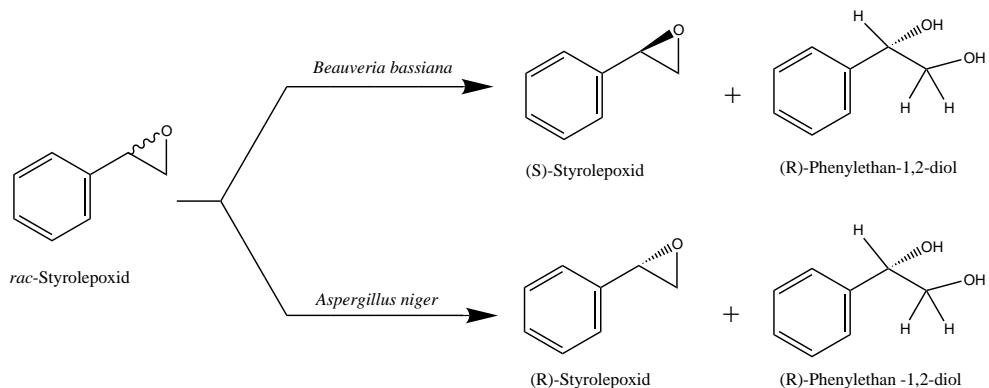


Abbildung 6.1: Stereoselektive Biohydrolyse von Styrolepoxid mit *Aspergillus niger* und *Beauveria bassiana*

Als entscheidende Schwierigkeiten dieser Biohydrolyse sind die geringe Löslichkeit des Eduktes und die Reaktionsführung mit einer PilzSuspension bekannt. Eine Steigerung der Eduktkonzentration und eine gute Rückhaltbarkeit des Katalysators mit möglicher Wiederverwendung sind aber für eine technische Nutzung notwendig. Hierzu wurde nach der Optimierung der Zellanzucht in Bezug auf maximale Zellzahl und hohe Hydrolyseaktivität das Reaktionssystem analysiert. Die Autohydrolyse des Eduktes wurde dabei als wichtigste Nebenreaktion quantifiziert. Weitere in biokatalytischen Reaktionen mit Ganzzellsystemen vorkommenden Reaktionen und Effekte, wie Racemasenaktivität, Rückreaktionen und Inhibitionen konnten anhand geeigneter Experimente im untersuchten System ausgeschlossen werden. Eine Weiterreaktion des Produktes zum Aldehyd ist in der Substanzklasse nachweisbar, findet aber bei 1,2-Phenylethandiol unter den gewählten Reaktionsbedingungen nicht statt. Zur Erhöhung der Eduktkonzentration wurden Biohydrolysen in Lösemittel-Puffer-

Gemischen durchgeführt. Es zeigte sich, dass sich durch den Einsatz dieser Gemische die Eduktlöslichkeit deutlich steigern lässt. Die Aktivität der Biokatalysatoren wird bei den für die Pilze optimalen Konzentration nur in Maßen verringert.

Um den Biokatalysator wirksam von der Produktlösung zurückzuhalten, wurden die Pilzhyphen in Polyvinylalkohol verkapselt. Es wurde gezeigt, dass die Biohydrolyse innerhalb von 6 Tagen mit wiedergewonnenem Biokatalysator ohne Selektivitätsverlust durchgeführt werden kann. Die Untersuchung der Diffusionsvorgänge in dem Polyvinylalkohol ergab, dass sie am besten durch einen Lösungs-Diffusionsmechanismus beschrieben werden können. Die Diffusionskonstanten wurden in Diffusionsversuchen durch eine PVA Membran ermittelt.

Für eine schnelle kontinuierliche Reaktionsführung ist eine Anreicherung der Enzymkonzentration notwendig. Hierfür wurden verschiedene Zellaufschlussverfahren für die Pilzzellen getestet. Mit den unter technischen Bedingungen durchführbaren Verfahren kann aber keine Anreicherung erfolgen. Hier sind in Zukunft noch weitere molekulabiologische Methoden anzuwenden, um die Enzyme gegebenenfalls zu isolieren. Zur Ermittlung der Substratbreite der untersuchten Reaktion, wurden noch nicht beschriebene etherverbrückte Substrate erfolgreich hydrolysiert (siehe Abbildung 6.2). Mit den Pilzepoxidhydrolasen können neben den bekannten substituierten Styrolepoxiden auch Ringsysteme und die etherverbrückten Epoxide stereoselektiv geöffnet werden. Ein interessantes Substratsegment konnte somit auch der kinetischen Racematspaltung unterzogen werden.

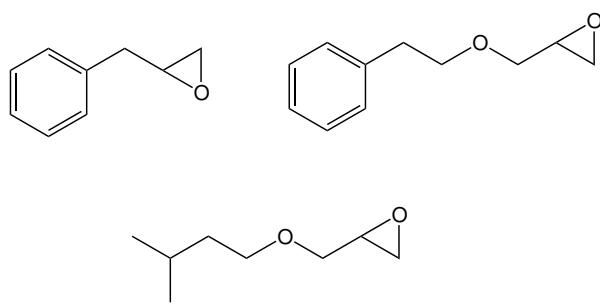


Abbildung 6.2: In der vorliegenden Arbeit neu eingeführten Substrate für Pilzepoxidhydrolasen

Im abschließenden Modellierungsteil wurde aus dem zuvor identifizierten Reaktionssystem und den gewonnenen kinetischen Daten ein Modell für die Biohydrolyse mit den suspendierten Pilzzellen aufgestellt und an die Meßdaten angepasst. Hierdurch

lassen sich Aussagen über die nicht direkt bestimmbarre biokatalytische Reaktion machen. Der Modellansatz mit einer Michaelis-Menton-Kinetik für die Biohydrolyse lieferte die besten Ergebnisse bei den Anpassungen. Im zweiten Schritt wurde das Modell erweitert, um die Biohydrolyse mit den Immobilisaten zu beschreiben. Hierzu wurde ein Zweiphasenmodell erstellt. In die Immobilisatphase wurde dabei ein Stofftransportwiderstandsterm eingefügt und die zuvor ermittelten Diffusionskoeffizienten eingesetzt. Die analytisch schwer zu modellierende linsenförmige Geometrie konnte bei der Simulation mit nummerisch arbeitenden Werkzeugen entsprechend beschrieben werden.

Zur weiteren Verbesserung dieses Prozesses ist die Anreicherung der Epoxidhydrolasenaktivität notwendig. Dieses kann der Anwendung der verwendeten Immobilisate zu einem Durchbruch in der Technik verhelfen. Die hierzu notwenigen molekularbiologischen Methoden werden zur Zeit bereits bei *Aspergillus niger* eingesetzt, mit dem Ziel verbesserte Mikroorganismen oder sogar das reine Enzym zu isolieren. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse können dann direkt auf Hydrolysen mit dem reinen Enzym angewandt werden.

7 Anhang

Notation

Symbol	Einheit	Bedeutung
A	$[m^2]$	Fläche
α	$[1/L]$	spezifische Grenzfläche
BFM	$[g]$	Biofeuchtmasse
B_r	$[m^3]$	Kugelvolumen
BTM	$[g]$	Biotrockenmasse
c	$[g/L]$	Konzentration
\dot{c}	$[\frac{g}{Ls}]$	zeitliche Änderung der Konzentration
d	$[-]$	Dublett
D	$[cm^2/s]$	Diffusionskoeffizient
div	$[-]$	Divergenz
DMF	$[-]$	Dimethylformamid
DMSO	$[-]$	Dimethylsulfoxid
DSC	$[-]$	Differential Scanning Calorimeter (Dynamisches Differenzkalorimeter)
DSMZ	$[-]$	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
E	$[-]$	Enatioselektivität
ee	$[\%]$	Enantiomerer Überschuss
EH	$[-]$	Epoxidhydrolase
FID	$[-]$	Flammenionisationsdetektor
GC	$[-]$	Gaschromatographie
HPLC	$[-]$	high performance liquid chromatographie (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
J	$[mol/min]$	Stoffstrom
k	$[mol/s]$	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante
NMR	$[-]$	nuclear magnetic resonanz (Kernresonanz)
m	$[-]$	Multiplett
MHZ	$[-]$	Megaherz
p.a.	$[-]$	Analysenqualität
ppm	$[-]$	parts per million, Verschiebung
PVA	$[-]$	Polyvinylalkohol
q	$[-]$	Quartett
(R)	$[-]$	rektus (rechts)
REM	$[-]$	Rasterelektronenmikroskopie
(S)	$[-]$	sinister (links)

Symbol	Einheit	Bedeutung
s	[–]	Singulett
SDS	[–]	Natriumdodecylsulfat
t	[–]	Triplet
t	[h]	Zeit
TC	[mg/L]	gesamter Kohlenstoffgehalt
THF	[–]	Tetrahydrofuran
TIC	[mg/L]	gesamter anorganischer Kohlenstoffgehalt
TOC	[mg/L]	gesamter organischer Kohlenstoffgehalt
TRIS	[–]	(Hydroxymethyl)aminomethan
V	[L]	Volumen

Indices

<i>AH</i>	Autohydrolyse
<i>b</i>	Bulkphase
<i>D</i>	Diol
<i>DR</i>	(R)-1,2-Phenylethandiol
<i>DS</i>	(S)-1,2-Phenylethandiol
<i>E</i>	Epoxid
<i>ER</i>	(r)-Styrolepoxid
<i>ES</i>	(s)-Styrolepoxid
<i>i</i>	Immobilisatphase
<i>l</i>	Ortsindex im LentiKat
<i>p</i>	Permeatphase
<i>R</i>	Retentatphase
<i>S</i>	Styrolepoxid
<i>WR</i>	Weiterreaktion
<i>x, δ</i>	Ortsindex

7.1 Bestimmung des Diffusionskoeffizienten in PVA-Membranen

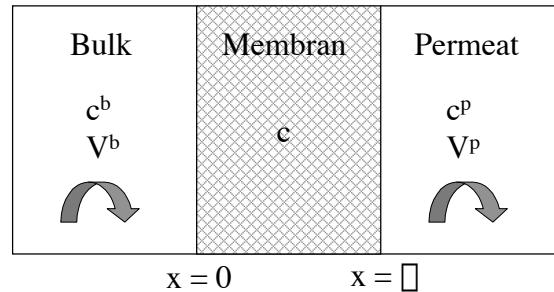


Abbildung 7.1: Bilanzraum der Diffusionsmessung

Bilanzen:

$$V^b \dot{c}^b = -A J_{|x=0} \quad (7.1)$$

$$\partial_t c + \operatorname{div} J = 0 \quad (0 < x < \delta) \quad (7.2)$$

$$V^p \dot{c}^p = A J_{|x=\delta} \quad (7.3)$$

Stoffstrom: Fick'sches Gesetz

$$J = -D \partial_x c \quad (7.4)$$

A - Grenzfläche Membran - Bulk bzw. Permeat

V^b - Bulkvolumen

V^p - Permeatvolumen

Randbedingungen:

$$c(t, 0) = c^b(t), \quad c(t, \delta) = c^p(t)$$

Anfangsbedingungen:

$$c^b(0) = c_0^b, \quad c(0, x) = 0 \quad (0 < x < \delta), \quad c^p(0) = 0$$

Vereinfachungen:

Volumenverhältnis:

$$q = V^p/V^b$$

spezifische Grenzfläche:

$$a = A/V^b$$

Modell:

$$\dot{c}^b = aD\partial_x c(0) \quad (7.5)$$

$$\partial_t c = D\partial_x^2 c, \quad (0 < x < \delta) \quad (7.6)$$

$$\dot{c}^p = \frac{1}{q}aD\partial_x c(\delta) \quad (7.7)$$

$$c(t, 0) = c^b(t), \quad c(t, \delta) = c^p(t) \quad (7.8)$$

$$c^b(0) = c_0^b, \quad c(0, x) = 0, \quad c^p(0) = 0 \quad (7.9)$$

Quasistationäres Modell: stationäre Diffusion

$$0 = D\partial_x^2 c \quad \text{in} \quad 0 < x < \delta, \quad c(0) = c^b, c(\delta) = c^p \quad (7.10)$$

$$\Rightarrow \partial_x c \equiv \text{konst.} = \frac{c^p - c^b}{\delta} \quad (7.11)$$

Einsetzen in die Bulk-Permeatbilanz:

$$\dot{c}^b = -\frac{aD}{\delta}(c^b - c^p) \quad (7.12)$$

$$q\dot{c}^p = \frac{aD}{\delta}(c^b - c^p) \quad (7.13)$$

Massenerhaltung:

$$\dot{c}^b(t) + q\dot{c}^p = 0 \quad (7.14)$$

$$\Rightarrow c^b + qc^p = \text{konst} = c_0^b \quad (7.15)$$

$$\Rightarrow c^b(t) = c_0^b - qc^p(t) \quad (7.16)$$

Einsetzen in die Permeatbilanz:

$$q\dot{c}^p = \frac{aD}{\delta}(c_0^b - (1 + q)c^p) \quad (7.17)$$

$$\Rightarrow \dot{c}^p = \alpha(c_\infty - c^p) \quad (7.18)$$

mit

$$\alpha = (1 + 1/q) \frac{aD}{\delta} \quad (7.19)$$

$$c_\infty = \frac{c_0^b}{1 + q} \quad (7.20)$$

Lösen der Differentialgleichung:

$$\frac{\dot{c}^p}{c^p - c_\infty} = -\alpha \quad (7.21)$$

$$\Rightarrow [\ln | c^p - c_\infty |]_0^t = -\alpha t \quad (7.22)$$

$$\Rightarrow \ln \frac{c^p(t) - c_\infty}{-c_\infty} = -\alpha t \quad (7.23)$$

$$\ln \left(1 - \frac{c^p(t)}{c_\infty} \right) = -\alpha t \quad (7.24)$$

$$1 - \frac{c^p(t)}{c_\infty} = e^{-\alpha t} \quad (7.25)$$

$$c^p(t) = c_\infty (1 - e^{-\alpha t}) \quad (7.26)$$

Aus der Auftragung entsprechend der Formel 7.24 resultiert die Steigung (α) und daraus der Diffusionskoeffizient (D).

7.2 Anpassungs routinen

7.2.1 Biohydrolyse mit Pilzsuspension

```

function [k,Fehlerq]=Anpassen
% Funktion zum Anpassen von Messdaten
load digl
daten = digl;
fhaendle = figure;
plot(daten(:,1),daten(:,2),'r*',daten(:,1),daten(:,3),'g*',
daten(:,1),daten(:,4),'b*',
daten(:,1),daten(:,5),'y*');
C=daten;
options=optimset('ShowStatusWindow','iter',
'LevenbergMarquardt','off');
[k,Fehlerq]=LSQNONLIN(@Differenzen,[1,1,1],[0 0 0],[],,
options,C,fhaendle);
global T CSim
h=[T,CSim];
save Sim.dat -ASCII -TABS h
% -----
function F = Differenzen(k,C,fhaendle)
global T CSim
options = odeset('jacobian',@Jacobian);
delete(findobj('Tag','iterline'));
[T,CSim] = ODE45(@DGLSystem,[0, 10],[0.58; 0; 0.58; 0],
options,k);
figure(fhaendle);
lhaendle = [line([T],CSim(:,1),'color','r'),line([T],CSim(:,2),
'color','b'),line([T],
CSim(:,3),'color','g'),line([T],CSim(:,4),'color','y')];
set(lhaendle,'Tag','iterline','Marker','none');
CSimTER = INTERP1(T,CSim(:,1),C(:,1));
CSimTDR = INTERP1(T,CSim(:,2),C(:,1));
CSimTES = INTERP1(T,CSim(:,3),C(:,1));
CSimTDS = INTERP1(T,CSim(:,4),C(:,1));
F = [CSimTER-C(:,2),CSimTDR-C(:,4),CSimTES-C(:,3),
CSimTDS-C(:,5)];
% -----
function dcdt = DGLSystem(t,c,k)
dcdt = [-k(1)*c(1)/(k(2)+c(1))-2*k(3)*c(1);...          \%ER
         k(1)*c(1)/(k(2)+c(1))+k(3)*c(1)+k(3)*c(3);... \%DR
         -2*k(3)*c(3);...                                \%ES
         k(3)*c(1)+k(3)*c(3)];                          \%DS
% -----
function dfdc = Jacobian(t,c,k)
dfdc = [-k(1)*c(2), -k(1)*c(1), 0;...    \% df1dc1 df1dc2 df1dc3
         -k(2)*c(2), -k(2)*c(1), 0;...    \% df2dc1 df2dc2 df2dc3
         k(3)*c(2), k(3)*c(1), 0];      \% df3dc1 df3dc2 df3dc3

```

7.2.2 Eindimensionale Diffusion

```

function [k,Fehlerq]=Anpassen
close all;
global nk np nd
np=3;
nk=4;
nd=np+1;

```

```

feval(@octplot,[],[],'initall');
options=optimset('LevenbergMarquardt','on','Display','iter','ShowStatusWindow','off','Diagnostics','on','LargeScale',1);
[X,RESNORM,RESIDUAL,EXITFLAG,OUTPUT,LAMBDA,JACOBIAN]=LSQNONLIN(@Fehler,[10,1],[0.1 0.000001],[500 50],options);
ci = nlparci(X,RESIDUAL,JACOBIAN)
function F=Fehler(k_0)
global nk np nd
Oberflache=5127;
VolumenLsg=1;
L_Lenti=150e-6;
D_Lenti=1e-10;
k_Auto=3.47e-6;
k_D=[D_Lenti D_Lenti D_Lenti D_Lenti];
k_RL=[-2*k_Auto 0 0 0;+k_Auto 0 +k_Auto 0 0 -2*k_Auto 0;+k_Auto 0 +k_Auto 0];
k_RB=[0 0 0 0;0 0 0 0;0 0 0 0];
k_RB=[-2*k_Auto 0 0 0;+k_Auto 0 +k_Auto 0 0 -2*k_Auto 0;+k_Auto 0 +k_Auto 0];
k_MM_1=[-k_0(1) 0 0 0;k_0(1) 0 0 0;0 0 0 0;0 0 0 0];
k_MM_2=[k_0(2) 1 1 1;k_0(2) 1 1 1;1 1 1;1 1 1];
k_0=[0.5 0 0.5 0];
xc=oknullsy(np,0,0);
[A,B]=orthkol(xc,0,1);
xc=[xc;1];
Diffusion=spalloc(nk*nd,nk*nd,nk*nd*np);
for i=[0:(nk-1)]
    Diffusion((1:np)+i*nd,(1:nd)+i*nd)=k_D(i+1)/L_Lenti^2*B(1:np,1:np+1);
end

Stoffuebergang=spalloc(nk*nd,nk*nd,nk*nd);
for i=[0:(nk-1)]
    Stoffuebergang(nd+i*nd,(1:nd)+i*nd)=-k_D(i+1)/L_Lenti*Oberflache/VolumenLsg*A(nd,:);
end
Reaktion=spalloc(nk*nd,nk*nd,nk*nd);
for i=[0:(nk-1)]
    for j=[0:(nk-1)]
        for k=[1:(np)]
            Reaktion(i*nd+k,j*nd+k)=k_RL(i+1,j+1);
        end
    end
end
ReaktionB=spalloc(nk*nd,nk*nd,nd);
for i=[0:(nk-1)]
    for j=[0:(nk-1)]
        ReaktionB((nd)+i*nd,(nd)+j*nd)=k_RB(i+1,j+1);
    end
end

J=Diffusion+Stoffuebergang+ReaktionB+Reaktion;
c0=zeros(1,nd*nk);
for i=[0:(nk-1)]
    c0(nd+i*nd)=c_0(i+1);
end
options=odeset('Jacobian',@Jac,'MaxStep',5,'outputfcn',@octplot,'bdf','off','stats','off');
[t,c]=ode15s(@dfdt,[0:0.1:25],c0,options,J,1,xc,np,nk,nd,Reaktion,k_MM_1,k_MM_2);
load('daten.mat');
feval(@octplot,t,c,'plot');
CSimT1 = INTERP1(t,c(:,nd),t_mess);
CSimT2 = INTERP1(t,c(:,2*nd),t_mess);
CSimT3 = INTERP1(t,c(:,3*nd),t_mess);
CSimT4 = INTERP1(t,c(:,4*nd),t_mess);
F = [CSimT1-c_mess(:,1);CSimT2-c_mess(:,2);CSimT3-c_mess(:,3);CSimT4-c_mess(:,4)];
function dc=Jac(t,c,J,F,xc,np,nk,nd,Reaktion,k_MM_1,k_MM_2)
ReaktionMM=spalloc(nk*nd,nk*nd,nk*nd);

```

```

for i=[0:(nk-1)]
    for j=[0:(nk-1)]
        if k_MM_1(i+1,j+1) ~= 0
            for k=[1:(np)]
                ci=c(i*(nd)+k);
                ReaktionMM(i*nd+k,j*nd+k)=-k_MM_1(i+1,j+1)*k_MM_2(i+1,j+1)*ci/(k_MM_2(i+1,j+1)+ci).^2+k_MM_1(i+1,j+1)
            end
        end
    end
end
dc=J+ReaktionMM;
function dfdc=dfdt(t,c,J,F,xc,np,nk,nd,Reaktion,k_MM_1,k_MM_2)
ReaktionMM=zeros(nk*nd,1);

for i=[0:(nk-1)]
    for j=[0:(nk-1)]
        if k_MM_1(i+1,j+1) ~= 0
            ci=c((1:np)+j*nd);
            ReaktionMM((1:np)+i*nd)=ReaktionMM((1:np)+i*nd)+k_MM_1(i+1,j+1).*ci./(k_MM_2(i+1,j+1)+ci);
        end
    end
end
dfdc=J*c+ReaktionMM;
function state=octplot(t,c,flag,varargin)
state=0;
colors={'r','b','g','y','w'};
global hl hb hm hf1 hf2
global np nk nd
switch flag

    case 'initall'
        load('daten.mat');
        hf1=figure('position',[650,200,500,350],'renderer','zbuffer')
        set(gca,'color',[0.7,0.7,0.5],'box','on','yLim',[0,1.1*max(max(c_mess))])
        for i=[1:4]
            m(i)=line(t_mess,c_mess(:,i));
            set(m(i),'Marker','*','LineStyle','none','LineWidth',1,'Color',colors{i});
        end
        hf2=figure('position',[100,200,500,350],'renderer','zbuffer');

        set(gca,'XLim',[0,1.2],'XLimMode','manual','YLim',[0,1.3*max(max(c_mess))],'YLimMode','manual','Color','none',...
            'box','on','XTick',[0:0.2:1]);
        patch([1,1,1.2,1.2],[0 1 1 0],[0 0 0 0],'facecolor',[0.7,0.7,0.5]);
    case 'init'
        delete(findobj('Tag','a'));
        figure(hf2)
        for i=[0:(nk-1)]
            hl(i+1)=line(varargin{3},c((1:nd)+i*nd));
            set(hl(i+1),'Marker','o','LineStyle','none','Color',colors{i+1},'Tag','a');
            hb(i+1)=line([1 1.2],[c(nd+i*nd) c(nd+i*nd)]);
            set(hb(i+1),'LineWidth',2,'LineStyle','--','Color',colors{i+1},'Tag','a');
        end
    case 'plot'
        figure(hf1)
        delete(findobj('Tag','LineOld'));
        set(findobj('Tag','LineNew'),'LineWidth',1.0,'LineStyle','--','Tag','LineOld')
        for i=[0:(nk-1)]
            hm(i+1)=line(t,c(:,(nd)+i*nd));
            set(hm(i+1),'Marker','none','LineStyle','--','LineWidth',1.5,'Color',colors{i+1},'Tag','LineNew');
        end
    end
end

```

```

    end

    case ''
        for i=[0:(nk-1)]
            set(hl(i+1), 'ydata', c((1:nd)+i*nd)')
            set(hb(i+1), 'ydata', [c(nd+i*nd) c(nd+i*nd)])
        end
    end;
drawnow;

```

7.2.3 Biohydrolyse mit Immobilisaten

```

function [k,Fehlerq]=Anpassen
close all;

load fem2
fem=meshinit(fem,'out','fem','hmax',0.05,'hnum',1200);
% fem=meshrefine(fem,'out','fem');
% fem=meshrefine(fem,'out','fem');
% fem=meshrefine(fem,'out','fem');
% fem=meshrefine(fem,'out','fem');

mf=figure('name','Mesh','color',[1,1,1],'Render','opengl');
geomplot(fem.geom3D,'parent',gca,'Detail','Extra Fine')
axis image
set(gca,'visible','off','view',[-161,-78]);
set(findobj('Type','Patch'),'Facealpha',0.2,'FaceLighting','phong','FaceColor',[0.6,0.6,0.9]);
meshplot(fem,'Parent',gca);

D_Lenti=5.86e-9;
fem.const={'D' D_Lenti};
fem.equ.be{1}={{'-'D./r' '0'}};
fem.equ.f{1}{1}='0';
fem.equ.c{1}{1}={'D'};

[K,L,M,N,DA] = assemble(fem,'tpoint','gauss1');

[KE,LE,NULL,UD,DE] = femlin(fem,'uscale','none','out',{'Ke','Le','Null','ud','De'},'tpoint','gauss1');

[AR,G1X,G1Y,G2X,G2Y,G3X,G3Y]=FLTRG(fem.mesh.p,fem.mesh.t);
ng=size(G1X,2);

Ev = sparse([fem.mesh.t(1,:),fem.mesh.t(2,:),fem.mesh.t(3,:)]',...
    [[1:ng],[1:ng],[1:ng]],...
    [ones(1,ng),ones(1,ng),ones(1,ng)]);
s = sum(Ev');
sh=1./s;

Ev = sparse([fem.mesh.t(1,:),fem.mesh.t(2,:),fem.mesh.t(3,:)]',...
    [[1:ng],[1:ng],[1:ng]],...
    sh([fem.mesh.t(1,:),fem.mesh.t(2,:),fem.mesh.t(3,:))]);

Cx = sparse([fem.mesh.t(1,:),fem.mesh.t(2,:),fem.mesh.t(3,:)]',...
    [[1:size(G1X,2)],[1:size(G1X,2)],[1:size(G1X,2)]],...
    [G1X,G2X,G3X]);

Cy = sparse([fem.mesh.t(1,:),fem.mesh.t(2,:),fem.mesh.t(3,:)]',...
    [[1:size(G1X,2)],[1:size(G1X,2)],[1:size(G1X,2)]],...
    [G1X,G2X,G3X]);

```

```

[G1Y,G2Y,G3Y]);
Abx= Ev*Cx';
Aby= Ev*Cy';

idx = [find(fem.mesh.e(5,:)==2)];
idxl = fem.mesh.e(1,idx);
idxr = fem.mesh.e(2,idx);
deltax = abs(fem.mesh.p(1,idxr)-fem.mesh.p(1,idxl));
deltay = abs(fem.mesh.p(2,idxr)-fem.mesh.p(2,idxl));
r=2*pi*fem.mesh.p(1,:);

intelx = sparse([ones(1,size(idx,2))],idxl,deltay/2.*r(idxl),1,size(Abx,1));
interx = sparse([ones(1,size(idx,2))],idxr,deltay/2.*r(idxr),1,size(Abx,1));
intely = sparse([ones(1,size(idx,2))],idxl,deltax/2.*r(idxl),1,size(Aby,1));
intery = sparse([ones(1,size(idx,2))],idxr,deltax/2.*r(idxr),1,size(Aby,1));
intex = intelx+interx;
intey = intely+intery;

v=-D_Lenti*[intex*Abx+intey*Aby]*NULL;
t=-D_Lenti*[intex*Abx+intey*Aby]*UD;

idx = [find(fem.mesh.e(5,:)==3)];
idxl = fem.mesh.e(1,idx);
idxr = fem.mesh.e(2,idx);

deltax = abs(fem.mesh.p(1,idxr)-fem.mesh.p(1,idxl));
deltay = abs(fem.mesh.p(2,idxr)-fem.mesh.p(2,idxl));

r=2*pi*fem.mesh.p(1,:);

intelx = sparse([ones(1,size(idx,2))],idxl,deltay/2.*r(idxl),1,size(Abx,1));
interx = sparse([ones(1,size(idx,2))],idxr,deltay/2.*r(idxr),1,size(Abx,1));
intely = sparse([ones(1,size(idx,2))],idxl,deltax/2.*r(idxl),1,size(Aby,1));
intery = sparse([ones(1,size(idx,2))],idxr,deltax/2.*r(idxr),1,size(Aby,1));
intex = intelx+interx;
intey = intely+intery;

v=v+D_Lenti*[intex*Abx+intey*Aby]*NULL;
t=t+D_Lenti*[intex*Abx+intey*Aby]*UD;

np=size(v,2);
nd=np+1;

feval(@octplot,[],[],'initall');
options=optimset('LevenbergMarquardt','on','Display','none','ShowStatusWindow','off','Diagnostics','on','LargeScale','off','MaxIter',10);

[X,RESNORM,RESIDUAL,EXITFLAG,OUTPUT,LAMBDA,JACOBIAN]=LSQNONLIN(@Fehler,[4,10,0.02],
[0 0.001 0.001],[20 20 20],options, ...
K,L,M,N,DA,KE,LE,NULL,UD,DE,v,t,ng,np,nd,D_Lenti,fem,AR);
ci = nlparci(X,RESIDUAL,JACOBIAN)
X

function F=Fehler(k,K,L,M,N,DA,KE,LE,NULL,UD,DE,v,t,ng,np,nd,D_Lenti,fem,AR)

Oberflache=5127;
VolumenLsg=1;
L_Lenti=150e-6;

k

```

```

k_Auto=k(3);
k_MM_1s=k(1);
k_MM_2s=k(2);
k_D=[D_Lenti D_Lenti D_Lenti D_Lenti];
k_RL=[-2*k_Auto 0 0 0;+k_Auto 0 +k_Auto 0;0 0 -2*k_Auto 0;+k_Auto 0 +k_Auto 0];
k_RB=[0 0 0 0;0 0 0 0;0 0 0 0;0 0 0 0];
k_RB=[-2*k_Auto 0 0 0;+k_Auto 0 +k_Auto 0;0 0 -2*k_Auto 0;+k_Auto 0 +k_Auto 0];
k_MM_1=[-k_MM_1s 0 0 0;k_MM_1s 0 0 0;0 0 0 0;0 0 0 0];
k_MM_2=[k_MM_2s 1 1 1;k_MM_2s 1 1 1;1 1 1 1;1 1 1 1];
c_0=[0.225 0 0.225 0];
nk=3;
L_Grenze=1;

KX=-[KE,NULL'*K*UD;v,t];
[KXi,KXj,KXw]=find(KX);
Diffusion=spalloc(nd*4,nd*4,size(KXi,1)*4);

for i=[0:3]
    Diffusion=Diffusion+sparse(KXi+i*nd,KXj+i*nd,KXw,nd*4,nd*4);
end

DX=[DE,zeros(size(DE,1),1);zeros(1,size(DE,2)),1/204000000];
[DXi,DXj,DXw]=find(DX);
Mass=spalloc(nd*4,nd*4,size(DXi,1)*4);

for i=[0:3]
    Mass=Mass+sparse(DXi+i*nd,DXj+i*nd,DXw,nd*4,nd*4);
end

Mef = sparse( [fem.mesh.t(1,:),fem.mesh.t(2,:),fem.mesh.t(3,:)] ,...
    [[1:ng],[1:ng],[1:ng]],...
    [repmat(1/3,1,ng),repmat(1/3,1,ng),repmat(1/3,1,ng)]);

Mnf = sparse( [fem.mesh.t(1,:),fem.mesh.t(2,:),fem.mesh.t(3,:)] ,...
    [[1:ng],[1:ng],[1:ng]],...
    [1/3*AR,1/3*AR,1/3*AR]);

ReaktionL=spalloc(4*nd,4*nd,4*nd);
ReaktionB=spalloc(4*nd,4*nd,16);

RL=[NULL'*Mnf*Mef'*NULL,NULL'*Mnf*Mef'*UD];
[RLi,RLj,RLw]=find(RL);

for i=[0:3]
    for j=[0:3]
        ReaktionL=ReaktionL-k_RL(i+1,j+1)*1*sparse(RLi+i*nd,RLj+j*nd,RLw,nd*4,nd*4);
        ReaktionB(np+1+nd*i,np+1+nd*j)=-1/20400000*k_RB(i+1,j+1);
    end
end

J=Diffusion-ReaktionL-ReaktionB;
%r=symamd(J);
r=1:size(J,1);

c0=zeros(1,nd*4);
for i=[0:3]
    c0(nd+i*nd)=c_0(i+1);
end

```

```

end

options=odeset('Mass',Mass(r,r),'Jacobian',@Jac,'MaxStep',2,'bdf','off','AbsTol',1e-4,'RelTol',1e-2,'stats','on','outputfcn',@octplot);

[t,c(:,r)]=ode15s(@dfdt,[0:0.0125:1,1.25:0.25:7],c0(r),options,J,fem,NULL,UD,k_MM_1,k_MM_2,Mef,
Mnf,np,nk,nd,ng,r,ReaktionL,L_Grenze);
gidx=find(c(:,nd)+c(:,3*nd)>L_Grenze);
c(gidx,nd)=c(gidx,nd)./(c(gidx,nd)+c(gidx,nd+2*nd))*L_Grenze;
c(gidx,nd+2*nd)=c(gidx,nd+2*nd)./(c(gidx,nd)+c(gidx,nd+2*nd))*L_Grenze;

load('daten.mat');
feval(@octplot,t,c,'plot',J,fem,NULL,UD,k_MM_1,k_MM_2,Mef,Mnf,np,nk,nd,ng,r,ReaktionL,L_Grenze);

CSimT1 = INTERP1(t,c(:,nd),t_mess);
CSimT2 = INTERP1(t,c(:,2*nd),t_mess);
CSimT3 = INTERP1(t,c(:,3*nd),t_mess);
CSimT4 = INTERP1(t,c(:,4*nd),t_mess);
assignin('base','h',[t,c(:,nd),c(:,2*nd),c(:,3*nd),c(:,4*nd)]);
F = [CSimT1-c_mess(:,1);CSimT2-c_mess(:,2);CSimT3-c_mess(:,3);CSimT4-c_mess(:,4)];

function dc=Jac(t,c,J,fem,NULL,UD,k_MM_1,k_MM_2,Mef,Mnf,np,nk,nd,ng,r,ReaktionL,L_Grenze)

ReaktionMM=spalloc(4*nd,4*nd,4*nd);

c(r)=c;

if (c(nd)+c(nd+2*nd)>L_Grenze)
    c(nd)=0;
    c(nd+2*nd)=0;
end

for i=[0:3]
    for j=[0:3]
        if k_MM_1(i+1,j+1) ~= 0
            ci=Mef.* (NULL*c((1:np)+j*nd)+UD*c(j*nd+np+1));
            Jh=(-k_MM_1(i+1,j+1)*k_MM_2(i+1,j+1)*ci./(k_MM_2(i+1,j+1)+ci).^2+k_MM_1(i+1,j+1)./
            (k_MM_2(i+1,j+1)+ci));
            Mnfm = Mnf.* sparse( [fem.mesh.t(1,:),fem.mesh.t(2,:),fem.mesh.t(3,:)] ,...
                [[1:ng],[1:ng],[1:ng]],...
                [Jh,Jh,Jh]);
            [Jhi,Jhj,Jhw]=find(NULL'*Mnfm*Mef'*NULL);
            ReaktionMM=ReaktionMM+sparse(Jhi+i*nd,Jhj+j*nd,Jhw,nd*4,nd*4);
        end
    end
end
dc=J(r,r)+ReaktionMM(r,r);

function dfdc=dfdt(t,c,J,fem,NULL,UD,k_MM_1,k_MM_2,Mef,Mnf,np,nk,nd,ng,r,ReaktionL,L_Grenze)

ReaktionMM=zeros(4*nd,1);

c(r)=c;
if (c(nd)+c(nd+2*nd)>L_Grenze)
    c(nd)=c(nd)/(c(nd)+c(nd+2*nd))*L_Grenze;
    c(nd+2*nd)=c(nd+2*nd)/(c(nd)+c(nd+2*nd))*L_Grenze;
end

for i=[0:3]
    for j=[0:3]
        if k_MM_1(i+1,j+1) ~= 0

```

```

ci=Mef'*(NULL*c((1:np)+j*nd)+UD*c(j*nd+np+1));
ReaktionMM((1:np)+i*nd)=ReaktionMM((1:np)+i*nd)+NULL'*Mnf*
(k_MM_1(i+1,j+1).*ci./(k_MM_2(i+1,j+1)+ci));
end
end
end

dfdc=J(r,r)*c(r)+ReaktionMM(r);

function state=octplot(t,c,flag,J,fem,NULL,UD,k_MM_1,k_MM_2,Mef,Mnf,np,nk,nd,ng,r,
ReaktionL,L_Grenze)

state=0;
colors={'r','b','g','y','w'};
global hl hb hm hf1 hf2 s1 s2 s3 s4 sui su2 su3 su4

switch flag
  case 'initall'
    load('daten.mat');
    hf1=figure('position',[650,200,500,350],'renderer','zbuffer')
    set(gca,'color',[0.7,0.7,0.5],'box','on','yLim',[0,0.3])
    for i=[1:4]
      m(i)=line(t_mess,c_mess(:,i));
      set(m(i),'Marker','*','LineStyle','none','LineWidth',1,'Color',colors{i});
    end

    hf2=figure('position',[100,200,700,550],'renderer','opengl');
    s1=subplot(2,2,1);
    s2=subplot(2,2,2);
    s3=subplot(2,2,3);
    s4=subplot(2,2,4);
    set([s1 s2 s3 s4],'Color',[0.7,0.7,0.5],'box','on','zLim',[-0.02 0.33],'view',[45,45]);
  end

  case 'init'
    c(r)=c(:,1);

  if (c(nd)+c(nd+2*nd)>L_Grenze)
    c(nd)=c(nd)/(c(nd)+c(nd+2*nd))*L_Grenze;
    c(nd+2*nd)=c(nd+2*nd)/(c(nd)+c(nd+2*nd))*L_Grenze;
  end
    delete(findobj('Tag','su'));
    fem.sol.u=NULL*c([1:np],1)+UD*c(np+1,1);
    sui=postplot(fem,'tridata','u','triz','u','parent',s1,'Tribar','off','view',get(s1,'view'),'axisequal','on');
    fem.sol.u=NULL*c([nd+1:nd+np],1)+UD*c(nd+np+1,1);

    su2=postplot(fem,'tridata','u','triz','u','parent',s2,'Tribar','off','view',get(s2,'view'),'axisequal','on');
    fem.sol.u=NULL*c([2*nd+1:2*nd+np],1)+UD*c(2*nd+np+1,1);

    su3=postplot(fem,'tridata','u','triz','u','parent',s3,'Tribar','off','view',get(s3,'view'),'axisequal','on');
    fem.sol.u=NULL*c([3*nd+1:3*nd+np],1)+UD*c(3*nd+np+1,1);

    su4=postplot(fem,'tridata','u','triz','u','parent',s4,'Tribar','off','view',get(s4,'view'),'axisequal','on');
    set([sui su2 su3 su4],'Tag','su');
    set([s1 s2 s3 s4],'zLim',[0 0.3] );
  end

  case 'plot'
    figure(hf1)

```

```

delete(findobj('Tag','LineOld'));
set(findobj('Tag','LineNew'),'linewidth',1.0,'LineStyle','--','Tag','LineOld')
for i=[0:3]
    hm(i+1)=line(t,c(:,(nd)+i*nd));
    set(hm(i+1),'Marker','none','LineStyle','--','linewidth',1.5,'color',colors{i+1}, 'Tag','LineNew');
end

case ''
    c(r)=c(:,1);
if (c(nd)+c(nd+2*nd)>L_Grenze)
    c(nd)=c(nd)/(c(nd)+c(nd+2*nd))*L_Grenze;
    c(nd+2*nd)=c(nd+2*nd)/(c(nd)+c(nd+2*nd))*L_Grenze;
end

u=NULL*c([1:np],1)+UD*c(np+1,1);
set(su1,'zdata',[u(fem.mesh.t(1,:)),u(fem.mesh.t(2,:)),u(fem.mesh.t(3,:))]', 'cdata',[u(fem.mesh.t(1,:)),u(fem.mesh.t(2,:)),u(fem.mesh.t(3,:))]');
set(s1,'CLim',[min(u),max(u)]);

u=NULL*c([nd+1:nd+np],1)+UD*c(nd+np+1,1);
set(su2,'zdata',[u(fem.mesh.t(1,:)),u(fem.mesh.t(2,:)),u(fem.mesh.t(3,:))]', 'cdata',[u(fem.mesh.t(1,:)),u(fem.mesh.t(2,:)),u(fem.mesh.t(3,:))]);
set(s2,'CLim',[min(u),max(u)]);

u=NULL*c([2*nd+1:2*nd+np],1)+UD*c(2*nd+np+1,1);
set(su3,'zdata',[u(fem.mesh.t(1,:)),u(fem.mesh.t(2,:)),u(fem.mesh.t(3,:))]', 'cdata',[u(fem.mesh.t(1,:)),u(fem.mesh.t(2,:)),u(fem.mesh.t(3,:))]);
set(s3,'CLim',[min(u),max(u)]);

u=NULL*c([3*nd+1:3*nd+np],1)+UD*c(3*nd+np+1,1);
set(su4,'zdata',[u(fem.mesh.t(1,:)),u(fem.mesh.t(2,:)),u(fem.mesh.t(3,:))]', 'cdata',[u(fem.mesh.t(1,:)),u(fem.mesh.t(2,:)),u(fem.mesh.t(3,:))]);
set(s4,'CLim',[min(u),max(u)]);

end;

drawnow;

```

Literatur

- [1] Aintsworth, S.; 1977, Steady state Enzyme Kinetics, 1. Aufl., Sheffield, The Macmillan Press LTD.
- [2] Archelas, A.; 1998, Fungal epoxide hydrolases: new tool for the synthesis of enantiopure epoxides and diols, *Journal of Molecular Catalysis B*, Nr. 55, S. 79-85.
- [3] Archer, I.V.J.; 1997, Epoxide Hydrolases as Asymmetric Catalysts, *Tetrahedron*, Vol. 53, Nr. 46, S. 15167-15662.
- [4] Archelas, A.; Delbecque, J.-P.; Furstoss, R.; 1993, Microbiological Transformations 30, Enantioselective hydrolysis of racemic epoxides: The Synthesis of Enantiopure Insect Juvenile Hormone Analogs (Bower Compound), *Tetrahedron: Asymmetry*, Vol. 4, Nr. 12, S. 2445-2446.
- [5] Atkins, W.P.; 1990, *Physikalische Chemie*, 1. Aufl., Weinheim, Verlag Chemie.
- [6] Azerad, R.; 1994, Application of biocatalysts in organic synthesis, *Bull. Soc. Fr.*, Nr. 132, S. 17-51.
- [7] Baerns, M.; Hofmann, H.; Renken, A.; 1992, *Chemische Reaktionstechnik*, 2. Aufl., Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- [8] Ballesteros, A.; Gill, I.; 2000, Bioencapsulation with synthetic polymers (Part1): Sol-Gel Encapsulated Biologicals, *Tibtech*, Nr. 18, S. 282-296.
- [9] Baratti, C., Moussou, P.; Archelas, A.; Furstoss, R.; 2000, Clues for the existence of two different epoxid hydrolase activities in the fungus *Beuveria bassiana*, *Enzyme and Microbial Technology*, Nr. 26, S. 414-420.
- [10] Bast, E.; 1999, *Mikrobiologische Methoden*, 1. Aufl., Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- [11] Becker, H.; 2001, *Organikum: organisch-chemisches Grundpraktikum*, 21. Aufl., Weinheim, Verlag Chemie.
- [12] Beyer, H.; Walther, W.; 1997, *Lehrbuch der Organischen Chemie*, 23. Aufl., Stuttgart, S. Hirzel Verlag.
- [13] Bisswanger, H.; 2000, *Enzymkinetik Theorie und Methoden*, 3. Aufl., Weinheim, Verlag Chemie.
- [14] Boyer, R.F.; 1992, *Modern Experimental Biochemistry*, 2. Aufl., Redford City, Benjamin Cummings Publishing Company.
- [15] Braun, C.; Kalinowski, H.-O. Berger; S.; 1998, *150 and More Basic NMR Experiments*, 2. Aufl., Weinheim, Verlag Chemie.

- [16] Brodbeck, U.; 1980, Enzyme Inhibitors, 1. Aufl., Weinheim, Verlag Chemie.
- [17] Carey, F.A.; Sundberg, R.J.; 1995, Organische Chemie, 1. Aufl., Weinheim, Verlag Chemie.
- [18] Clement, M.T.; 1951, Citric Acid Fermentation of Beet Molasses by *Aspergillus niger* in Submerged Culture, Ottawa, Canadian Journal of Technology, Nr. 30, S. 82-88.
- [19] Cost 840 Workshop; 2001, Practical Aspects of Encapsulation Technologies, Book of Abstracts, 1.Aufl., Braunschweig, FAL Eigenverlag.
- [20] Crueger, W.; Crueger, A.; 1989, Biotechnologie-Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie, 3.Aufl., München, Oldenbourg.
- [21] Cruz, A.J.G.; Almeida R.M.R.G.; Araujo M.L.G.C.; Giordano R.C.; Hokka C.O.; 2001, The dead core model applied to beads with immobilized cells in a fed-batch cephalosporin C production bioprocess, Chemical Engineering Science, Nr. 56, S. 419-425.
- [22] Dekant, W.; Vanvokag, S.; 1995, Enzyme Catalysis in Organic Synthesis Vol. 1, 1. korrigierter Nachdruck., Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- [23] Drauz, K; Waldmann, H.; 1995, Enzyme Catalysis in Organic Synthesis Vol. 1, 1. Aufl., Weinheim, Verlag Chemie.
- [24] Drauz, K; Waldmann, H.; 1995, Enzyme Catalysis in Organic Synthesis Vol. 2, 1. Aufl., Weinheim, Verlag Chemie.
- [25] Faber, K.; 1999, Biotransformations in Organic Chemistry, 4.Aufl., Berlin, Springer.
- [26] Faber, K.; Mischitz, M.; Kroutil, W.; Wandel, U.; 1995, Asymmetric Microbial Hydrolysis of Epoxides, Tetrahedron: Asymmetry, Vol. 6, Nr. 6, S. 1261-1272.
- [27] Faber, K.; Mischitz, M.; Hechtberger, P.; Wirnsberger, M.; Klempier, N.; 1993, Asymmetric Hydrolysis of Epoxides using an Immobilised Enzyme Preparation from *Rhodococcus* sp., Tetrahedron: Asymmetry, Vol. 4, Nr. 6, S. 1161-1164.
- [28] Faber, K.; Mischitz, M.; Mirtl, C.; Saf, R.; 1996, Regioselectivity of *Rhodococcus* NCIMB 11216 Epoxid Hydrolase: Applicability of E-Values for Description of Enantioselectivity Depends on Substrate Structure, Tetrahedron: Asymmetry, Vol.7, Nr. 7, S. 2041-2046.
- [29] Faber, K.; Orru, R.; 1999, Stereoselectivities of Microbial Epoxide Hydrolases, Current Opinion in Chemical Biology, Vol. 3, S. 16-21.
- [30] Fargali, S.; 2000, Untersuchungen zur stereoselektiven Öffnung von Epoxiden mit Pilzen, Diplomarbeit, Paderborn.

- [31] Feustel, H.; 1977, Die Welt der Pilze, 1. Aufl., Darmstadt, Anthes.
- [32] Fersht, A.; 1977, Enzyme Structure and Mechanism, 1. Aufl., San Francisco, W.H. Freeman and Company.
- [33] Finlayson, B. A.; 1980, Nonlinear Analysis in Chemical Engineering, Chemical Engineering Series, 1. Aufl., New York, McGraw-Hill.
- [34] Fitzer, E.; Fritz, W.; Emig G.; 1995, Technische Chemie, 4. Aufl., Berlin, Springer.
- [35] Flessner, T.; Doye, S.; 1999, N,N-Bis(3,5-di-*t*-butylsalicylidene)-1,2-cyclohexanediaminomanganes(III)chlorid - the Jacobsen Catalyst, Journal für Praktische Chemie, Vol. 314, Nr. 5, S. 436-444.
- [36] Furstoss, R.; Archelas, A.; 2001, Synthetic application of epoxide hydrolases, Current Opinion in Chemical Biology, Nr. 5, S. 112-119.
- [37] Furstoss, R.; Archelas, A.; Genzel, Y.; Broxtermann, Q.B.; Schulze, B.; 2001, Microbiological Transformation 47. A Step towards a Green Chemistry Preparation of Enantiopure (S)-2-, -3- and -4-pyridyloxirane via epoxide hydrolase-catalysed kinetic resolution, J. Org. Chem., Nr. 66, S. 538-543.
- [38] Furstoss, R.; Archelas, A.; Genzel Y.; Broxtermann Q.B.; Schulze B.; 2000, Preparation of enantiopure (S)-2-pyridyloxirane via epoxide hydrolase-catalysed kinetic resolution, Tetrahedron: Asymmetry, Nr. 11, S. 3041-3044.
- [39] Furstoss, R.; Chen, C.; Archelas, A.; 1993, Microbiological Transformations 27, The First Example for Preparative-Scale Enantioselective or Diastereoselective Epoxid Hydrolyses Using Microorganisms. An Unequivocal Access to All Four Bisabolol Stereoisomeres, J. Am. Soc., Nr. 58, S. 5528-5532.
- [40] Furstoss, R.; Cleij, M.; Archelas, A.; 1998, Microbiological Transformations 42, TA two liquid phase preparative scale process for an epoxide hydrolase catalysed resolution of para-bromo-a-methyl styrene oxide. Occurrence of a surprising enantioselectivity enhancement, Tetrahedron: Asymmetry, Nr. 9, S. 1839-1842.
- [41] Furstoss, R.; Pedragosa-Moreau, S.; Archelas, A.; 1993, Epoxide Hydrolases as a Preparative Access to both Enantiomers of Styrene Oxide, J. Am. Soc., Nr. 58, S. 5533-5536.
- [42] Furstoss, R.; Pedragosa-Moreau, S.; Archelas, A.; 1998, Use of Epoxide Hydrolases for the Synthesis of Enantiopure Alkyl Epoxides, Tetrahedron, Nr. 54, S. 1563-1572.
- [43] Furstoss, R.; Pedragosa-Moreau, S.; Archelas, A.; Guitton C.; Faucher D.; Bariatti J.C.; 1999, Purification and characterisation of a highly enantioselective epoxide hydrolase from *Aspergillus niger*, European Journal of Biochemistry, Nr. 263, S. 386-395.

- [44] Furstoss, R.; Pedragosa-Moreau, S.; Archelas, A.; 1996, Synthesis of Enantiopure Epoxides and Vicinal Diols using Fungal Epoxide Hydrolase Mediated Hydrolysis, *Tetrahedron Letters*, Nr. 19, Vol. 37, S. 3319-3322.
- [45] Furstoss, R.; Pedragosa-Moreau, S.; Archelas, A.; 1996, Use of Epoxide Hydrolase Mediated Biohydrolysis as a Way to Enantiopure Epoxides and Vicinal Diols: Application to Substituted Styrene Oxide Derivatives, *Tetrahedron*, Nr. 52, S. 4593-4606.
- [46] Furstoss, R.; Pedragosa-Moreau, S.; Archelas, A.; Morisseau, C.; Baratti, J.; 1996, Microbiological Transformations 33, Fungal Epoxid Hydrolases Applied to the Synthesis of Enantiopure Para-Substituted Styrene Oxides. A Mechanistic approach, *J. Org. Chem.*, Nr. 61, S. 7402-7407.
- [47] Gawly, R.E.; Aube, J.; 1996, *Tetrahedron Organic Chemistry Series*, Volume 14, Principles of Asymmetric Synthesis, 1. Aufl., Oxford, Elsevier.
- [48] Gerhartz, W.; 1990, *Enzymes in Industry*, 1. Aufl., Weinheim, Verlag Chemie.
- [49] GeniaLab; 2001, *Tips und Tricks*, 6. Aufl., Braunschweig, Firmenschrift, www.GeniaLab.com, Eigenverlag, Braunschweig.
- [50] Gemeiner, G.; 1992, *Enzyme Engineering Immobilized Biosystems*, 1. Aufl., New York, Ellis Horwood.
- [51] Hartung, J.; 2001, *Katalysen, Kinasen, Kondensate*, Frankfurt, Nachrichten aus der Chemie, Nr. 12, S. 1390.
- [52] Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B.; 1991, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 4. Aufl., Stuttgart, Thieme.
- [53] Hicks, B.-J.; Watt, A.-D.; Cossens, D.; 2000, The potential of *Beauveria bassiana* as a biological control agent against the pine beauty moth, *Forest Ecology and Management*, Vol. 149, S. 275-281.
- [54] Hilker, I.; Bothe D.; Prüss J.; Warnecke H.-J.; 2001, Chemo-enzymatic epoxidation of unsaturated plant oils, *Chemical Engineering Science*, Nr. 56, S. 427-432.
- [55] Hufford, D.; Capiton, G.; Clark, M.; Baker J.; 1981, Metabolism of Imipramine by Microorganisms, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 70, Nr. 2, S. 151-155.
- [56] Jahnz, U.; Schubert, M.; Vorlop, K.-D.; 2002, Process development for production of FDA from inulin on an industrial scale: Screening, genetic engineering and immobilisation, *Landbauforschung Völkerode*, Sonderheft 241, 113-119.
- [57] Jakobsen, E.N.; 1993, *Catalytic Asymmetric Synthesis*, 1. Aufl., Weinheim, Verlag Chemie.

- [58] Jakubith, M.; 1991, Chemische Verfahrenstechnik, 1. Aufl., Weinheim, Verlag Chemie.
- [59] Kergomard, A.; Renard M.; Veschambre H.; 1982, Microbiological Reduction of α , β -Unsaturated Ketons by *Beauveria sulfurescens*, Journal of Organic Chemistry, Nr. 47, S. 792-798.
- [60] Kieslich, K.; 1976, Microbiological Glucosidation of a Phenolic Hydroxyl Group, Chemische Berichte, Nr. 109, S. 2259-2265.
- [61] Liese A.; Karutz M.; Kamphuis J.; Wandrey C.; Kragel U.; 1996, Enzymatic Resolution of 1-Phenyl-1,2-ethandiol by Enantioselective Oxidation: Overcoming Product Inhibition by Continuous Extraction, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 51, S. 544-550.
- [62] Löwe, A.; 2002, Chemische Reaktionstechnik mit MATLAB und SIMULINK, 1. Aufl., Weinheim, Verlag Chemie.
- [63] Maloney, T.C.; 2000, Messung der Porengrößenverteilung mittels DSC, User-Com, Nr. 2, S. 14-17.
- [64] Marquardt, H.; 1997, Lehrbuch der Toxikologie, 1. Auflage, Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- [65] Matsumoto, K.; Fuwa, S.; Kitajima, H.; 1995, Enzyme-Mediated Enantioselective Hydrolysis of Cyclic Carbonates, Tetrahedron Letters, Nr. 36, Vol. 36, S. 6499-6502.
- [66] McCoy, M.; 1999, Biocatalysis Grows for Drug Synthesis, CuEN, Nr. 4, S. 10-14.
- [67] Mika, D.; 2001, Untersuchungen zur enantioselektiven Ringöffnung von Epoxiden durch Biokatalyse, Diplomarbeit, Paderborn.
- [68] Morrison, R.T; Boyd, R.N.; 1986, Lehrbuch der Organischen Chemie, 3. Aufl., Weinheim, Verlag Chemie.
- [69] Mulder, M.; 1996, Basic Principles of Membrane Technology, 2. Aufl., Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.
- [70] Müller, E.; 1992, Mykologie, 5. Aufl., Stuttgart, Thieme.
- [71] Munk, K.; 2001, Grundstudium Biologie Mikrobiologie, 1. Aufl., Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- [72] Prüße, U.; Jahnz, U.; Wittlich, R.; Bredford, J.; Vorlop, K.-D.; 2002, Bead production with JetCutting and rotating disc/nozzle technologies, Landbauforschung Völkerode, Sonderheft 241, S.1-10.
- [73] Rappaport, Z.; 1967, Handbook of Tables for Organic Compound Identification, 3. Aufl., Ohio, CRC Press.

- [74] Rehm, H.-J.; Reed, G.; Pühler, A.; Stadler, P.; 1991, Biotechnology Vol. 4, Measuring Modelling and Control, 2.Aufl., Weinheim, Verlag Chemie.
- [75] Rehm, H.; 1997, Der Experimentator: Proteinbiochemie, 2. Aufl., Stuttgart, Fischer.
- [76] Reichelt, R.; 1988, Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry, 2. Aufl., Weinheim, Verlag Chemie.
- [77] Römpf; 1988, Lexikon der Chemie, 9.Aufl., Stuttgart, Thieme.
- [78] Schügerl, K.; 1985, Bioreaktionstechnik Band 1, Grundlagen, Formalkinetik, Reaktortypen und Prozessführung, 1.Aufl., Aarau, Salle und Sauerländer.
- [79] Schügerl, K.; 1991, Bioreaktionstechnik Band 2, Bioreaktoren und ihre Charakterisierung, 1.Aufl., Aarau, Salle und Sauerländer.
- [80] Sharpless, K.B.; 2002, Auf der Suche nach neuer Reaktivität, Angewandte Chemie, Nr. 114, S. 2126-2135.
- [81] Sharpless, K.B.; Katsuki T.; 1980, The First Practical Method for Asymmetric Epoxidation, J.Am.Soc., Nr. 102, S. 4263.
- [82] Sinclair, G.C.; Kristiansen, B.; 1987, Fermentation Kinetics and Modelling, 1.Aufl., Manchester, Open University Press.
- [83] Stinson, S.C.; 2001, Chiral Chemistry, C&EN, Nr. 20, Vol. 79, S.2.
- [84] Straathof, A.A.-J.; Panke, S.; Schmidt, A.; 2002, The production of fine chemicals by biotransformations, Current Opinion in Biotechnology, Nr. 13, S. 548-556.
- [85] Schwantes, H.O.; 1995, Biologie der Pilze, 1.Aufl., Stuttgart, Verlag Chemie.
- [86] Schwedt, G.; 1994, Chromatographische Trennmethoden, 3.Aufl., Stuttgart, Thieme.
- [87] Sykes, P.; 1988, Reaktionsmechanismen in der Organischen Chemie, 9.Aufl., Weinheim, Verlag Eugen Ulmer.
- [88] van Beyma; 1973, Oxygenation of Dialkylbenzenes, Bioorganic Chemistry, Nr. 2, S. 99-100.
- [89] Vollhardt, K.P.; 1990, Organischen Chemie, 1.Aufl., Weinheim, Verlag Chemie.
- [90] Vollmert, B.; 1985, Grundriss der Makromolekularen Chemie, Band 2, 1.Aufl., Karlsruhe, Verlag E. Vollmert.
- [91] Vorlop, K-D.; Jekel, M.; 2000, Patentschrift DE 19827552C1 Verfahren zur Herstellung eines Geles aus Polyvinylalkohol und nach dem Verfahren hergestelltes mechanisch hochstables Gel.

- [92] Vorlop, K-D.; Remmers, P.; 1991, Patentschrift DE 4027218C1 Verfahren zur Herstellung von Biokatalysatoren.
- [93] Vorlop, K-D.; Ding, W-A.; 1997, Patentschrift DE 4327923C1 Gel aus Polyvinylalkohol und Verfahren zu seiner Herstellung.
- [94] Wedler, G.; 1987, Lehrbuch der Physikalische Chemie, 3.Aufl., Weinheim, Verlag Chemie.
- [95] Willetts, A.; Grogan G.; Rippe C.; 1997, Biohydrolysis of substituted styrene oxides by *Beauveria densa*, Journal of Molecular Catalysis B, Nr. 3, S. 253-257.
- [96] Zachmann, H. G.; 1990, Mathematik für Chemiker, 4.Aufl., Weinheim, Verlag Chemie.

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die durch ihre Unterstützung und Hilfe das Gelingen dieser Arbeit ermöglicht haben. Insbesondere gilt mein Dank:

Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Warnecke für die interessante Themenstellung und seine intensive fachliche und herzliche persönliche Betreuung.

Herrn PD. Dr. Bernhardt Westermann für die sehr engagierte Betreuung, für die vielen Diskussionen und die Übernahme des Korreferates.

Frau Dipl. Chem. Samira Fargalli und Herrn Dipl. Chem. Ing. Daniel Mika für ihr Engagement während ihrer Diplomarbeiten und vieler Diskussionen.

Frau Ulrike Schnittker für die Unterstützung bei den GC-Messungen und Thomas Ahrens und den Auszubildenden für ihr Engagement während ihrer Einsätze in meinem Labor.

Der Arbeitsgruppe Warnecke für die gute Arbeitsatmosphäre und Zusammenarbeit. Speziell Dipl. chem. Hermann Post für die Unterstützung bei der Modellprogrammierung, PD Dr. Bothe für die Hilfe bei der Lösung des Diffusionsproblems und Michael Motzigemba, Hendrik Reimann, Oliver Reipschläger, und Marina Lovrinovic für alles.

Der Arbeitsgruppe Westermann für die hervorragende Zusammenarbeit und die Unterstützung bei organisch chemischen Fragestellungen.

Allen nicht namentlich genannten Mitarbeitern und Freunden, die mich mit Rat und Tat unterstützt haben.

Einen besondern Dank meiner Familie, ohne deren Glauben an mich und ihrer Unterstützung diese Arbeit nicht möglich wäre.

Abstract of the PhD Thesis
Stereoselective Biohydrolysis of Epoxides:
Analysis, Optimisation and Modelling

By Thorsten Bruss

Enantiopure Epoxides and their corresponding diols are versatile synthons in the chemical and pharmaceutical industry. The present work deals with the stereoselective biohydrolysis of styreneoxide and derivatives with epoxidhydrolasis from the fungi *Aspergillus niger* (DSM 823) and *Beauveria bassiana* (DSM 1344) in a whole cell fermentation (figure 1).

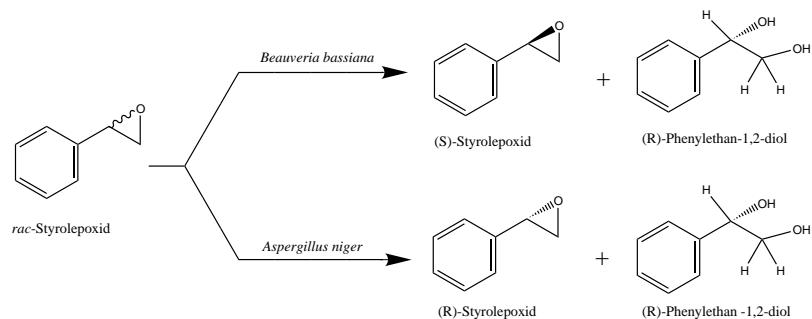


Abbildung 1: Enatiokonvergent biohydrolysis of styreneoxide with *Aspergillus niger* (DSM 823) and *Beauveria bassiana* (DSM 1344)

After optimisation of growing conditions in a batch fermenter and determination of the optimal harvest time, the reaction system was analysed and kinetically quantified for mathematic modelling. For the enhancement of the reaction mode, in order to receive higher substrate concentration, the reaction behaviour in cosolvent system was measured. Subsequently, an immobilisation process in polyvinylalcohol (Lenti-Kats) was established, which enables an application of the biocatalyst for 7 days. The substrat range of this biohydrolysis was extanded by a new type of etherbridged epoxides. Using the measured kinetic data a mathematic model was established, which includes different kinetic aspects and substrat transport limitation in the immobilised biocatalyst.