

satorherstellung und, im Falle von Redoxreaktionen, das zelleigene Cofaktor-Regenerationssystem ermöglichen eine ökonomische Prozessführung. Ein häufig auftretendes Problem besteht allerdings darin, dass die Substrate und Produkte schlecht wasserlöslich oder schädlich für die Zellen sind. Abhilfe lässt sich hier durch eine mehrphasige Prozessführung schaffen.^[2] Die dabei eingesetzten organischen Lösungsmittel sind jedoch oft selbst zelltoxisch und möglicherweise explosionsgefährlich und umweltschädlich. Als vielversprechende Alternativen bieten sich grüne Lösungsmittel (green solvents) wie überkritische Fluide und ionische Flüssigkeiten (ILs, ionic liquids) an.^[11,3]

Wir berichten hier über die Verwendung von ILs als Substratreservoir und In-situ-Extraktionsmittel in einem effizienten mehrphasigen Prozess zur Ganzzell-katalysierten Herstellung von Feinchemikalien am Beispiel der asymmetrischen Reduktion von 4-Chloracetophenon (4-Cl-AP) zu (*R*)-1-(4-Chlorphenyl)ethanol (1-4-Cl-PE) mit *Lactobacillus kefir*.^[4] Damit wird erstmalig gezeigt, dass ein zelluläres Cofaktor-Regenerationssystem in Gegenwart von ILs aktiv ist und ohne Zusatz von Cofaktoren zu hohen Produktkonzentrationen führt.

Um ökonomisch interessant zu sein, erfordern Ganzzell-katalysierte Redoxreaktionen ein für den Biokatalysator unschädliches, nicht mit Wasser mischbares Lösungsmittel, das dazu noch schlecht wasserlösliche Substanzen löst. Unter dieser Voraussetzung kann im zweiphasigen System die wässrige Phase optimale Bedingungen für die Zellen und die Cofaktor-Regenerierung bereitstellen und die Lösungsmittelphase als Substratreservoir und In-situ-Extraktionsmittel fungieren. Wir konzentrierten uns auf nicht mit Wasser mischbare ILs als zweite flüssige Phase, da diese Stoffe wegen ihres verschwindend geringen Dampfdrucks leicht und ungefährlich zu handhaben sind und bereits über biokatalytische Zellaktivität in ihrer Gegenwart berichtet wurde.^[3a,b,5] Die in dieser Arbeit verwendeten ILs waren: 1-*n*-Butyl-3-methylimidazolium-hexafluorophosphat (BMIM[PF₆]), BMIM-bis(trifluormethansulfon)imid (BMIM[TF₃N]) und Methyltrioctylammonium-[TF₃N] (OMA[TF₃N]).

Zunächst wurde in gerührten zweiphasigen 2.8-mL-Ansätzen der Einfluss unterschiedlicher ILs auf die Zellmembran von *L. kefir* untersucht; die Zellmembran ist zum einen wichtig für die Cofaktor-Regenerierung und zum anderen das Hauptangriffsziel der Lösungsmitteltoxizität.^[6] Die Ergebnisse wurden mit den Resultaten aus Tests mit organischen Lösungsmitteln verglichen, darunter Methyl-*tert*-butylether (MTBE) und Diisopropylether, von denen bekannt ist, dass sie eine stabile Umgebung für Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* bilden.^[7] Die Tests mit organischen Lösungsmitteln zeigen, dass die Schädigung der Zellmembran wie erwartet von log *P*, dem Verteilungskoeffizienten zwischen *n*-Octanol und Wasser, abhängt (Abbildung 1).^[8,9] Mit *n*-Decan (log *P* = 5.0) sinkt die Membranintegrität nur auf 52.7 %, mit MTBE (0.9), Diisopropylether (1.5), *n*-Octanol (3.0) und *n*-Decanol (4.6) auf 10 % oder darunter.

ILs dagegen schädigen die Zellmembran von *L. kefir* nicht (Abbildung 1b). Die Membranintegrität scheint eher anzusteigen, ein Effekt, der mit Morphologieänderungen erklärt werden kann und ähnlich auch bei wachsenden Zellen

Bioverfahrenstechnik

Effiziente Ganzzell-Biotransformation im zweiphasigen System ionische Flüssigkeit/Wasser**

Holger Pfründer,* Maya Amidjojo, Udo Kragl und Dirk Weuster-Botz*

Der Einsatz von ganzen Zellen als Biokatalysatoren ist eine effiziente Methode zur Gewinnung von chiralen Feinchemikalien.^[1] Die hohe Produktselektivität, die einfache Kataly-

[*] Dipl.-Biotech. H. Pfründer, Dipl.-Ing. M. Amidjojo, Prof. Dr.-Ing. D. Weuster-Botz
Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik
Technische Universität München
Boltzmannstraße 15, 85748 Garching (Deutschland)
Fax: (+49) 89-289-15714
E-mail: h.pfruender@lrz.tum.de
d.weuster-botz@lrz.tum.de

Prof. Dr. U. Kragl
Fachbereich Chemie
Universität Rostock
Albert-Einstein-Straße 3a, 18059 Rostock (Deutschland)

[**] Wir danken Solvent Innovation für die Bereitstellung der ionischen Flüssigkeiten und dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die finanzielle Unterstützung (Förderung 0312737E).

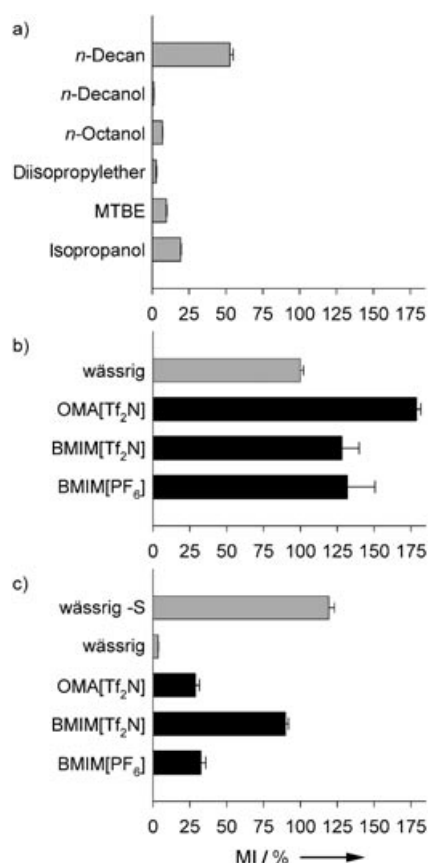


Abbildung 1. Membranintegrität (MI) von *Lactobacillus-kefir*-Zellen nach 5 h Inkubation im zweiphasigen Gemisch aus: a) Puffer und organischen Lösungsmittel, b) Puffer und ionischer Flüssigkeit im Vergleich zum rein wässrigen Ansatz, c) Puffer mit Glucose und ionischer Flüssigkeit mit 4-Chloracetophenon im Vergleich zum rein wässrigen Ansatz mit („wässrig“) und ohne („wässrig-S“) dispergiertem 4-Chloracetophenon.

beobachtet wurde (Ergebnisse nicht gezeigt). Daraufhin wurde die Fähigkeit von ILs untersucht, den schädigenden Einfluss von Substraten und Produkten der Biokatalyse auf die Zellen zu reduzieren. Ohne eine Lösungsmittelphase resultiert die Zugabe von 150 mM Substrat im fast vollständigen Verlust der Membranintegrität, wohingegen mit BMIM[Tf₂N] die Membran weitgehend intakt bleibt (89.8 %) (Abbildung 1c). BMIM[PF₆] und OMA[Tf₂N] reduzieren die Toxizität lediglich auf ca. 30 %, obwohl die Verteilungskoeffizienten für Substrat und Produkt bei allen drei ILs ähnlich sind (Tabelle 1). Folglich ist es nicht möglich, die Eignung von ILs für Ganzzell-katalysierte Prozesse allein

anhand ihrer Verteilungskoeffizienten und Biokompatibilität in Abwesenheit von toxischen Substanzen abzuleiten. Es sind Versuche unter den realen Prozessbedingungen nötig, um die richtige IL für ein gegebenes System aus Biokatalysator und Reaktanten zu identifizieren.

Für die Prozesseffizienz sind die Verteilungskoeffizienten für Substrat und Produkt dennoch interessant. Sie bestimmen neben der Substratverfügbarkeit auch die Prozessausschüttung, d.h. die Menge des in der Extraktionsphase angereicherten Produkts bezogen auf die eingesetzte Menge Substrat. Bei 20 % Lösungsmittelphase würde z.B. der Einsatz von Decan (mit einem niedrigen log*D*-Wert von 1.54 für 1-4-Cl-PE) die Prozessausschüttung um 11.5 %, entsprechend dem Anteil des in der wässrigen Phase zurückbleibenden Produkts, reduzieren (Tabelle 1). Mit BMIM[Tf₂N] beträgt dieser Verlust nur 3.7 %.

Zur Untersuchung der erreichbaren chemischen Ausbeute (gebildetes Produkt bezogen auf das eingesetzte Substrat) und Produktreinheit wurden Biotransformationen in Gegenwart verschiedener Lösungsmittel (20 %) durchgeführt (Tabelle 1). Mit 25 g L⁻¹ *L. kefir* (Trockenmasse) in der wässrigen Phase dauerte die Reaktion 6 Stunden. Dabei wurde eine etwas geringere Produktausbeute erhalten als mit 50 g L⁻¹ Zellen nach 3 Stunden. Eine Regulierung des pH-Werts erhöht die Ausbeute nicht signifikant (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Vorteile einer Verwendung von ILs gegenüber einer Prozessführung mit dispergiertem Substrat und Produkt zeigen sich sowohl in der Ausbeutesteigerung von 46.2 % auf 92.8 % als auch in einem ausgezeichneten Enantiomerenüberschuss von 99.7 % mit BMIM[Tf₂N] als Lösungsmittelphase.

Trotz der beeinträchtigten Membranintegrität werden auch mit BMIM[PF₆] und OMA[Tf₂N] sehr gute Ergebnisse erzielt (Tabelle 1). Mit MTBE hingegen ist die Ausbeute sehr gering. Offenbar wird die Membran in Gegenwart von MTBE noch schneller zerstört als ohne MTBE durch Substrat und Produkt allein. Dadurch bricht die Regenerierung des Co-faktors zusammen, bevor größere Mengen an Produkt gebildet wurden.

Der Ansatz mit BMIM[Tf₂N] und 50 g L⁻¹ Zellen wurde auf einen 200-mL-Batchprozess im Rührkesselreaktor (600 rpm, 2.3 WL⁻¹) übertragen.^[10] Der Reaktionsverlauf und die Prozessparameter wurden aufgezeichnet (Abbildung 2). Die chemische Ausbeute (93.8 ± 1.0 %) und die Produktreinheit (99.6 ± 0.1 % ee) waren identisch zum 2.8-mL-Maßstab. Damit sind die Prozessausschüttung (88.3 ± 1.4 %), die volumenbezogene Produktivität (20.4 ± 0.4 g L⁻¹ h⁻¹) und die Produktkonzentration (81.6 ± 1.6 g L⁻¹) weitaus höher als

Tabelle 1: Verteilungskoeffizienten log*D* von 4-Chloracetophenon und 1-(4-Chlorphenyl)ethanol im System Lösungsmittel/wässrige Phase und chemische Ausbeuten *Y* bei unterschiedlichen Zelldichten und Produktreinheiten (angegeben als Enantiomerenüberschuss).

	wässrig	BMIM[PF ₆]	BMIM[Tf ₂ N]	OMA[Tf ₂ N]	MTBE	<i>n</i> -Decan ^[a]
log <i>D</i> (4-Cl-AP)	Löslichkeit ≈ 7 mM	2.65 (± 0.17)	2.71 (± 0.10)	2.77 (± 0.7)	2.73 (± 0.38)	2.38 (± 0.16)
log <i>D</i> (1-4-Cl-PE)	Löslichkeit ≈ 25 mM	1.93 (± 0.08)	2.03 (± 0.09)	1.98 (± 0.12)	2.54 (± 0.37)	1.54 (± 0.10)
<i>Y</i> [%] (25 g L ⁻¹ Zellen)	42.1 (± 6.5)	82.7 (± 2.1)	89.0 (± 6.2)	80.1 (± 17.1)	2.4 (± 0.0)	n.b.
<i>Y</i> [%] (50 g L ⁻¹ Zellen)	46.2 (± 3.7)	88.2 (± 4.7)	92.8 (± 3.4)	88.4 (± 6.0)	4.2 (± 0.1)	n.b.
ee [%] (50 g L ⁻¹ Zellen)	98.1 (± 0.2)	99.8 (± 0.0)	99.7 (± 0.1)	99.4 (± n.b.)	96.3 (± 0.2)	n.b.

[a] n.b. = nicht bestimmt.

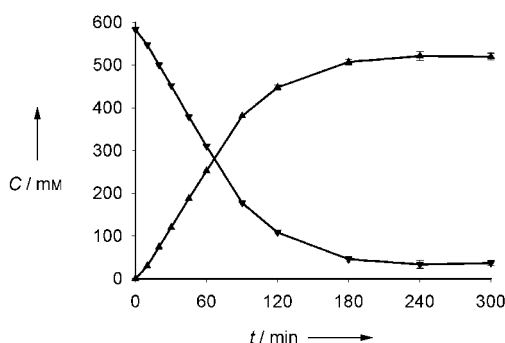


Abbildung 2. Verlauf der Konzentrationen von 4-Cl-AP (▼) und 1-4-Cl-PE (▲) in BMIM[Tf₂N] bei der Biotransformation mit *Lactobacillus kefir* in einem zweiphasigen System.

bei bisher beschriebenen Ganzzell-katalysierten Ketonreduktionen in ILs, bei denen keine Cofaktor-Regeneration genutzt wurde.^[5d] Darüber hinaus schneiden die Kennzahlen dieses Prozesses bei einem Vergleich mit industriellen biokatalytischen Prozessen sehr gut ab.^[1b,g] Da keine Emulsifizierung des Zweiphasengemischs beobachtet wurde, konnten die Phasen leicht durch Sedimentation oder Zentrifugation getrennt werden. Das Produkt wurde mit Hexan aus der ionischen Flüssigkeit extrahiert und gaschromatographisch untersucht. Eine quantitative und umweltschonendere Produktisolierung sollte durch Destillation, Pervaporation, Nanofiltration oder Extraktion mit überkritischen Fluiden möglich sein,^[11] und die ionische Flüssigkeit könnte dann wiederverwendet werden. Die Membranintegrität der Zellen nach Ende der Reaktion betrug 101.7% (± 5.8), weshalb auch diese vermutlich erneut eingesetzt werden können. Die Wechselzahl des Cofaktors geht gegen unendlich, da kein Zusatz von NADPH oder anderen Redoxäquivalenten nötig war. Deshalb ist von sehr niedrigen Prozesskosten auszugehen.

Zusammengefasst zeigt die nicht mit Wasser mischbare ionische Flüssigkeit BMIM[Tf₂N] sehr gute Lösungsmiteileigenschaften für 4-Chloracetophenon und den durch Reduktion gebildeten Benzylalkohol, ohne schädigend auf die Zellmembran von *L. kefir* zu wirken. BMIM[Tf₂N] konnte somit erfolgreich als Substratreservoir und In-situ-Extraktionsmittel für einen Ganzzell-katalytischen Prozess mit zellulärer Regenerierung des Cofaktors eingesetzt werden. Die Übertragbarkeit dieser Prozessführung auf andere Reaktionen wird derzeit von uns untersucht. Möglicherweise führt dieser neuartige Ansatz zu einer verstärkten Nutzung der Ganzzell-Biokatalyse zur Herstellung von Feinchemikalien.

Experimentelles

Für die Biotransformationen wurden das Lösungsmittel (IL oder organisches Lösungsmittel, 600 mM 4-Chloracetophenon, 20 Vol.-%) und der Puffer (0.2 M KP_i, pH 6.5, 0.2 M Glucose, suspendierte *Lactobacillus-kefir*-Zellen DSM20587) in mit Rührern ausgestatteten Gefäßen oder in einem Rührkesselreaktor gemischt, sodass dispergierte IL-Tröpfchen mit Durchmessern unter 1 mm vorlagen.^[10] In Referenzansätzen ohne Lösungsmittel wurde die gleiche Menge

Substrat in der wässrigen Phase dispergiert. Die Proben wurden bei Bedarf mit Salzsäure versetzt, die Phasen getrennt und mit Ethylacetat (wässrige Phase) und Hexan (IL) extrahiert und anschließend auf einer chiralen BGB-174-Säule (BGB Analytik AG) mit einem CP-3800-GC-System (Varian) analysiert.

Eingegangen am 6. April 2004 [Z460241]

Stichwörter: Asymmetrische Katalyse · Biotransformationen · Cofaktoren · Ganzzellverfahren · Ionische Flüssigkeiten

- [1] a) K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook*, Springer, Berlin, **1997**, S. 8–10; b) A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim **2000**, S. 25–27; c) A. Liese, M. Villela Filho, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 595–603; d) B. Schulze, M. G. Wubbolts, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 609–615; e) A. Schmid, J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, *Nature* **2001**, *409*, 258–268; f) A. Zaks, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 130–136; g) A. J. J. Straathof, S. Panke, A. Schmid, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 548–556; h) R. N. Patel, *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *31*, 804–826; i) M. Bertau, *Curr. Org. Chem.* **2002**, *6*, 987–1014.
- [2] a) C. Laane, S. Boeren, K. Vos, C. Veeger, *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, *30*, 81–87; b) G. J. Salter, D. B. Kell, *Crit. Rev. Biotechnol.* **1995**, *15*, 139–177; c) R. Leon, P. Fernandes, H. M. Pinheiro, J. M. S. Cabral, *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *23*, 483–500; d) A. J. J. Straathof, A. J. J. *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19*, 755–762.
- [3] a) K. R. Seddon, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1997**, *68*, 351–356; b) U. Kragl, M. Eckstein, N. Kaftzik in *Ionic Liquids in Synthesis* (Hrsg.: P. Wasserscheid, T. Welton), Wiley-VCH, Weinheim, **2003**, S. 336–346; c) R. D. Rogers, K. R. Seddon, *Science* **2003**, *302*, 792–793; d) A. J. Mesiano, E. J. Beckman, A. J. Russell, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 623–633; e) T. Matsuda, T. Harada, K. Nakamura, *Chem. Commun.* **2000**, *15*, 1367–1368; f) S. V. Dzuba, R. A. Bartsch, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 158–160; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 148–150.
- [4] W. Hummel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1990**, *34*, 15–19.
- [5] a) M. Freemantle, *Chem. Eng. News* **2003**, *81*, 9; b) B. Jastorff, R. Stormann, J. Ranke, K. Molter, F. Stock, B. Oberheitmann, W. Hoffmann, J. Hoffmann, M. Nuchter, B. Ondruschka, J. Filser, *Green Chem.* **2003**, *5*, 136–142; c) S. G. Cull, J. D. Holbrey, V. Vargas-Mora, K. R. Seddon, G. J. Lye, *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *69*, 227–233; d) J. Howarth, P. James, J. Dai, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7517–7519.
- [6] Die Membranintegrität wurde mit dem Testkit LIFE/DEAD BacLight (Molecular Probes) bestimmt.
- [7] M. Villela Filho, T. Stillger, M. Müller, A. Liese, C. Wandrey, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3101–3104; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2993–2996.
- [8] Werte für log *P* (Verteilungskoeffizient zwischen *n*-Octanol und Wasser) wurden auf der Internetseite http://syrrs.com/esc/est_kowdemo.htm erhalten.
- [9] A. Inoue, K. Horikoshi, *J. Ferment. Bioeng.* **1991**, *71*, 194–196.
- [10] D. Weuster-Botz, S. Stevens, A. Hawrylenko, *Biochem. Eng. J.* **2002**, *11*, 69–72.
- [11] a) L. A. Blanchard, D. Hancu, E. J. Beckman, J. F. Brennecke, *Nature* **1999**, *399*, 28–29; b) T. Schafer, C. M. Rodrigues, C. A. M. Afonso, J. G. Crespo, *Chem. Commun.* **2001**, *17*, 1622–1623; c) S. H. Schöfer, N. Kaftzik, P. Wasserscheid, U. Kragl, *Chem. Commun.* **2001**, *5*, 425–426; d) J. Krockel, U. Kragl, *Chem. Eng. Technol.* **2003**, *26*, 1166–1168.