

Modellgestützte Entwicklung eines Prozesses für die mikrobielle Hydrolyse von Propionitril zu Ammoniumpropionat

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften
der Universität Stuttgart zur Erlangung
der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Hans Jürgen Christian
aus Heidenheim

Hauptberichter: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Syldatk
Mitberichter: Prof. Dr.-Ing. Matthias Reuss
Tag der mündlichen Prüfung: 4. April 2000

Universität Stuttgart
Institut für Bioverfahrenstechnik
Lehrstuhl Physiologische Mikrobiologie

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Allen bedanken, die zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders gilt mein Dank Prof. Dr. C. Syldatk für das Bereitstellen des Themas, die stets offene Tür zu seinem Büro, die Freiheit zur Verwirklichung meiner Ideen und nicht zuletzt die intensive Unterstützung in der Zeit des Zusammenschreibens.

Prof. Dr.-Ing. M. Reuss möchte ich für die engagierte Zusammenarbeit und schnelle Anfertigung des Co-Referates danken.

Ich danke dem BMBF und der BASF AG, insbesondere Prof. Dr. B. Hauer, für die finanzielle und materielle Unterstützung und das große Interesse an dieser Arbeit.

Sabine danke ich für die freundschaftliche Hilfe in den „interessanten Zeiten“, in denen ohne ihre unendliche Geduld und Hilfsbereitschaft so manche Hürde bei der Modellbildung und Simulation nur schwer zu überwinden gewesen wäre.

Concha danke ich für die großartige Unterstützung dieser Arbeit durch eine Diplomarbeit und ihre engagierte Hiwi-Tätigkeit.

Sandra für die Bereitstellung eines E. coli Klones mit Amidaseaktivität und die vielen Tipps bei den genetischen Arbeiten.

PhD. Dr. M. Pietzsch für seine Diskussionsbereitschaft und die stetige Unterstützung bei der Verwirklichung meiner Ideen.

Besonderer Dank gilt all meiner Kollegen, Achim, Andrea, Andreas, Harald, Jojo, Kai, Kerstin, Klaus, Markus, Martin, Olli, Ralf, Sandra, Susi, Tomi und den Hiwis Ester, Natalie, Tina und Tobias die mir die Zeit am IBVT unvergeßlich machten.

Meinen Eltern und Großeltern möchte ich für die großartige Unterstützung und ihre beständige Motivation danken.

Rodi und ihren Eltern danke ich für ihre Freundschaft und die vielen Gelegenheiten, meine Gedanken bei gemütlichem Zusammensein zu ordnen.

	1
INHALTSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG	6
1.1 Natürliches Vorkommen von Nitrilen	6
1.2 Xenobiotisches Vorkommen von Nitrilen	6
1.3 Nitrilverseifung	7
1.3.1 Chemische Verseifung	7
1.3.2 Enzymatische Verseifung	7
1.4 Anwendung der Propionsäure und ihrer Salze	8
1.5 Chemische Herstellung von Propionsäure	9
1.6 Stand der Technik für die Verseifung von Nitrilen und Amiden	9
1.6.1 Beschreibung der Nitrilhydratasen	10
1.6.2 Beschreibung der Amidasen	12
1.7 Zielsetzung der Arbeit	14
2 MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 Allgemeine Arbeitshinweise	16
2.2 Chemikalien	16
2.3 Mikroorganismus	16
2.3.1 Stammbestimmung	16
2.3.2 Durchführung	16
2.3.2.1 <i>Isolierung chromosomaler DNA</i>	16
2.3.2.2 <i>Amplifizierung des 16S rRNA-Gens</i>	17
2.3.2.3 <i>Agarose-DNA-Gelelektrophorese</i>	18
2.3.2.4 <i>Bestimmung der Konzentration und Größe der PCR-Fragmente</i>	19
2.3.2.5 <i>Sequenzierung und Datenbankvergleich der PCR-Fragmente</i>	19
2.4 Zellanzucht	20
2.4.1 Kulturführung	20
2.4.1.2 <i>Medien zur Stammhaltung</i>	20
2.4.1.3 <i>Medien für die Zellvermehrung in Flüssigkultur</i>	21
2.4.2 Biomasseproduktion im Schüttelkolben	22
2.4.3 Biomasseproduktion im 100 l Bioreaktor	23

2.4.3.1 <i>Beschreibung des Bioreaktors</i>	23
2.4.3.2 <i>Durchführung der Kultivierung</i>	24
2.4.4 Lagerung der erhaltenen Zellen	25
2.5 Analytik	26
2.5.1 Bestimmung der optischen Dichte	26
2.5.2 Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration	26
2.5.3 Bestimmung der Biofeuchtmasskonzentration und der Zellkonzentration	26
2.5.4 Proteinbestimmung nach Bradford	27
2.5.5 Bestimmung der Glucosekonzentration	27
2.5.6 Bestimmung des Ammoniumgehalts in Lösung	28
2.5.7 Analytik der Substrate und Produkte der Nitrilverseifung	29
2.5.8 Aktivitätstest mit ganzen Zellen (quantitativ)	30
2.5.8.1 <i>Puffersysteme</i>	30
2.5.8.2 <i>Standardaktivitätstest mit freien, ruhenden Zellen</i>	31
2.5.8.3 <i>Standardaktivitätstest mit immobilisierten Zellen</i>	31
2.5.9 Auswertung des Standardaktivitätstests	32
2.5.10 SDS-Gelelektrophorese	33
2.5.10.1 <i>Zellaufschluß</i>	33
2.5.10.2 <i>SDS-Gelelektrophorese</i>	34
2.5.10.3 <i>Durchführung</i>	34
2.5.10.4 <i>Proteinauftrennung</i>	35
2.5.10.5 <i>Probenvorbereitung</i>	35
2.5.10.6 <i>Silberfärbung (BioRad Silver Stain Fertigtest):</i>	36
2.5.10.7 <i>Auswertung des Proteingels</i>	36
2.6 Biochemische Charakterisierung	36
2.6.1 Bestimmung des Temperaturoptimums	36
2.6.2 Bestimmung des pH-Optimums	37
2.6.3 Untersuchung der Lagerstabilität	37
2.6.4 Umsetzung von Propionitril im Zweiphasensystem	37
2.6.4.1 <i>Theorie</i>	37
2.6.4.2 <i>Umsetzung mit freien Zellen</i>	38
2.6.4.3 <i>Umsetzung mit lyophilisierten Zellen</i>	38
2.6.4.4 <i>Umsetzung mit alginatimmobilisierten Zellen</i>	38
2.6.5 Einfluß von Licht auf die Anfangsreaktionsrate von freien Zellen	38
2.6.6 Umsetzung von 1 M Substrat mit freien Zellen	39
2.6.7 Gefriertrocknung der Mikroorganismen	39
2.7 Immobilisierung der Mikroorganismen	39
2.7.1 Alginatimmobilisierung	39
2.7.2 Acrylamidimmobilisierung	40

2.8 Untersuchungen zur Reaktionsführung	42
2.8.1 Absatzweise Reaktionsführung mit freien und immobilisierten Zellen	42
2.8.2 Einsatz von Immobilisat im Standardansatz	43
2.8.2.1 <i>Alginatimmobilisat</i>	43
2.8.2.2 <i>Acrylamidimmobilisat</i>	43
2.8.3 Absatzweise Reaktionsführung mit kontinuierlicher Substratzugabe (fed-batch)	43
2.8.3.1 <i>Umsatz mit freien Zellen</i>	43
2.8.3.2 <i>Umsatz mit Alginatimmobilisat</i>	44
2.8.4 Absatzweise Reaktionsführung mit Alginatimmobilisat mit diskontinuierlicher Substratzugabe	44
2.8.5 Kontinuierlicher Festbettreaktor mit Alginatimmobilisat	45
2.8.5.1 <i>Nitrilhydrataseansatz</i>	45
2.8.5.2 <i>Amidaseansatz</i>	45
2.8.6 Kontinuierliche Reaktionsführung mit Alginatimmobilisat	46
2.8.6.1 <i>Propionitrilumsetzung</i>	46
2.8.6.2 <i>Propionamidumsetzung</i>	46
3 ERGEBNISSE	47
3.1 Klassifizierung des verwendeten Stammes	47
3.2 Kultivierung von <i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM 13002	48
3.2.1 Kultivierung im Schüttelkolben	48
3.2.2 Kultivierung im Rührreaktor	50
3.3 Charakterisierung der Biomasse bezüglich der Umsetzung von Propionitril	54
3.3.1 Standardaktivitätstest	54
3.3.2 Korrelation der Biomassekonzentration mit der Zellzahl und der Biotrockenmassekonzentration	55
3.3.3 Bestimmung des pH-Optimums der Enzymreaktionen	55
3.3.4 Bestimmung des Temperaturoptimums der Enzymreaktionen	57
3.3.5 Einfluß der Temperatur auf die Enzymaktivität ruhender Zellen bei Lagerung	58
3.3.6 Gefriertrocknung der Zellen	59
3.3.7 Untersuchung zur Lichtabhängigkeit der Nitrilhydratasereaktion	60
3.3.8 Umsetzung von Propionitril bei hohen Substratkonzentrationen und im Zweiphasensystem	60
3.3.8.1 <i>Umsetzung mit freien Zellen</i>	61
3.3.8.2 <i>Umsetzung mit lyophilisierten freien Zellen</i>	61
3.3.8.3 <i>Umsetzung mit alginatimmobilisierten Zellen</i>	61
3.3.8.4 <i>Umsetzung von 1 M Propionitril mit freien Zellen</i>	63

3.4 Immobilisierung der Biomasse	64
3.4.1 Immobilisierung der Biomasse in Kalziumalginat	64
3.4.2 Repeated Batch mit alginatimmobilisierten Zellen	67
3.4.3 Immobilisierung der Biomasse mit Polyacrylamid	69
3.5 Untersuchung zur Prozeßführung	71
3.5.1 Absatzweise Propionitrilverseifung mit freien Zellen	72
3.5.2 Absatzweise Propionitrilhydrolyse mit kontinuierlicher Substratzudosage	74
3.5.3 Kontinuierliche Substratumsetzung im Festbett	76
3.5.4 Kontinuierliche Substratumsetzung im Rührreaktor	80
3.6 Mathematische Modellierung	83
3.6.1 Parameteridentifikation	84
3.6.1.1 <i>Anfangsreaktionsraten</i>	84
3.6.1.2 <i>Dynamische Simulation</i>	89
3.6.2 Simulation eines Fed-batch Prozesses	94
3.6.3 Simulation eines kontinuierlichen Prozesses	100
3.6.3.1 <i>Inaktivierung der Nitrilhydratase</i>	102
3.6.3.2 <i>Inaktivierung der Amidase</i>	105
3.6.4 Abschätzung der Stofftransportlimitierung bei in Kalziumalginat immobilisierten Zellen	107
3.7 Optimierung des Mediums für die Zellanzucht	111
3.7.1 Expression des Enzymsystems	111
3.7.2 Einfluß der Wachstumsphase auf die spezifische Aktivität	112
3.7.3 Einfluß der Glucosekonzentration auf die spezifische Aktivität	113
3.7.4 Einfluß von Ammonium auf die spezifische Aktivität	115
3.7.5 Einfluß von Eisen auf die spezifische Aktivität	116
4 DISKUSSION	116
4.1 Charakterisierung der Biomasse	117
4.1.1 Stammbestimmung	118
4.1.2 Beschreibung der katalytisch aktiven Enzyme	119
4.1.3 Untersuchung zu den Kultivierungsbedingungen für die Bereitstellung des Biokatalysators	119
4.1.3.1 <i>Verwertung verschiedener C- und N-Quellen</i>	119
4.1.3.2 <i>Aktivitätsverlauf bei der Kultivierung</i>	121
4.1.3.3 <i>Einfluß der Glucosekonzentration auf die Aktivität der Biomasse</i>	122
4.1.3.4 <i>Einfluß von anorganischen Salzen auf die Aktivität der Biomasse</i>	122
4.1.3.5 <i>Organische Induktoren</i>	124
4.1.3.6 <i>Schaumbildung während der Kultivierung</i>	125
4.1.3.7 <i>Vorschläge zu einer Optimierung der Herstellungsbedingungen</i>	125

4.2 Biochemische Charakterisierung der ruhenden Zellen als Biokatalysator	126
4.2.1 Einfluß des pH- Wertes auf die Aktivität und Stabilität des Biokatalysators	126
4.2.2 Einfluß der Temperatur auf die Aktivität und Stabilität des Biokatalysators	127
4.2.3 Gefriertrocknung der Zellen	128
4.2.4 Einsatz der Zellen im Zwei-Phasen-System	128
4.2.5 Einfluß der Lichteinstrahlung auf die Reaktion	130
4.2.6 Zusammenfassung	130
4.3 Einsatz des Biokatalysators bei verschiedenen Prozeßführungsstrategien	131
4.3.1 Immobilisierung der Zellen	132
4.3.2 Diffusionslimitierung bei Immobilisierung in Kalziumalginat	134
4.3.3 Absatzweise Prozeßführung mit immobilisierten Zellen	135
4.3.4 Absatzweise Prozeßführung mit kontinuierlicher Substratzugabe	138
4.3.5 Kontinuierliche Prozeßführung im gerührten Reaktor	139
4.3.6 Kontinuierliche Prozeßführung im Festbett	141
4.3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den verschiedenen Prozeßführungen	142
4.4 Bestimmung der Reaktionskinetiken des Zwei-Enzym-Systems	145
4.4.1 Modellbildung	145
4.4.2 Anwendung des Modells auf verschiedene Prozeßführungen	149
4.4.2.1 Absatzweiser Prozeß mit kontinuierlicher Substratzudosage	149
4.4.2.2 Kontinuierlicher Prozeß im Rührreaktor	149
4.4.3 Abschließende Wertung der dynamische Simulation	150
5 AUSBLICK	151
6 ZUSAMMENFASSUNG	153
7 LITERATURVERZEICHNIS	155
8 ANHANG	165
8.1 Basenabfolge der 16S rDNA von <i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM 13002	165
8.2 Abkürzungen	166

1 Einleitung

In den letzten Jahren wurden vermehrt biotechnologische Prozesse zur Gewinnung von Feinchemikalien in der Industrie eingesetzt. Dies spiegelt sich in einer Reihe von Übersichtsartikeln über diesen Themenbereich wieder, wie zum Beispiel bei Liese et al. (Liese & Filho 1999). Dabei werden in jüngster Zeit nicht nur solche Substanzen biotechnologisch gewonnen, die mit herkömmlichen chemischen Methoden schwer zugänglich sind (Bommarius et al 1998, Ogawa & Shimizu 1999), sondern auch zunehmend intermediäre Chemikalien wie Acrylamid und Nikotinamid (Yamada & Kobayashi 1996). Die in diesen Prozessen genutzten biologischen Katalysatoren können dazu auch unter nichtnatürlichen Bedingungen eingesetzt werden. Diese sind zum Beispiel organische Lösungsmittel, hohe Temperaturen und extreme pH-Werte, wie sie in der chemischen Industrie oftmals notwendig sind. Dabei eignen sich Organismen aus extremen Umgebungen wie heißen Quellen und Bereichen mit hohen Konzentrationen an Giftstoffen in besonderer Weise für diese Einsätze (Dordick et al 1998).

1.1 Natürliches Vorkommen von Nitrilen

Nitrile, deren einfachster Vertreter die Blausäure (Hydrogencyanid) darstellt, sind chemisch durch ein dreifach gebundenes Stickstoffatom am Ende einer Kohlenstoffkette charakterisiert.

Nitrilverbindungen sind in der Natur weit verbreitet. In allen bisher untersuchten Organismenklassen kommen Vertreter mit der Eigenschaft der Synthese von Nitrilverbindungen vor (Jallageas et al 1980, Legras et al 1990). Besonders im Pflanzenreich sind Hydrogencyanid und die Derivate mit Aminosäure- oder Glycosidgerüst häufig anzutreffen. Von vielen weiteren Nitrilverbindungen in Pflanzen und auch bestimmten Schwämmen sind Aminosäuren als Synthesestufen bekannt (Legras et al 1990). Diese Verbindungen dienen unter anderem als Fraßschutz oder auch als Kohlenstoff- und Stickstoffquellen in den entsprechenden Samen der Pflanzen. In Mikroorganismen dagegen wird zumeist die Aminosäure Glycin als Precursor in Hydrogencyanid und CO_2 umgesetzt (Legras et al 1990).

Die Giftigkeit dieser Verbindungen beruht neben anderen Schädigungen auf einer starken Komplexbildung der durch Lyse der Ausgangsverbindungen entstehenden Blausäure mit Schwermetallionen im aktiven Zentrum von Enzymen, wie sie unter anderem auch in der Atmungskette vorkommen (Gargas et al 1995, Fennell et al 1991, Preuss et al 1996).

1.2 Xenobiotisches Vorkommen von Nitrilen

In der chemischen Synthese werden Nitrile häufig als hydrophiles und leicht flüchtiges Lösungsmittel eingesetzt, wie zum Beispiel Acetonitril, Propionitril und Benzylcyanid als Ausgangsmaterial für Benzylharze. Acrylonitril und Adiponitril werden in großen Mengen zur Herstellung von Polymeren wie

Latex und Nylon verwendet (Battistel et al 1997, Wyatt & Linton 1988). Auch als Schutzgruppe in der chemischen Synthese wird Blausäure häufig verwendet und fällt daher als hochgiftiger Abfallstoff an. Auch durch Herbizide mit nitrilhaltigen Gruppen (Hoagland et al 1995) werden große Mengen an solchen Blausäurederivaten in der Umwelt freigesetzt (Preuss et al 1996).

Das in dieser Arbeit verwendete Nitril der Propionsäure wird unter anderem technisch durch die Alkylierung von Cyaniden (Kolbesynthese) oder die Dehydratisierung von Propionamid hergestellt. Dieses wird hauptsächlich aus der Säure und Ammonium gewonnen (Jallageas et al 1980). Zudem kann auch Acrylonitril in größeren Mengen durch Reduktion zu Propionitril umgewandelt werden.

1.3 Nitrilverseifung

1.3.1 Chemische Verseifung

Die Hydrolyse der chemisch hergestellten Nitrile kann auf unterschiedliche Arten erfolgen.

Bei der chemischen Nitrilumwandlung können Nitrile unter sauren oder basischen Bedingungen zur Säure hydrolysiert werden (Jallageas et al 1980). Mit Wasserstoffperoxid dagegen kann selektiv eine Reduktion der Nitrilgruppe bis zur Stufe des Amids erfolgen (Becke et al 1971). Bei den meisten Nitrilhydrolysen sind allerdings neben stark sauren oder basischen Bedingungen auch hohe Drücke von bis zu 200 bar und Reaktionstemperaturen von ca. 180 °C notwendig (Becke et al 1971).

Da die Amide auf diesem Weg wesentlich schwerer herzustellen sind als die entsprechenden Säuren, werden auch katalytische Methoden unter relativ milden Bedingungen verwendet:

Die Verseifung von Acrylonitril zu Acrylamid im technischen Maßstab erfolgt unter Verwendung eines Kupferkatalysators, wobei allerdings dennoch die entsprechende Säure als unerwünschte Verunreinigung auftritt. Daneben reagiert das Amid aufgrund seiner Doppelbindung in geringen Mengen zu Nitrilotrispropionamid und Ethylencyanhydrin ab. Desweiteren kann es bei diesem Prozeß zu einer Polymerisierungsreaktion von Amid und entstehender Säure kommen, was dann zu hohen Verlusten in der Ausbeute des Prozesses führt. Zudem wird das Produkt durch Kupferionen belastet, die aufwendig aus dem Produkt entfernt und zurückgewonnen werden müssen (Shimizu 1997).

1.3.2 Enzymatische Verseifung

In der Natur werden Nitrilverbindungen hauptsächlich durch Mikroorganismen abgebaut (Theil 1997).

Diese Umsetzung von Nitrilverbindungen durch Bakterien erfolgt auf zwei unterschiedlichen Wegen (Kobayashi & Shimizu 1994, Kobayashi et al 1992, Kakeya et al 1991, Firmin & Gray 1976).

Eine Nitrilase (E. C. 3.5.5.1) kann die Umsetzung von Nitrilen zur Säure ohne die Freisetzung des Zwischenproduktes Amid direkt in einem Einschnittverfahren katalysieren (Kobayashi & Shimizu 1994).

Das Nitrilhydratase-Amidase-System ist dagegen eine Zweienzymreaktion, bei der zuerst die Nitrilhydratase (E.C. 4.2.1.84) das Nitril zum Amid verseift. Dieser Schritt ist eine Addition von Wasser,

weshalb die Nitrilhydratasen nicht unter die Hydrolasen, sondern unter die Lyasen eingegliedert werden.

Das Carbonsäureamid wird dann in einem zweiten Schritt durch eine Amidase (E.C. 3.5.1.4) in die korrespondierende Säure und Ammonium umgewandelt. Dies ist ein hydrolytischer Schritt, wie er für Amide auch durch Acylasen und Carbamoylasen katalysiert wird (Theil 1997).

Die unterschiedlichen Reaktionswege sind in Abbildung 1.1 dargestellt.

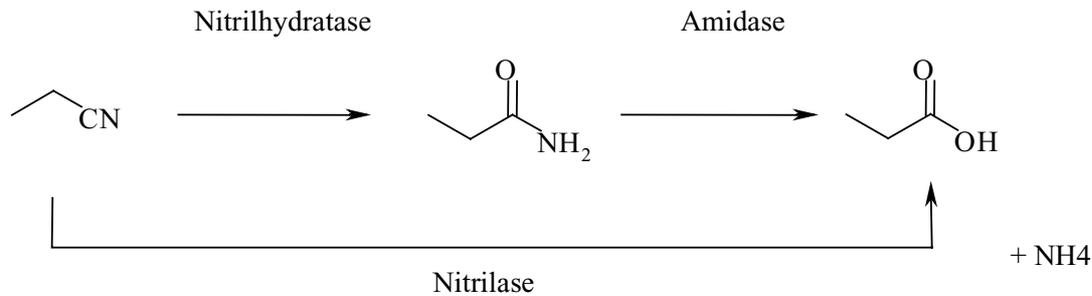


Abbildung 1.1: Darstellung der unterschiedlichen enzymatischen Wege zur Hydrolyse der nitrilhaltigen Verbindungen durch Mikroorganismen.

Solche Nitrilhydrataseaktivitäten sind besonders in der Familie der Actinomyceten, mycelartig wachsende Bodenbakterien, weit verbreitet (Thompson et al 1988). Aber auch gewisse niedere Pilze können derartige Verbindungen verwerten (Kuwahara et al 1980). Unter den Actinomyceten können Vertreter der Gattung *Rhodococcus* überdies mit Nitrilen als alleiniger Kohlenstoff- und Stickstoffquelle wachsen. Daneben besitzen auch Repräsentanten der Gattung *Corynebacterium*, *Brevibacterium* und *Agrobacterium* Nitrilhydratasen zur Verstoffwechslung von natürlich auftretenden Polymeren mit Nitrilgruppen. In der Gattung der gram⁺ Pseudomonaden sind ebenfalls Stämme mit nitrilhydrolysierenden Eigenschaften bekannt (Nawaz et al 1989).

1.4 Anwendung der Propionsäure und ihrer Salze

Die durch den in dieser Arbeit beschriebenen Prozeß gewonnene Propionsäure und ihre Salze wird vorwiegend im Lebens- und Futtermittelbereich (Yang et al 1993, Lueck 1980, Draughon et al 1982, Huitson 1968) angewendet. Die reine Säure findet in Veresterungen zur Geschmacksstoffsynthese z.B. im Rumaroma Verwendung. Besonders interessant ist auch die fungizide Wirkung der Propionsäure, wie sie bei der Herstellung von Silagematerial notwendig ist (Draughon et al 1982). In Lebensmitteln werden Propionsäure und ihre Salze als Zugabe bei der Herstellung von Pumpernickel und Mürbteigen verwendet (E 280 - 283). Dabei ist für die Propionsäure und ihre Salze eine Wirksamkeit gegen *Bacillus mesentericus* beschrieben, der bei der Teigherstellung für das Fadenziehen des Teiges verantwortlich ist (Spicher 1993). In der Polymerproduktion wird Propionsäure zur Veresterung von Cellulose (Thermoplastik) und als Vorstufe zur Herstellung von Vinylpropionat als Monomerbaustein von Kunststoffen verwendet (Reppe 1956).

Die Ammonium-, Natrium- und Calciumsalze der Propionsäure werden auch in der Veterinärmedizin bei der Kälbermast zur Behandlung von Verdauungsstörungen während der Umstellung von Lactat- auf Glucoseverwertung dem Futter beigegeben, wofür eine hohe Reinheit des Produktes erwünscht ist.

1.5 Chemische Herstellung von Propionsäure

Das gewünschte Zielprodukt des in dieser Arbeit entwickelten Prozesses, das Ammoniumsalz der Propionsäure, wird bisher durch chemische Synthese aus Ethylen, CO₂ und Dampf (Reppe Synthese, Reppe 1956) oder aus Erdgas (Fischer-Tropsch Prozeß) gewonnen.

Besonders reine Propionsäure wird bislang durch die Fermentation von Abfällen aus der Holzindustrie mit Bakterien der Gattung *Propionibacterium* (Wayman 1962) hergestellt, wobei allerdings neben der Propionsäure noch andere Carbonsäuren gebildet werden, was die Ausbeute erniedrigt und weitere Reinigungsschritte zur Abtrennung der Propionsäure notwendig machen. Dazu sind auch noch weitere fermentative Methoden zur Propionsäureherstellung mit unterschiedlichen Substraten und Organismen bekannt (Playne 1985, Lewis & Yang 1992, Crespo et al 1990).

Auch die chemische Verseifung von Propionitril wird zur Gewinnung von Propionsäure genutzt, wobei neben dem gewünschten Produkt aufgrund der sauren Bedingungen und der notwendigen Neutralisation während der Umsetzung auch große Mengen an Salzen anfallen (Theil 1997).

1.6 Stand der Technik für die Verseifung von Nitrilen und Amiden

Die Mehrzahl der bisher bekannten und technisch verwendeten Biotransformationen nutzen die Eigenschaften von Zellen oder von Zellteilen zur Umwandlung eines Substrates in einem einzigen Reaktionsschritt zu einer anderen Verbindung, dem Produkt (Ruttloff 1994, Stackebrandt 1998). Diese Reaktionen sind erwünschtermaßen zumeist stereo- und regiospezifisch, wobei auch nichtnatürliche Substrate umgewandelt werden können (Liese & Filho 1999).

Um die Biokatalysatoren für einen wiederholten Einsatz nach Beendigung der Reaktion einfach aus der Produktlösung abtrennen zu können, werden diese häufig als Immobilisate verwendet. Dies sind größere Agglomerate von Enzymen oder Zellen, die durch einfache mechanische Methoden aus den Produktlösungen abtrennbar sind (Katchalski-Katzir 1993, Böttger 1996).

Auch die Herstellung von Acrylamid aus Acrylonitril unter Verwendung von ruhenden Zellen der Gattung *Pseudomonas chlororaphis* B23 und *Rhodococcus rhodochrous* J1 nutzt die Vorteile einer Immobilisierung, wobei Acrylamid als Polymer für den Zelleinschluß verwendet wird (Katchalski-Katzir 1993, Nitto 1983, Kobayashi et al 1992).

Die in anderen Prozessen verwendeten und auf einem DEAE-Trägermaterial immobilisierten Zellen eines *Rhodococcus* sp. (SP361, NOVO Nordisc Industri, A/S Copenhagen, Denmark) wurden ebenfalls bezüglich ihrer nitrilverseifenden Eigenschaften eingehend untersucht (Cohen et al 1990, Beard et al

1993, Firmin & Gray 1976). Dabei wurden neben einer Nitrilase-, auch Amidase- und Nitrilhydrataseaktivitäten gefunden. Allerdings wurde dabei die Prozeßstabilität und der Einsatz im technischen Maßstab nicht näher untersucht. Zudem ist dieser Katalysator derzeit kommerziell nicht mehr erhältlich.

Wie bereits oben geschildert, wird die Verseifung von Nitrilen, insbesondere von Acrylonitril und Nicotinonitril, zu den entsprechenden Amiden im großen Maßstab industriell angewandt (Bunch 1998, Beard & Page 1998, Hughes et al 1998) und ist daher gut untersucht. Hierbei handelt es sich um eine Einschrittreaktion unter Verwendung der Nitrilhydratase in Form ruhender Zellen der Gattung *Rhodococcus* und *Pseudomonas* (Bunch 1998). Die Amidaseaktivitäten zur weiteren Umwandlung des Amids zur Säure, welche zumeist ebenfalls in den verwendeten Ganzzellsystemen auftreten, waren dabei ausdrücklich nicht erwünscht (Kobayashi & Shimizu 1998). Ferner wurde die Anwendung dieser Biotransformation zur Herstellung von Adipat und β -Caprolactam aus Adiponitril bereits 1988 von Novo Industri in Erwägung gezogen (Thompson et al 1988).

Enzyme aus der Klasse der Amidasen sind in sehr vielen Organismenklassen gefunden und untersucht worden (Ettinger & DeLuca 1995, Chebrou et al 1996b). Dennoch sind Umsetzungen mit der in dieser Arbeit untersuchten Amidase aus *Rhodococcus* derzeit nicht im technischen Einsatz (Kobayashi et al 1997), allerdings unter intensiver Begutachtung, da festgestellt wurde, daß cis-9-Octadecenamide, oder Oleamide, und Anandamide als bioaktive Signalmoleküle durch Amidasen zu den inaktiven Fettsäuren umgewandelt werden (Cravatt et al 1996, Patricelli et al 1999). Zudem wird das Pflanzenhormon Indoleessigsäure durch pflanzenpathogene *Pseudomonas*-Stämme aus dem entsprechenden Amid gebildet. Diese Untersuchungen führten zu einem Transformationssystem für die Wandlung von Kalluskulturen zu echten Pflanzen (Zambryski et al 1989).

In weiteren Untersuchungen konnten aufgrund der Enantioselektivität der Amidase auch racemische α -Aminoamide selektiv zu den (S)-Aminosäuren mit einem ee-Wert von >98 % umgesetzt werden, was unter anderem zur Herstellung enantiomerenreinen Aminosäuren genutzt werden kann (Beard & Page 1998).

1.6.1 Beschreibung der Nitrilhydratasen

Enzyme aus der Klasse der Nitrilhydratasen können in unterschiedlichen Formen in Mikroorganismen vorkommen. Dabei sind die Metallabhängigkeit, die Anzahl und Größe der Untereinheiten und das Substratspektrum wesentliche Unterscheidungsmerkmale. Die bisher am genauesten untersuchten Nitrilhydratasen und ihre Eigenschaften sind in Tabelle 1.1 zusammengefaßt.

Tabelle 1.1: Beschreibung der industriell verwendeten Nitrilhydratasen

Organismus	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> J1	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> J1	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> B23	<i>Rhodococcus</i> sp. N-771 und N-774	<i>Brevibacterium</i> R312 entspricht: <i>Rhodococcus</i> sp. 312
	Hohes Molekulargewicht	Niedriges Molekulargewicht			
MW [kDa]	130	520	100	70	87
Untereinheiten [kDa]	26 und 29	26.6 und 29	25 und 25	28.5 und 29	26 und 27.5
Zahl der Untereinheiten des Heterodimers	4	18 - 20	4	2	4
Temperatur-optimum [°C]	40	35	20		25
Temperatur-stabilität [°C]	30	50	20		20
pH-Optimum	8.8	6.5	7.5		7.8
pH-Stabilität	6.5 - 8.0	6.0 - 8.5	6.0 - 7.5		6.5 - 8.5
Metallion	Kobalt	Kobalt	Eisen	Eisen	Eisen
Substrate	aromatisch	aliphatisch	aliphatisch	aliphatisch	aliphatisch
Induktor	Cyclohexan-carboxamid und Kobalt	Urea und Kobalt	Aliphatische Nitrile, Amide und Säuren, Isovaleriansäure Methacrylamid		konstitutiv
Literatur	(Yamada & Kobayashi 1996)	(Yamada & Kobayashi 1996)	(Yamada & Kobayashi 1996)	(Endo & Watanabe 1989)	(Yamada & Kobayashi 1996)

Die in Tabelle 1.1 beschriebenen Nitrilhydratasen wurden intensiv biochemisch charakterisiert. Dabei wurden die einzelnen Enzyme gereinigt und ihre Aminosäuresequenz bestimmt, wobei auch die Klonierung und Expression des entsprechenden Genes in *Escherichia coli* durchgeführt wurde (Mayaux et al 1990, Nagasawa et al 1987, Nagasawa et al 1986, Kobayashi et al 1989). Es wurde dabei festgestellt, daß die Nitrilhydratasen aus *Rhodococcus* R312, *Rhodococcus* sp. N-774 und sp. N-771 in ihren beiden Untereinheiten eine Homologie von jeweils bis zu 95 % in der Abfolge der Aminosäuren zeigte. Die Nitrilhydratasen von *Rhodococcus* sp. N-774 und *Pseudomonas chlororaphis* B23 sind dagegen nur zu etwa 60 % bezüglich ihrer Aminosäuresequenz identisch (Scarrows et al 1996).

Es wurde festgestellt, daß die eisenabhängigen Nitrilhydratasen eine bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannte Nicht-Häm-Eisen-Konfiguration im aktiven Zentrum zeigten (Kobayashi & Shimizu 1998, Sugiura et al 1987). In intakten Zellen und auch im freien Enzym konnte gezeigt werden, daß die Aktivität durch Stickstoffmonoxid reversibel gehemmt wird, welches in den Zellen gebildet wird (Sari et al 1998). Durch Lichteinstrahlung ist eine Ablösung des NO aus dem Fe-Komplex im aktiven Zentrum induzierbar (Bonnet et al 1997, Endo et al 1999, Noguchi et al 1996, Mayer & Hemmens 1997). Bei einer Zellanzucht im Dunkeln wird die Nitrilhydratase aus *Rhodococcus* sp. B312 und sp.

N-771 in einer inaktiven, NO-assoziierten Form exprimiert, und kann durch Lichteinstrahlung aktiviert werden (Nagamune et al 1990). Dagegen wird die Nitrilhydratase aus *Pseudomonas chlororaphis* auch im Dunkeln aktiv synthetisiert (Nakajima 1987).

Zu der Synthese der Nitrilhydratase sowohl in *Pseudomonas* wie auch in *Rhodococcus*, wird ein Faltungsprotein, P47K, benötigt (Hashimoto et al 1994, Nishiyama et al 1991). Neben der Amidase und weiteren Proteinen, die auf dem Nitrilhydratase-Amidase-Operon festgestellt wurden, ist speziell P47K für eine aktive Expression der Nitrilhydratase in *Escherichia coli* notwendig.

Zur genaueren Untersuchung des Enzymaufbaus wurde eine Röntgenstrukturanalyse von den Kristallen der Nitrilhydratase aus *Rhodococcus* sp. 312 mit einer Auflösung von 2.65 Å (PDB 1AHJ) und von *Rhodococcus* sp. N-771 mit einer Auflösung von 1.7 Å (PDB 2AHJ) durchgeführt (Huang et al 1997, Tsujimura et al 1997, Nagashima et al 1998). Dabei wurde die Struktur des Tetramers aus 2 $\alpha\beta$ -Untereinheiten genau beschrieben und das aktive Zentrum in einer Spalte zwischen den beiden zusammengehörenden Untereinheiten lokalisiert. Es wurde festgestellt, daß sich der Eisenkern auf der α -Untereinheit befindet. Die β -Untereinheit scheint hauptsächlich strukturstabilisierende Funktion zu besitzen.

Der katalytische Mechanismus geht von einem nucleophilen Angriff des Metallions auf die Nitrilgruppe des Substrates aus. Dabei kann entweder der Kohlenstoff oder auch der Stickstoff angegriffen werden, wodurch es zu einem Ligandenaustausch mit einer Base des Enzyms im Bereich des aktiven Zentrums kommt. Das enzymgebundene Metallion übernimmt dabei die Rolle der Lewis-Säure. Es wurde bei den Untersuchungen zum aktiven Zentrum auch eine post-translationale Modifikation einer Cysteingruppe zu einer Cysteinsulfonsäure festgestellt, die eine wichtige Rolle in der Koordination des Eisenkerns und der Bindung des NO im aktiven Zentrum hat (Claiborne et al 1999, Tsujimura et al 1996). Dies könnte also auch bei der katalytischen Aktivität des Enzymes eine Rolle spielen.

Da die vorliegende Literatur bisher nur wenige Aussagen über die Prozeßstabilität der Nitrilhydratase bei der Verseifung von Nitrilen allgemein und der Umsetzung von Propionitril im besonderen zuläßt, ergaben sich interessante Anknüpfungspunkte für die vorliegende Arbeit. Besonders die kinetische Beschreibung und die Inaktivierung der Nitrilhydratase sollten daher eingehend untersucht werden.

1.6.2 Beschreibung der Amidasen

Bei den in Tabelle 1.1 aufgeführten Mikroorganismen sind mit den jeweiligen Nitrilhydratase zumeist auch Amidasen (E.C. 3.5.1.4) eng assoziiert (Mayaux et al 1990, Mayaux et al 1991, Kobayashi et al 1993a, Novo et al 1995, Asano et al 1982). Bei den Nitrilhydrataseoperons für die beschriebenen Stämme ist die Amidase dicht vor oder, wie bei *Rhodococcus rhodochrous* J1-L (Kobayashi et al 1993b), hinter den Genloci für die Untereinheiten der Nitrilhydratase lokalisiert (Chebrou et al 1996b). Einzig das Operon der kobaltabhängigen schweren Nitrilhydratase aus *Rhodococcus rhodochrous* J1 besitzt keine Amidase (Kobayashi et al 1993b, Kobayashi & Shimizu 1998). Die Charakterisierung der Amidasen zeigt als Substrate zumeist aliphatische Amide, wobei auch eine zweite Klasse von Amidasen mit aromatischen Substraten in den untersuchten Stämmen gefunden wurden.

Tabelle 1.2: Beschreibung der Amidase aus industriell verwendeten Mikroorganismen

Organismus	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> J1	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> B23	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Rhodococcus</i> sp. N-771 und N-774	<i>Brevibacterium</i> R312 entspricht <i>Rhodococcus</i> sp. 312
MW [kDa]	300	105	38.4	108	87
Untereinheiten [kDa]	38	54	33	54.671	26 27.5
Zahl der Untereinheiten	8	2	1 - 6	2	3 - 4
Temperatur-optimum [°C]	55	50			
Temperatur-stabilität [°C]	50	50			
pH-Optimum	8.0	7.0 - 8.6	6.5 – 8.0 7.2		
pH-Stabilität	7.4	5.9 - 9.9			
Substrate	Acetamid Acrylamid Propionamid	Aliphatisch und aromatisch		aromatisch	aliphatisch
Induktor	Acetonitril	Aliphatische Amide Butyronitril			
Literatur	(Asano et al 1982, Kobayashi et al 1993a)	(Ciskanik et al 1995)	(Kelly & Kornberg 1964, Kelly & Kornberg 1962, Ambler et al 1987, Lowe et al 1989)	(Mayaux et al 1991, Azza et al 1994)	(Azza et al 1994)

Die Untersuchung und der Vergleich der Genstrukturen zeigt starke Homologien der Enzyme untereinander (Kobayashi et al 1997, Azza et al 1993, Moreau et al 1993, Mayaux et al 1991), wobei die Amidasen der Stämme *Rhodococcus* sp. 312 und *Rhodococcus* sp. N-774 und *Pseudomonas aeruginosa* (Soubrier et al 1992) zu über 80 % miteinander identisch vorliegen und die Amidasen von *Rhododococcus rhodochrous* J-1 und *Pseudomonas* B23 ebenfalls nur wenige Aminosäureaustausche zeigen. Die enantioselektive Amidase aus *Rhodococcus* sp. zeigt eine hohe Ähnlichkeit zu der Amidase aus *Rhodococcus* R312 (Mayaux et al 1991).

Aufgrund der ungewöhnlich hohen Homologien (> 80 %) zwischen den Sequenzen der Amidase von Gram⁺- und Gram⁻- Stämmen wird vermutet, daß es im Zuge der Entwicklung zu einem Gentransfer zwischen den Stämmen gekommen ist (Soubrier et al 1992).

Hochkonserviert sind dabei die Bereiche um Gly189, wobei als charakteristische Gruppe ein GGSSGG-Motiv bei Aminosäureposition 167 und den folgenden zu erkennen ist (Chebrou et al 1996a). Im Zuge der Charakterisierung der Amidase wurden auch Homologien zu Nitrilhydratase gefunden und auch die Eigenschaft, Nitrile zu verseifen, wurde für bestimmte Amidasen beschrieben (Novo et al 1995, Kobayashi et al 1998a, Kobayashi et al 1998b).

Von der Arbeitsgruppe um Mayaux wurden die Amidasen aus *Rhodococcus* R312 und *Rhodococcus* N-772 als nahezu identisch beschrieben.

Bisher wurde jedoch nur die Amidase von *Pseudomonas aeruginosa* kristallisiert, weshalb auch der genaue Aufbau des aktiven Zentrums nur für dieses Enzym bekannt ist (Fournand et al 1998, Kobayashi et al 1997).

Dabei wurde festgestellt, daß das an Position 166 lokalisierte Cystein mit hoher Wahrscheinlichkeit die nukleophile Gruppe für die Hydrolyse des Substrates darstellt (Farnaud et al 1999). Es wird sogar vorgeschlagen, die Amidasen, ähnlich wie die Lipasen, in cystein-, asparagin- und eisenabhängige Enzymklassen zu unterscheiden, da auch für die Amidase eine ähnliche katalytische Triade im aktiven Zentrum angenommen werden kann.

Zudem zeigten Inkubationen der übrigen Amidasen mit Mercaptoethanol und weiteren Reagenzien zur Oxidation von Schwefelgruppen stark inhibitorische Wirkung, was ebenfalls die Lokalisierung einer Cysteingruppe im aktiven Zentrum nahelegt (Kobayashi et al 1998a, Kobayashi et al 1997).

Die in Tabelle 1.2 erwähnten Amidasen wurden bezüglich ihrer Verwendbarkeit in der technischen Anwendung bisher nur sehr unzureichend charakterisiert. Besonders der Zusammenhang mit der Nitrilhydratase wurde zumeist nur auf genetischer Ebene betrachtet (Chebrou et al 1996a, Bigey et al 1995, Hashimoto et al 1994). Über Prozeßstabilitäten von Amidasen und ihre Nutzung in einem Zwei-Enzym-System wurden bisher wenige literaturbekannte Untersuchungen durchgeführt (Daniel 1994, Bernet et al 1987).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Für den angestrebten Prozeß zur mikrobiellen Verseifung von Propionitril wurde von dem Industriepartner ein Mikroorganismus mit nitrilverseifenden Eigenschaften zur Verfügung gestellt.

Der Stamm sollte zuerst auf seine Gattungszugehörigkeit hin untersucht werden. Dazu sollte zu Beginn der Arbeit eine Kultivierung der Mikroorganismen im Bioreaktor durchgeführt werden, um für die weiteren Untersuchungen eine größere Menge an homogener Zellmasse bereitzustellen. Zudem sollten Vorschläge für ein optimiertes Kultivierungsmedium in Bezug auf die zu erhaltende Biomassekonzentration und die spezifische Aktivität der Zellen erarbeitet werden.

Der aus der Kultivierung erhaltene Biokatalysator sollte daraufhin auf seine Optima bezüglich des pH-Wertes und der Temperatur für einen technischen Einsatz untersucht werden. Dazu sollte ein Standardaktivitätstest entwickelt werden, der eine Aussage über die spezifische Aktivität unter den entsprechenden Bedingungen zuließ. Dies erforderte auch die Entwicklung einer geeigneten Analytik für die Quantifizierung der an der Reaktion beteiligten Komponenten.

Um eine Abschätzung für die maximale Substratkonzentration bei einer absatzweisen Prozeßführung zu erhalten, sollte das Verhalten des Biokatalysator bei Produktkonzentrationen an der Löslichkeitsgrenze und im Zwei-Phasen-System untersucht werden.

Für eine Abschätzung geeigneter Reaktorkonzepte für die Propionitrivelseifung sollten verschiedene Prozeßführungsstrategien im absatzweisen und kontinuierlichen Betrieb durchgeführt werden. Dies erforderte zudem eine Immobilisierung der Zellmasse.

Zusätzlich sollte ein reaktionskinetisches Modell für die Reaktionen der Nitrilhydratase und Amidase erstellt werden, um für zukünftige Arbeiten eine modellgestützte Prozeßauslegung zu ermöglichen. Dazu mußten die Einflüsse von Substrat- und Produktkonzentrationen auf das Enzymsystem gemessen und daraus die Parameter des Modelles abgeschätzt werden. Eine Überprüfung des erhaltenen Modelles sollte anhand verschiedener Prozeßführungen in der dynamischen Simulation durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeine Arbeitshinweise

Alle Arbeiten wurden, wenn nicht anders vermerkt, auf Eis oder im Kühlraum durchgeführt. Dabei wurden aufgrund der Giftigkeit von Propionitril und zum Schutz vor Kontamination geeignete Handschuhe getragen.

2.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, mit kommerziell erhältlichem p.a.-Reinheitsgrad von den Firmen Fluka (Buchs, CH), Merck (Darmstadt, D), Sigma (St. Louis, USA), Boehringer (Mannheim, D) und Riedel-de Haën (Seelze, D) bezogen.

2.3 Mikroorganismus

In dieser Arbeit wurde ein von BASF bereitgestellter Mikroorganismus mit den in den folgenden Abschnitten dargestellten Methoden klassifiziert und bezüglich seiner nitrilverseifenden Eigenschaften charakterisiert.

2.3.1 Stammbestimmung

Für die taxonomische Einordnung isolierter Stämme wird unter anderem deren DNA-Abschnitte isoliert, welche für die 16S rRNA kodieren, mittels PCR vermehrt und danach sequenziert. Die 16S rDNA des Stammes von BASF hatte dabei eine Länge von 1476 bp. Danach erfolgte ein Vergleich der erhaltenen Sequenz mit der anderer Mikroorganismen, welche in Sequenzdatenbanken gespeichert sind. Je genauer dabei die Basenabfolgen der jeweiligen Stämme übereinstimmen, desto enger sind sie miteinander verwandt (Böttger 1996, Lane 1991).

2.3.2 Durchführung

2.3.2.1 Isolierung chromosomaler DNA

Von einer Agarplatte mit frischen Kolonien von *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002 wurde eine gut gewachsene Einzelkolonie (Durchmesser ca. 2 - 3 mm) mit einer Impföse in 30 µl sterilem VE-Wasser resuspendiert. Hierfür wurde ein ebenfalls steriles Eppendorfreaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, D) verwendet. Um die Zellen aufzuschließen, wurde der Ansatz anschließend 5 min bei 100 °C in einem MiniCycler (Biozyme, Oldendorf, D) inkubiert und nachfolgend 1 min bei 14000 Upm in einer Eppendorf Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg, D) zentrifugiert.

Der Überstand mit der DNA wurde in ein dünnwandiges und steriles 0.5 ml PCR-Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen.

2.3.2.2 Amplifizierung des 16S rRNA-Gens

Zur Amplifizierung des 16S rRNA-Gens wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Der Reaktionsansatz für die PCR enthielt die in Tabelle 2.1 beschriebenen Komponenten:

Tabelle 2.1: Komponenten für die PCR

Komponente	Menge	Konzentration im Ansatz
Primer 27f 50 pmol 5´agagttgatcctggctcag 3´	1.6 µl	1 µM
Primer 1522 rN 50 pmol 5´catgcgccgcaaggagtgatcca(a/g)ccgca 3´	1.4 µl	1 µM
10 x PCR Reaktionspuffer	5 µl	1 x
MgCl ₂ 25 mM	3 µl	1.5 mM
dNTP-Mix (2.5 mM)	2 µl	0.1 mM
Template-DNA	5 µl	
DNA-Polymerase	5 µl	1 U
Wasser	ad 50 µl	

Für die Kontrollreaktionen wurde der Ansatz einmal nur mit Primer 27f und einmal mit Primer 1522rN durchgeführt. Beide Ansätze sollten keine Amplifikation der Gene ermöglichen. Als weitere Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Template-DNA hergestellt. Die restlichen Komponenten wurden nicht geändert.

Zur Vermeidung von Verdampfungsverlusten wurde der Ansatz mit 2 Tropfen Mineralöl überschichtet.

Das folgende in Tabelle 2.2 dargestellte PCR-Programm wurde für die Amplifizierung verwendet:

Tabelle 2.2: PCR-Programm für die Amplifizierung der 16S rDNA

Parameter	Zeitdauer	Änderung
Temperatur	2 min	94 °C
Zugabe der DNA-Polymerase		
Temperatur	1 min	94 °C
PCR-Cyclus mit 23 Wiederholungen		
Temperatur	30 sec	45 °C
Temperatur	2 min	72 °C
Temperatur	30 sec	94 °C
Letzter PCR-Schritt		
Temperatur	30 sec	45 °C
Temperatur	15 min	72 °C
Lagerung		4 °C

Nach 2 Minuten wurde die DNA-Polymerase zugegeben. Dafür wurde das Eppendorfreaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, D) kurz geöffnet (dazu aber nicht aus dem Block herausgenommen), anschließend mit der Pipette schnell durch die Ölschicht gestochen und die DNA-Polymerase zugegeben.

2.3.2.3 Agarose-DNA-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese hatte das Ziel, die entstandenen PCR-Fragmente aufzutrennen, um im Anschluß daran das gewünschte Fragment aus dem Gel eluieren zu können. Für diesen Zweck wurde 1%iges (w/v Agarose) TAE-Agarosegel mit 1 µl/ml Ethidiumbromid in unverdünntem TAE-Puffer (Amersham Pharmacia, Upsala, S) hergestellt (60 ml Gelvolumen).

Die Elektrophoresekammer wurde ebenfalls mit unverdünntem TAE-Puffer als Elektrolytflüssigkeit befüllt.

Von der PCR-Probe wurden 40 µl Probe und mit 1 µg DNA Größenstandard (Amersham Pharmacia, Upsala, S) mit 1/10 Volumen Auftragspuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Es wurden 40 µl der so vorbereiteten Proben in jeweils eine der Taschen des Geles gegeben und bei 75 V 1 Stunde aufgetrennt.

Die gewünschte Bande (ca. 1.5 kb) wurde anschließend mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten und mit dem GeneClean III (Bio 101 Inc., La Jolla, USA) Kit eluiert. Die aus der Agarose ausgeschnittene DNA-Bande wurde in ein steriles und vorgewogenes Eppendorfreaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, D) überführt und gewogen.

Sodann wurden 300 µl NaCl 0,9 % pro 0.1 g Agarose zugegeben und bei 50 °C für 5 min in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, D) inkubiert, um die Agarose vollständig aufzuschmelzen. Danach wurden 5 µl Glasmilch (Bio 101 Inc., La Jolla, USA) zugegeben, suspendiert und die Suspension für 5 min auf Eis gelagert. Sodann wurde die Glasmilchsuspension für 5 min bei 14000 Upm in einer Eppendorf Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg, D) abzentrifugiert. Nachdem der Überstand sorgfältig entfernt worden war, wurde das Pellet dreimal mit je 500 µl eiskaltem NEW WASH (Bio 101 Inc., La Jolla, USA) unter den oben beschriebenen Bedingungen gewaschen. Zum Schluß wurde das Pellet noch einmal abzentrifugiert und alles Ethanol gründlich entfernt. Das Pellet der Glasmilchfällung wurde in 5 µl VE-Wasser resuspendiert und 3 min bei 50 °C inkubiert. Die Suspension wurde für 30 sec. abzentrifugiert und der Überstand in ein frisches, steriles Eppendorfgefäß (Eppendorf, Hamburg, D) überführt. Danach wurde das Pellet noch zwei weitere Male nach demselben Verfahren resuspendiert, inkubiert und abzentrifugiert. Die Überstände wurden gesammelt und nochmals abzentrifugiert, um die restliche Glasmilch (Bio 101 Inc., La Jolla, USA) abzutrennen. Der so erhaltene Überstand wurde in ein frisches, steriles Eppendorfgefäß (Eppendorf, Hamburg, D) überführt.

2.3.2.4 Bestimmung der Konzentration und Größe der PCR-Fragmente

Vor der DNA-Sequenzierung mußte die Größe und Konzentration der Probe bestimmt werden. Dies erfolgte über eine weitere Elektrophorese in einem Agarosegel wie oben beschrieben, wobei zusätzlich ein spezieller DNA-Marker (MBI Fermentes, Lituania, Spanien) aufgetragen wurde. Dieser erlaubte eine Einordnung der Probe nach Größe und, über die Intensität der Fluoreszenz der einzelnen Banden unter UV-Licht, auch eine Quantifizierung der DNA-Menge.

2.3.2.5 Sequenzierung und Datenbankvergleich der PCR-Fragmente

Die Sequenzierung erfolgte im Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart mittels eines automatischen Sequenzierers (Modell ABI 373) nach der Didesoxy-Methode nach Sanger (Sanger et al 1977).

Die Auswertung der 16S rDNA Abschnitte erfolgte über das Sequenzvergleichsprogramm PCGENE (IntelliGenetics, Genf, CH). Dieses vergleicht entsprechende Regionen aus den Daten beider Sequenzierungsrichtungen. Sowohl als gesichert geltende Sequenzabschnitte, als auch die vollständige Sequenz, wurden dann gespeichert und konnten mit den Einträgen in frei zugänglichen Sequenzdatenbanken verglichen werden.

Dazu wurde die erhaltene 16S rDNA Basensequenz mit der DNA-Datenbanken FASTA und BLAST (Cook 1999, Altschul et al 1990, Pearson 1990) verglichen und das Ergebnis von dort importiert.

Zur Erstellung des Stammbaumes wurden die Sequenzen der 16S rDNA der über den Datenbankvergleich erhaltenen nahe verwandten Stämme über das Programmpaket ClustalX

(Thompson et al 1997) verglichen, und die hierbei erhaltenen Verwandtschaften der Stämme abgebildet.

2.4 Zellanzucht

Für die Anzucht der Zellen des Stammes *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002 wurden mehrere Medien verwendet, sowohl in Form von Agarplatten als auch von Flüssigmedien. Für das Wachstum in Flüssigmedien wurden Schüttelkolben mit Schikanen und verschiedene Rührreaktoren verwendet.

2.4.1 Kulturführung

2.4.1.2 Medien zur Stammhaltung

Für die Kulturführung auf Agarplatten wurde ein LB-Komplexmedium mit der in Tabelle 2.3 beschriebenen Zusammensetzung verwendet:

Tabelle 2.3: Medium für die Stammhaltung auf Agarplatte

Mediumskomponente	Konzentration	
BactoTrypton, Difco 0123-15-5	10	g/l
Hefeextrakt, Gibco BRL, UK 20047-056	5	g/l
NaCl	10	g/l
Agar	15	g/l

Die Substanzen wurden in 970 ml VE-Wasser gelöst, mit 1 M NaOH auf pH 7.2 eingestellt und dann bis 1l Endvolumen aufgefüllt.

Die Lösungen wurden bei 121 °C und 1 atü Druck für 21 min sterilisiert und unter der Sterilbank in kommerziell erhältliche sterile Plastikpetrischalen gegossen. Nach dem Abkühlen wurden die Platten steril verpackt und bei 4 °C gelagert.

Die Reinkultur wurde regelmäßig alle vier Wochen auf LB-Agarplatten überimpft, für zwei Tage bei 30 °C im Brutraum inkubiert und anschließend bei 4 °C im Kühlraum gelagert.

2.4.1.3 Medien für die Zellvermehrung in Flüssigkultur

Tabelle 2.4: Mediumskomponenten für die Zellvermehrung in Flüssigkultur

Medium 1		Medium 2	
Separat autoklavieren		Separat autoklavieren	
K ₂ HPO ₄	0.5 g/l	Na ₂ HPO ₄	0.5 g/l
KH ₂ PO ₄	0.5 g/l	KH ₂ PO ₄	0.5 g/l
Separat autoklavieren		Sterilfiltriert	
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g/l	Citronensäure	0.2 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0.5 g/l	Fe(III)SO ₄	0.2 g/l
CoCl ₂	10 mg/l	Separat autoklavieren	
Caprolactam	0.5 g/l	(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g/l
Hefeextrakt	3 g/l	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1.1 g/l
SL5 (s. Tab. 2.5)	2 ml/l	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0.05 g/l
Separat autoklavieren		Hefeextrakt	2 g/l
Glucose	2 g/l	SL6 (s. Tab. 2.5)	1 ml/l
Separat autoklavieren		Separat autoklavieren	
Glucose	2 g/l	Glucose	2 g/l

Alle Komponenten außer der Glucoselösung wurden vor der Sterilisation mit NaOH auf pH 7.2 eingestellt.

Tabelle 2.5: Komponenten der Spurenelementlösungen SL5 und SL6

SL5		SL6	
EDTA	2.5 g/l	EDTA	5 g/l
Fe(III)SO ₄	1 g/l	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	1.1 g/l
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0.05 g/l	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0.04 g/l
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0.015 g/l	MnSO ₄ x 1 H ₂ O	6 g/l
H ₃ BO ₃	0.15 g/l	H ₃ BO ₃	0.06 g/l
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0.1 g/l	KJ	0.01 g/l
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0.005 g/l		
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0.01 g/l		
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0.015 g/l		

Die Medien wurden in der oben genannten Reihenfolge angesetzt. Dazu wurden konzentrierte Lösungen hergestellt: 800 ml Salze (zusammen mit der durch Sterilfiltration zugegebenen Eisenlösung), 150 ml Puffer und 50 ml Glucose für insgesamt 1l Lösung, so daß sich nach dem sterilen Zusammengießen dieser Lösungen die oben beschriebenen Konzentrationen ergaben.

Die Eisensalzlösungen des Mediums 2 (siehe Tabelle 2.4b) wurden mit gleichen Gewichtsanteilen (w/w) an Citronensäure hergestellt, wobei die maximale Löslichkeit bei 2 g/l Eisensalz lag. Nach dem Einstellen des pH-Wertes auf pH 7.2 wurden die Lösungen über eine Sterilfiltration mit sterilen 0.2 µm Filtern (Gelman Science, Michigan, USA) zu den restlichen autoklavierten Mediumskomponenten zugegeben.

Die Zellanzucht im Flüssigmedium erfolgte mit den oben beschriebenen Medien, wobei bei den Versuchen zur Aktivitätssteigerung der Mikroorganismen durch Medienoptimierung noch verschiedene Salze zugegeben bzw. besondere Mediumsbedingungen eingestellt wurden. Diese werden jeweils gesondert im Ergebnisteil beschrieben.

2.4.2 Biomasseproduktion im Schüttelkolben

Standardmäßig wurde für die Biomasseproduktion im Erlenmeyerkolben mit Schikanen (Schott, Mainz, D) Kolben mit 250, 500, 1000 oder 5000 ml Füllvolumen verwendet. Die Verwendung von Schüttelkolben wurde insbesondere bei der Optimierung der Kultivierungsbedingungen und zur Herstellung von Vorkulturen für das Animpfen von Rührreaktoren eingesetzt.

Diese wurden mit 20 % des maximalen Füllvolumens des Kolbens des jeweilig verwendeten Mediums ohne Glucose und, bei Medium 1, auch ohne Phosphatpuffer befüllt, bei 121 °C und 1 atü Druck für 21 min sterilisiert und dann unter einer sterilen Werkbank Variolab (Waldner, Wangen, D) mit den übrigen separat sterilisierten Mediumskomponenten befüllt (s. Abschnitt 2.4.1). Die Kolben wurden nach dem Beimpfen bei 30 °C auf einer Rotationsschüttelmaschine (New Brunswick Scientific, Edison, USA) bei 120 Upm für 48 h inkubiert.

Für die Versuche zur Mediumsoptimierung, die Aktivitätstests und die Biofeuchtmassebestimmung wurden die Zellen nach Ende der Kultivierung über Zentrifugation für 20 min bei 5000 Upm und 4 °C in einem Rotor JA-10 mit einer Ultrazentrifuge (Beckmann J2-21 M/E) abgeerntet.

Für die Verwendung der Kultur als Animpfkultur (Inoculum) wurden die Zellsuspensionen steril zu den jeweiligen Medien in den Bioreaktoren zugegeben.

2.4.3 Biomasseproduktion im 100 l Bioreaktor

2.4.3.1 Beschreibung des Bioreaktors

Zur Produktion einer größeren Menge einheitlicher Zellmasse für anschließende Versuche zur Propionitrilhydrolyse, wurde eine Kultivierung im 60 l Maßstab durchgeführt. Der verwendete Stahlbioreaktor (Typ 9230 FLAW IL, Bioengineering, Wald, CH) ist in Abbildung 2.1 skizziert. Die zusätzlich verwendeten Komponenten sind in Tabelle 2.6 dargestellt.

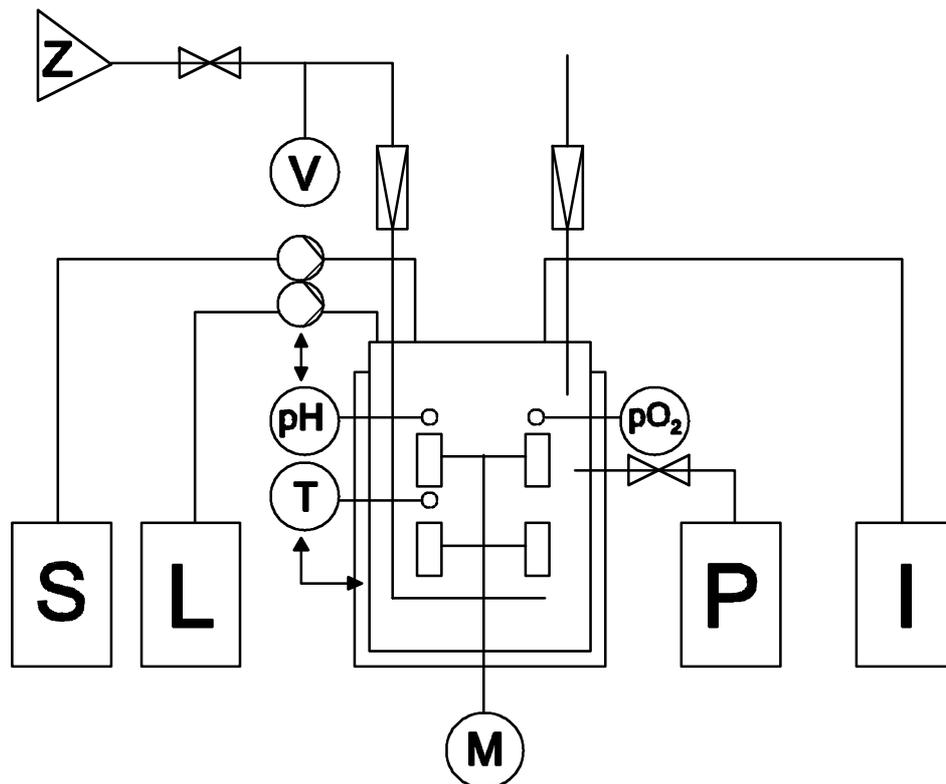


Abbildung 2.1: Skizze des Aufbaus des 100-l-Bioreaktors Typ 9230 FLAW IL
 S Säurevorratsgefäß, L Laugevorratsgefäß, I Inokulum, P Probenentnahme, M Motor,
 Z Zuluft, pH pH-Regelung, pO₂ pO₂-Überwachung, T Temperaturregelung,
 V Überwachung des Volumenstroms der Zuluft

Ausstattung des 100-l-Bioreaktors:

- PID-Temperaturregler
- Sterilisierbare, drucküberlagerte pH-Calumelektrode, Steuerung der Säure- und Laugezudosage über einen pH-Regler
- Luftzufuhr
- Druckregelung
- Sterilisierbares Handprobenentnahmeventil
- Doppelter Sechs-Blatt-Scheibenrührer
- Abgasanalyse
- Gewichtüberwachung durch Wiegen der gesamten Apparatur

Zur Vorbereitung der Kultivierung wurden die pO_2 - und die pH-Meßeinheit kalibriert. Die Waage, auf welcher der Bioreaktor stand, wurde tariert. Dann wurde der gesamte Bioreaktor zusammen mit 57 l vorgelegtem Phosphatpuffer (s. Abschnitt 2.4.1.3 Medium 1) für 21 min bei 121 °C und 2 bar sterilisiert. Zur pH-Regelung wurden je 3 l 10 % (w/v) NaOH- und 10 % (w/v) Phosphorsäurelösungen hergestellt und in den Vorratsgefäßen sterilisiert. Nach dem Abkühlen wurde die 500 ml konzentrierte Glucoselösung, 2,5 l konzentrierte Salz- und Hefeextraktlösung, Antischaum (Ucolub N115, Fragol Schmiermittelindustrie GmbH, Mühlheim/Ruhr, D) und zuletzt das Inoculum steril dem Reaktor zugegeben. Die Probenentnahme erfolgte über ein dampfsterilisierbares Druckventil. Der Inhalt des Bioreaktors wurde nach der Anzucht durch einen Hahn am Boden des Bioreaktors abgelassen und in die Zellabtrennung überführt.

Für die Zellanzucht wurden die in Tabelle 2.6 dargestellten Bedingungen und Parameter eingestellt:

Tabelle 2.6: Anzuchtbedingungen für die Kultivierung im 100-l-Bioreaktor Typ 9230 FLAW IL

Parameter	
Belüftungsrate	10 NI/min
Drehzahl	150 Upm
Temperatur	30 °C
pH _{Soll}	7.2
pH	0.5

Einstellung des pH mit 10 % (w/v) NaOH (steril in drucküberlagertem Vorratsgefäß)
 10 % (v/v) H₃PO₄ (steril in drucküberlagertem Vorratsgefäß)

2.4.3.2 Durchführung der Kultivierung

Es wurde eine Anzucht in drei Stufen durchgeführt. Die Vorkultur 1 wurde in fünf separaten 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen (s. Abschnitt 2.4.2, Medium 1) von einer Agarplatte (s. Abschnitt 2.4.1.2) mit einer Impföse in ein Volumen von 50 ml angeimpft und 48 h bei 30 °C auf einem Schüttler inkubiert (s. Abschnitt 2.4.2). Mit diesen Vorkulturen wurden dann jeweils fünf sterile 5000 ml Erlenmeyerkolben mit einem Inhalt von je 1 l (s. Abschnitt 2.4.2, Medium 1) beimpft. Vor der Zugabe des Inokulums zur Kulturbrühe im Bioreaktor wurde eine Nullprobe aus dem Reaktor genommen und dann die 5l Inoculum in den Reaktor eingefüllt, so daß insgesamt 64.6 l Kulturflüssigkeit im Reaktor vorlagen.

Nach 27.5 h Prozeßzeit wurden 1 l mit einer Konzentration von 173 g/l Hefeextrakt und 115 g/l Ammoniumsulfat zugegeben. Zu diesem Zeitpunkt waren durch Probennahmen 7.9 l aus dem Bioreaktor entnommen worden. Nach 38.5 h Prozeßzeit wurden 5 l Konzentrat zugegeben, bestehend aus 90.3 g/l Hefeextrakt und 60.2 g/l Ammoniumsulfat.

Über die Kultivierungszeit wurden in regelmäßigen Abständen sterile Proben entnommen und davon die optische Dichte (s. Abschnitt 2.5.1) und die Biotrockenmassekonzentration (s. Abschnitt 2.5.2), der pH-Wert und zusätzlich der Glucose- und Ammoniumkonzentration bestimmt (s. Abschnitt 2.5.5 und 2.5.6).

Des Weiteren wurde über eine Meßsonde der Sauerstoffpartialdruck pO_2 des Mediums im Bioreaktor gemessen. Die Abgasanalyse lieferte kontinuierlich die Meßwerte für den prozentualen Volumengehalt an Sauerstoff YO_2 und Kohlendioxid YCO_2 in der Fermenterabluft. Diese wurden bei jeder Probennahme abgelesen und protokolliert.

Nach 54 h wurde die Kultivierung nach dem Erreichen der stationären Wachstumsphase der Zellen beendet. Der Inhalt des Bioreaktors wurde abgelassen und die Biofeuchtmasse daraus mit einer kontinuierlichen Cepa-Schnellzentrifuge (Typ GLE, Firma Carl Padberg, Lahr, D) unter den in Tabelle 2.8 beschriebenen Bedingungen gewonnen.

Tabelle 2.7: Zentrifugationsbedingungen

Parameter	
Trommeldurchmesser	44 mm
Drehzahl	33750 Upm
Durchflußrate	250 ml/min

Die so erhaltene Biofeuchtmasse wurde zu je 100 g portioniert und bei 4 °C zur sofortigen Verwendung gelagert bzw. bei -20 °C eingefroren.

2.4.4 Lagerung der erhaltenen Zellen

Größere Mengen an abzentrifugierter Biofeuchtmasse, die über längere Zeit gelagert werden sollten, wurden bei -20 °C eingefroren. Dazu wurden diese in Portionen zu je etwa 100 g in handelsübliche Gefrierbeutel abgefüllt, welche dann unter leichtem Vakuum mit einem Folienschweißgerät verschlossen wurden. Die Biofeuchtmasse hatte dabei eine pastöse Konsistenz ähnlich wie Preßhefe.

2.5 Analytik

2.5.1 Bestimmung der optischen Dichte

Die optische Dichte (OD) von Zellsuspensionen wurde in 1 ml Plastikkuvetten mit einem Spektralphotometer (Typ Ultrospec III, Firma Amersham Pharmacia, Uppsala, S) bei 595 nm gegen Luft gemessen. Um eine lineare Korrelation der OD mit der Zelldichte der Lösung zu gewährleisten, wurde die Suspension so mit NaCl 0.9 % verdünnt, daß die OD bei einem Wert < 0.6 lag. Als Referenzprobe wurde die Absorption der 0.9 % NaCl-Lösung ohne Zellen gemessen. Die OD berechnete sich dann aus der Differenz der Absorption der Probe und der Referenzprobe mal dem Verdünnungsfaktor.

2.5.2 Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration

Zur Bestimmung der Biotrockenmassenkonzentration wurde ein definiertes Volumen, jedoch mindestens 10 ml der untersuchten Zellsuspension über einen zuvor getrockneten und auf einer Feinwaage (Mettler-Toledo, Greifensee, CH) gewogenen Membranfilter (Gelman Sciences, Michigan, USA) mit einer Porenweite von $0.2 \mu\text{m}$ und einem Durchmesser von 45 mm durch Anlegen eines Vakuums abgefiltert und der Filter anschließend 4 h bei $100 \text{ }^\circ\text{C}$ im Trockenschrank getrocknet. Dann wurde der Membranfilter erneut gewogen und die Gewichts Differenz bestimmt. Es wurden immer Doppelbestimmungen durchgeführt. Aus der Gewichts Differenz und dem Volumen der filtrierten Menge Zellsuspension wurde dann die Biotrockenmassekonzentration pro ml Medium berechnet.

2.5.3 Bestimmung der Biofeuchtmassenkonzentration und der Zellkonzentration

Die Biofeuchtmassenkonzentration der Zellen in einer Suspension wurde durch die Zentrifugation der Zellsuspension und das Auswiegen des erhaltenen Pellets bestimmt. Dazu wurde der trockene Zentrifugenbecher gewogen, die Zellsuspension zugegeben und wiederum gewogen. Nach Zentrifugation für 20 min bei 5000 Upm in einer Beckmann Ultrazentrifuge (Beckmann, Marca, UK) mit einem Rotor JA-10 bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde der Überstand sorgfältig entfernt und der Becher mit Pellet ausgewogen. Die Biofeuchtmassenkonzentration ergab sich aus der Differenz des Gewichtes des leeren Bechers und des Bechers mit Pellet bezogen auf die Menge eingesetzter Zellsuspension.

Um die Anzahl der Zellen pro Volumeneinheit Flüssigkeit zu bestimmen, wurden die Zellen einer Zellsuspension mit bekannter Biofeuchtmasse unter Verwendung eines speziellen Objektträgers unter einem Mikroskop ausgezählt. Dazu wurde eine 0.2%ige Zellsuspension mit einer 1%igen Formaldehydlösung 1:10 verdünnt, um die Zellen abzutöten und zum Absinken auf die Oberfläche des Objektträgers zu bringen. Dieser Objektträger, eine sogenannte Helber-Kammer, besitzt eine Graduierung auf der Oberfläche in vier große Quadrate, bestehend aus 16 kleineren Quadraten, in

denen die Zellen zum Liegen kommen. Durch das Auszählen der Zellen in dem großen Quadrat und dem bekannten Abstand zwischen dem Quadrat auf dem Objektträger und dem Deckglas (= Volumen der Flüssigkeit) kann dann die Zellkonzentration bestimmt werden. Diese berechnet sich nach der Gleichung 2.1.

Gleichung 2.1: Berechnung der Zellkonzentration

$$N = \frac{\left[\frac{\text{Zellen}}{\text{Großquadrat}} \right]}{4} \times 5 \times 10^6 \times \text{VF}$$

N = Zellkonzentration [Zellen/ml]

VF = Verdünnungsfaktor für die untersuchte Zellsuspension

2.5.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Proteinbestimmung nach der Färbemethode von Bradford (Bradford 1976) wurde eine konzentrierte Farblösung (Firma Laboratories GmbH, München, D) verwendet. Für den Assay wurde die Stammlösung 1:5 (v/v) entsprechend der Vorschrift des Herstellers verdünnt. Davon wurden 2.5 ml zu 50 µl Probe gegeben und der Ansatz nach kurzem Homogenisieren für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktionsmessung der Lösung erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem Spektralphotometer (s. Abschnitt 2.5.1). Es wurde eine Kalibrierung mit Rinderserumalbumin im Bereich von 0.05 - 0.3 g/l erstellt. Als Referenz wurde anstatt der Proteinprobe reiner Probenpuffer zum Reaktionsansatz gegeben. Wenn die Konzentration der Probe höher als 0.3 g/l lag, wurde sie mit dem Probenpuffer zuvor entsprechend verdünnt. Bei jeder neuen Meßreihe wurden drei Referenzpunkte aus Rinderserumalbuminlösungen von 0.1, 0.2 und 0.3 mg/ml mitgemessen, da die angesetzten Verdünnungen der Bio-Rad Stammlösungen (Bio-Rad Laboratories, München, D) mit der Zeit alterten. Dies war vermutlich auf die Ausfällung des Farbstoffs Coomassie blue in der Färbelösung zurückzuführen. Die Lagerzeit derselben sollte bei 4 °C nicht länger als eine Woche betragen.

2.5.5 Bestimmung der Glucosekonzentration

Die Konzentration der Glucose im Medium wurde mit dem Testkit Granutest 250 (Firma Merck-Diagnostiks, Darmstadt, D) bestimmt. Dieser beruht auf den Arbeiten von Stouthamer (Stouthamer 1979), bei dem die D-Glucose durch eine Glucosedehydrogenase zu Glucolakton oxidiert wird. Dabei wird NAD^+ zu NADH_2 reduziert. Die Reaktionslösung für die Messung der Glucosekonzentration wurde entsprechend den Händlerinformationen hergestellt. Die Extinktionsänderung wurde mit dem unter 2.5.1 angegebenen Spektralphotometer in einer 1 ml Plastikkuvette gemessen. Dazu wurde in der Küvette 1 ml mit 100 µl Probe gemischt, die Extinktion gemessen und die Lösung für 8 - 30 min bei 37 °C inkubiert. Dann wurde die Extinktion wiederum gemessen und die Differenz der Werte bestimmt. Als Referenz wurde anstatt der Probe 100 µl VE-Wasser eingesetzt.

Eine lineare Extinktionszunahme bei 340 nm war in einem Meßbereich zwischen 20 und 200 mg/l Glucose zu beobachten.

Der Glucosegehalt berechnet sich entsprechend der Gleichung 2.2.

Gleichung 2.2: Berechnung der Glucosekonzentration in einer verdünnten Lösung

$$\text{Glucose [g/l]} = E_{\text{Probe}} - E_{\text{Referenz}} \times \frac{V \times F \times MG}{\epsilon \times d \times v}$$

- E: Extinktion bei 340 nm
 V: Gesamtvolumen (1.1 ml)
 F: Verdünnungsfaktor
 MG: Molekulargewicht von Glucose (180 g/mol)
 d: Schichtdicke der Küvette (1 cm)
 v: Probevolumen (100 µl)
 ε: molarer Extinktionskoeffizient (6320 M⁻¹cm⁻¹)

2.5.6 Bestimmung des Ammoniumgehalts in Lösung

Zur Bestimmung des Ammoniumgehaltes im Medium wurde der Ammoniumtest nach Fawcett (Fawcett & Scott 1960) durchgeführt. Dazu wurden die in Tabelle 2.8 beschriebenen Lösungen angesetzt.

Tabelle 2.8: Lösungen zur Bestimmung der Ammoniumkonzentration

Lösung 1		Lösung 2	
Phenol	4.99 g	NaOH	5 g
Na ₂ [Fe(CN ₃)NO] x 2 H ₂ O	0.0253 g	Hypochlorid	0.4 g
H ₂ O	500 ml	H ₂ O	1000 ml

Für den Test wurden in einem mit einem Stopfen verschließbaren Reagenzglas 0.1 ml Probe mit 2.5 ml Lösung 1 gemischt. Die Probe war dabei so verdünnt, daß die enthaltene Ammoniumkonzentration im Bereich zwischen 0 mg/l und 300 mg/l lag. Nach Zugabe von 2.5 ml Lösung 2 wurden die Testansätze bei 37 °C für 15 min im Schüttelwasserbad inkubiert und anschließend 15 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Die Extinktionsmessung erfolgte bei 546 nm in einem Spektralphotometer (s. Abschnitt 2.5.1). Als Referenz wurde statt der Probe 0.1 ml VE-Wasser eingesetzt.

Für eine Kalibrierung wurden fünf Proben mit bekanntem Ammoniumsulfatgehalt auf die oben beschriebene Weise behandelt. Die Konzentration berechnete sich dann aus der Extinktionsdifferenz der Probe in Korrelation mit der Ammoniumkonzentration aus der erstellten Eichkurve.

2.5.7 Analytik der Substrate und Produkte der Nitrilverseifung

Mit der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) wurde quantitativ die Konzentration an Propionitril, Propionsäureamid und Propionsäure in Proben aus den Aktivitätstests bestimmt (Gabriel et al 1996), (Moreau et al 1994). In Tabelle 2.9 werden die technischen Parameter und Analysebedingungen dargestellt.

Tabelle 2.9: Komponenten der HPLC-Anlage zur quantitativen Bestimmung der Substrat- und Produktkonzentrationen

Komponenten	
Isokratische Pumpe	Hewlett Packard Series 1050
Säule	Aminex HPX-87 H (BioRad, München, D)
Brechungsindex-Detektor	RI Detector ERC-7512 (Erma, Tokyo, J)
Integrator	Chrom Jet integrator (Spectra Physics, Darmstadt, D)
Fließrate	0.72 ml/min
Laufmittel	5 mM Schwefelsäure
Probevolumen	50 µl
Säulentemperatur	50 °C
Druck	29 bar

Die Kalibrierung des Gerätes erfolgte durch Doppelbestimmung mit Propionitril, Propionsäureamid und Propionsäure mit Konzentrationen von 1, 5, 10, 50 und 100 mM in VE-Wasser. Die Nachweisgrenze lag jeweils bei 1 mM, der Gerätefehler betrug 3.8 %. Die Analysebedingungen waren so optimiert, daß auf einem Chromatogramm zwei Proben ausgewertet werden konnten. Dazu wurden zwei Proben im Abstand von 2 min eingespritzt. Es ergaben sich dann die in Tabelle 2.10 beschriebenen Retentionszeiten. In Abbildung 2.3 ist ein typisches HPLC-Chromatogramm für die Trennung der an der Propionitrilverseifung beteiligten Substanzen dargestellt.

Tabelle 2.10: Retentionszeiten der analysierten Substanzen

Substanz	Retentionszeit [min]
Propionitril	12.06 und 14.12
Propionsäureamid	26.8 und 29.90
Propionsäure	8.20 und 10.26

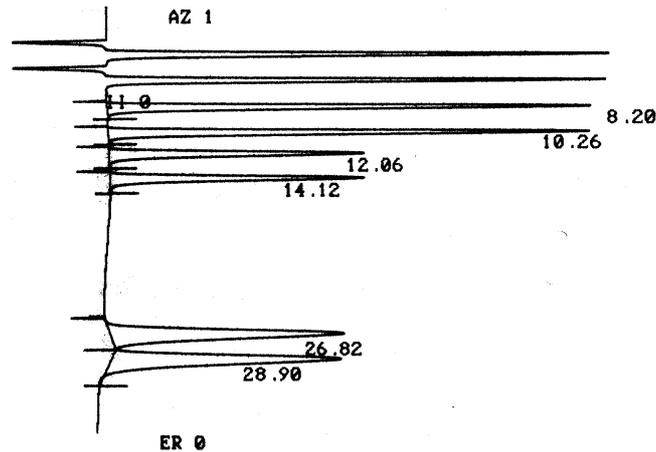


Abbildung 2.2: HPLC-Chromatogramm zur Bestimmung der Konzentration an Propionitril, Propionsäureamid und Propionsäure unter den in Tabelle 2.9 beschriebenen Bedingungen bei einer jeweiligen Stoffkonzentration von 100 mM der Substanzen.

2.5.8 Aktivitätstest mit ganzen Zellen (quantitativ)

2.5.8.1 Puffersysteme

Es wurden für die Umsetzung mit ruhenden Zellen die in Tabelle 2.11 beschriebenen Puffersysteme verwendet. Reaktionspuffer 1 wurde durch Mischen der beiden 50 mM Stammlösungen bis zum Erreichen des gewünschten pH-Wertes hergestellt.

Reaktionspuffer 2 und 3 wurde durch Titration mit NaOH auf den gewünschten pH-Wert eingestellt.

Tabelle 2.11: Puffersysteme für Ruhezellumsätze

System	
Reaktionspuffer 1	
Na ₂ HPO ₄	50 mM
NaH ₂ PO ₄	50 mM
pH	7.2
Reaktionspuffer 2	
TRIS/HCl	50 mM
pH	7.2
Reaktionspuffer 3	Reaktionspuffer 2 mit 0.5 g/l CaCl ₂

2.5.8.2 Standardaktivitätstest mit freien, ruhenden Zellen

Der Standardaktivitätstest mit freien, ruhenden Zellen wurde wie folgt durchgeführt:

In einem 50 ml Glasreaktor (EHS, Bovenden, D) wurden zu 25 ml Reaktionspuffer 1 eine Spatelspitze Zellmasse gegeben und diese durch Rühren mit einem Rührkern auf einem Magnetrührer suspendiert. Der Reaktor wurde über einen beheizbaren Mantel temperiert, wobei die Temperatur mit einem Wasserbad konstant auf 26 °C eingestellt war. Die Reaktion wurde nach Entnahme einer Probe ohne Substrat mit einem Volumen von 1 ml durch Zugabe von 169 µl reinem Propionitril gestartet. Die Anfangskonzentration von Propionitril im Aktivitätstest betrug somit 100 mM. Nach definierten Zeitpunkten von 0, 1, 3, 5, 15, 30 und 60 Minuten wurde mit einer Spritze über einen 0.2 µm Filter (Gelman Science, Michigan, USA), Durchmesser 25 mm, jeweils 1 ml Probe gezogen und durch die dabei erfolgte Abtrennung der Zellen die Reaktion abgestoppt. Die Proben wurden anschließend in HPLC-Gläschen überführt und die Konzentrationen von Substrat und Produkt mittels HPLC bestimmt (s. Abschnitt 2.5.7). Von der restlichen verbliebenen Zellsuspension im Reaktor nach Beendigung des Versuches, wurde die Biotrockenmasse, wie unter 2.5.2 beschrieben, bestimmt.

Für die Einzelbestimmung der Aktivität der Nitrilhydratase wurden Proben nach 0, 1, 3, 5 und 10 min genommen.

Experimente zur Einzelbestimmung der Aktivität der Amidase wurden ebenfalls wie oben beschrieben durchgeführt, jedoch mit der Änderung, daß als Substrat 312 µl einer 8 M Stammlösung von Propionamid in VE-Wasser eingesetzt wurden. Es wurde wieder entsprechend weniger Volumen an Zellsuspension eingesetzt, um nach der Zugabe von Substrat ein Gesamtvolumen von 25 ml im Reaktor zu erhalten. Die Probennahme erfolgte nach 0, 1, 15, 30, 45 und 60 min.

2.5.8.3 Standardaktivitätstest mit immobilisierten Zellen

Für die Bestimmung der Aktivitäten von immobilisierten Zellen wurden in einem mit 5 ml Reaktionspuffer 3 gefüllten 25 ml Standzylinder volumetrisch 2 ml des abgetropften Immobilisats eingemessen und mit Reaktionspuffer 3 auf 25 ml aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte wie im Standardtest mit freien Zellen, allerdings erfolgte die Probennahme durch Abpipettieren von 1 ml der Suspension inklusive den Immobilisatperlen und anschließendem filtrieren. Dadurch wurde ein Anreichern des Immobilisates in der Reaktionslösung verhindert.

2.5.9 Auswertung des Standardaktivitätstests

Die Aktivitäten der Zellen wurden immer auf die eingesetzte Biotrockenmasse im Reaktor bezogen. Dazu wurde bei immobilisierten Zellen die Biotrockenmasse über die verwendete Biofeuchtmasse zur Herstellung des Immobilisates und das eingesetzte Volumen an Immobilisat abgeschätzt. Der Umrechnungsfaktor (UF) von Biofeuchtmasse zu Biotrockenmasse wurde zu $UF = 4.5$ bestimmt. Um die Aktivitäten der Enzyme zu bestimmen, wurden aus den Meßpunkten durch Anlegen von Tangenten und Berechnung der jeweiligen Steigung über eine lineare Regression die Anfangsreaktionsraten der jeweiligen Produktbildung bestimmt. Dies erfolgte wie in Abbildung 2.3 dargestellt:

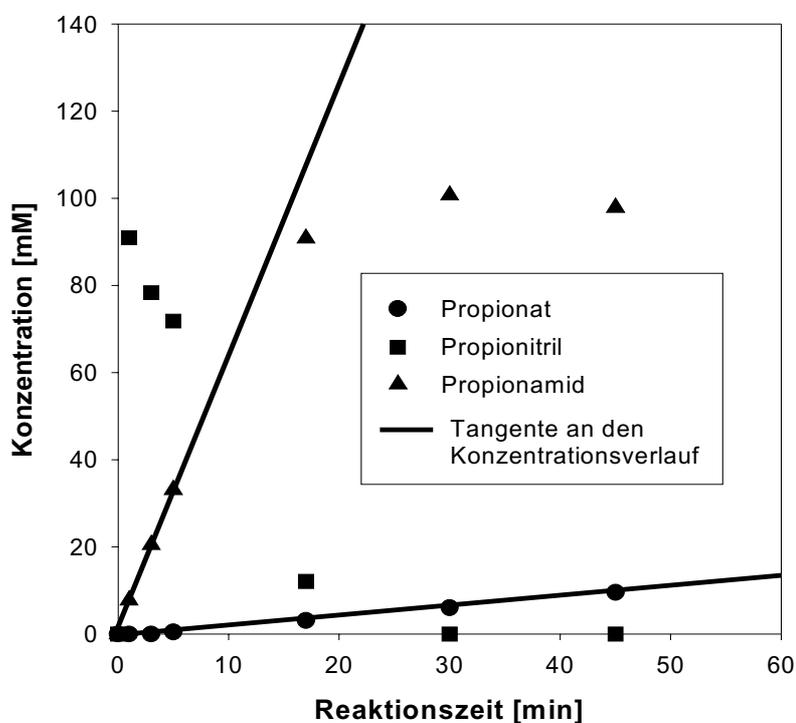


Abbildung 2.3: Bestimmung der spezifischen Anfangsreaktionsrate der Enzymreaktionen durch das Anlegen einer Tangente durch den Ursprung an die gemessenen Konzentrations-Zeit-Verläufe. Die beobachtbare Aktivität berechnete sich aus der Steigung der Tangenten über eine lineare Regression und der Biotrockenmasse in dem untersuchten Ansatz.

Die Aktivität wurde als spezifische Aktivität bezogen auf die im Ansatz verwendete Biotrockenmassekonzentration in U/g BTM angegeben. Die Berechnung erfolgte durch Messung der Entstehung an Produkt zum Zeitpunkt des Reaktionsstarts. Die spezifische Aktivität berechnet sich dann entsprechend der Gleichung 2.3:

Gleichung 2.3: Berechnung der spezifischen Aktivität

$$r^* = \frac{\text{Konzentration [mM]}}{\text{Zeit [min]}} \times 1000 \times \frac{1}{\text{BTM} \left[\frac{\text{g}}{\text{l}} \right]} = \left[\frac{\text{U}}{\text{gBTM}} \right]$$

r^* = spezifische Anfangsreaktionsrate [U/g BTM]
 Konzentration/Zeit = Steigung der Tangenten an die Meßpunkte [mM/min]
 BTM = Biotrockenmassekonzentration im Ansatz [g/l]

2.5.10 SDS-Gelelektrophorese

2.5.10.1 Zellaufschluß

- Prinzip

Beim Aufschluß mit einer Retschmühle werden die Zellen aufgrund der hohen Anpreßkräfte zwischen Mikroorganismen und Mahlkörpern (Glasperlen) aufgeschlossen. Dabei sind die Scherkräfte von untergeordneter Bedeutung. Der Aufschluß wird beeinflusst durch die Korngröße des Mahlgutes, die Schüttelfrequenz und die Zellkonzentration (Schütte & Kula 1986, Muschelknauz 1991).

- Durchführung

Um die Zellen des gram⁺ Mikroorganismus *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002 aufzuschließen wurde eine Retschmühle (F. Kurt Retsch GmbH & Co KG, Haan, D) eingesetzt (Schütte 1986). Diese Schwingarm-Kugelmühle hat zwei Metallbehälter, die je ein Volumen von 10 ml fassen. Der Aufschluß wurde, wenn nicht anders angegeben, bei 4 °C im Kühlraum unter den in Tabelle 2.12 beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 2.12: Parameter bei der Durchführung der Zellaufschlüsse mit der Retschmühle unter Variation des Aufschlußpuffers

Parameter	
Mahlkörper	8 ml bleifreie Glasperlen (Firma Dragon, Bayreuth, D) Ø 0,3 mm
Volumen der Zellsuspension	5 ml
Konzentration der Zellsuspension	30 % (w/v)
Schüttelfrequenz	100 Hz
Aufschlußpuffer	Reaktionspuffer 1

Vor dem Aufschluß wurde eine Nullprobe aus der Kammer entnommen (ca. 0.2 ml) und deren Proteingehalt bestimmt (s. Abschnitt 2.5.4). Nach einer Aufschlußzeit von 10 min wurde der Kammerinhalt entnommen. Die Zellrümpfer wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 14000 Upm mit einer gekühlten Eppendorf-Tischzentrifuge abgetrennt. Der Überstand von ca. 400 µl wurde zur weiteren Proteinbestimmung verwendet .

2.5.10.2 SDS-Gelelektrophorese

Zur Trennung von Proteinen im Polyacrylamidgel wird einerseits der Siebeffekt des Gels, zum anderen die Ladung der Proteine ausgenutzt (Laemmli 1970). Damit die elektrophoretische Trennung allein von der Größe des Moleküls abhängt, muß die individuelle Ladung der Proteine ausgeschaltet werden. Dies wurde durch die Verwendung des Detergens SDS erreicht, welches die Nativstruktur von Proteinen zerbricht und diese zu einer frei beweglichen Kette entfaltet, sowie durch Anlagerung an hydrophobe Bereiche des Proteins dieses mit negativen Ladungen belädt. Um störende Disulfidbrücken zu reduzieren, wurde das Protein zusätzlich noch mit im Probenpuffer vorliegendem Mercaptoethanol inkubiert. Für die Molekulargewichtsbestimmung wurde die relative Beweglichkeit von Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht in Bezug auf einen internen Standard verglichen.

2.5.10.3 Durchführung

Das Gel bestand aus einem ca 4.5 cm Trenngel und einem ca 1.5 cm langen Sammelgelabschnitt. Die Zusammensetzung wurde in Tabelle 2.13 genauer beschrieben.

Zunächst wurden die Komponenten des jeweiligen Gels ohne APS und TEMED zusammengegeben, vorsichtig gemischt und 5 min im Ultraschallbad entgast. Die Polymerisation wurde dann für das Trenngel mit Zugabe von TEMED und APS gestartet und die Lösung dann zügig zwischen die zuvor mit Ethanol gereinigten und abgedichteten Platten gefüllt. Um eine gerade Abschlußfront zu erhalten, wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet. Nach ungefähr 30 min wurde der

Tabelle 2.13: Pipettierschema zum Erstellen von zwei 12 % SDS-Gelen

REAGENZ	TRENNGEL (12.5 %)	SAMMELGEL (3 %)
Acrylamid/Bisacrylamid Stammlösung (30 %:0.8 %)	8 ml	660 µl
Tris-HCl, 1.88 M, pH 8.8	5 ml	-----
Tris-HCl, 0.625 M, pH 6.8	-----	800 µl
H ₂ O _{bid}	6.7 ml	2.5 ml
SDS (10 %)	200 µl	40 µl
APS (10 %), frisch	100 µl	20 µl
TEMED	10 µl	8 µl

Isopropanolüberstand verworfen und das Sammelgel über das Trenngel gegossen. Gleich nach dem Einfüllen wurde der Probenkamm eingedrückt und mindestens 30 min gewartet bis das Gel auspolymerisiert war.

2.5.10.4 Proteinauftrennung

Nachdem das Dichtgummi entfernt wurde, wurde das auspolymerisierte Gel in die Fertigapparatur (Firma Biometra, Göttingen, D) eingesetzt und mit Klammern befestigt. Das zuvor 1:10 mit H₂O_{bid} verdünnte Fertiglaufmittelkonzentrat (Tris/Glycin/SDS, Firma BioRad, München, D) wurde in die obere und untere Laufmittelkammer eingefüllt und der Kamm aus dem Sammelgel genommen.

Um einen ungestörten und gleichmäßigen Lauf zu erhalten, wurden mit einer Spritze die Luftblasen unter dem Gel zwischen den beiden Glasplatten entfernt.

2.5.10.5 Probenvorbereitung

Bei der Silberfärbung der Proteine im Gel wurde die Probe auf eine Proteinkonzentration von 0.1 g/l gebracht. Die Probe wurde dann im Verhältnis 10 µl:20 µl (v/v) mit Probenpuffer verdünnt und 5 min bei 95 °C im Thermomixer inkubiert. Die Zusammensetzung des Probenpuffers ist aus Tabelle 2.14 zu entnehmen.

Tabelle 2.14: Zusammensetzung des Probenpuffers für die SDS-Gelelektrophorese

Komponente	Konzentration
Tris-HCl, pH 6.8	0.125 M
Glycerin	20 % (v/v)
SDS	4 % (v/v)
Mercaptoethanol	10 % (w/v)
Bromphenolblau	0.05 % (w/v)

Pro Tasche wurden nun ca. 15 µl Probe aufgetragen, vom Größenstandard wurden 5 µl aufgetragen. Die Apparatur wurde dann an die Spannungsversorgung Standard Power Pack (Biometra, Göttingen, D) angeschlossen. Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur und einer Spannung von 40 V durchgeführt, bis die Bromphenolblaubande die Grenze zwischen Sammelgel und Trenngel erreicht hatte. Dann wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Sobald die Bromphenolblaubande das untere Ende des Gels erreicht hatte, wurde der Lauf abgebrochen.

Als Größenstandard wurde der Proteinmarker ProSieve (FMC BioProdukts, Rockland, USA) verwendet. Der Marker enthielt Proteine der Größen 5, 10, 15, 25, 35, 50, 75, 100, 150 und 225 kDa. Das Protein der Größe 50 kDa lag mit 100 µg in der doppelten Proteinmenge der übrigen Proteine vor.

2.5.10.6 Silberfärbung (BioRad Silver Stain Fertigtest):

Für die Silberfärbung wurden die Fertiglösungen (BioRad, München, D) nach Vorschrift verdünnt, wobei der Test sehr sensitiv auf Verunreinigungen des Wassers mit Ionen reagierte, so daß alle Lösungen mit Nanoporwasser angesetzt und dann bei 4 °C gelagert wurden.

Das Gel wurde 30 min in einem 40 % Methanol- und 10 % Essigsäure-Gemisch fixiert und dann für 5 min in Oxidationslösung inkubiert. Um die restliche Oxidationslösung zu entfernen, wurde nun das Gel über einen Zeitraum von maximal 15 min immer wieder mit 200 ml bidestilliertem Wasser gewaschen und anschließend für 20 min in Silberreagenzlösung inkubiert. Das Gel wurde nun kurz mit bidestilliertem Wasser gespült und dann solange in Entwickler inkubiert, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar wurden. Die Reaktion wurde mit 7%iger Essigsäure gestoppt. Zur Lagerung wurde das Gel blasenfrei zwischen zwei Lagen Cellophan (Model 583 Gel dryer, BioRad, München, D) gelegt, über einen Rahmen gespannt und bei Raumtemperatur getrocknet.

Nach Trocknung des Gels über Nacht wurde dieses eingescannt und mit dem Programm imagemaster (Amersham Pharmacia, Uppsala, S) ausgewertet.

2.5.10.7 Auswertung des Proteingeles

Für die Auswertung des Proteingeles wurde dieses über einen Scanner im tif-Format digitalisiert und die Datei über das Programm imagemaster (Amersham Pharmacia, Uppsala, S) ausgewertet. Dabei wurde die Helligkeitsverteilung jeder Bande integriert und über die bekannte Konzentration der Markerproteine in die entsprechenden Konzentrationen umgerechnet. Somit konnten die Konzentrationen der untersuchten Enzyme in der Probe bestimmt werden. Zudem konnte auch das Molekulargewicht der Banden durch die Kalibrierung mit dem verwendeten Marker genau berechnet werden.

2.6 Biochemische Charakterisierung

2.6.1 Bestimmung des Temperaturoptimums

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums der beiden Enzymreaktionen wurde der Standardaktivitätstest folgendermaßen abgewandelt:

Das Wasserbad wurde auf die entsprechende Temperatur eingestellt und der Reaktionspuffer 2 bis zur Einstellung einer konstanten Temperatur im Glasreaktor gerührt. Dabei wurde in Abständen von 5 °C zwischen 10 °C und 40 °C die Aktivität des jeweilig untersuchten Enzymes gemessen. Nach Zugabe der Zellen wurden diese 5 min im vortemperierten Puffer unter Rühren inkubiert, und dann die Reaktion durch Substratzugabe gestartet. Es wurden für beide Enzyme einzeln die Temperaturoptima bestimmt.

2.6.2 Bestimmung des pH-Optimums

Für die Bestimmung des pH-Optimums wurde der Standardaktivitätstest (s. Abschnitt 2.5.8) wie folgt abgeändert:

Reaktionspuffer 2 wurde jeweils im Abstand von 0.5 pH-Einheiten auf pH-Werte zwischen 6 und 10.5 eingestellt. Nach Zellzugabe wurden diese für 5 min in dem entsprechenden Puffer vorinkubiert und dann die Reaktion durch Zugabe von Substrat gestartet. Es wurden für beide Enzyme einzeln die pH-Optima bestimmt.

2.6.3 Untersuchung der Lagerstabilität

Zur Untersuchung der Lagerstabilität wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt.

Für den ersten Ansatz wurde 0.5 l homogene Zellsuspension in Reaktionspuffer 1 hergestellt und im Standardtest (s. Abschnitt 2.5.8) die spezifische Aktivität der Suspension bestimmt. Dann wurden 4 Fraktionen mit je 150 ml hergestellt, die dann bei 6 °C, 11 °C, 16 °C und bei Raumtemperatur (23 °C) in einem geschlossenen Gefäß gelagert wurden.

Nach 0, 1, 2, 5, 8, 11 und 14 Tagen wurden Proben entnommen und mittels des Standardaktivitätstests die spezifische Aktivität der Nitrilhydratase und der Amidase gemessen.

Für den zweiten Ansatz wurden Zellen in 100 ml Reaktionspuffer 2 bei pH 7.2 und parallel in 100 ml Reaktionspuffer 2 bei pH 9 suspendiert und in einem geschlossenen Gefäß bei Raumtemperatur (23 °C) gelagert. Es wurden nach 0, 1, 2 und 5 Tagen Proben entnommen und die spezifische Aktivität mittels des Standardaktivitätstests (s. Abschnitt 2.5.8) bestimmt. Aus der Auftragung der spezifischen Aktivität gegen die Lagerungszeit wurde über einen empirischen Ansatz (Dellweg 1987) unter Annahme einer exponentiellen Inaktivierung die Geschwindigkeitskonstante k [s^{-1}] der Inaktivierung für die jeweilige Temperatur bestimmt.

2.6.4 Umsetzung von Propionitril im Zweiphasensystem

2.6.4.1 Theorie

Das Substrat Propionitril bildet ab einer Konzentration von 1.5 M im wässrigen Ansatz eine zweite organische Phase. Da die Produkte der Reaktion wesentlich besser löslich sind, wurden Versuche im 2-Phasensystem durchgeführt, wobei das nicht gelöste Nitril sich nachlösen und verseift werden sollte. Die Ansätze wurden im diskontinuierlich betriebenen Rührreaktor (s. Abschnitt 2.5.8) durchgeführt, wobei das Nitril als Reinstoff in der gewünschten Menge zugegeben wurde.

2.6.4.2 Umsetzung mit freien Zellen

Der Standardansatz (s. Abschnitt 2.5.8) wurde so abgewandelt, daß 10 g/l BTM im Reaktor vorlagen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 ml reinem Propionitril gestartet und wie beschrieben (s. Abschnitt 2.5.8) die Proben entnommen. Zudem wurden nach 120 min und 24 h jeweils eine Probe entnommen.

2.6.4.3 Umsetzung mit lyophilisierten Zellen

Die Versuche zum Einsatz von lyophilisierten Zellen im Zweiphasensystem erfolgten in 1 ml Eppendorfreaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg, D). Es wurden die entsprechenden Propionitril/Wasser-Gemische hergestellt und 1 ml jeder Mischung im Eppendorfreaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, D) vorgelegt. Die Reaktion wurde in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, D) mit der maximalen Schüttelfrequenz und bei 26 °C inkubiert. Nach 10 min, 60 min und 24 h wurden jeweils 100 µl Proben entnommen und analysiert (s. Abschnitt 2.5.7), unter Verwendung eines 100 µl-Adapters im HPLC-Gläschen.

2.6.4.4 Umsetzung mit alginatimmobilisierten Zellen

Es wurden für den Versuch 67 ml Immobilisatvolumen mit 8.45 g BFM, wie unter 2.7.1 beschrieben, hergestellt. Es wurde im Standardansatz (s. Abschnitt 2.5.8) mit 10 ml Immobilisatvolumen gearbeitet, was einer Biotrockenmassekonzentration von 11 g/l entspricht. Als Substrat wurden 3 ml reines Propionitril zugegeben, wodurch sich eine ca. 0.5 cm hohe Nitrilphase über der Flüssigphase bildete. Durch das Rühren des Ansatzes mit einem Magnetkern (s. Abschnitt 2.5.8) konnte keine homogene Suspension erhalten werden, dennoch löste sich das Nitril während der Hydrolyse innerhalb von 10 min soweit in die Flüssigphase nach, daß keine zweite Phase mehr sichtbar war. Zusätzlich wurden nach 90 min und 24 h jeweils eine weitere Probe entnommen und analysiert (s. Abschnitt 2.5.7).

2.6.5 Einfluß von Licht auf die Anfangsreaktionsrate von freien Zellen

Es wurden parallel zwei Standardaktivitätstests (s. Abschnitt 2.5.8) mit Reaktionspuffer 1 im Glasreaktor angesetzt. Dabei wurde einer der beiden Glasreaktoren zuvor mit handelsüblicher Alufolie umwickelt, so daß dieser lichtdicht verschlossen war. Sowohl bei dem abgedunkelten, als auch bei dem belichteten Ansatz wurde nach 1 h Inkubation unter Standardreaktionsbedingungen (s. Abschnitt 2.5.8) Substrat zugegeben und der Konzentrationsverlauf über die Zeit durch HPLC-Messungen verfolgt.

2.6.6 Umsetzung von 1 M Substrat mit freien Zellen

Es wurde der Standardaktivitätstest (s. Abschnitt 2.5.8) so abgeändert, daß zuerst eine Stammlösung mit einem Volumen von 50 ml Reaktionspuffer 1 und 20 g BFM angesetzt wurde (entsprechend 400 g/l). Es wurden von dieser Stammlösung Verdünnungen auf eine BFM-Konzentration von 2, 5, 10, 20, 50 und 100 g/l mit Reaktionspuffer 1 hergestellt, und die Reaktion im Glasreaktor unter Standardbedingungen mit 1.76 ml reinem Propionitril gestartet, was eine Nitrilkonzentration von 1 M im Ansatz ergab. Die Probennahme erfolgte nach 0, 3, 30, 60, 90, 120, 180, 240 und 300 min. Die Proben wurden für die HPLC-Analyse 1:10 mit Reaktionspuffer 1 verdünnt.

2.6.7 Gefriertrocknung der Mikroorganismen

Es wurden 6 g Biofeuchtmasse mit 2 ml Reaktionspuffer 1 resuspendiert und die erhaltene Zellsuspension auf einer handelsüblichen Petrischale mit einem Spatel zu einem dünnen Film ausgestrichen. Die Petrischale wurde für 2 h bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Danach wurde die noch kalte Petrischale in eine Anlage zur Gefriertrocknung überführt. Unter Vakuum wurde die Zellsuspension für 12 h getrocknet. Die so erhaltenen lyophilisierten Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.7 Immobilisierung der Mikroorganismen

Für die Immobilisierung ganzer Zellen standen verschiedene Methoden zur Verfügung (Fukui & Tanaka 1984), (Jack & Zajic 1977).

Zuerst erfolgte der Einschluß in ein Alginatpolymer das über ionische Wechselwirkungen zusammengehalten wird. Dabei kommt es zu einem Austausch von einwertigen Na^+ -Ionen durch zweiwertige Ca^{2+} -Ionen aus der Vernetzerlösung, die dann die einzelnen Alginatstränge miteinander verbinden (Gilson et al 1990).

Als weitere Methode wurde der Einschluß in ein kovalentes Netzwerk eingesetzt (Katchalski-Katzir 1993). Dazu wurden die beiden Komponenten Acrylamid und Bisacrylamid über eine radikalische Reaktion miteinander vernetzt und so die Zellen eingeschlossen.

2.7.1 Alginatimmobilisierung

Für die Immobilisierung der Zellen in Alginat wurden die in Tabelle 2.15 beschriebenen Lösungen verwendet:

Tabelle 2.15: Herstellung der Lösungen für die Alginatimmobilisierung

Komponente	Zusammensetzung
Alginatlösung	3 % (w/v) in H ₂ O bid.
Zellsuspension	30 % (w/v) in Reaktionspuffer 2
Vernetzerlösung	Reaktionspuffer 2 mit 1 g/l CaCl ₂
Reaktionspuffer 3	Reaktionspuffer 2 mit 0.5 g/l CaCl ₂

Die Alginatlösung wurde 1:1 mit der Zellsuspension gemischt und auf Eis gelagert. Dann wurde die Suspension über eine Schlauchpumpe in einen Apparat zur Sprühvertropfung gepumpt und in die Vernetzerlösung eingetropf. Diese Apparatur war vergleichbar zu der von Pommersheim et al. (Pommersheim et al 1994) verwendeten. Die dabei angewandte Versprühtechnik ergab einen Durchsatz von 120 ml pro Stunde an Zellsuspension pro Düse, wobei insgesamt 12 Düsen zur Verfügung standen.

Die Vernetzerlösung war, wie auch die Zellsuspension, auf Eis gelagert und wurde mittels eines Magnetrührers durchmischt.

Die entstandenen Alginatperlen mit einem Durchmesser von etwa 0.9 mm wurden 30 min in der Vernetzerlösung ausgehärtet, mit Reaktionspuffer 3 gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Für den Aktivitätstest mit immobilisierten Zellen wurde der Standardaktivitätstest wie folgt abgeändert: Es wurde als Pufferlösung Reaktionspuffer 3 eingesetzt. Anstatt der freien Zellen wurden 2 ml (volumetrisch bestimmt) des Immobilisates eingesetzt. Dabei erfolgte das Abstoppen der Reaktion über die unter 2.5.8 beschriebene Filtration, wobei die Entnahme der Probe so erfolgte, daß auch eine entsprechende Menge an Immobilisat entnommen wurde, um die Anreicherung des Katalysators in der Reaktionslösung zu verhindern.

Die eingesetzte Biotrockenmasse wurde dann über das Verhältniss von eingesetzter Biofeuchtmasse zu Biotrockenmasse (Faktor 4.5) berechnet.

2.7.2 Acrylamidimmobilisierung

Für die Immobilisierung in Acrylamid wurden verschiedene Mischungen der Grundkomponenten (s. Tabelle 2.16) auf ihre Immobilisierungseigenschaften hin getestet.

Tabelle 2.16: Herstellung der Lösungen für die Acrylamidimmobilisierung

Komponente	Zusammensetzung
Acrylamidstammlösung 1	Rotiphorese Gel30 (Roth GmbH+Co., Karlsruhe, D), 30 % Acrylamid, 0.8 % Bisacrylamid
Acrylamidstammlösung 2	Rotiphorese Gel19 (Roth GmbH+Co., Karlsruhe, D), 19 % Acrylamid, 1 % Bisacrylamid
Acrylamidstammlösung 3	0.0277 g Bisacrylamid in 3.52 ml H ₂ O bid gelöst
TEMED	N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylendiaminlösung (Bio-RAD Lab. München, D)
APS-Lösung	10%ige (w/v) Ammoniumpersulfatlösung in H ₂ O bid. (immer frisch angesetzt)
Zellsuspension	3 g Biofeuchtmasse mit 2 ml Reaktionspuffer 2 suspendiert

Es wurden die in Tabelle 2.17 dargestellten Mischungen für die Immobilisierung getestet:

Tabelle 2.17: Mischung der Stammlösungen aus Tabelle 2.16 für Ansatz 1

Komponente	Volumen
Acrylamidstammlösung 2	5 ml
TEMED	75 µl
APS-Lösung	150 µl
Zellsuspension	5 ml

Die Lösungen 1 - 3 wurden in einer Glaspetrischale gemischt und 2 min bei Raumtemperatur vorpolymerisiert. Dann wurde die Zellsuspension zugegeben und mit einem Spatel untergemischt, wobei sorgfältig eine Blasenbildung vermieden wurde. Zur Auspolymerisierung wurde die Petrischale auf einer vorgekühlten Metallplatte für ca. 15 min gelagert. Nach Aushärtung des Geles wurde dieses mit Reaktionspuffer 2 gewaschen und bis zur Weiterverwendung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Tabelle 2.18: Mischung der Stammlösungen aus Tabelle 2.16 für Ansatz 2

Komponente	Volumen
Acrylamidstammlösung 1	5 ml
APS-Lösung	5 ml
TEMED	100 µl
Zellsuspension	250 µl

Die Lösungen 1 und 2 wurden ebenfalls in einer Glaspetrischale gemischt und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Lösungen 3 und 4 zugegeben und mit einem Spatel untergemischt, wobei sorgfältig eine Blasenbildung vermieden wurde. Zur Auspolymerisierung wurde wie im Ansatz 1 verfahren. Nach Aushärtung des Geles wurde dieses mit Reaktionspuffer 2 gewaschen und bis zur Weiterverwendung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert

Tabelle 2.19: Mischung der Stammlösungen aus Tabelle 2.16 für Ansatz 3

Komponente	Volumen
Acrylamidstammlösung 2	1.48 ml
Acrylamidstammlösung 3	3.52 ml
TEMED	250 µl
APS-Lösung	100 µl
Zellsuspension	5 ml

Die Herstellung des Immobilisats erfolgte wie bei Ansatz 1 beschrieben.

2.8 Untersuchungen zur Reaktionsführung

Für die absatzweise Reaktionsführung (batch) wurde der im Standardaktivitätstest (s. Abschnitt 2.5.8) beschriebene Glasreaktor verwendet. Dabei kamen sowohl freie als auch immobilisierte Zellen zum Einsatz, die nach der unter Abschnitt 2.7 beschriebenen Methode hergestellt wurden.

Für kontinuierliche und absatzweise Prozeßführungen mit kontinuierlicher Substratzugabe wurde ein 500 ml Membranreaktor verwendet, der mit einem Sechsblasscheibenrührer ausgestattet war (s. Beschreibung bei Indlekofer (Indlekofer 1996)).

Für die Umsetzungen im Festbettreaktor wurde das entsprechende Immobilisat in eine Säule mit Temperiermantel (XK 16, Amersham Pharmacia, Uppsala, S) gegeben.

Als Pumpen für den Zu- bzw. Ablauf wurden in allen Fällen Schlauchpumpen (Typ 101, Watson-Marlow Lim., Falmouth, GB) und Kolbenpumpen (Typ KP 2000, Desaga GmbH, Heidelberg, D) verwendet.

2.8.1 Absatzweise Reaktionsführung mit freien und immobilisierten Zellen

Die absatzweise Reaktionsführung mit freien Zellen wurde unter 2.5.8 beschrieben. Aufgrund der schwierigen Wiederverwendbarkeit der freien Zellen wurde der mehrfache Einsatz des Katalysators mit immobilisierten Zellen untersucht.

2.8.2 Einsatz von Immobilisat im Standardansatz

2.8.2.1 Alginatimmobilisat

Für die Untersuchungen zum Einfluß der Perlengröße auf die Reaktionsrate wurden über die unter 2.7.1 beschriebene Versprühanlage aus 8.45 g BFM in 67 ml Prepolymerlösung Perlen mit unterschiedlichen Größen durch Variation des Preßluftstromes hergestellt. Durch Ausgießen wurden Perlen der Größen 0.9 mm, 1.8 mm und 2.5 mm erhalten und im Standardansatz verwendet.

Für den mehrfachen Einsatz von Immobilisat im Standardtest (s. Abschnitt 2.5.8) wurde Alginatimmobilisat wie unter 2.7.1 beschrieben hergestellt. Dabei wurden 1.25 g BFM und 0.15 g Alginat in 50 ml Reaktionspuffer gelöst und in Vernetzertlösung versprüht. Es wurden 4 ml der erhaltenen Immobilisatperlen im Standardtest (s. Abschnitt 2.5.8) mit doppeltem Volumen (50 ml) eingesetzt. Die Anreicherung der Katalysatorkonzentration im Ansatz wurde über das entnommene Volumen berechnet und wurde entsprechend bei der Berechnung der Aktivität berücksichtigt. Nach Ende des Standardaktivitätstests nach 60 min wurden die Perlen mit Reaktionspuffer 3 gewaschen und wieder im Standardtest eingesetzt.

Die Immobilisatperlen wurden zwischen dem 1. und 2. Ansatz und zwischen dem 4. und 5. Ansatz jeweils 24 h in Reaktionspuffer 3 bei 4 °C gelagert.

2.8.2.2 Acrylamidimmobilisat

Es wurde ein Acrylamidimmobilisat wie unter 2.7.2 beschrieben hergestellt und der etwa 1 mm dicke Polymerfilm mit einem Skalpell in Stücke von etwa 5 mm Kantenlänge zerschnitten. Der Standardaktivitätstest wurde wie unter 2.5.8 durchgeführt, wobei 0.547 g eines 4 Tage bei 4 °C gelagerten Immobilisats im Standardtest mit Reaktionspuffer 2 eingesetzt wurden. Zwischen der 3. und 4. Umsetzung und der 5. und 6. Umsetzung wurde das Immobilisat für 20 h bei 4 °C in Reaktionspuffer 2 gelagert.

2.8.3 Absatzweise Reaktionsführung mit kontinuierlicher Substratzugabe (fed-batch)

2.8.3.1 Umsatz mit freien Zellen

Für den Einsatz freier Zellen in einer absatzweisen Reaktionsführung mit kontinuierlicher Zudosage von Substrat wurde ein 2l Glasreaktor (HWS, Mainz, D) verwendet. Dieser wurde über den Temperiermantel mit einem Wasserbad auf 17 °C temperiert. Für die Umsetzung wurde 25 g BFM in 500 ml Reaktionspuffer 1 suspendiert und in den Reaktor eingefüllt. Als konstanter Zulauf über eine Schlauchpumpe (s. Abschnitt 2.8) wurde reines Propionitril zugegeben. Die Zulauftrate wurde auf 0.04

ml/min eingestellt, wobei sich nach Start des Versuches ein Vollumsatz des Nitrils bis zur Propionsäure einstellte. Zur Kontrolle wurden in regelmäßigen Abständen auf die gleiche Weise wie im Standardansatz (s. Abschnitt 2.5.8) Proben gezogen. Der Zulauf wurde nach 140 h gestoppt. Danach wurde der Ansatz weitere 40 h ohne Nitrilzugabe gerührt, bis kein Nitril im Ansatz mehr nachweisbar war. Nach Zentrifugation und Waschen der Zellen mit Reaktionspuffer 1, wurden die Zellen erneut, wie zuvor beschrieben, eingesetzt.

2.8.3.2 Umsatz mit Alginatimmobilisat

Es wurden 100 ml Alginatimmobilisat wie unter 2.7.1 beschrieben hergestellt. Dazu wurden 25 g BFM in 25 ml Reaktionspuffer 2 suspendiert und mit 50 ml Alginatlösung gemischt. Nach dem Immobilisieren wurden die Zellen in Reaktionspuffer 2 mit 0.05 % (w/v) CaCl_2 für 48 h gelagert.

Der unter Abschnitt 2.8 beschriebene Membranreaktor wurde mit 200 ml Reaktionspuffer 3 und 50 ml Immobilisat gefüllt. Der Reaktor wurde mit 300 Upm gerührt und auf 17 °C temperiert. Der Zulauf mit reinem Propionitril wurde zu Beginn des Versuches auf 0.1 ml/min eingestellt. Nach 300 min wurde der Zulauf auf 0.02 ml/min eingestellt. Der Zulauf wurde nach 145 h gestoppt, als Propionitril in der Reaktionslösung nachgewiesen werden konnte. Nach 180 h wurde der Versuch beendet und der Reaktor über die untere Ablassöffnung entleert, wobei das Immobilisat durch eine Gazemembran zurückgehalten wurde. Dann wurde das Immobilisat 2 Mal mit je 200 ml Reaktionspuffer 3 gewaschen. Der Reaktor wurde dann wieder mit 200 ml Reaktionspuffer 3 aufgefüllt, und der Ansatz wie oben beschrieben wiederholt, wobei der Zulauf zu Beginn auf 0.015 ml/min eingestellt wurde. Nach 190 h wurde der Zulauf unterbrochen und das Immobilisat wie oben beschrieben gewaschen und wiederverwendet.

Bei der dritten Wiederverwendung wurde der Zulauf mit 0.015 ml/min gestartet und nach 16 h auf 0.01 ml/min eingestellt. Nach 60 h wurde der Zulauf gestoppt. Der Verlauf der Konzentrationen der Reaktanden wurde bis 100 h Prozeßzeit ohne Nitrilzugabe weitergemessen.

2.8.4 Absatzweise Reaktionsführung mit Alginatimmobilisat mit diskontinuierlicher Substratzugabe

Um die Art der Inaktivierung der Nitrilhydratase zu untersuchen, wurden Zellen mit reduzierter Nitrilhydrataseaktivität durch eine Nitrilumsetzung hergestellt, und das Proteinmuster im Rohaufschluß mit dem von freien Zellen verglichen.

Die Herstellung des für den Versuch verwendeten Alginatimmobilisats erfolgte wie unter 2.7.1 beschrieben. Es wurden 2.94 g BFM eingesetzt und insgesamt 23 ml Immobilisatperlen hergestellt.

Es wurde der Standardaktivitätstest mit Immobilisat so abgeändert, daß in 50 ml Reaktionsvolumen im Glasreaktor 4 ml dieses Immobilisates in Reaktionspuffer 3 vorlagen. Zum Start der Reaktion und nach 5, 10, 15 und 20 min wurden jeweils 338 µl reines Propionitril zugegeben. Die Probenahme erfolgte so, daß entsprechend dem Probenvolumen auch das Immobilisat aus dem Reaktionsansatz entfernt wurde, um Volumenfehler zu vermeiden. Die Proben wurden nach 0, 1, 3, 5, 6, 8, 10, 11, 13, 15, 16, 18, 20, 21, 23, 25, 30, 45, 60 und 120 min entnommen und analysiert. Die Reaktion wurde

nach 125 min beendet und das Immobilisat mit Reaktionspuffer 3 gewaschen. Danach wurden 2 ml des verbliebenen Immobilisats im Standardansatz (s. Abschnitt 2.5.8) ohne Immobilisatentnahme 2 weitere Male eingesetzt.

Um zu untersuchen, ob die Nitrilhydratase durch die durchgeführte Reaktion oder durch einen proteolytischen Abbau inaktivierte, wurden nach dem mehrfachen Einsatz die Zellen mit Reaktionspuffer 1 aus dem Alginat herausgelöst und mit einer Eppendorf Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg, D) abzentrifugiert. Nach Resuspendieren des Pellets und einem weiteren Reinigungsschritt mit Reaktionspuffer 1 und anschließendem Abzentrifugieren wurden die Zellen aufgeschlossen (s. Abschnitt 2.5.10.1), und der Rohaufschluß mittels Gelelektrophorese (s. Abschnitt 2.5.10) und einer quantitativen Auswertung des Proteingehalts der Zellen bezüglich der Nitrilhydratase analysiert.

2.8.5 Kontinuierlicher Festbettreaktor mit Alginatimmobilisat

Für den Einsatz von Immobilisat im Festbettreaktor wurde eine Pharmaciasäule (s. Abschnitt 2.8) verwendet. Es wurde die Nitrilhydratase- und der Amidasereaktion jeweils gesondert betrachtet die nachfolgend beschriebenen Bedingungen für die Umsetzung eingestellt.

2.8.5.1 Nitrilhydrataseansatz

Es wurde wie unter 2.7.1 beschrieben Immobilisat hergestellt (6 g BFM in 40 g Immobilisat). Dieses zeigte im Standardaktivitätstest eine spezifische Aktivität von 14222 U/g BTM für die Nitrilhydratase und 301 U/g BTM für die Amidase. Die Säule wurde mit 17 g Immobilisat befüllt und auf 6 °C temperiert. In den ersten 24 h wurde die Substratlösung mit einer Schlauchpumpe zudosiert. Dann wurde diese Pumpe aufgrund starker Schwankungen in der Fließrate durch die unter 2.8 beschriebene Kolbenpumpe ersetzt und im weiteren die zugegebene 100 mM Propionitrillösung in Reaktionspuffer 3 mit einer Fließrate von 20 ml/h über die Säule gepumpt. Aus dem Ablauf des Festbettreaktors wurde in regelmäßigen Abständen Proben gezogen und analysiert. Nach 276 h wurde 500 mM Propionitrillösung zugepumpt. Nachdem kein Produkt mehr im Ablauf nachweisbar war, wurde nach 74 h der Zulauf wieder auf 100 mM Propionitril umgestellt. Nach weiteren 90 h wurde der Versuch beendet.

3 ml des verwendeten Immobilisats wurde mit Reaktionspuffer 3 gewaschen und anschließend im Standardansatz auf Aktivität getestet.

2.8.5.2 Amidaseansatz

Es wurde wie unter 2.7.1 beschrieben Immobilisat (3 g BFM in 20 g Immobilisat) hergestellt und nach einer Lagerzeit von 7 Tagen bei 4 °C in Reaktionspuffer 3 verwendet. Im Standardtest ergab sich eine Aktivität von 31 U/g BTM für die Amidase. Eine Pharmaciasäule (s. Abschnitt 2.8) wurde mit 25 ml Immobilisat befüllt und auf 30 °C temperiert. Mit der unter 2.8 beschriebenen Kolbenpumpe wurde 100 mM Propionamidlösung in Reaktionspuffer 3 mit einer Fließrate von 1 ml/h über die Säule gepumpt.

Aus dem Ablauf des Festbettreaktors wurden in regelmäßigen Abständen Proben gezogen und analysiert. Nach 129 h wurde die Fließrate auf 3 ml/h erhöht. Nach 474 h wurde eine 500 mM Propionamidlösung zugepumpt. Nachdem kein Produkt mehr im Ablauf der Säule zu finden war, wurde nach 125 h der Zulauf wieder auf 100 mM Propionitril zurückgestellt. Nach weiteren 579 h wurde der Versuch beendet.

2.8.6 Kontinuierliche Reaktionsführung mit Alginatimmobilisat

Für die Umsetzungen unter kontinuierlichem Mediumszu- und -ablauf wurde der unter 2.8 beschriebene Membranreaktor verwendet. Als Zulaufpumpe wurde die unter 2.8 beschriebene Kolbenpumpe eingesetzt, als Ablaufpumpe wurde die unter 2.8 beschriebene Schlauchpumpe verwendet. Es wurde sowohl Propionitril als auch Propionamid als Zulauf verwendet. Für die beiden Versuche wurden die nachfolgend beschriebenen Bedingungen für die Umsetzung eingestellt.

2.8.6.1 Propionitrilumsetzung

Für den Versuch wurde Immobilisat wie unter 2.7.1 beschrieben hergestellt. Es wurden hierbei 20.1 g BFM zur Herstellung von 100 ml Immobilisat verwendet. Das frisch hergestellte Immobilisat hatte eine spezifische Aktivität von 7014 U/g BTM für die Nitrilhydratase und 136 U/g BTM für die Amidase, was einer Aktivität von 7512 U im Reaktor unter den Bedingungen des Standardaktivitätstests entsprach. Da die Reaktionstemperatur auf 6 °C eingestellt wurde, war die beobachtbare Aktivität, bei einer über die Temperaturabhängigkeit der Nitrilhydratasereaktion abgeschätzten Aktivität, etwa 3756 U. 24 ml dieses Immobilisats wurden im Membranreaktor in 100 ml Gesamtvolumen bei 6 °C in Reaktionspuffer 3 eingesetzt, was einer BTM von 10.7 g/l entsprach. Der Rührer wurde auf 300 Upm, der Zulauf von 120 mM Propionitril in Reaktionspuffer 3 wurde auf 250 ml/h eingestellt. Nach 21 h wurde der Zulauf auf 400 ml/h erhöht. Nach einer Laufzeit von 45 h wurde der Ansatz bei konstantem Zulauf für 3 h abgedunkelt, um den Einfluß von Licht auf die Nitrilhydratasereaktion zu beobachten. Nach einer Reaktionszeit von 113 h wurde der Zulauf auf 200 ml/h und nach 150 h auf 100 ml/h herabgesetzt. Der Versuch wurde nach 214 h beendet.

2.8.6.2 Propionamidumsetzung

Für den Versuch wurde Immobilisat wie unter 2.7.1 beschrieben hergestellt. Es wurden hierbei 8.03 g BFM zur Herstellung von 50 ml Immobilisat verwendet. Im Standardaktivitätstest wurde eine spezifische Aktivität von 323 U/g BTM für die Amidase gemessen. 48 ml dieses Immobilisats wurden im Membranreaktor in 158 ml Gesamtvolumen bei 30 °C in Reaktionspuffer 3 eingesetzt. Die Rührung wurde auf 300 Upm, der Zulauf von 100 mM Propionamid in Reaktionspuffer 3 wurde auf 0.73 ml/min eingestellt. Nach 380 h wurde der Zulauf auf 0.43 ml/min verringert. Der Versuch wurde nach 1330 h beendet.

3 Ergebnisse

3.1 Klassifizierung des verwendeten Stammes

Zur genauen Klassifizierung des Stammes LU8207 wurde eine Stammbestimmung mittels 16S rDNA-Sequenzvergleich durchgeführt (s. Abschnitt 2.3.2). Dazu wurde eine Komplettssequenzierung der 16S rDNA, wie unter 2.3 beschrieben, vorgenommen.

Über die beschriebenen (s. Abschnitt 2.3.2.5) Programme zum Vergleich der Sequenzen wurde eine 99%ige Identität mit *Rhodococcus erythreus* bestimmt. Eine 98%ige Übereinstimmung ergab sich zu *Nocardia calcarea*. Es wurde ein Stammbaum für die Beschreibung der Verwandtschaftsverhältnisse der vergleichbaren Stämme erstellt. Dieser wird in Abbildung 3.1 dargestellt.

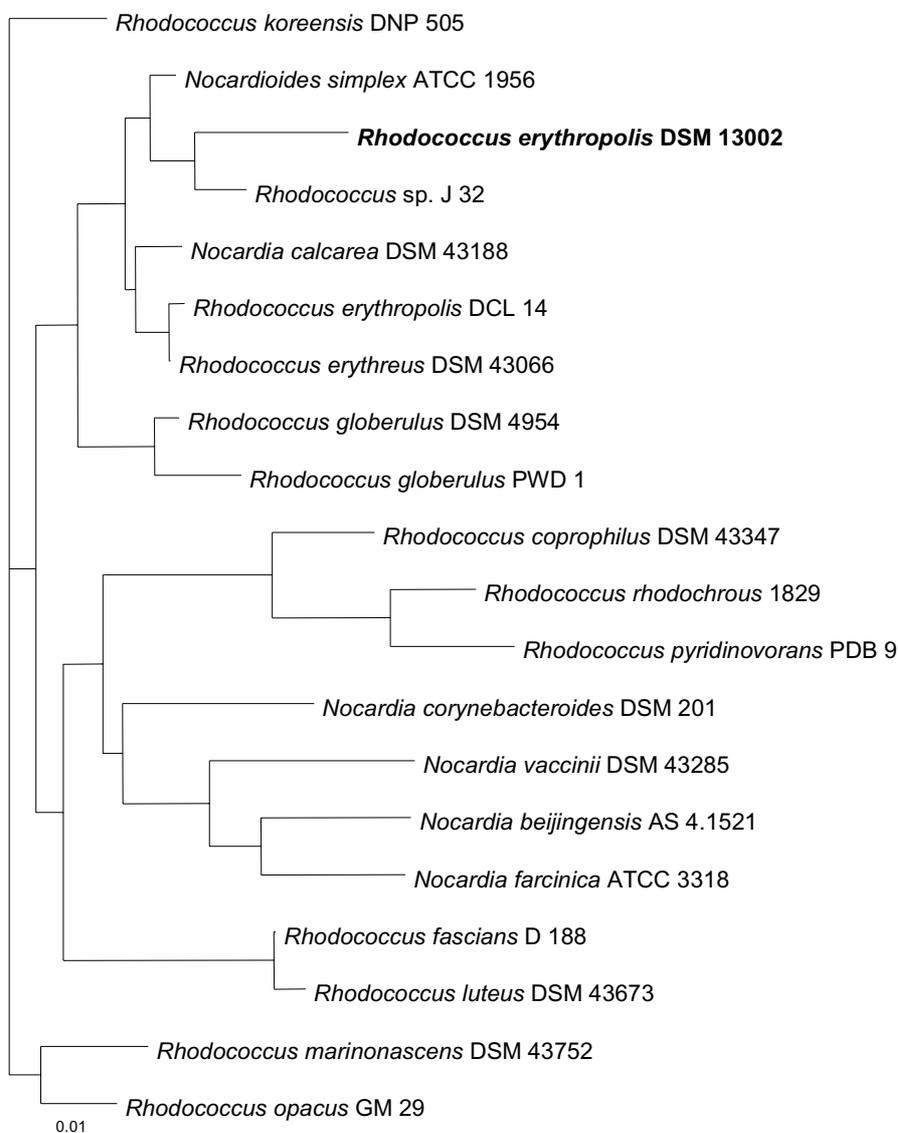


Abbildung 3.1: Stammbaumeinordnung des verwendeten Mikroorganismus in die Gattung *Rhodococcus*

Eine parallel durchgeführte taxonomische Bestimmung des Stammes durch die DSMZ ergab eine Klassifizierung als *Rhodococcus erythropolis*. Dabei wurden zusätzlich die Morphologie, Chemotaxonomie und die molekularbiologische Klassifizierung untersucht.

Die Morphologie von *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002 zeigt kurze verzweigte Hyphen, die im Alter in Stäbchen und Kokken zerfallen. Die Kolonien auf Agarplatte wurden als glänzend, hell beigerot beschrieben mit RAL 3012. Des Weiteren wurden die Aminosäuren des Peptidoglycangerüsts analysiert. Dabei wurde als Hauptbestandteil die meso-Diaminopimelinsäure identifiziert, die für Angehörige der Gattung *Rhodococcus* typisch ist. Eine Extraktion der Mycolsäuren des Stammes ergab im Bezug auf die Kettenlänge (C₃₂ – C₄₆) und im Vergleich der Chromatogrammmuster hohe Ähnlichkeit zu *Rhodococcus erythropolis*. Das Fettsäuremuster der Membran zeigte unverzweigte gesättigte und ungesättigte Fettsäuren und zudem Tuberculostearinsäure, welche für die Vertreter *Rhodococcus* und ihre nahen Verwandten wie *Mycobacterium*, *Nocardia* und *Gordonia* charakteristisch ist. Das Fettsäuremuster wurde mit Einträgen in Datenbanken verglichen und die Übereinstimmung mit den Daten von *Rhodococcus erythropolis* festgestellt. Zudem wurde auch hier eine Teilsequenzierung der 16S rDNA (ca. 500 bp) durchgeführt und eine Homologie (>99.5 %) mit *Rhodococcus erythropolis* festgestellt.

Der Stamm wurde von der DSMZ als apathogener *Rhodococcus erythropolis* mit Risikogruppe 1 eingestuft und erhielt die Nummer DSM 13002.

3.2 Kultivierung von *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002

Um den Stamm *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002 auf seine nitrilverseifenden Eigenschaften hin zu untersuchen, wurde eine geeignete Menge an Biomasse hergestellt. Dazu wurden in Schüttelkolbenexperimenten erste Daten über den Verlauf der Kultivierung gewonnen. Mittels einer Kultivierung im Bioreaktor sollte daraufhin eine größere Menge an Biomasse für die Charakterisierung und die Untersuchungen zum Einsatz als Ganzzellkatalysator bei verschiedenen Prozeßführungen hergestellt werden.

3.2.1 Kultivierung im Schüttelkolben

Mit dem unter 2.4.1.3 beschriebenen Medium 1 und unter den in 2.4.2 beschriebenen Bedingungen wurden erste Versuche zur Kultivierung der Zellen des Stammes DSM 13002 mit 1 l Mediumvolumen in einem 5 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen durchgeführt. Dabei wurde das Wachstum anhand des Verlaufes der optischen Dichte (OD), der Biotrockenmassekonzentration (BTM) und die Ammonium- und Glucosekonzentration im Medium über die Prozeßzeit verfolgt. Als Vorkultur für das Animpfen wurden 50 ml einer 12 h in diesem Medium (s. Abschnitt 2.4.1.3 Medium 1) und unter den unter 2.4.2 beschriebenen Bedingungen inkubierten Kultur verwendet. Es ergaben sich die in Abbildung 3.2 dargestellten Verläufe der Zustandsvariablen über die Prozeßzeit:

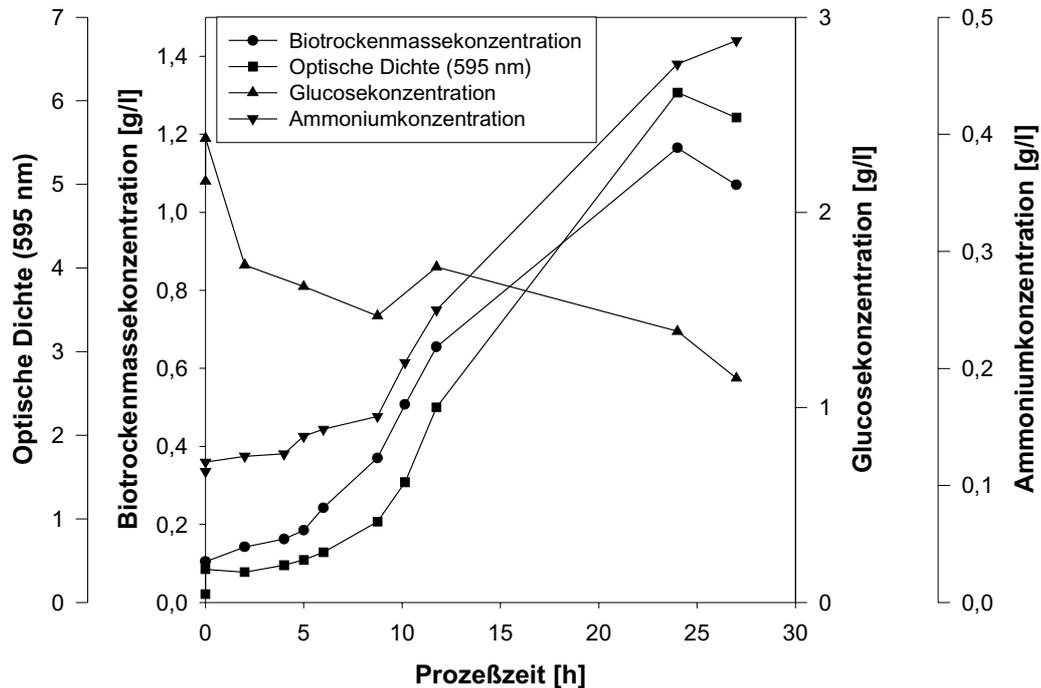


Abbildung 3.2: Verläufe der optischen Dichte, Biotrockenmassekonzentration, Glucosekonzentration und Ammoniumkonzentration über die Prozeßzeit bei einer Kultivierung des Stammes *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002 im 5 l Schüttelkolben bei einem Mediumsvolumen von 1 l. Es wurde das Medium 1 mit 3 g/l Hefeextrakt (s. Abschnitt 2.4.1.3) verwendet und bei 30 °C auf einer Schüttelmaschine bei 120 Upm inkubiert. Als Animpfkultur wurden 50 ml einer unter denselben Bedingungen 12 h gewachsene Kultur eingesetzt.

Die Messung des pH- Wertes vor und nach der Inkubation ergab einen Anstieg von pH 7.2 auf pH 7.8. Die Zellen zeigten zunächst eine stäbchen- bzw. kokkenförmige Morphologie während der exponentiellen Phase, in der stationären Phase verklumpten sie jedoch zu größeren, mycelartigen Agglomeraten. Die Kultur wuchs über die Prozeßzeit submers mit einer orangenen Färbung.

Für die Werte der Biotrockenmassekonzentration war ein exponentieller Zuwachs ab dem Zeitpunkt des Animpfens zu erkennen. Die optische Dichte zeigte hingegen eine Beschleunigungsphase, also ein nicht konstant exponentielles Anwachsen der Zellen von etwa drei Stunden.

Die Biotrockenmassekonzentration und die optische Dichte zeigten in der exponentiellen Wachstumsphase einen synchronen Verlauf und es wurde eine spezifische Wachstumsrate bezüglich der Biotrockenmassekonzentration von $\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$ bestimmt.

Aus dem in Abbildung 3.2 dargestellten Verlauf der Glucosekonzentration war zu erkennen, daß die Konzentration an Glucose bis zum Ende der exponentiellen Phase kaum abnahm. Zu Beginn der Anzucht lag die Konzentration an Glucose bei 2 g/l, wobei dann zu Beginn der stationären Phase nach 24 h immer noch 1.5 g/l im Medium vorlagen. Anscheinend wurde dann in der stationären Phase die

Glucose von den Zellen verstärkt als C-Quelle genutzt. Zum Ende der Anzucht nach 27 h waren noch 1.2 g/l Glucose im Medium.

Es wurden 2 g/l Ammoniumsulfat eingesetzt, was einem Ammoniumgehalt von 0.54 g/l entspricht. Es zeigte sich, daß die eingesetzte Menge an Ammonium im Medium zu Beginn der Kultivierung trotz geeigneter Kalibrierung der Analytik nicht nachweisbar war. Wie aus Abbildung 3.2 zu ersehen ist, konnten zu Beginn der Kultivierung nur etwa 0.2 g/l nachgewiesen werden. Zudem kam es über den Prozeßverlauf zu einem Anstieg der Ammoniumkonzentration auf einen Wert von 0.5 g/l nach 27 h Prozeßzeit.

Als Erklärung für den Anstieg der Ammoniumkonzentration wurde angenommen, daß Hefeextrakt als Kohlenstoffquelle verwertet wurde. Dieses besteht zu einem großen Teil aus Aminosäuren, von denen das Kohlenstoffgerüst abgebaut und das dabei anfallende Ammonium in das Medium abgegeben werden kann.

Der Versuch wurde nach 27 h abgebrochen, nachdem zuvor 5 h kein Anstieg der Biotrockenmassekonzentration gemessen wurde. Die Biotrockenmassekonzentration lag nach 27 h bei 1.1 g/l. Die optische Dichte lag zu diesem Zeitpunkt bei $OD = 9$.

Zu diesem Zeitpunkt war Glucose nicht limitierend für das Wachstum. Es wurde daher angenommen, daß eine für das Wachstum der Mikroorganismen notwendige Komponente des Hefeextrakts aufgebraucht war.

3.2.2 Kultivierung im Rührreaktor

Um für die Untersuchung des Biokatalysators eine größere Mengen an homogener Zellmasse zu erhalten, wurde der Stamm *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002 in einem Rührkesselbioreaktor mit einem Füllvolumen von 70 l Medium 1 kultiviert.

Dabei konnten durch die Möglichkeit der Regelung von Begasung, Temperatur, Rührung und pH-Wert definierte Bedingungen für die Kultivierung eingestellt werden, was in den Versuchen mit einer Kultivierung im Schüttelkolben so nicht möglich war. Durch die angeschlossene Abgasanalyse der Reaktorabluft konnten zudem weitere Aussagen über das Wachstum der Biomasse bei der Kultivierung erhalten werden.

Im ersten Prozeßabschnitt sollten die Experimente aus den Schüttelkolbenversuchen nachvollzogen werden. In einem zweiten Prozeßabschnitt sollte untersucht werden, ob durch die Zugabe von Hefeextrakt und Ammoniumsulfat das Wachstum wieder gestartet und somit höhere Zellkonzentrationen erreicht werden können.

Der Versuch wurde wie in Abschnitt 2.4.4 beschrieben durchgeführt. Es ergaben sich die in Abbildung 3.3 dargestellten Änderungen der gemessenen Parameter über die Prozeßzeit.

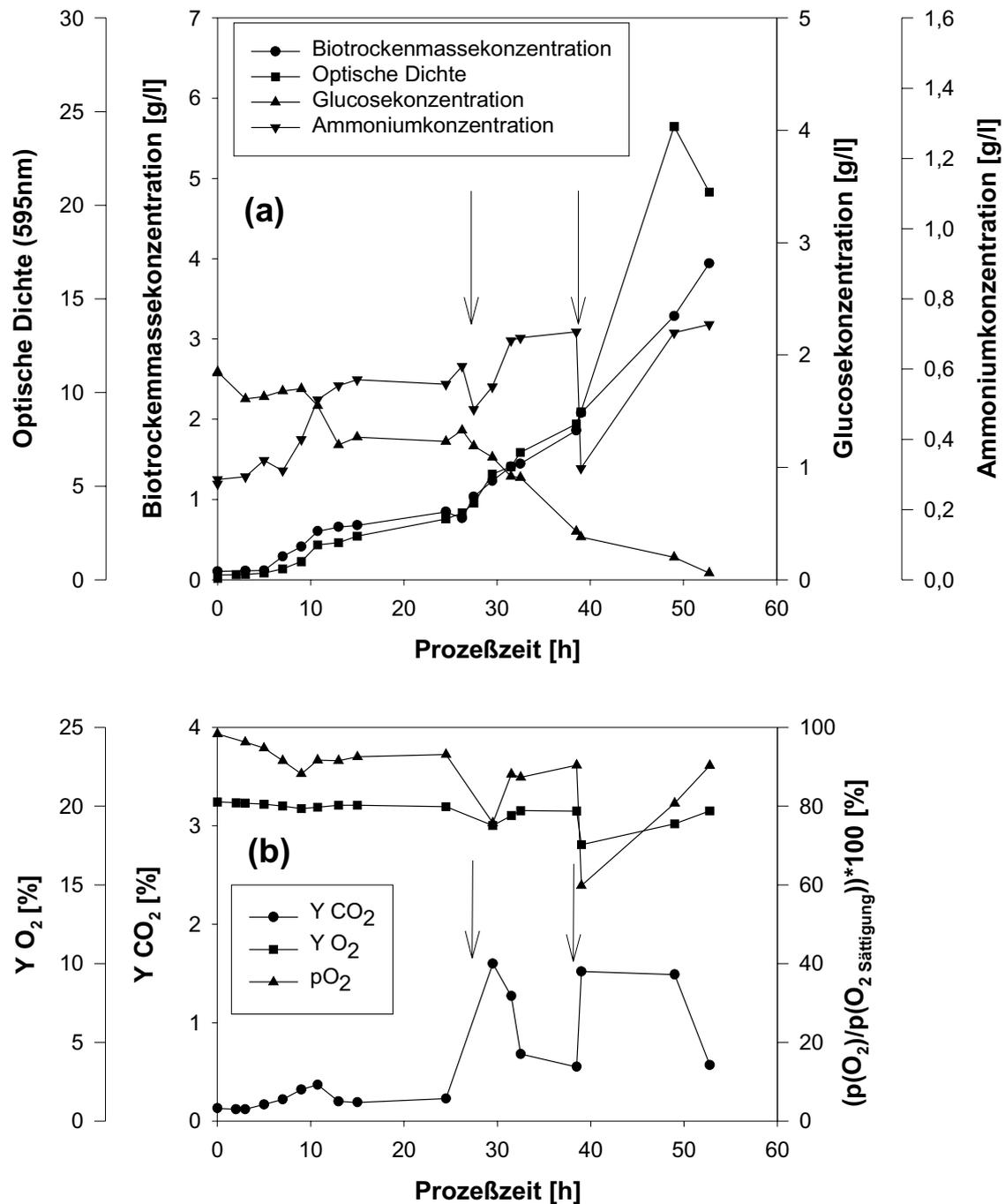


Abbildung 3.3: Verläufe über die Prozeßzeit für die Optische Dichte, Biotrockenmassekonzentration, Glucosekonzentration und Ammoniumkonzentration (a), die Sauerstoffsättigung in der Kulturflüssigkeit und Abluftanalyse (b) und die Aktivität der Enzyme bei einer Kultivierung des Stammes *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002 im 100 l Bioreaktor bei einem Mediumsvolumen von 60 l. Es wurde das Medium 1 (s. Abschnitt 2.4.1.3) verwendet und bei 30 °C und einem pH-Wert von 7.2 kultiviert. Die Kultur wurde mit 10 NI/min belüftet, bei einer Rührerdrehzahl von 150 Upm. Als Animpfkultur wurden 5 l einer unter denselben Bedingungen 12 h im Erlenmeyerkolben gewachsenen Kultur eingesetzt. Zu den mit Pfeilen markierten Zeitpunkten erfolgte die Zugabe von Hefeextrakt und Ammonium.

Im Bioreaktor erfolgte kein vollständiges submerses Wachstum über die Prozeßzeit. Durch die Begasung kam es zu heftigem Schäumen der Zellsuspension besonders zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase, was zu einem Austragen von Biomasse in die Spritzzone an die Wand des Bioreaktors oberhalb der Flüssigkeit führte.

Als Antischaummittel wurde Ucolub mehrfach zu der Kulturbrühe zugegeben, was das starke Schäumen allerdings jeweils nur für wenige Minuten unterdrücken konnte.

Der Verlauf des Wachstums im Bioreaktor über 27.5 h entsprach sehr gut dem Wachstum der Zellen im Schüttelkolben (s. Abbildung 3.2). Die optische Dichte lag nach 28 h etwa bei einem Wert von $OD=6$, die Biotrockenmassekonzentration bei etwa 1 g/l. Es ergab sich eine spezifische Wachstumsrate von $\mu = 0.2$ bezogen auf die Biotrockenmassekonzentration in der exponentiellen Wachstumsphase in der Prozeßzeit von 5-15 h.

Wie schon im Schüttelkolbenversuch, war innerhalb der ersten 27.5 h Prozeßzeit auch hier keine vollständige Verstoffwechslung der Glucose zu beobachten. Nach dem Ende der exponentiellen Phase nach lagen nach 28 h Prozeßzeit noch 1.2 g/l Glucose im Medium vor.

Die gemessene Ammoniumkonzentration (Abbildung 3.3a) zeigte in den ersten 27.5 h einen zum Schüttelkolbenexperiment vergleichbaren Verlauf, wobei auch hier zu Beginn der Kultivierung nur eine Ammoniumkonzentration von etwa 0.25 g/l vorlag, die dann bis auf 0.6 g/l nach 27.5 h anstieg.

Bereits im Schüttelkolbenversuch wurde eine Limitierung durch einen Bestandteil des Hefeextraktes oder auch eine eventuelle Stickstofflimitierung als Grund für die Stagnation des Wachstums vermutet, wie dies auch bei der Kultivierung im Bioreaktor nach etwa 24 h eintrat. Durch Zugabe von Hefeextrakt und Ammonium nach 27.5 h und 38.5 h konnte das Wachstumsverhalten weitergehend untersucht werden. Dabei sollte das zugegebene Ammoniumsulfat einer eventuellen Stickstofflimitierung durch das Verdünnen der Kulturlösung entgegenwirken. Dennoch sank nach Zugabe der Lösungen jeweils die Ammoniumkonzentration stark ab auf einen Wert von 0.42 g/l und 0.23 g/l. Innerhalb der folgenden 8-10 h nach der jeweiligen Zugabe stieg dann die Ammoniumkonzentration wieder bis auf einen Wert von etwa 0.62 g/l an, weshalb angenommen wurde, daß während der gesamten Kultivierung keine Stickstofflimitierung vorlag.

Sofort nach der ersten Zugabe von Hefeextrakt/Ammoniumsulfat-Lösung stieg die optische Dichte und die Biotrockenmassekonzentration wieder an. Dieser Wachstumsschub hielt etwa 8-10 h an, dann wurde erneut ein Verlangsamung des Wachstum festgestellt. Die Biotrockenmassekonzentration stieg zu diesem Zeitpunkt noch leicht an. Nach der zweiten Zugabe nach 38.5 h konnte das Wachstum erneut beschleunigt werden. Zum Ende der Kultivierung nach einer Prozeßzeit von 55 h lag dann die Biotrockenmassekonzentration bei 5 g/l, die OD bei einem Wert von $OD = 40$. In der exponentiellen Wachstumsphase nach 7 h Prozeßzeit war das Verhältnis von OD zu BTM bei 2.5 - 2.7. In der Übergangsphase zur stationären Phase nach 12 h lag dieser Wert bei 4.5, in der stationären Phase

dann bei einem Wert von mehr als 5. Diese Schwankung im Verhältnis von OD/BTM läßt sich durch den Dimorphismus der Zellen vom einzelligen Wachstum zum mycelartigen Agglomerieren erklären, da die optische Dichte durch Streuung durch große Agglomerate stark beeinflusst wird.

Zudem wurde besonders zum Ende der Kultivierung nach 45 h durch Schaumbildung Biomasse aus der Zellsuspension ausgetragen und setzte sich an der Wand des Bioreaktors ab, was sowohl bei der Messung der OD als auch der TS in den letzten Stunden der Kultivierung zu geringe Werte ergab. Dabei war die Schaumbildung so heftig, daß der Versuch auch aufgrund der Gefahr eines Überschäumens nach 52.5 h abgebrochen wurde.

Nach der ersten Zugabe der Hefeextrakt/Ammoniumsulfat-Lösung nach 27.5 h ging der Glucoseverbrauch auf einen geringeren Wert als in der vorhergehenden stationären Phase zurück, wobei diese jedoch in der stationären Phase des Wachstums verstoffwechselt wurde. Dieser Effekt war nach der zweiten Zugabe nur sehr schwach ausgeprägt, wobei hier die Glucosekonzentration bei 0.5 g/l lag. Die Endkonzentration bei Ernte lag bei 0.06 g/l Glucose im Medium.

Die Sauerstoffsättigung der Kulturlösung sollte während der Kultivierung so hoch sein, daß eine Sauerstofflimitierung der strikt aeroben Mikroorganismen des Stammes *Rhodococcus* vermieden wird. Die Sauerstoffsättigung (Abbildung 3.3b) im Medium ging in der ersten exponentiellen Phase nach 10 h Prozeßzeit zurück auf einen Wert von $pO_2 = 90 \%$, um in der ersten stationären Phase nach etwa 20 h wieder auf 95 % Sättigung anzusteigen. Jeweils nach Zugabe des Hefeextraktes nach 27.5 h und 38.5 h ging aufgrund des starken Wachstums und der Atmung der Zellen der Sauerstoffgehalt im Medium zurück auf einen Wert von $pO_2 = 75 \%$ bzw. $pO_2 = 60 \%$. In der jeweils anschließenden Wachstumsphase stieg die Sauerstoffsättigung des Mediums auf einen Wert von $pO_2 = 95 \%$ an. Somit war unter den eingestellten Bedingungen für die Rührerdrehzahl und die Zulufrate über die gesamte Prozeßzeit praktisch keine Sauerstofflimitierung festzustellen.

Auch die Zusammensetzung der Bioreaktorabluft änderte sich aufgrund der hohen Zellatmung nach der Zugabe des Hefeextraktes. Der Sauerstoffgehalt ging auf 18 % bzw. 17.7 % des Volumenstromes zurück, der CO_2 -Gehalt der Abluft stieg auf über 1.6 % (s. Abbildung 3.2 b) an. Da sterile Raumluft mit einem Gehalt von 21 % Sauerstoff und einem Kohlendioxidgehalt von 0.04 % in den Reaktor eingegeben wurde, wurde also der Sauerstoff während des Wachstums verbraucht und CO_2 gebildet. Diese Werte gingen in der anschließenden Phase mit einem geringeren Zellwachstum wieder auf die ursprünglichen Werte zurück, wobei auch diese Parameter zur zeitlichen Abgrenzung der Wachstumsphasen herangezogen werden konnten. Dabei deuteten das Absinken der Zustandsvariablen auf die ursprünglichen Werte (s. Abbildung 3.3 b) auf das Erreichen einer stationären Phase des Wachstums hin.

Es war somit klar nachzuweisen, daß, wie bereits im Schüttelkolben festzustellen war (s. Abschnitt 3.2.1), in der ersten Kultivierungsphase mit Medium 1 vorrangig Hefeextrakt als C- und N-Quelle genutzt wurde. Erst wenn eine der darin enthaltenen Komponenten verbraucht war, wurde verstärkt

die Glucose verstoffwechselt, wobei jedoch das Zellwachstum und damit auch der Sauerstoffverbrauch der Zellen stagnierte. Auch die Stickstoff- und Sauerstoffkonzentration war während der Kultivierung nicht limitierend. Durch die Zugabe von Hefeextrakt konnte das Wachstum wieder angeregt werden. Es ließen sich durch die Zufütterung von Hefeextrakt Zellkonzentrationen von 4-5 g/l BTM erreichen, gegenüber etwa 1 g/l im Schüttelkolbenexperiment (s. Abschnitt 3.2.1).

Die Kultur wurde über eine Durchlaufzentrifuge von der Biomasse abgetrennt (s. Abschnitt 2.4.4). Die so erhaltene Zellmasse von 1.1 kg wurde für weitere Versuche eingefroren.

3.3 Charakterisierung der Biomasse bezüglich der Umsetzung von Propionitril

Die aus der Bioreaktorkultivierung (s. Abschnitt 3.2.2) erhaltene Biomasse wurde für alle weiteren Untersuchungen zur Charakterisierung der Schlüsselparameter für die Hydrolyse wie Temperatur und pH-Wert, sowie der kinetischen Konstanten der Enzyme verwendet. Dabei wurden die für die Reaktion optimalen Parameter ermittelt und der Ganzzellkatalysator sowohl als freie Zellen als auch als Immobilisat auf seine Verwendbarkeit unter verschiedenen Prozeßbedingungen hin untersucht.

3.3.1 Standardaktivitätstest

Zur Charakterisierung der Zellmasse bezüglich ihrer propionitrilverseifenden Eigenschaften wurde zuerst der unter 2.5.8 beschriebene Standardaktivitätstest entwickelt. Dabei wurde darauf geachtet, daß sowohl die Reaktion der Nitrilhydratase als auch die vergleichsweise wesentlich langsamere Reaktion der Amidase in einem Test abgebildet werden konnte. Dies war bei einer Biotrockenmassekonzentration von 0.2 - 0.7 g/l und einer Substratkonzentration von 100 mM Propionitril bei 26 °C möglich. Auch nichtlineare Einflüsse auf die Kinetik der Reaktion durch Agglomeration der eher hydrophoben Zellen und Mischungsprobleme bei der Substratzugabe aufgrund hoher Biomassekonzentrationen konnten dabei vernachlässigt werden. Es wurde eine Substratkonzentration von 100 mM für den Standardansatz gewählt, so daß die Startkonzentration an Substat im Maximum der spezifischen Anfangsreaktionsraten der jeweiligen Enzymreaktionen (also mindestens die 5-fache Konzentration des jeweiligen K_M -Wertes) lag, aber nur eine geringe Limitierung durch die Substratüberschußhemmung mit einem jeweiligen K_I -Wert von etwa 200 mM (s. Abschnitt 3.6.1) auftrat.

Die Bestimmung der Anfangsreaktionsraten erfolgte unter Vernachlässigung der Inaktivierung und der Produktentstehung in dem Zeitraum der jeweiligen Reaktion, was aufgrund der Untersuchungen zur Inaktivierung der Enzyme (s. Abschnitt 3.3.5) und den gemessenen Konzentrations-Zeit-Verläufen (s. Abbildung 3.26) begründete Annahmen waren.

Da für alle diesbezüglichen Versuche eine schnelle Probennahme mit einem sofortigen Abstoppen beider Reaktionen notwendig war, wurden die Zellen durch Filtration von der Reaktionslösung abgetrennt. Eine Probe konnte so innerhalb von 5 sec. entnommen und abgestoppt werden, was

bezüglich der beobachteten Gesamtreaktion von mehreren Minuten einen geringen Fehler durch die Weiterreaktion während der Probennahme führte. Zudem waren durch den Meßbereich der Analytik bis in einen Konzentrationsbereich von 300 mM keine Verdünnungsschritte für die weitere Aufarbeitung der Proben notwendig, welche zu einem Fehler in den Meßwerten für die Konzentrationen der an der Reaktion beteiligten Komponenten hätten führen können.

Die Meßwerte von parallel angesetzten Nitrilumsetzungen zeigten untereinander eine Abweichung von maximal 5 % bezüglich der aus den gemessenen Konzentrations-Zeit-Verläufen bestimmten spezifischen Aktivität, wobei der Fehler hauptsächlich auf der Seite der Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration (s. Abschnitt 2.5.2) lag. Die Konzentrationsbestimmung durch die HPLC-Messung zeigte eine Abweichung von 1 % bei Mehrfacheinspritzung.

3.3.2 Korrelation der Biomassekonzentration mit der Zellzahl und der Biotrockenmassekonzentration

Zur Abschätzung der Biotrockenmassekonzentration (BTM) aus Reaktionsansätzen, von denen nur die eingesetzte Biofeuchtmasskonzentration (BFM) bekannt war, wurde der Korrelationsfaktor zwischen BFM, BTM und der Zellzahl bestimmt.

Es wurden in Reaktionspuffer 1 eine Zellsuspension mit 2 g/l BFM hergestellt.

Die Doppelbestimmung der BTM (s. Abschnitt 2.5.2) ergab einen Mittelwert von 0.442 g/l im Ansatz bei einer Abweichung von 2 %. Die optische Dichte lag bei einer Dreifachbestimmung (s. Abschnitt 2.5.1) bei $OD = 1.956$ bei einer Abweichung von 2 %. Mittels einer Helberkammer (s. Abschnitt 2.5.2) wurden die Zellen in der Zellsuspension ausgezählt. Danach waren $8 \cdot 10^8$ Zellen/ml im Ansatz. Eine Dreifachbestimmung dieses Wertes ergab eine Abweichung von 3 %.

Es ergab sich somit für Ruhezellen in Reaktionspuffer 1 ein Verhältnis von 1:1 für BFM:OD und von 4.44 für das Verhältnis OD:BTM. Dieser Wert wurde später für die Berechnung der Biotrockenmassekonzentration in den Versuchen mit immobilisierten Zellen bei bekannter Biofeuchtmasskonzentration verwendet.

3.3.3 Bestimmung des pH-Optimums der Enzymreaktionen

Zur Bestimmung des pH-Optimums der jeweiligen Enzymreaktion wurde, wie unter 2.6.2 beschrieben, sowohl das pH-Optimum für die spezifische Aktivität der Nitrilhydratase als auch der Amidase bei einer jeweiligen Substratkonzentration von 100 mM bestimmt. Es ergaben sich die in Abbildung 3.4 dargestellten Aktivitätsverläufe für die Anfangsreaktionsraten der Enzyme.

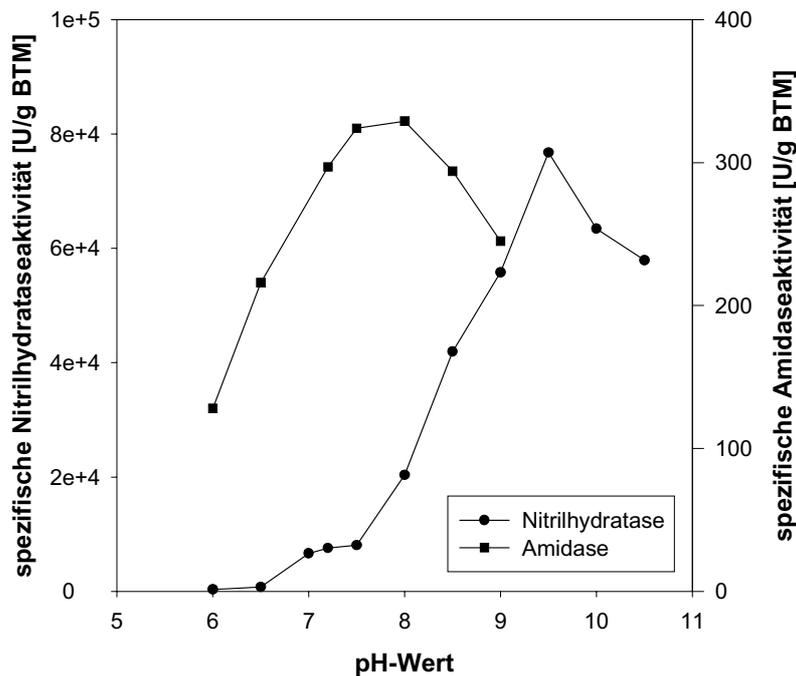


Abbildung 3.4: Darstellung der Abhängigkeit der Anfangsreaktionsrate der Nitrilhydratase und der Amidase in freien, ruhenden Zellen von dem pH-Wert. Die Bedingungen für die Reaktion waren die des Standardaktivitätstests (s. Abschnitt 2.5.8) bei 26 °C. Die eingesetzte Substratkonzentration für die Reaktionen lag bei 100 mM Propionitril für die Nitrilhydratasereaktion bzw 100 mM Propionamid für die Amidasereaktion unter Verwendung eines 50 ml Glasreaktors mit 25 ml Mediumsvolumen. Die Zellen wurden vor Beginn des Versuches für 5 min bei dem jeweiligen pH-Wert vorinkubiert und dann die Reaktion gestartet.

Die spezifische Aktivität der Nitrilhydratase zeigte ein ausgeprägtes Optimum bei pH 9.5, war aber noch bei pH 10.5 aktiv. Bei pH 6 war sie inaktiv.

Die spezifische Aktivität der Amidase zeigte ein eher breites Optimum zwischen pH 7.2 und pH 8.5. Die Amidase war, anders als die Nitrilhydratase, auch noch bei pH 6 aktiv.

Ein parallel angesetzter Versuch ohne Zellzugabe zeigte keine Zersetzung des Substrates bei den jeweiligen pH-Werten und Reaktionszeiten.

Für die Gesamtreaktion wurde ein pH-Wert angestrebt, der für die Amidase, dem weniger aktiven Enzym also, geeignet war. Aufgrund der vorliegenden Daten (s. Abbildung 3.4) konnte dieser somit kein pH-Wert oberhalb von pH 8 sein. Zur Verwendung im Standardaktivitätstest wurde daher ein pH-Wert von 7.2 gewählt, da auch das Endprodukt der Gesamtreaktion, Ammoniumpropionat, in diesem Bereich pufferte. Ein anderer pH-Wert würde bei hohen Produktkonzentrationen zu einer pH-Verschiebung während der Reaktion führen oder zumindest einen höheren Regelungsaufwand für den angestrebten Prozeß bedeuten. Zudem würde für die spätere Aufarbeitung des Produkts eine Titration notwendig werden, was eine zusätzliche Salzmenge anfallen lassen würde. Außerdem wurden Versuche zur Stabilität der Nitrilhydratasereaktion bei Lagerung bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt (s. Abschnitt 3.3.5) und es konnte eine wesentlich schlechtere Stabilität bei pH 9 gegenüber pH 7.2 festgestellt werden.

3.3.4 Bestimmung des Temperaturoptimums der Enzymreaktionen

Die optimale Temperatur für die Reaktionen der beiden Enzyme im Ganzzellsystem wurde wie unter 2.6.1 beschrieben bestimmt. Dazu wurden die Anfangsreaktionsraten der jeweiligen Enzymreaktionen bei der untersuchten Temperatur im Standardaktivitätstest ermittelt. Die erhaltenen spezifischen Reaktionsraten wurden in Abbildung 3.5 gegen die Zeit aufgetragen.

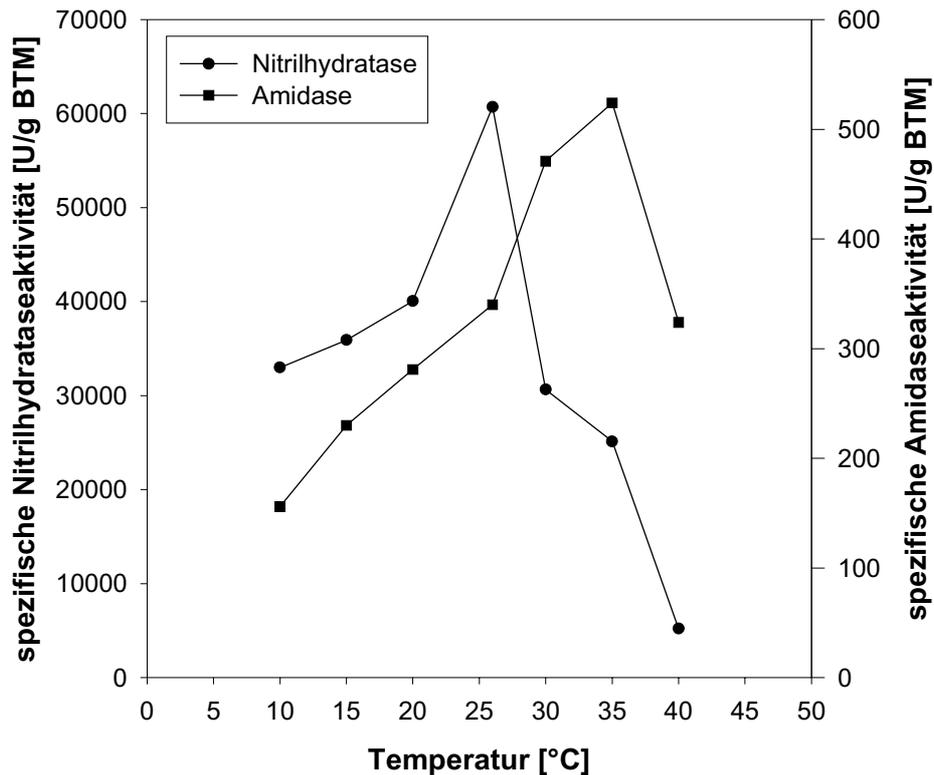


Abbildung 3.5: Darstellung der Abhängigkeit der Anfangsreaktionsrate der Nitrilhydratase und der Amidase in freien, ruhenden Zellen von der Temperatur. Die Bedingungen für die Reaktion waren die des Standardaktivitätstests (s. Abschnitt 2.5.8) bei pH 7.2. Die eingesetzte Substratkonzentration für die Reaktionen lag bei 100 mM Propionitril für die Nitrilhydratasereaktion bzw. 100 mM Propioniamid für die Amidasereaktion unter Verwendung eines 50 ml Glasreaktors mit 25 ml Mediumvolumens. Die Zellen wurden vor Beginn des Versuches für 5 min bei der jeweiligen Temperatur vorinkubiert und dann die Reaktion gestartet.

Es war für die Nitrilhydratasereaktion ein deutliches Maximum in der Anfangsreaktionsrate bei 26 °C festzustellen. Bei Temperaturen darüber ging die Anfangsreaktionsrate zurück. Dabei war in den auf 30 °C temperierten Ansätzen zu beobachten, daß die Reaktion nicht bis zum Vollumsatz ablief, sondern nur zu 50 % oder weniger. Die Reaktion blieb dann stehen, was darauf zurückgeführt wurde, daß die Nitrilhydratase innerhalb weniger Minuten bei dieser Temperatur vollständig inaktivierte. Das Optimum der Amidasereaktion lag bei 35 °C, wobei hier die Reaktion noch vollständig ablief. Bei Temperaturen oberhalb 40 °C nahm die Anfangsreaktionsrate der Amidase deutlich ab.

3.3.5 Einfluß der Temperatur auf die Enzymaktivität ruhender Zellen bei Lagerung

Um den Einfluß der Temperatur bei der Lagerung des Biokatalysators auf dessen Anfangsreaktionsrate zu bestimmen, wurde dieser über einen Zeitraum von maximal 14 Tagen bei verschiedenen Temperaturen in Reaktionspuffer 1 gelagert und die Aktivität mittels des Standardaktivitätstests nach definierten Zeitpunkten bestimmt. Es ergaben sich die in Abbildung 3.6 dargestellten Inaktivierungskonstanten bei verschiedenen Temperaturen über die Zeit (s. 2.6.3):

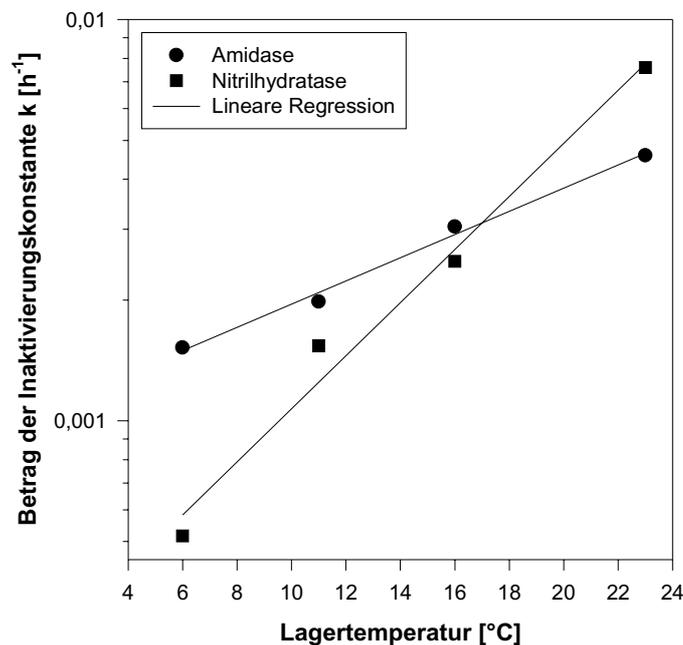


Abbildung 3.6: Auftragung des Betrages der Inaktivierungskonstanten k der Nitrilhydratase und der Amidase über der jeweiligen Lagertemperatur. Die ruhenden Zellen wurden in Reaktionspuffer 1 bei der jeweiligen Temperatur gelagert und die Anfangsreaktionsrate der Enzyme nach 0, 24, 50, 100, 170 und 270 h Lagerung mit dem Standardaktivitätstest bestimmt. Die Inaktivierungskonstanten wurden durch eine lineare Regression im Programmpaket SigmaPlot (Jandel Scientific) erhalten.

Aus der Abbildung 3.6 ist zu erkennen, daß bei einer Temperatur von etwa 17 °C beide Enzyme während der Lagerung in etwa gleich schnell inaktivierten, mit einer Halbwertszeit von 216 h. Die Nitrilhydratase war, im Gegensatz zur Amidase, bei höheren Temperaturen instabiler, wie bereits die Messungen zum Temperaturoptimum gezeigt hatten mit einer Halbwertszeit bei 23 °C von 86 h. Bei Temperaturen unter 10 °C war die Nitrilhydratase deutlich stabiler als die Amidase. Beide Enzyme zeigten keine Aktivitätsabnahme bei Lagerung der Biomasse bei –20 °C über einen Zeitraum von mehreren Monaten.

Aufgrund der Versuche zum pH-Optimum (s. Abschnitt 3.3) und den dabei erhaltenen hohen Aktivitäten der Nitrilhydratase bei pH-Werten um pH 9, wurde der Einfluß der Lagerung bei diesem pH-Wert untersucht. Es ergab sich der in Abbildung 3.7 dargestellte Aktivitätsverlauf für die Anfangsreaktionsrate der Nitrilhydratase über die Lagerzeit.

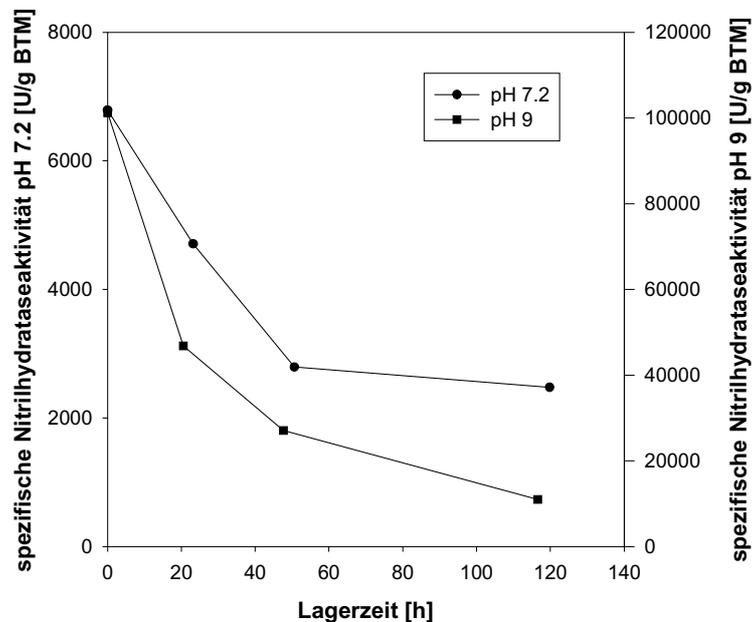


Abbildung 3.7: Auftragung der Anfangsreaktionsrate der Nitrilhydratase bei Lagerung des Biokatalysators bei Raumtemperatur über den angegebenen Zeitraum in Reaktionspuffer 1 bei dem angegebenen pH-Wert. Die Anfangsreaktionsrate wurde unter Verwendung des Standardaktivitätstests bei dem jeweiligen pH-Wert ermittelt.

Es ist zu erkennen, daß bei einer Lagertemperatur von 21 °C (Raumtemperatur) die Abnahme der Aktivität der Nitrilhydratase bei den verglichenen pH-Werten von pH 7.2 und pH 9 wesentliche Unterschiede zeigt. Bei dem verwendeten pH-Wert von pH 9 nahm die Aktivität der Nitrilhydratase wesentlich schneller ab mit einer Halbwertszeit von 90 h, als bei dem parallelen Ansatz mit pH 7.2 mit einer Halbwertszeit von 150 h. Die Anfangsreaktionsraten der Nitrilhydratase lagen bei pH 7.2 bei 6700 U/g BTM und bei pH 9 bei 100000 U/g BTM. Am Ende des Versuches zeigte die Nitrilhydratase des Ansatzes mit pH 7.2 etwa 75 % Verlust bezüglich der Anfangsreaktionsrate, der Ansatz mit pH 9 einen Verlust von 90 %. Somit hatte der hohe pH-Wert bei der Lagerung der Biomasse ebenfalls einen erniedrigenden Einfluß auf die Lagerstabilität der Nitrilhydratase, ebenso wie die Lagertemperatur.

3.3.6 Gefriertrocknung der Zellen

Um die Lagerstabilität bei Temperaturen oberhalb des Gefrierpunktes zu verbessern, wurde untersucht, ob die Zellen gefriergetrocknet werden können und dabei aktiv bleiben.

Zur Gefriertrocknung der Zellen wurde wie unter 2.6.7 beschrieben vorgegangen. Nach einer Lagerzeit des Lyophilisats von 14 Tagen bei 4 °C wurde ein Standardaktivitätstest in Reaktionspuffer 1 mit den Zellen durchgeführt. Die Anfangsaktivität der Fällungen für die Nitrilhydratase lag bei 7980 U/g BTM und die der Amidase bei 388 U/g BTM, was für die Nitrilhydratase eine Restaktivität von etwa 80 % bedeutete. Die Amidase zeigte hingegen keine Verluste an Aktivität durch die Lyophilisierung. Es war zu beobachten, daß die gefriergetrocknete Biomasse bei Einsatz in Reaktionspuffer 1 wieder rehydrierte und kein Protein in der Zellsuspension nachweisbar war, welches möglicherweise aufgrund entstandener Schädigungen der Zellmembranen bei der Gefriertrocknung aus den Zellen ausgetreten wäre.

3.3.7 Untersuchung zur Lichtabhängigkeit der Nitrilhydratasereaktion

Wie in der Literatur beschrieben (Endo et al 1999), zeigte auch die in dieser Arbeit untersuchte Nitrilhydratase eine Abhängigkeit in der Reaktionsrate davon, ob die Biomasse vor und während des Aktivitätstests im Dunkeln aufbewahrt wurde oder nicht. Dazu wurden, wie unter 2.6.5 beschrieben, zwei parallele Standardansätze (s. Abschnitt 2.5.8) mit entsprechender Belichtung im Glasreaktor bzw. mit einem vollständig abgedunkelten Reaktor für 60 min gerührt und dann die Reaktion durch Nitrilzugabe gestartet. Es war zu beobachten, daß der Ansatz ohne Belichtung nur 60 % der Anfangsreaktionsrate des belichteten Ansatzes bezüglich der Nitrilhydratasereaktion zeigte. Die Amidase zeigte hingegen eine praktisch unveränderte Anfangsreaktionsrate. Die Nitrilhydratase wurde somit zwar gehemmt, allerdings nicht vollständig inhibiert, wie von Endo et al. beschrieben. Daher wurde besonders darauf geachtet, alle Reaktionen bei geeigneter Beleuchtung durchzuführen. Dazu genügte offensichtlich die Exposition der Zellsuspensionen gegenüber normalem Raumlicht.

3.3.8 Umsetzung von Propionitril bei hohen Substratkonzentrationen und im Zweiphasensystem

Aus wirtschaftlichen Gründen wäre eine Umsetzung von sehr hohen Propionitrilkonzentrationen von Interesse. Das Substrat Propionitril ist jedoch nur bis zu einer Konzentration von 1.5 M in Wasser löslich. Bei höheren Konzentrationen bildet sich eine zweite organische Phase, während die Reaktionsprodukte Propionamid und Ammoniumpropionat wesentlich besser löslich sind. Daher wurde die Umsetzung von Propionitril bei hohen Konzentrationen und im Zweiphasensystem untersucht. Dafür wurden Umsetzungen mit freien, lyophilisierten und in Kalziumalginat immobilisierten Zellen durchgeführt.

3.3.8.1 Umsetzung mit freien Zellen

In einem unter Abschnitt 2.6.4.2 beschriebenen Versuch wurden Nitrilkonzentrationen im Standardansatz gewählt, die nicht mehr löslich waren, sondern zur Bildung einer zweiten, organischen Phase über der wässrigen Reaktionslösung führten. Dies war ab einer Konzentration von 1.5 M Propionitril in Lösung der Fall.

Bei einem Standardansatz mit freien Zellen in einem solchen 2-Phasen-System war zu bemerken, daß nur etwa 50 mM Propionitril umgesetzt wurden und dann die Nitrilhydratasereaktion stoppte. Zudem kam es zu einer Pigmentextraktion der Zellen durch die organische Phase, was zu einem Ausbleichen der sonst leicht orangen Suspension und einer Gelbfärbung der Nitrilphase führte.

3.3.8.2 Umsetzung mit lyophilisierten freien Zellen

Es wurden auch lyophilisierte Zellen (s. Abschnitt 2.6.7) zur Umsetzung von hohen Propionitrilkonzentrationen im Zweiphasensystem eingesetzt. Dazu wurde in Eppendorfreaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg, D) reines Propionitril und mehrere Wasser/Propionitril Mischungen (1:100, und 1:10 v/v und im stöchiometrischen Reaktionsverhältnis 4:1 mol/mol) vorgelegt. Es wurden jeweils 0.3 g Lyophilisat zugegeben und dann die Reaktion, wie in Abschnitt 2.6.4.3 beschreiben, durchgeführt. Es wurde in den Ansätzen mit 1:10 (v/v) und 4:1 (mol/mol) ein Umsatz von 5-10 mM Propionitril zu Propionamid gemessen. Die übrigen Ansätze zeigten keinen Umsatz. In allen Ansätzen konnten die Zellen nicht frei suspendiert werden, sondern verklumpte zu kugeligen Agglomeraten mit einem Durchmesser von etwa 5 mm. Dabei kam es zu einer Extraktion der Zellwandpigmente der Mikroorganismen in die Nitrilphase.

Es war also weder bei freien noch bei lyophilisierten Zellen möglich, Propionitril im Zweiphasensystem vollständig umzusetzen.

3.3.8.3 Umsetzung mit alginatimmobilisierten Zellen

Eine Immobilisierung von Zellen führt häufig zu einer Stabilisierung gegenüber Lösungsmitteln. Daher wurde nach der Immobilisierung der Zellen in Kalziumalginat (s. Abschnitt 2.7.1) das Immobilisat in einem Zweiphasensystem mit Propionitril als organische Phase eingesetzt.

Die Umsetzung mit alginatimmobilisierten Zellen ergab folgenden Verlauf der Konzentrationen über die Zeit:

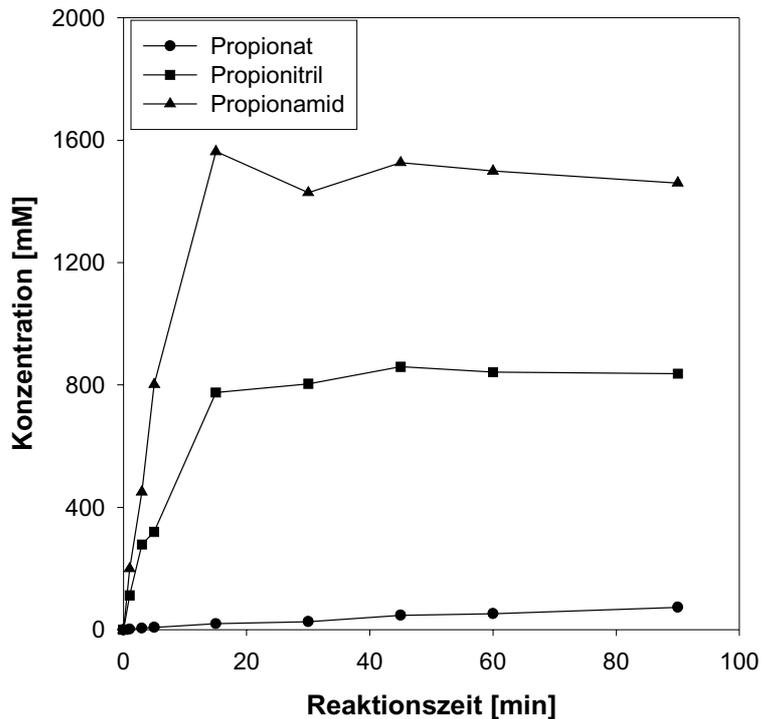


Abbildung 3.8: Umsetzung von 2.4 M Propionitril in einem wässrigen Zweiphasensystem mit kalziumalginatimmobilisierter Biomasse. Es wurden unter Standardbedingungen (26 °C, pH 7.2) 2.4 M Propionitril mit 10 g Immobilisat und einer Biotrockenmassekonzentration von 11 g/l in einem Reaktionsvolumen von 28 ml umgesetzt, wobei die organische Phase umgesetzt wurde. Die gemessenen Konzentrationen in der wässrigen Phase wurden über der Reaktionszeit aufgetragen.

Es war festzustellen, daß die gesamte Stoffmenge innerhalb von 15 min langsam in die wässrige Phase nachgelöst wurde. Der auffällige Anstieg der Nitrilkonzentration in der wässrigen Phase auf 800 mM wurde dabei sowohl durch die Nachlösegeschwindigkeit des Substrates als auch die gleichzeitige Umsetzung zu Propionamid beeinflusst. Allerdings konnte auch mit immobilisierten Zellen das Propionitril nicht vollständig umgesetzt werden. Die Nitrilkonzentration in der Lösung lag am Ende bei 800 mM, die Propionamidkonzentration bei 1.6 M. Die Reaktion der Nitrilhydratasereaktion kam bereits nach etwa 15 min zum Erliegen. Um die Reaktion der Amidase zu untersuchen, wurde der Ansatz weitere 20 h gerührt und die letzte Probe nach 20 h Reaktionszeit gezogen. Es war dabei festzustellen, daß es keine Veränderung mehr in der Nitrilkonzentration gab, die Amidase jedoch konstant weiterreagierte und das bereits gebildete Propionamid zur Säure hydrolysierte. Das Stoppen der Nitrilhydratasereaktion könnte dabei auch auf eine vollständige Inhibition durch das Substrat und besonders die gebildeten Produkte zurückgeführt werden. Die beobachtbare Reaktionsrate zu Beginn des Versuches lag für die Nitrilhydratasereaktion bei 13400 U/g BTM und für die Amidase bei 80 U/g BTM.

3.3.8.4 Umsetzung von 1 M Propionitril mit freien Zellen

Aufgrund der in Abschnitt 3.3.8.1 festgestellten Probleme bei einem Einsatz der freien Zellen im Zweiphasensystem wurde versucht, Propionitrilkonzentrationen knapp unterhalb der Löslichkeitsgrenze umzusetzen. Dazu wurden, wie in Abschnitt 2.6.6 beschrieben, verschiedene Biomassekonzentrationen bis zu 100 g/l im Standardaktivitätstest verwendet. Es ergab sich der in Abbildung 3.9 dargestellte Verlauf der Propionamidkonzentration mit der Reaktionszeit:

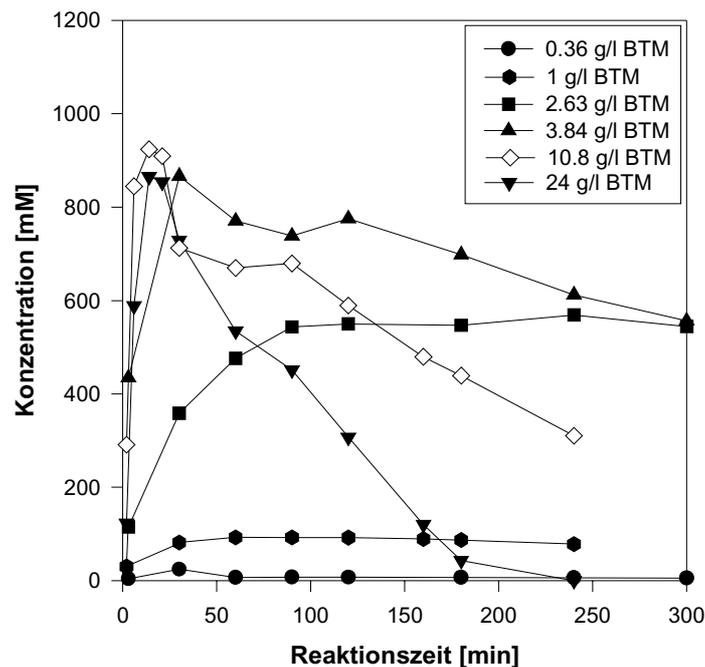


Abbildung 3.9: Umsetzung von 1 M Propionitril unter den Bedingungen des Standardaktivitätstests bei verschiedenen Biomassekonzentrationen. Dargestellt wurde der zeitliche Verlauf des Zwischenproduktes Propionamid über die Reaktionszeit für die Umsetzung mit der entsprechenden Biotrockenmassekonzentration.

Es war zu erkennen, daß bei geringen Katalysatorkonzentrationen die Reaktion stehenblieb und erst ab einer Konzentration von 3.84 g/l BTM ein Umsatz bis zur Propionsäure erfolgte. Bei einer Konzentration von 24 g/l BTM erfolgte innerhalb von 250 min ein Vollumsatz.

Es war also möglich, mit freien Zellen bei einer entsprechenden Menge an Katalysator Konzentrationen von 1 M Propionitril im Ansatz zu verseifen, ohne daß die Zellen dabei lysierten. Vermutlich war der direkte Kontakt der Zellen mit der organischen Phase ein Grund für die nicht vollständige Reaktion, und führte zu deren Inaktivierung. Wodurch die Reaktion bei geringen Katalysatorkonzentrationen und offensichtlich noch verseifbaren Mengen an Nitril in Lösung zum Erliegen kam, konnte allerdings nicht geklärt werden.

Eine eingehende Berechnung der genauen Parameter für die Umsetzung erfolgt in Abschnitt 3.6.

3.4 Immobilisierung der Biomasse

Eine Immobilisierung der Biomasse hat gegenüber der Verwendung von freien, ruhenden Zellen mehrere Vorteile in der Anwendung. Zum Einen eine einfache Abtrennung aus der Reaktionslösung und Wiederverwendbarkeit des Biokatalysators, zum Anderen zeigte sich eine stabilisierende Wirkung auf die Enzymaktivität, wie sie unter Abschnitt 3.3.8.3 gezeigt werden konnte.

Für die Immobilisierung sollte eine kostengünstige und effiziente Methode entwickelt werden, die, bei Erhalt einer hohen Restaktivität der Zellen, diese einfacher einsetzbar machen sollte. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Einschlußmethoden verwendet und miteinander verglichen.

3.4.1 Immobilisierung der Biomasse in Kalziumalginat

Die Immobilisierung der Biomasse in Kalziumalginat wurde wie unter Abschnitt 2.7.1 beschrieben durchgeführt. Das Immobilisat bestand nach dem Aushärten aus nahezu sphärischen Partikeln, die eine sehr gute Stabilität gegenüber den durch die Rührung mit einem Magneten im Standardaktivitätstest (s. Abschnitt 2.5.8) auftretenden Abriebs- und Scherkräften zeigten. Die Partikel wurden nach der Immobilisierung ausgesiebt, wobei bei 90 % der erhaltenen Partikel Korngrößen zwischen 0.8 und 1 mm bestimmt wurden. Weitere 5 % waren zwischen 1 und 1.4 mm groß, alle übrigen größer oder kleiner als die angegebenen Durchmesser.

Durch die schonende und schnelle Methode eignete sich diese Art der Immobilisierung zur Herstellung von Immobilisat für weitere Versuche zur Reaktionsführung.

Um zu untersuchen, welchen Einfluß die Immobilisierung auf die beobachtbare Anfangsaktivität hatte, wurden Immobilisate mit verschiedenen Durchmessern aus einer Zellsuspension mit Alginat (8.45 g BFM in einem Gesamtvolumen von 67 ml) wie unter 2.7.1 beschrieben hergestellt. Durch Aussieben wurden Immobilisatperlen mit einem Durchmesser von 0.9, 1.8 und 2.5 mm gewonnen. Es wurden immer 2 ml des jeweiligen Immobilisates im Standardaktivitätstest (s. Abschnitt 2.5.8) eingesetzt. Da durch die Verwendung derselben Zellsuspension und die mengenmäßige Äquivalenz bezüglich des Immobilisats die jeweiligen Standardaktivitätsansätze gleiche Zellmengen enthielten, waren die erhaltenen Anfangsaktivitäten der untersuchten Nitrilhydratasereaktion nur vom Durchmesser der Immobilisatperlen beeinflusst. In Abbildung 3.8 wurden die gemessenen Anfangsaktivitäten der Nitrilhydratase bei verschiedenen Durchmessern der Immobilisatperlen dargestellt.

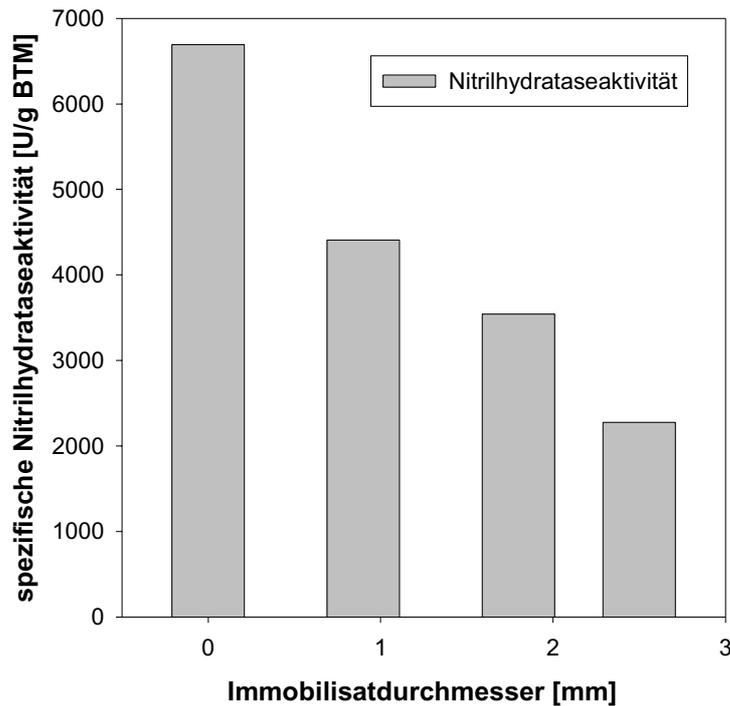


Abbildung 3.10: Auftragung der Anfangsaktivität der Nitrilhydratase bei freien Zellen (Immobilisatdurchmesser = 0) und bei Kalziumalginatimmobilisaten mit verschiedenen Durchmessern im Standardaktivitätstest. Die Biomassekonzentration in den jeweiligen Umsetzungen waren vergleichbar unter Verwendung einer Immobilisatmenge von 2 g im Standardaktivitätstest mit einer Biotrockenmassekonzentration von 28 mg/g Immobilisat.

Es war ein deutlicher Rückgang der Anfangsreaktionsrate der Nitrilhydratase in Abhängigkeit von dem Durchmesser des Immobilisates zu verzeichnen. Da alle drei Immobilisate gleich hergestellt wurden, war der Unterschied in deren Aktivitäten nicht durch eine einfache Inaktivierung während des Polymerisierungsprozesses zu erklären. Eine Abschätzung, ob die gegenüber den frei suspendierten Zellen wesentlich niedrigere Reaktionsrate auf eine Stofftransportlimitierung zurückzuführen war, wurde in Abschnitt 3.6.2.4 vorgenommen.

Aufgrund der dabei erhaltenen Daten konnte gezeigt werden, daß im Falle eines Einschusses der Zellen in Kalziumalginat eine Stofftransportlimitierung vorlag. Somit war auch der Rückgang der Aktivität des kleinsten Immobilisates bezüglich der freien Zellen vermutlich nicht auf eine Inaktivierung der Zellen während der Immobilisierung sondern auf die beschriebene Limitierung zurückzuführen.

In einem weiteren Versuch wurde das Alginatimmobilisat bezüglich seiner Wiederverwendbarkeit untersucht.

Dazu wurde wie unter 2.7.1 beschrieben ein Alginatimmobilisat mit 1.25 g BFM in 50 ml Immobilisatvolumen hergestellt. Dann wurde der volumenmäßig verdoppelte Standardaktivitätstest (s.

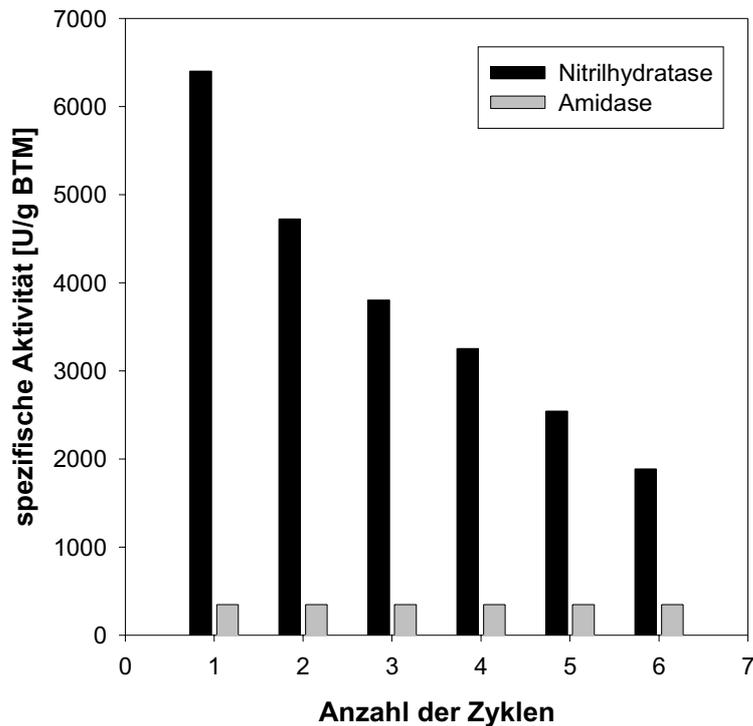


Abbildung 3.11: Änderung der Anfangsreaktionsrate der Nitrilhydratase und der Amidase bei wiederholtem Einsatz von kalziumalginatimmobilisierter Biomasse im Standardaktivitätstest. Es wurde eine Biotrockenmassekonzentration von 0.6 g/l für die jeweiligen Propionitrilumsetzungen verwendet. Der Durchmesser des verwendeten Immobilisates lag bei 0.9 mm.

Abschnitt 2.5.8) mit 4 ml Immobilisatvolumen ohne Entnahme des Katalysators durchgeführt, was einer BTM von 0.4 g/l im Ansatz entsprach. Nach 60 min Reaktionszeit wurden die Immobilisatperlen gewaschen und erneut für den Standardtest verwendet. Es ergaben sich bei einer mehrfachen Wiederverwendung der Zellen die in Abbildung 3.11 dargestellten Anfangsreaktionsraten.

Es ist zu erkennen, daß sich die Anfangsreaktionsrate der Nitrilhydratase für die Umsetzung von Propionitril mit der Zahl der Umsätze verringerte. Dabei war die Nitrilhydratase mit einer beobachtbaren Reaktionsrate von 5814 U/g BTM wesentlich aktiver als die Amidase, aber auch instabiler, da nach sechs Umsetzungen nur noch 30 % Restaktivität nachweisbar waren. Die Amidase blieb über die Reaktionszeit konstant aktiv mit einer Aktivität von 348 U/g BTM. Es konnte gezeigt werden, daß die mehrfache Wiederverwendung des Immobilisates im Standardansatz möglich war.

Die Aktivitätsverluste der Nitrilhydratase wurden dabei nicht durch eine Ausschwemmung der Zellmasse aus dem Reaktor während der Reaktion oder durch die der Reaktion nachgeschalteten Waschschritte verursacht, da die Anfangsreaktionsrate der Amidase über die gesamte Zeit nahezu konstant blieb. Allerdings könnte durch das Waschen des Immobilisates und die damit verbundene schnelle Änderung der Osmolarität eine Schädigung der Zellen aufgetreten sein. Der Einfluß der Inaktivierung bei der Temperatur des Standardaktivitätstestes von 26 °C hatte dabei vermutlich einen

eher geringen Einfluß, da das Immobilisat nur für insgesamt 6 h bei dieser Temperatur eingesetzt wurde und die Halbwertszeit bei 23 °C bei ruhenden Zellen bei mehr als 100 h lag (s. Abschnitt 3.3.5). Das Immobilisat zeigte eine sehr gute Prozeßstabilität im Bezug auf Abrieb oder auch Auflösung der Polymermatrix.

3.4.2 Repeated Batch mit alginatimmobilisierten Zellen

Um festzustellen, ob die in den Versuchen zur Wiederverwendung der immobilisierten Biomasse festgestellte Inaktivierung der Nitrilhydratase (s. Abschnitt 3.5.2) auf einen schnellen proteolytischen Abbau des Enzymes oder eine Inaktivierung durch die Propionitrilverseifung zurückzuführen war, wurde untersucht, ob sich die Konzentration der Nitrilhydratase in mehrfach wiederverwendeten Zellen im Vergleich zu der von frischen Zellen veränderte.

Dazu wurde mit kalziumalginatimmobilisierten Zellen ein absatzweiser Ansatz mit einer pulsweisen Zugabe von Propionitril durchgeführt. Durch diese Art der Prozeßführung konnte innerhalb von 40 min eine Konzentration von 600 mM Propionamid erhalten werden, was der umgesetzten Substratmenge bei einem sechsfachen Einsatz der immobilisierten Zellen entsprach. Danach wurde das Immobilisat gewaschen und nacheinander 2 weitere Male in einem Standardansatz zur Bestimmung der Anfangsreaktionsrate der Nitrilhydratase verwendet.

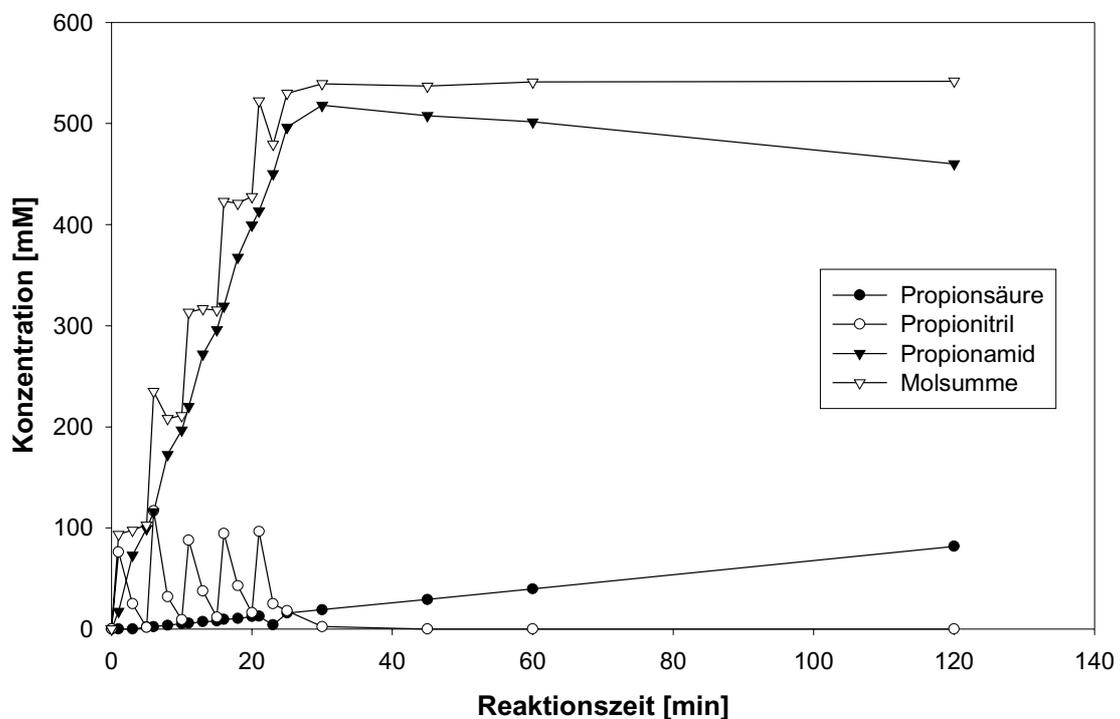


Abbildung 3.12: Verlauf der Konzentrationen bei einer wiederholten Zugabe von Propionitril zu einem Standardansatz zur Propionitrilverseifung mit kalziumalginatimmobilisierter Biomasse. Das Immobilisat wurde nach der ersten Zugabe von Propionitril auf die Nitrilhydrolyseaktivität hin untersucht.

Die Immobilisierung der Biomasse erfolgte wie unter 2.7.1 beschrieben. Dazu wurde 2.94 g BFM in insgesamt 23 g Immobilisat eingesetzt. Es wurde ein dem Volumen nach doppelter Standardansatz unter den beschriebenen Bedingungen (s. Abschnitt 2.5.8) mit insgesamt 4 ml Immobilisat angesetzt, was einer Biotrockenmasse von 2.2 g/l im Ansatz entsprach. Der Verlauf der Konzentrationen der Substrate und Produkte bei der Umsetzung von Propionitril mit den immobilisierten Zellen wurde in Abbildung 3.12 dargestellt.

Es war zu erkennen, daß innerhalb von 5 min die zum Start zugegebene Propionitrilkonzentration von 100 mM Propionitril in Lösung umgesetzt wurde, was einer spezifischen Aktivität der Nitrilhydratase von 9500 U/g BTM entsprach. Das weiter pulsweise zugegebene Nitril wurde dann ebenfalls vollständig zu Amid umgesetzt. Die Amidase arbeitete wesentlich langsamer, aber ebenfalls mit konstanter Aktivität von 136 U/g BTM über die gesamte Reaktionszeit.

Die Immobilisatperlen wurden nach der Reaktionszeit von 120 min gewaschen. An 2 ml der so behandelten Zellen wurden zwei aufeinanderfolgende Standardaktivitätstests durchgeführt. Das Immobilisat zeigte nach dem Ende des Versuchs bei zweimaliger Wiederverwendung der Zellen im Standardansatz eine Restaktivität von ca. 70 % im Vergleich mit der Anfangsreaktionsrate der Nitrilhydratase bei den frischen Zellen.

Um zu überprüfen, ob die Nitrilhydratase während den Umsetzungen proteolytisch abgebaut wurde, wurden die zur Propionitrilverseifung (s. Abb. 3.12) eingesetzten Immobilisatperlen, wie im Abschnitt 2.8.4 beschrieben, aufgelöst und die so erhaltenen Zellen aufgeschlossen.

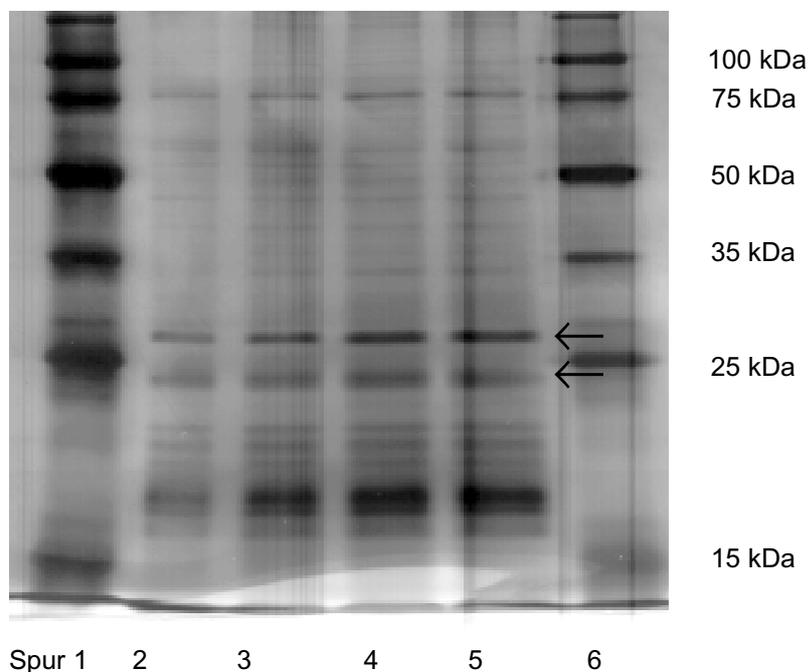


Abbildung 3.13: SDS-Gel verschiedener Rohaufschlüsse von *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002. Es wurden folgende Proben aufgetragen: Spur 1 und 6 Markerprotein; Spur 2 und 3 Rohaufschluß der wiederverwendeten Zellen; Spur 4 und 5 Rohaufschluß von frischen Zellen. Die beiden Untereinheiten der Nitrilhydratase (α - Untereinheit 24 kDa, β -Untereinheit 28 kDa) sind mit Pfeilen markiert.

Über eine SDS-Gelelektrophorese konnte das Bandenmuster der Proteine eines Rohaufschlusses von frischen Zellen mit dem eines Rohaufschluß der mehrfach wiederverwendeten Zellen des Immobilisats verglichen werden. Es ergab sich die Abbildung 3.12 des SDS-Geles mit den jeweiligen Aufschlüssen. Aus den Banden des Geles war zu ersehen, daß die Nitrilhydratase aufgrund ihrer Menge eines der Hauptproteine im Rohaufschluß darstellte. Zudem ergaben sich durch die Auswertung und Quantifizierung der Banden mit dem Programmpaket Iagemaster keine signifikante Abnahme der prozentualen Menge an Nitrilhydratase in den Zellen durch Einsatz zur Verseifung des Substrates Propionitril im Vergleich mit dem Aufschluß der freien Zellen.

Es war in diesem Versuch festzustellen, daß die Inaktivierung der Nitrilhydratase hauptsächlich von der umgesetzten Menge an Propionitril abhing und dabei ein proteolytischer Abbau der Nitrilhydratase in den Zellen eine untergeordnete Rolle spielte. Auch bei dieser Prozeßführung war die Inaktivierung der Nitrilhydratase wesentlich schneller als die der Amidase, was mit der Abnahme der Nitrilhydrataseaktivität des Immobilisates bei Mehrfachverwendung vergleichbar war.

3.4.3 Immobilisierung der Biomasse mit Polyacrylamid

Eine weitere Immobilisierungsmethode für ruhende Zellen als Biokatalysator beruht im Gegensatz zu den ionischen Bindungen bei Kalziumalginat auf dem Einschluß der Zellen in einem kovalent vernetzten Gel. Diese Methode des Zelleinschlusses benötigte daher keine zusätzlichen Salze zur Stabilisierung der Polymermatrix.

Der Einschluß der Biomasse erfolgte dazu wie unter 2.7.2 beschrieben. Dabei wurde festgestellt, daß das Verhältniss von Acrylamid zu Bisacrylamid einen starken Einfluß auf die Aktivität der Zellen hatte (s. Abbildung 3.14).

Zudem war eine Temperaturerhöhung während der Immobilisierung festzustellen. Bei einem ungekühlten Ansatz zur Immobilisierung stieg die Temperatur des Ansatzes durch die Polymerisationsreaktion bis auf 30 °C und mehr, was eine Beeinträchtigung der Anfangsreaktionsraten der Enzyme, besonders der temperaturempfindlichen (s. Abschnitt 3.3.5) Nitrilhydratase, zur Folge hatte. Eine Kühlung des Ansatzes auf Eis ließ die Polymerisationsreaktion jedoch auch nach 1 h Reaktionszeit nicht vollständig ablaufen und es war somit kein festes Gel zu erhalten. Dabei war auch durch eine Erhöhung der TEMED- und APS-Konzentrationen (s. Abschnitt 2.7.2) keine bessere oder vollständige Polymerisation möglich. Daher wurden die Ansätze 1 - 3 zuerst für 2 min (s. Abschnitt 2.7.2) vorpolymerisiert, um die radikalische Reaktion zu starten und schon einen gewissen Polymerisierungsgrad für das Gel zu erreichen. Dann wurde die Zellsuspension untergemischt und die Reaktionswärme mittels einer eiskalten Metallplatte abgeführt (s. Abschnitt 2.7.2).

Dabei entstand ein festes, etwa 1 mm dickes Gel, das aber gegenüber Scherbelastungen, wie sie z.B.

durch Rührung oder einfaches Biegen entstehen, sehr empfindlich war. Es zerfiel unter diesen Bedingungen in sehr kleine Trümmer, die keine einheitliche Form mehr aufwiesen. Die Anfangsreaktionsraten für die Nitrilhydratase und die Amidase bei den verschiedenen Ansätzen zur Immobilisierung der Biomasse wurde in Abbildung 3.14 dargestellt.

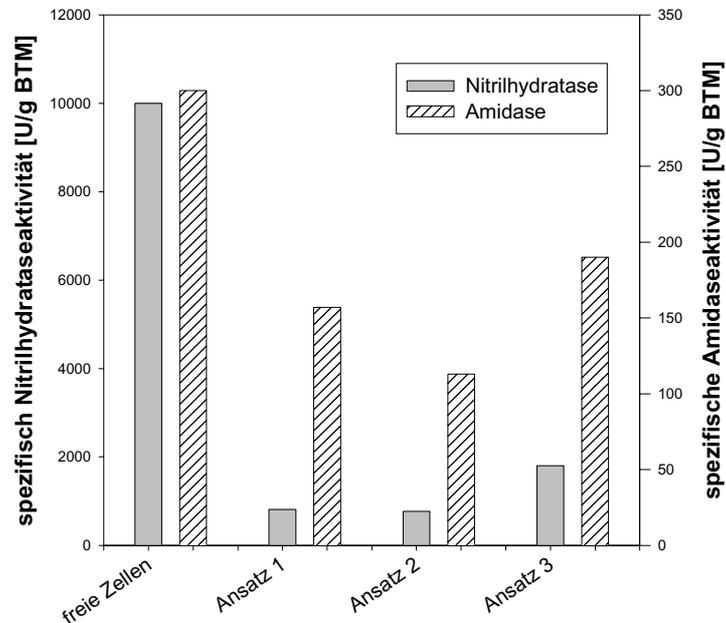


Abbildung 3.14: Anfangsreaktionsraten der Nitrilhydratase und der Amidase bei verschiedenen Acrylamid/Bisacrylamid- Konzentrationen in den Ansätzen zu Acrylamidimmobilisierung der ruhenden Zellen. Das Immobilisat wurde im Standardaktivitätstest eingesetzt und die Anfangsreaktionsraten bestimmt.

In den Ansätzen 1 - 3 wurde das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid variiert. Dabei lag im Ansatz 1 das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid bei 30:1, im Ansatz 2 bei 19:0.8 und im Ansatz 3 bei 9:1. Es war also eine Verbesserung der Ausbeute bezüglich der Nitrilhydrataseaktivität durch die Erniedrigung des Acrylamidanteils in der Polymerlösung festzustellen.

Das im Ansatz 3 erhalten Immobilisat wurde bei 4 °C gelagert. Dabei wurden im Abstand von 24 h und 72 h die Anfangsreaktionsraten der Enzymreaktionen gemessen, um eine mögliche Erhöhung der Zellaktivität festzustellen. Nach 24 h waren 2638 U/g BTM und nach 72 h 4775 U/g BTM für die Nitrilhydratase nachweisbar. Auch die Amidase zeigte nach 72 h 100 % der Ausgangsaktivität. Dabei ist eventuell ein Wachstum auf dem nicht vollständig polymerisierten Acrylamid als Aktivator denkbar, da der Lagerpuffer für das Immobilisat trotz Waschen des Polymers nach 72 h eine leichte Trübung durch nicht immobilisierte Zellen aufwies. Mit dem 72 h gelagerten Immobilisat wurden Untersuchungen zur Wiederverwendbarkeit des Immobilisates durchgeführt, wobei die Zellen mehrmals im Standardaktivitätstest wiederverwendet wurden.

Es ergaben sich die in Abbildung 3.15 dargestellten Anfangsreaktionsraten der Nitrilhydratase und der Amidase bei den acrylamidimmobilisierten Zellen.

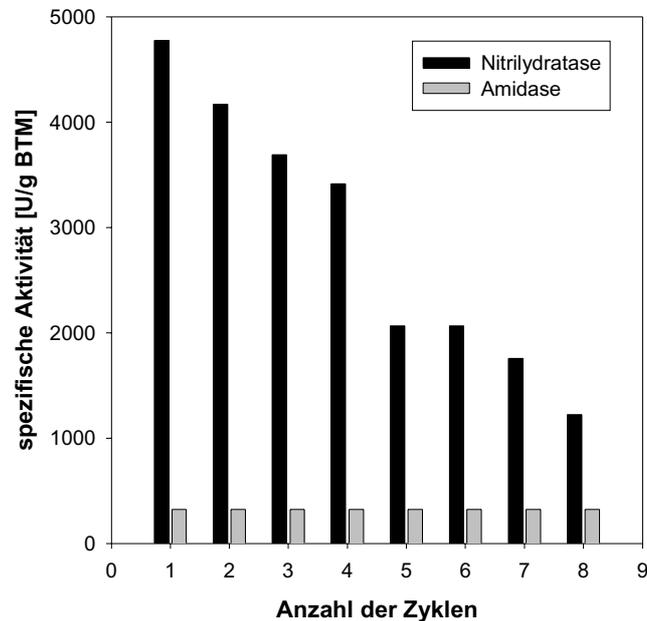


Abbildung 3.15: Änderung der Anfangsreaktionsrate der Nitrilhydratase und der Amidase bei wiederholtem Einsatz von acrylamidimmobilisierter Biomasse im Standardaktivitätstest. Es wurde eine Biotrockenmassekonzentration von 1.5 g/l als Immobilisat für die jeweiligen Propionitrilumsetzungen verwendet. Die Dicke der verwendeten Immobilisatstücke lag bei 0.9 mm, die Breite und die Länge bei jeweils 5 mm.

Wie zuvor bei den alginatimmobilisierten Zellen, war auch hier eine Abnahme der Aktivität der Nitrilhydratase über die Zahl der Einsatzzyklen festzustellen. Es war erkennbar, daß die Anfangsreaktionsrate der Nitrilhydratase sich mit der Zahl der Umsätze verringerte, die Aktivität der Amidase aber nahezu konstant blieb. Das Immobilisat zeigte auch nach insgesamt 9 h unter Rühren noch eine gute Stabilität und zeigte keinen Verlust an Zellen. Dennoch wurde, aufgrund der geringen Nitrilhydrataseaktivität nach Immobilisierung und der erschwerten Handhabung des Immobilisates in Form eines Geles, diese Einschlußmethode nicht weiter eingesetzt, zumal es auch zu keiner Verbesserung der Prozeßstabilität im Vergleich mit den kalziumalginatimmobilisierten Zellen kam.

3.5 Untersuchung zur Prozeßführung

Für die Umsetzung von Propionitril mit freien und immobilisierten Zellen sollten verschiedene Reaktortypen und Substratzugabestrategien auf ihre Eignung für einen Prozeß hin untersucht werden. Dabei kamen neben einem kontinuierlich betriebenen Rührreaktor und einem Festbettreaktor auch

eine absatzweise Prozeßführung mit kontinuierlicher Substratzugabe zum Einsatz. Besonders die Halbwertszeit der Reaktionsraten unter den entsprechenden Prozeßbedingungen sollten aus diesen Versuchen ermittelt werden. Desweiteren sollte die Stabilität der Immobilisatperlen untersucht werden.

3.5.1 Absatzweise Propionitrilverseifung mit freien Zellen

Wie im Abschnitt 3.3.8 beschrieben, war es nicht möglich, Substratkonzentrationen von mehr als 1.5 M Propionitril mit freien Zellen unter Verwendung einer absatzweisen Prozeßführung umzusetzen. Für einen kostengünstigen Prozeß ist dagegen eine möglichst hohe Produktkonzentration im Bioreaktor wünschenswert. Daher wurde untersucht, ob hohe Produktkonzentrationen bei einem absatzweisen Prozeß erreichbar waren, indem das Substrat Propionitril kontinuierlich während der Umsetzung zudosiert wurde. Hierfür wurden freie und immobilisierte Zellen eingesetzt. Da die maximale Reaktionszeit auch von der Halbwertszeit der einzelnen Enzyme abhängt, wurde aufgrund der Versuche zur Inaktivierung von ruhenden Zellen (s. Abschnitt 3.3.5) eine Reaktionstemperatur von 17°C gewählt. Bei dieser Temperatur zeigen beide Enzyme bei Lagerung im Reaktionspuffer etwa dieselbe Halbwertszeit. Die Konzentrationsverläufe von Substrat und Produkt für die Umsetzung mit freien Zellen über die Prozeßzeit sind in Abbildung 3.16 dargestellt.

Bei kontinuierlicher Zudosage von Propionitril wurden Umsetzungszeiten von bis zu 150 h erreicht. Nach 60 h Reaktionszeit war neben dem Endprodukt Ammoniumpropionat auch Propionamid in einer Konzentration von 20 mM nachweisbar. Bis zum Abstoppen des Zulaufs stieg die Konzentration bis 400 mM an. Auch Propionitril war nach 130 h nachweisbar. Dessen Endkonzentration lag nach 150 h Reaktionszeit und dem Abstoppen des Zulaufs bei 200 mM. Das Endprodukt Ammoniumpropionat wurde hierbei bis zu einer Konzentration von 3 M im Bulk angereichert.

Nach Zulaufstopp wurde die Reaktion weiter gemessen. Das Propionitril im Bulk wurde innerhalb von 30 h vollständig umgesetzt. Dabei errechnete sich für die Nitrilhydratase nach Abschaltung des Zulaufs und unter den im Reaktor vorliegenden Bedingungen eine spezifische Aktivität von 15 U/g BTM. Die Änderungen der Propionamidkonzentration war Aufgrund der Nitrilhydrolyse in diesem Zeitbereich so gering, daß die Aktivität der Amidase nicht bestimmbar war. Eine eingehende kinetische Beschreibung des Prozesses erfolgt in Abschnitt 3.6.2.1.

Die freien Zellen aus der Fed-batch Umsetzung wurden, wie unter Abschnitt 2.8.3.1 beschrieben, abzentrifugiert, gewaschen und erneut verwendet. Der Reaktionsverlauf (s. Abbildung 3.16b) für die zweite Umsetzung von Propionitril war in den ersten 30 h der Reaktion mit der des ersten Umsatzes nahezu identisch und ein Vollumsatz zur Propionsäure konnte bei der selben Zulauftrate erreicht werden. Propionamid und vor allem Propionitril waren jedoch früher nachweisbar, nach 33 h Reaktionszeit Propionamid und nach 60 h auch Propionitril. Der Zulauf wurde nach 100 h gestoppt und nach 190 h eine letzte Probe aus dem Ansatz entnommen. Die Reaktion war zu diesem Zeitpunkt vollständig bis zum Endprodukt Ammoniumpropionat abgelaufen und eine Endkonzentration von 2.7 M Ammoniumpropionat erreicht.

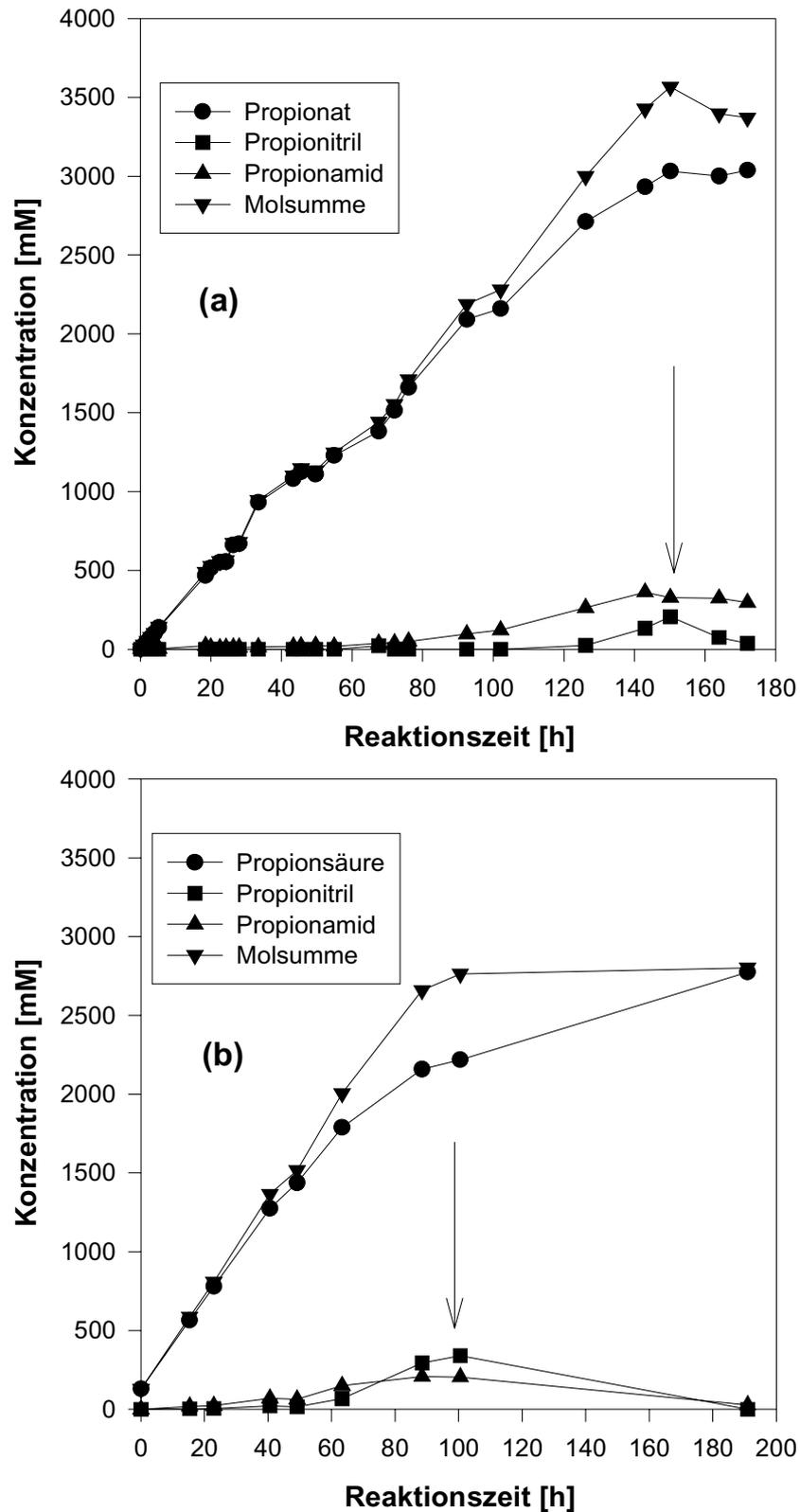


Abbildung 3.16: Darstellung der Konzentrations-Zeit-Verläufe bei einem absatzweisen Prozeß mit kontinuierlicher Zugabe von reinem Propionitril. Es werden die Verläufe für den Einsatz von freien Zellen bei 17 °C aufgezeigt, (a) erster Zyklus, (b) zweiter Zyklus mit den Zellen aus dem ersten Ansatz. Zu den mit Pfeilen markierten Zeitpunkten wurde der Zulauf gestoppt.

Es war also durch kontinuierliche Zudosage des Substrates eine wesentlich höhere Produktkonzentration erreichbar als bei den Batchansätzen, wobei die Nitrilkonzentration im Ansatz unterhalb der Löslichkeitsgrenze lag. Durch die Einstellung der Zulauftrate auf einen Wert, bei dem ein Vollumsatz erreicht wurde, war die spezifische Aktivität der Enzyme gering. Das lag darin begründet, daß nicht in einem Konzentrationsbereich der Substratsättigung gearbeitet wurde, sondern deutlich unterhalb des K_M -Wertes des jeweiligen Enzymes (s. Abschnitt 3.6.1.1). In diesem Konzentrationsbereich liegt eine lineare Abhängigkeit der Reaktionsrate von der Substratkonzentration vor.

Zudem ergaben sich bei der Wiederverwendung Probleme mit der Reinigung und Abzentrifugation der Zellen. Es kam bei der Zentrifugation durch Vorliegen eines weichen und schleimartigen Pellets zu Verlusten an Zellmasse. Ebenso wurde auch durch die Probennahme Zellmasse aus der Reaktion abgezogen, so daß eine dritte Wiederverwendung aufgrund der geringen Restzellmasse nicht möglich war.

3.5.2 Absatzweise Propionitrilhydrolyse mit kontinuierlicher Substratzudosage

Aufgrund der besseren Wiederverwendbarkeit immobilisierter gegenüber frei suspendierter Zellen, wurden die in 3.5.1 dargestellten Versuche mit kalziumalginatimmobilisierten Zellen durchgeführt. Es konnte dabei untersucht werden, ob auch mit immobilisierten Zellen Produktkonzentrationen über 1.5 M erhalten werden können. Es wurden die in den Abbildungen 3.17a, b und c dargestellten Konzentrations/Zeitverläufe aufgenommen.

Der Versuch wurde wie in Abschnitt 2.8.3.2 beschrieben durchgeführt. Es wurden, wie bei dem Versuch mit den freien Zellen (s. Abschnitt 3.5.1), eine Immobilisatmenge verwendet, die 50 g/l BFM im Ansatz entsprach.

Die Zulauftrate an Propionitril wurde zu Beginn des ersten Ansatzes (s. Abbildung 3.17a) zu hoch eingestellt, als daß sich ein Vollumsatz einstellen konnte, was zu einem Nachweis von Propionamid in den ersten 5 h der Reaktionslösung führte. Nachdem die Zulauftrate nach 5 h auf 18 % des Ausgangswertes eingestellt wurde, war nach 16 h das Zwischenprodukt Propionamid nicht mehr nachweisbar und ein Vollumsatz bis zum Ammoniumpropionat festzustellen.

Es wurde in diesem Ansatz über einen Zeitraum von 140 h eine Umsetzung bei konstantem Zulauf gemessen. Nach 60 h war zuerst Propionamid nachweisbar. Dessen Konzentration stieg nach 140 h zum Ende des Zulaufs bis auf 500 mM an.

Auch Propionitril war nach 130 h nachweisbar. Die Endkonzentration lag bei dem Zulaufstopp nach 140 h bei 200 mM Ammoniumpropionat wurde bis zu einer Konzentration von 3 M gebildet.

Der Zulaufstopp erfolgte nach 140 h. Die Reaktion wurde aber weiter verfolgt, um zu untersuchen, ob die Enzyme vollständig inaktiviert waren, bzw. durch die Substratkonzentrationen gehemmt wurden. Das Propionitril wurde innerhalb von 25 h vollständig umgesetzt. Dies ergab für die Nitrilhydratase eine Restaktivität von 9 U/g BTM unter den Bedingungen, die im Ansatz vorlagen. Bei dieser Umsetzung war die Aktivität der Amidase nicht aus der Abnahmerate bestimmbar, da über die Reaktion der Nitrilhydratase Propionamid nachgebildet wurde.

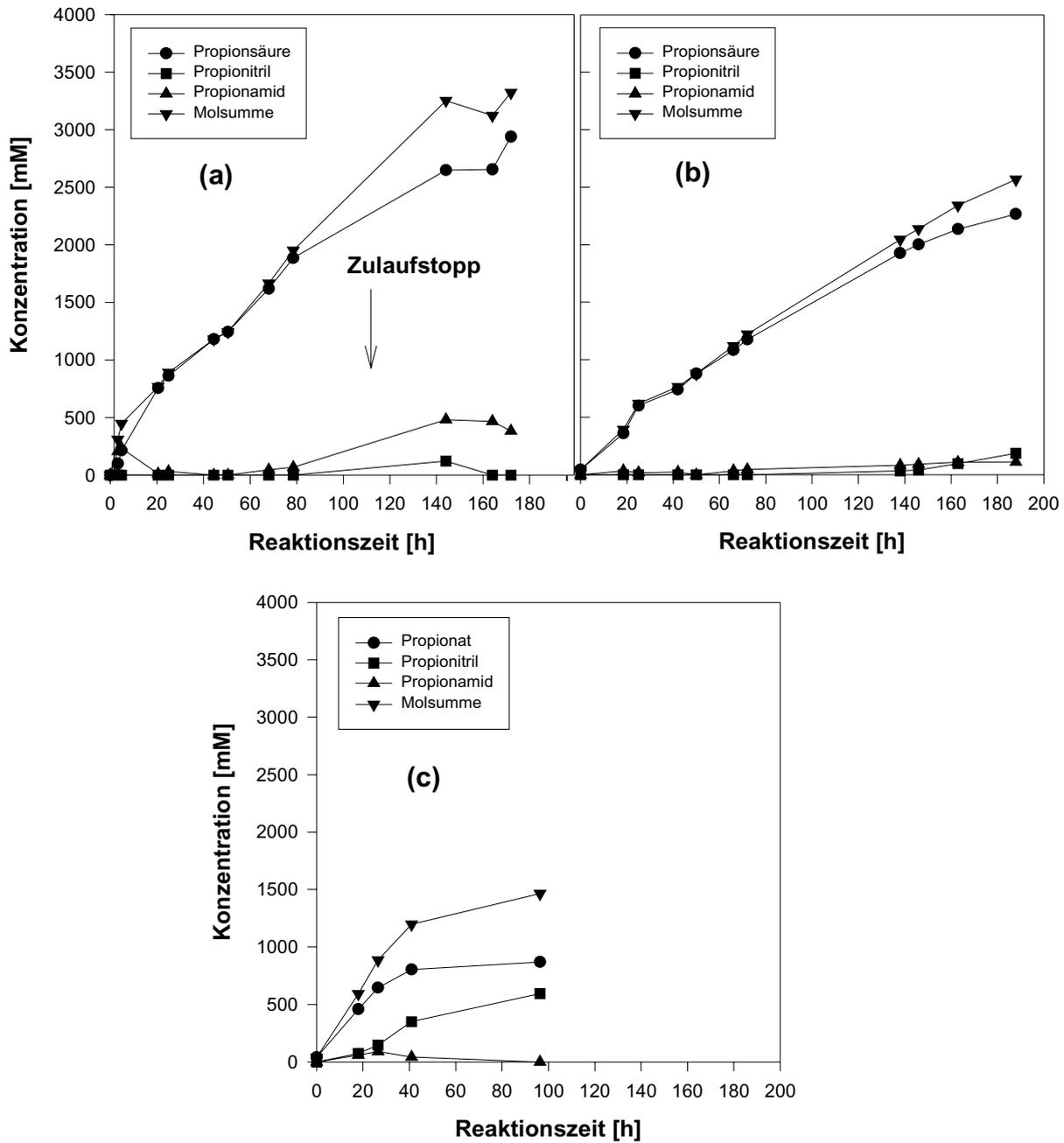


Abbildung 3.17 a, b, c: Darstellung der Konzentrations-Zeit-Verläufe bei einem absatzweisen Prozeß mit kontinuierlicher Zugabe von reinem Propionitril. Es werden die Verläufe für den Einsatz von kalziumalginatimmobilisierten Zellen bei 17 °C aufgezeigt, (a) erster Zyklus, (b) zweiter Zyklus, (c) dritter Zyklus mit den Zellen aus dem jeweils vorhergehenden Ansatz. Zu den mit Pfeilen markierten Zeitpunkten wurde der Zulauf gestoppt.

Das Immobilisat wurde mit Reaktionspuffer 3 gewaschen und erneut für die oben beschriebene Umsetzung verwendet (s. Abbildung 3.17b). Um einen Vollumsatz zum Ammoniumpropionat zu erhalten, wurde die Zulaufrate um 30 % reduziert, da aufgrund der Versuche mit freien Zellen mit einem Verlust an Aktivität gerechnet wurde. Wie im Versuch mit freien Zellen (s. Abschnitt 3.5.1) war auch hier zu erkennen, daß die im ersten Ansatz beobachtete Hemmung der Reaktion reversibel war, da die Reaktionsrate in den ersten 30 h des zweiten Ansatzes zu über 95 % Umsatz bis zum Ammoniumpropionat führte. Allerdings war auch hier eine Inaktivierung der Enzyme durch den Einsatz zur Propionitrilverseifung zu beobachten, dennoch war die Einsatzzeit der immobilisierten Zellen bis zur vollständigen Inaktivierung mit insgesamt 188 h deutlich länger als bei freien Zellen.

Dabei war Propionamid mit konstant steigender Konzentration über die gesamte Reaktionszeit nachweisbar, die Endkonzentration lag bei 100 mM.

Das Substrat Propionitril konnte nach 138 h mit einer Konzentration von 30 mM im Ansatz nachgewiesen werden. Die Endkonzentration an Propionitril lag bei 200 mM. Aufgrund der geringeren Zulaufrate zeigte hier das Immobilisat wesentlich länger einen Umsatz der Substrate und auch geringere Endkonzentrationen an Substrat und Zwischenprodukt im Vergleich zu dem zweiten Ansatz mit freien Zellen (s. Abbildung 3.16b). Die Endkonzentration an Ammoniumpropionat lag bei 2.25 M.

Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen ein drittes Mal verwendet (s. Abbildung 3.17c). Dabei wurde der Zulauf wie bei der zweiten Umsetzung eingestellt. Da schon nach einer Reaktionszeit von 16 h Propionitril und Propionamid im Ansatz nachweisbar waren, wurde der Zulauf zu diesem Zeitpunkt noch einmal um 25 % herabgesetzt. Nach 53 h wurde der Zulauf gestoppt und der Ansatz weitere 43 h unter Rührung inkubiert.

Am Ende des Versuches war kein Amid im Ansatz nachweisbar. Die Propionitrilkonzentration nahm ab 16 h proportional mit dem Zulauf an Nitril zu und blieb nach dem Abschalten des Zulaufs konstant bei 600 mM, ebenso wie die Propionatkonzentration bei 900 mM. Die Nitrilhydratase zeigte also nach 16 h keine Aktivität mehr, die Amidase war noch aktiv und setzte das bis zum Zulaufstopp nach 53 h gebildete Propionamid zu Ammoniumpropionat um.

Somit konnte das Immobilisat deutlich länger für eine absatzweise Prozeßführung mit Zudosage des Substrates eingesetzt werden als die freien Zellen und dabei ebenfalls Produktkonzentrationen von bis zu 3 M Ammoniumpropionat in Lösung erreicht werden.

3.5.3 Kontinuierliche Substratumsetzung im Festbett

Die Verwendung eines Festbettreaktors (hinsichtlich des Verweilzeitverhaltens vergleichbar mit einem idealen Rohr-Reaktor) ergibt eine veränderliche Konzentration der Substrate und Produkte über die Länge des Bettes bei einer kontinuierlichen Durchströmung des Reaktors. Daher wurde in zwei weiteren Versuchen für die Hydrolyse von Propionitril und Propionamid mit kalziumalginatimmobilisierten Zellen jeweils ein Festbettreaktor unter den optimalen Bedingungen für die jeweilige Enzymreaktion verwendet.

Dabei wurde aufgrund der schnellen Inaktivierung der Nitrilhydratase (s. Abbildung 3.6) die Reaktionstemperatur im Festbettreaktor für die Propionitrilverseifung auf 6 °C eingestellt. Aufgrund der geringen Aktivität der Amidase wurde für diese Reaktion eine Temperatur von 30 °C gewählt, da bei dieser Temperatur eine hohe spezifische Aktivität der Amidase festgestellt wurde (s. Abschnitt 3.3.4), aber dennoch die Inaktivierung deutlich geringer war als bei dem Temperaturoptimum der Amidaseaktivität von 35 °C.

Dazu wurde ein Festbettreaktor mit Immobilisatperlen befüllt und unter den in Abschnitt 2.8.5.1 beschriebenen Bedingungen unter einem konstanten Zulauf von 100 mM Substrat betrieben. Es ergaben sich der in Abbildung 3.18 dargestellte Verlauf der Konzentration über die Reaktionszeit.

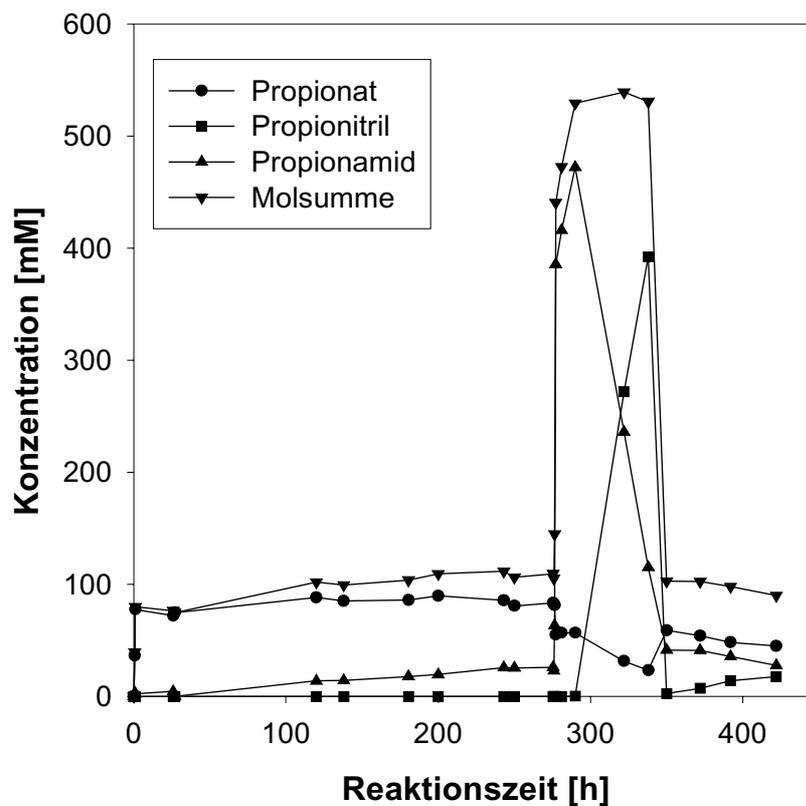


Abbildung 3.18: Verlauf der Konzentrationen im Ablauf eines Festbettreaktors mit kalziumalginatimmobilisierten Zellen. Es wurde kontinuierlich 100 mM Propionitril zugeführt, wobei im Zeitraum von 276 - 340 h Prozeßzeit die Zulaufkonzentration auf 500 mM Propionitril erhöht wurde.

In Abbildung 3.18 ist die Umsetzung von Propionitril in einem Säulenreaktor mit 17 ml Immobilisatvolumen bei einem Durchmesser von 1 cm zu sehen. Der Ansatz wurde auf 6 °C temperiert, da die Nitrilhydratase möglichst wenig durch die Temperatur inaktiviert werden sollte. Die Zulauftrate war dabei mit 20 ml/h so eingestellt, daß über die Säule ein Vollumsatz bis zum Ammoniumpropionat erreicht wurde. Es war ein kontinuierlicher Anstieg von Propionamid im Ablauf der Säule festzustellen. Dieser beruhte vermutlich auf der langsamen Inaktivierung der Nitrilhydratase, wie sie auch bei der mehrfachen Verwendung der immobilisierten Zellen beobachtet wurde, während

die Aktivität der Amidase unverändert blieb. Dabei war die Verweilzeit für das Propionamid aufgrund der deutlich langsameren Entstehung zu kurz, als daß ein Vollumsatz möglich gewesen wäre. Somit konnte über den Anstieg des Propionamids im Ablauf der Säule die Inaktivierung der Nitrilhydratase beobachtet werden.

Nach einer Prozeßzeit von 276 h wurde die Zulaufkonzentration auf 500 mM Propionitril heraufgesetzt, um den Effekt von Substratkonzentrationen in dem Konzentrationsbereich einer Substratüberschußhemmung der Nitrilhydratase zu testen. Dabei verringerte diese Konzentration an Substrat die Nitrilhydratasereaktion um etwa 50 % (s. Abbildung 3.22). Dennoch wurde auch diese Konzentration über einen Zeitraum von 17 h vollständig zum Amid umgesetzt. Dabei war auffällig, daß auch die Konzentration an Propionat im Ablauf der Säule etwas abnahm, dies ist möglicherweise durch die Substratüberschußhemmung der Amidase zu erklären. Innerhalb der nächsten 50 h nahm die Konzentration an Propionitril im Ablauf der Säule stark zu, was auf einen schnellen Durchbruch der Laufmittelfront zurückzuführen war.

Nach 340 h Prozeßzeit wurde wiederum auf 100 mM Propionitril Zulaufkonzentration umgeschaltet. Die Konzentrationen der Stoffe im Ablauf der Säule erreichten nahezu die Werte vor der Erhöhung der Substratkonzentration. Allerdings wurde die Anfangskonzentration an Propionamid nicht mehr ganz erreicht. Innerhalb von weiteren 100 h war auch Propionitril im Ablauf der Säule nachweisbar. Der Versuch wurde nach 420 h abgebrochen. Zu diesem Zeitpunkt lagen im Ablauf der Säule Konzentrationen von 45 mM Propionat, 28 mM Propionamid und 18 mM Propionitril vor.

Es ergab sich eine aufsummierte Produktmenge 2.33 mol/g BTM bezogen auf die eingesetzte Biotrockenmasse von 6.2 g.

Es war bei einer Prozeßtemperatur von 6 °C eine mittlere Aktivität der Nitrilhydratase über die gesamte Prozeßdauer von 92 U/g BTM meßbar. Die geringe Aktivität ist vermutlich auf Transportlimitierungen und besonders auf die geringe Konzentration an Substrat im Bereich des Ablaufs der Säule zurückzuführen, in welchem Substratkonzentrationen im Bereich des K_M -Wertes für die Nitrilhydratasereaktion, also weit außerhalb des Optimums für die Reaktion. Am Ende des Prozesses war die Aktivität des Immobilisates zu gering, um das Nitril vollständig umzusetzen. Die zunehmend geringere Aktivität wurde auf die Inaktivierung der Nitrilhydratase im Laufe der Prozeßzeit zurückgeführt.

Um die genaue spezifische Aktivität der Nitrilhydratase zu bestimmen, wurde nach Beendigung des Versuches das gesamte Immobilisat gemischt und, nach einem Waschschrift, 3 ml davon einem Standardaktivitätstest unterzogen. Es konnten dabei spezifische Aktivitäten von 188 U/g BTM für die Nitrilhydratase und 61 U/g BTM für die Amidase gemessen werden. Die Nitrilhydratase zeigte also einen Verlust von 98 % innerhalb von 18 Tagen, wenn sie als immobilisierter Biokatalysator bei 6 °C eingesetzt wurde.

Wie in Abschnitt 2.8.5.2 beschrieben wurde auch Propionamid als Substrat für einen Festbettreaktor verwendet. Die Konzentrationsverläufe im Ablauf des Säulenreaktors wurde in Abbildung 3.19 dargestellt.

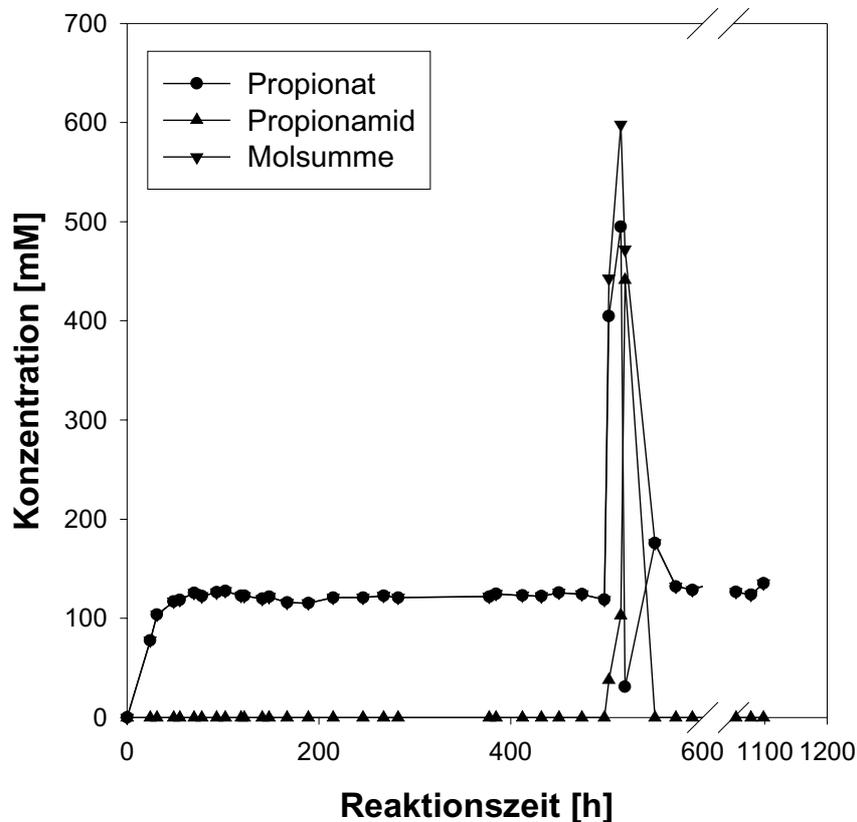


Abbildung 3.19: Verlauf der Konzentrationen im Ablauf eines Festbettreaktors mit kalziumalginatimmobilisierten Zellen. Es wurden kontinuierlich 100 mM Propionamid zugeführt, wobei im Zeitraum von 474 - 520 h Prozeßzeit die Zulaufkonzentration auf 500 mM Propionamid erhöht wurde.

Abbildung 3.19 zeigt den Verlauf der Konzentrationen im Ablauf eines Festbettreaktors für die Amidasereaktion bei einem Zulauf von 100 mM Propionamid. Der Ansatz wurde bei 30 °C temperiert, da bei dieser Temperatur die Amidase bei einer absatzweisen Prozeßführung eine hohe Aktivität zeigte, aber nur einer vergleichsweise geringen Inaktivierung unterlag, wie dies ab Temperaturen von 35 °C und darüber festgestellt wurde (s. Abschnitt 3.3.4). Die Säule wurde mit 25 ml Immobilisat gefüllt, was einer Aktivität von 30 U entsprach. Der Zulauf wurde auf 1 ml/h eingestellt. Auch hier wurde für einen großen Teil der immobilisierten Zellen unterhalb der Michaelis-Menten-Konstanten K_M für die Substratumsetzung gearbeitet (s. Tabelle 3.5). Nach 122 h wurde dann die Zulaufkonzentration auf 3 ml/h erhöht. Auch dabei zeigte sich ein Vollumsatz des Propionamides zu Ammoniumpropionat. Nach 474 h wurde die Zulaufkonzentration auf 500 mM Propionamid erhöht. Für 24 h konnte bei dieser Substratkonzentration ein Vollumsatz gemessen werden. Danach stieg innerhalb von 22 h Prozeßzeit die Propionamidkonzentration schnell bis 500 mM im Ablauf der Säule an. Es wurde dann wiederum auf 100 mM Propionamidlösung umgestellt und für weitere 24 Tage dieser Zulauf bei Vollumsatz beibehalten.

Es war festzustellen, daß über die Dauer des Versuches freie Zellen im Ablauf des Festbettreaktors gefunden wurden. Aufgrund der Abnahme des Immobilisatvolumens über die gesamte Prozeßzeit von etwa 15 % kann angenommen werden, daß es zu einem langsamen Auflösen des Alginatimmobilisates und somit auch zu einer Freisetzung der Zellen kam. Dies könnte durch das Entstehen von den einwertigen ionischen Produkten Propionsäure und Ammonium begründet sein. Durch diese einfach geladenen Ionen kann es zu einer Verdrängung des zweiwertigen Kalziums aus der ionischen Matrix des Kalziumalginates kommen, was zu einem Auflösen des Immobilisates führt. Insgesamt wurden in dieser Zeit 0.4 mol Produkt/g BTM hergestellt. Dies entspricht einer mittleren spezifischen Aktivität über die Prozeßzeit von 1050 h von 6.1 U/g BTM, die damit etwa 5 % der mittleren spezifischen Aktivität der Nitrilhydratasereaktion im Festbettreaktor zeigte. Dagegen lag die Einsatzzeit des immobilisierten Biokatalysators für die Propionamidhydrolyse mit 45 Tagen deutlich über der Einsatzzeit für die Nitrilhydrolyse, bei welchem ein Einsatz durch die Inaktivierung der Nitrilhydratase auf 18 Tage beschränkt war.

Es konnte also unter den beschriebenen Bedingungen ein kontinuierlicher Einsatz des Festbettreaktors unter Vollumsatz des Substrates bei der Nitrilhydratasereaktion von etwa 360 h erreicht werden. Bei der Amidasereaktion dagegen war auch nach 1050 h unter den beschriebenen Bedingungen noch keine Inaktivierung feststellbar.

3.5.4 Kontinuierliche Substratumsetzung im Rührreaktor

Bei einer kontinuierlichen Prozeßführung in einem Rührkessel stellt sich nach einer gewissen Einlaufphase ein Fließgleichgewicht bezüglich der Konzentrationen im Reaktor ein, das von der Durchflußrate, der Substratkonzentration und der Kinetik der Enzyme im Reaktor abhängt. Durch das Einstellen des Fließgleichgewichtes wird es möglich, die dynamischen Prozesse z.B. durch eine Inaktivierung bei der Propionitrilverseifung über die Änderung der Konzentrationen an Substrat und Produkt im Ablauf der Säule direkt zu beobachten. Es wurde für beide enzymatischen Reaktionen mit kalziumalginatimmobilisierten Zellen das jeweilige Substrat mit einer Konzentration von 120 mM und einer entsprechenden Durchflußrate kontinuierlich zu- und abgeführt, so daß sich zu Beginn des Versuches ein Umsatz von 90 % einstellte. Somit konnte auch die Inaktivierung der beiden Enzyme unter den jeweiligen optimalen Bedingungen getrennt betrachtet werden. Wie zuvor bei dem Einsatz des immobilisierten Biokatalysators im Festbettreaktor wurden auch hier die beiden Enzymreaktionen unter den jeweils günstigsten Bedingungen getrennt voneinander betrachtet, wobei für die Nitrilhydratasereaktion eine Reaktionstemperatur von 10 °C und für die Amidasereaktion eine Temperatur von 30 °C gewählt wurde (s. Abschnitt 3.5.3).

Für den Ansatz zur Nitrilhydrolyse ergaben sich unter den eingestellten Bedingungen (s. Abschnitt 2.8.6.1) die in Abbildung 3.20 dargestellten Konzentrationsverläufe über der Reaktionszeit.

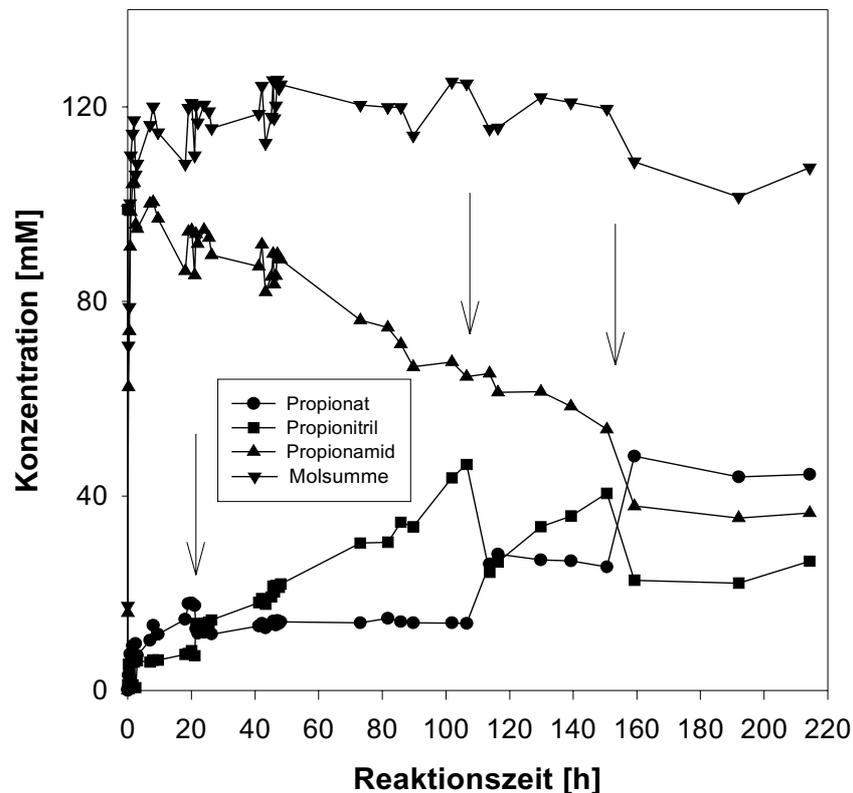


Abbildung 3.20: Verlauf der Konzentrationen im Ablauf eines kontinuierlich betriebenen Rührreaktors mit kalziumalginatimmobilisierten Zellen. Es wurde kontinuierlich 120 mM Propionitril zugeführt, wobei zu den mit Pfeilen gekennzeichneten Zeitpunkten die Zulauftrate erhöht bzw. zu den letzten beiden Zeitpunkten verringert wurde.

Bei einer Durchflußrate von 250 ml/h wurde unter den beschriebenen Bedingungen ein Umsatz von über 95 % bezüglich des Substrats Propionitril erreicht. Da es bei dieser Durchflußrate fast zu einem Vollumsatz des Nitriles kam und somit die Nitrilhydratasereaktion deutlich unterhalb der Halbsättigungskonstanten K_M betrieben wurde, wurde nach 21 h die Durchflußrate auf 400 ml/h erhöht. Bei dieser Durchflußrate stellte sich ein Umsatz von 84 % ein. Es war bei dieser Fließrate zu erkennen, daß die Aktivität der Nitrilhydratase mit der Zeit deutlich abnahm. Dies wurde durch den Anstieg der Propionitrilkonzentration im Auslauf von 13 mM auf 46 mM innerhalb von 85 h deutlich, was dann einen Umsatz von nur noch 60 % ergab.

Die Durchflußrate wurde zu diesem Zeitpunkt auf 200 ml/h zurückgesetzt, wodurch der Umsatz an Propionitril wieder auf 79 % anstieg. Auch nach der Verringerung der Durchflußrate ging die Aktivität kontinuierlich zurück, was sich in einem Anstieg der Substratkonzentration im Abfluß der Säule zeigte. Die Konzentration an Propionitril im Ablauf lag nach 113 h, also nach dem Ändern des Zulaufs, bei 24 mM, nach 150 h Prozeßzeit aber schon bei 40 mM. Wiederum wurde die Zulauftrate erniedrigt. Mit einem Zulauf von 100 ml/h wurde der Prozeß mit einer nahezu konstanten Nitrilhydrataseaktivität weitere 64 h bei einem Umsatz von 80 % fortgeführt. Insgesamt ergab dies eine Prozeßzeit von 214 h.

Bemerkenswerter Weise war die Aktivität der Amidase, gemessen an der Propionitrilkonzentration im Ablauf des Reaktors, über den jeweiligen Zeitraum mit konstanter Durchflußrate, nahezu konstant. Dies zeigte sich auch in der Änderung der Konzentration bei der Umstellung auf höhere oder niedrigere Durchflußraten, wobei jeweils die Konzentration im Ablauf ab- bzw. zunahm.

Um zu überprüfen, ob die Belichtung der Zellen einen Einfluß auf die Reaktionsrate der Nitrilhydratase unter Reaktionsbedingungen hat, wurde der Prozeß zwischen 45 h und 48 h Reaktionszeit unter Lichtausschluß durchgeführt. Es konnte dabei gezeigt werden, daß unter diesen Reaktionsbedingungen kein signifikanter Einfluß von Licht auf die Aktivität der Nitrilhydratase nachzuweisen war, entgegen den Beobachtungen bei ruhenden Zellen unter Lichtabschluß.

Insgesamt wurden 124 g Propionamid/g BTM hergestellt. Eine Bestimmung der Reaktionsraten und der Inaktivierungskonstanten wurde unter Verwendung einer dynamischen Simulation unter Abschnitt 3.6.2.2 durchgeführt.

Für den Umsatz von Propionamid mit kalziumalginatimmobilisierten Zellen wurde ebenfalls ein kontinuierlich betriebener Rührkessel eingesetzt. Dabei wurde unter den in Abschnitt 2.8.6.2

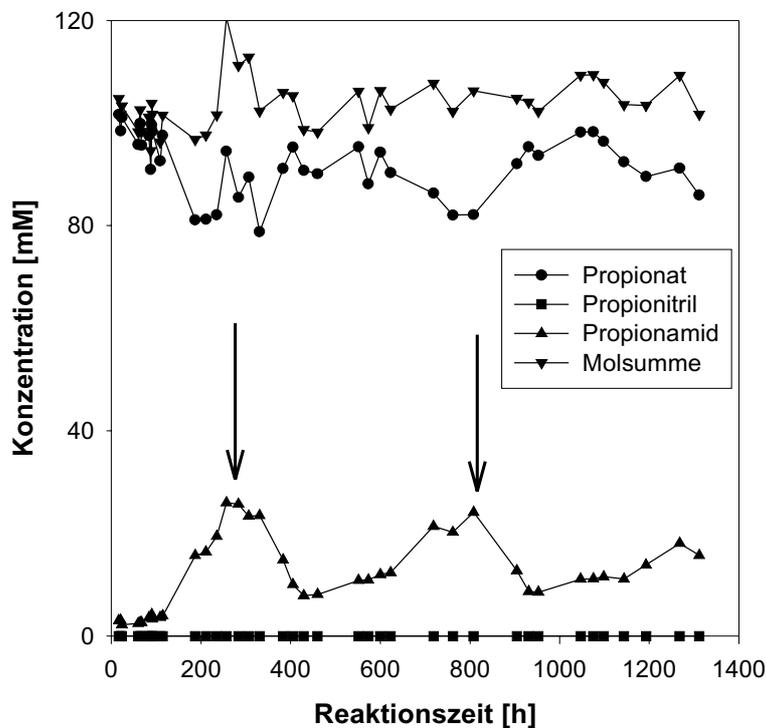


Abbildung 3.21: Verlauf der Konzentrationen im Ablauf eines kontinuierlich betriebenen Rührreaktors mit kalziumalginatimmobilisierten Zellen. Es wurde kontinuierlich 100 mM Propionamid zugeführt, wobei zu den mit Pfeilen gekennzeichneten Zeitpunkten die Zulauftrate verringert wurde.

beschriebenen Bedingungen mit einer Propionitrilkonzentration von 100 mM im Zulauf ein Umsatz von 90 % über die Zulauftrate eingestellt. Die Konzentrationen von Substrat und Produkt sind in Abbildung 3.21 über der Prozeßzeit aufgetragen.

Wie aus Abbildung 3.21 zu erkennen ist, konnte in den ersten 100 h die Propionamidkonzentration im Zulauf zu 98 % umgesetzt werden. Innerhalb der nächsten 100 h wurde ein Anstieg der Propionamidkonzentration festgestellt. Dies läßt auf eine Inaktivierung der Amidasereaktion schließen. Nach 14 Tagen wurde die Zulauftrate auf 25.2 ml/h herabgesetzt. Erst nach einer Prozeßzeit von etwa 100 h stellte sich wieder ein Umsatz von mehr als 90 % ein. Bei einem Volumenstrom von 25.2 ml/h und einem Reaktorvolumen von 158 ml sollte dann nach dem 5-fachen Volumenaustausch nach 30 h ein vollständiger Austausch des Mediums erfolgt sein und sich ein neues Fließgleichgewicht mit einer geringeren Propionamidkonzentration aufgrund der geringeren Verdünnungsrate im Bulk einstellen. Offensichtlich stellte sich aber das neue Fließgleichgewicht erst viel später, nach etwa 100 h ein. Dies könnte an einer langsamen Abgabe der Reaktionskomponenten aus dem Alginat liegen, welches aufgrund seiner geladenen Gruppen wie ein Ionenaustauscher wirkt, von dem dann besonders Propionat und Ammonium nur langsam ausgewaschen werden. Auch eine Akkumulation der Endprodukte im Alginat ist möglich. Dies könnte dann aufgrund der Inhibition der Amidasereaktion durch die Produkte (s. Abbildung 3.24) zu einer geringeren Reaktionsrate und somit, durch die verzögerte Abgabe der Produkte aus dem Alginat, auch zu einem langsameren Einstellen des Fließgleichgewichtes führen. Dabei war zu beobachten, daß sich auch das Immobilisat langsam auflöste, und die Zellen freigesetzt wurden, welche dann im Ablauf auftraten. Dies lag vermutlich an der gebildeten Propionsäure, die das Kalzium aus den Alginatperlen herauslöste, wie dies schon bei den Untersuchungen im Festbettreaktor (s. Abschnitt 3.5.3) beobachtet wurde. Nach 1311 h wurde der Versuch beendet. Dabei konnte ein Verlust von etwa 25 % des Immobilisatvolumens bezüglich der eingesetzten Menge von 48 ml Immobilisat zu Beginn des Versuches festgestellt werden. Die Ausbeute des Ansatzes lag bei 1.8 mol Produkt/g BTM. Eine genaue Bestimmung der Reaktionsrate und der Inaktivierungskonstante während der Prozeßzeit wurde in Abschnitt 3.6.4 unter Verwendung von dynamischer Simulation erhalten.

3.6 Mathematische Modellierung

Im folgenden wird ein funktionaler Zusammenhang zwischen der Reaktionsrate der untersuchten Enzyme Nitrilhydratase und Amidase und den jeweiligen Substrat- und Produktkonzentrationen hergestellt.

Für beide Enzyme wurde derselbe reaktionskinetische Ansatz, basierend auf der Sättigungskinetik nach Michaelis-Menten, gewählt. Zusätzlich wurden eine Substratüberschußhemmung und eine kompetitive Inhibition durch die entstehenden Produkte berücksichtigt und in folgendem mathematischen Ansatz (Gleichung 3.1) zusammengefaßt:

$$r = \frac{r_{\max} \times [S]}{K_M \left(1 + \sum \frac{[P_i]}{K_{IP}} \right) + [S] + \frac{[S]^2}{K_I}} \quad (3.1)$$

r	=	Reaktionsrate [mM/min]
r_{\max}	=	maximale Reaktionsrate [mM/min]
$[S]$	=	Substratkonzentration [mM]
$[P]$	=	Konzentration des jeweiligen Produktes [mM]
K_M	=	Michaelis-Mentenkonstante [mM]
K_I	=	Inhibitionskonstante [mM]

Zusätzlich sind in dieser Arbeit Reaktionsraten als spezifische, auf die Biotrockenmasse bezogene Größen angegeben und, wie in Gleichung 3.2 angegeben, mit r^* gekennzeichnet.

$$r^* = \frac{r}{[c_x]} \quad (3.2)$$

r^*	=	spezifische Reaktionsrate [U/g BTM]
r	=	Reaktionsrate [mM/min]
$[c_x]$	=	Biotrockenmassekonzentration [g/l]

3.6.1 Parameteridentifikation

Die Schätzung der kinetischen Parameter wurde sowohl durch die Messung von spezifischen Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten, als auch auf der Basis von dynamischen Simulationen vorgenommen. Die Ergebnisse beider Methoden sind im folgenden dargestellt.

3.6.1.1 Anfangsreaktionsraten

Gleichung 3.1 lässt sich unter Vernachlässigung der Produktkonzentrationen im Falle von Anfangsreaktionsraten auf folgende Form reduzieren:

$$r = r_{\max} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S] + \frac{[S]^2}{K_I}} \quad (3.3)$$

r	=	Reaktionsrate [mM/min]
r_{\max}	=	maximale Reaktionsrate [mM/min]
$[S]$	=	Substratkonzentration [mM]
K_M	=	Michaelis-Mentenkonstante [mM]
K_I	=	Inhibitionskonstante [mM]

Sämtliche Parameteridentifikationen innerhalb dieses Abschnittes wurden mit Hilfe von SigmaPlot (JandelScientific) und den darin implizierten Algorithmen zur nichtlinearen Regression vorgenommen.

Die in Gleichung 3.2 verwendeten Modellparameter können aus der jeweiligen Auftragung der Reaktionsrate über der Substratkonzentration für die beiden Enzyme Nitrilhydratase und Amidase bestimmt werden. In Abbildung 3.22 ist eine derartige Graphik gezeigt.

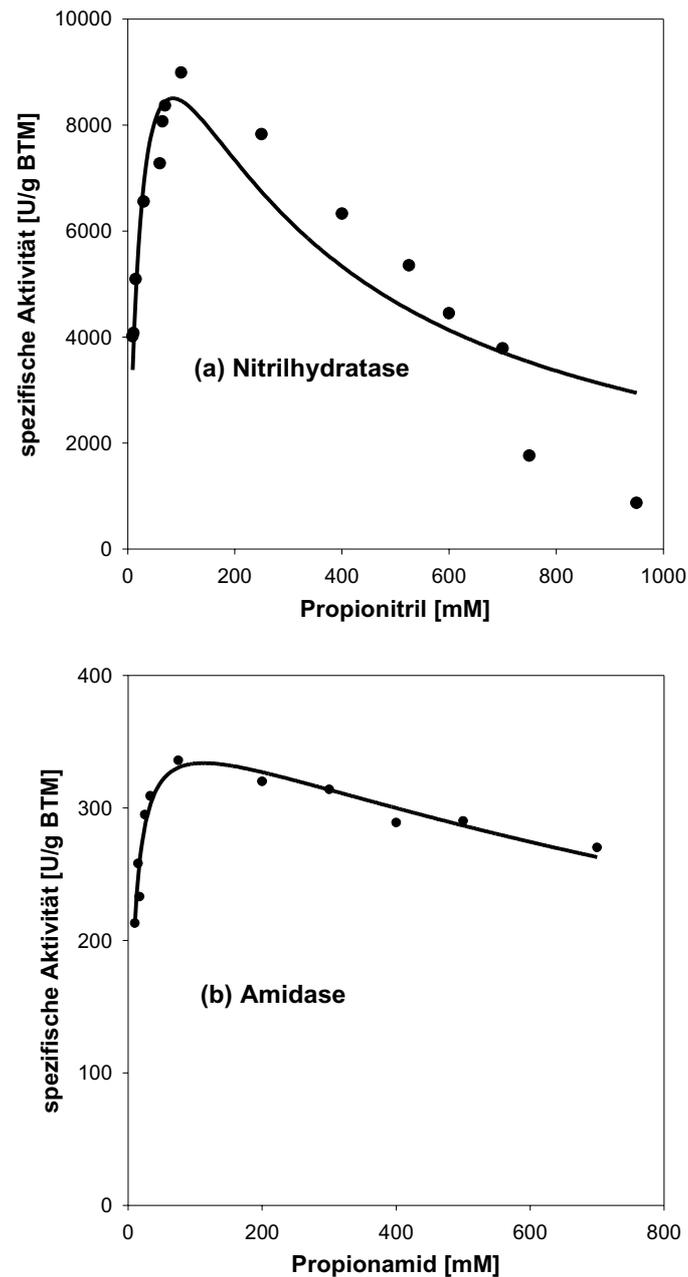


Abbildung 3.22: Es wurden die spezifischen Anfangsreaktionsraten bei variierter Substratkonzentration für die Reaktion der Nitrilhydratase (a) und der Amidase (b) aufgetragen. Dabei entsprechen die Punkte den experimentell erhaltenen Anfangsraten, während die durchgezogene Linie aus der Simulation hervorgeht.

Aus Abbildung 3.22a ist ersichtlich, daß bis zu einer Konzentration von etwa 100 mM Propionitril ein Anstieg der katalytischen Aktivität proportional zur Substratkonzentration festzustellen ist. Für Konzentrationen oberhalb von 200 mM Propionitril ist eine erhebliche Reduzierung der Umsatzrate zu erkennen.

Im Vergleich zur Nitrilhydratase zeigt die Amidase generell eine deutlich geringere spezifische Aktivität (vgl. Abbildung 3.22b). Allerdings ist die Substratüberschußhemmung bei diesem Enzym weniger stark ausgeprägt. Die anhand von Abbildung 3.22 mittels nichtlinearer Regression bestimmten kinetischen Parameter sind in Tabelle 3.1 zusammengefaßt.

Tabelle 3.1: Geschätzte Parameter (vgl. Gleichung 3.3) für die Kinetiken der Enzyme Nitrilhydratase und Amidase

Nitrilhydratase		Amidase	
r_{\max}^*	13920 [U/g BTM]	r_{\max}^*	381 [U/g BTM]
K_M	25 [mM]	K_M	7,9 [mM]
$K_{I\text{propionitril}}$	257 [mM]	$K_{I\text{propionamid}}$	1593 [mM]

Auffallend ist der deutliche Aktivitätsunterschied beider Enzyme (gerundet Faktor 30). Die Amidase zeigt eine geringere maximale spezifische Aktivität von etwa 380 U/g BTM. Zudem weist die Amidase eine höhere Affinität zum Substrat auf als die Nitrilhydratase. Die ausgeprägte Substratüberschußhemmung für beide Enzyme zeigt sich im Vergleich der Inhibitionskonstanten mit 257 mM für die Nitrilhydratase zu Propionitril und 1593 mM für die Amidase zu Propionamid.

In einer anschließenden Versuchsreihe wurden die Inhibitionskonstanten bezüglich der entstehenden Produkte mit Hilfe von Gleichung 3.1 abgeschätzt. Dazu wurden die in Tabelle 3.1 aufgeführten Parameter bei der Parameteranpassung konstant gehalten. Der Standardaktivitätstest wurde dahingehend verändert, daß zu Versuchsbeginn die jeweilig angegebene Produktkonzentration vorgelegt wurde. In den Abbildungen 3.23a bis 3.23c ist der Verlauf der spezifischen Aktivität der Nitrilhydratase für zunehmende Produktkonzentrationen der Produkte Propionamid, Propionat und Ammonium aufgetragen. In Abbildung 3.24 a und 3.24 b wird diese Auftragung für die spezifische Aktivität der Amidase mit den Produkten Propionat und Ammonium dargestellt.

Aus Abbildung 3.23 ist zu erkennen, daß in allen drei Auftragungen eine unterschiedlich ausgeprägte Abnahme der Nitrilhydrataseaktivität zu verzeichnen ist. Ammonium weist den stärksten inhibitorischen Einfluß auf die Nitrilhydratase unter den untersuchten Produkten auf. Auch die in Abbildung 3.24 dargestellte Änderung der Amidaseaktivität bei variiertem Produktkonzentration zeigt eine Abnahme bei höheren Ammoniumkonzentrationen. Allerdings scheint die Propionatkonzentration in dem untersuchten Konzentrationsbereich keinen inhibierenden Einfluß auf die spezifische Aktivität der Amidase zu haben.

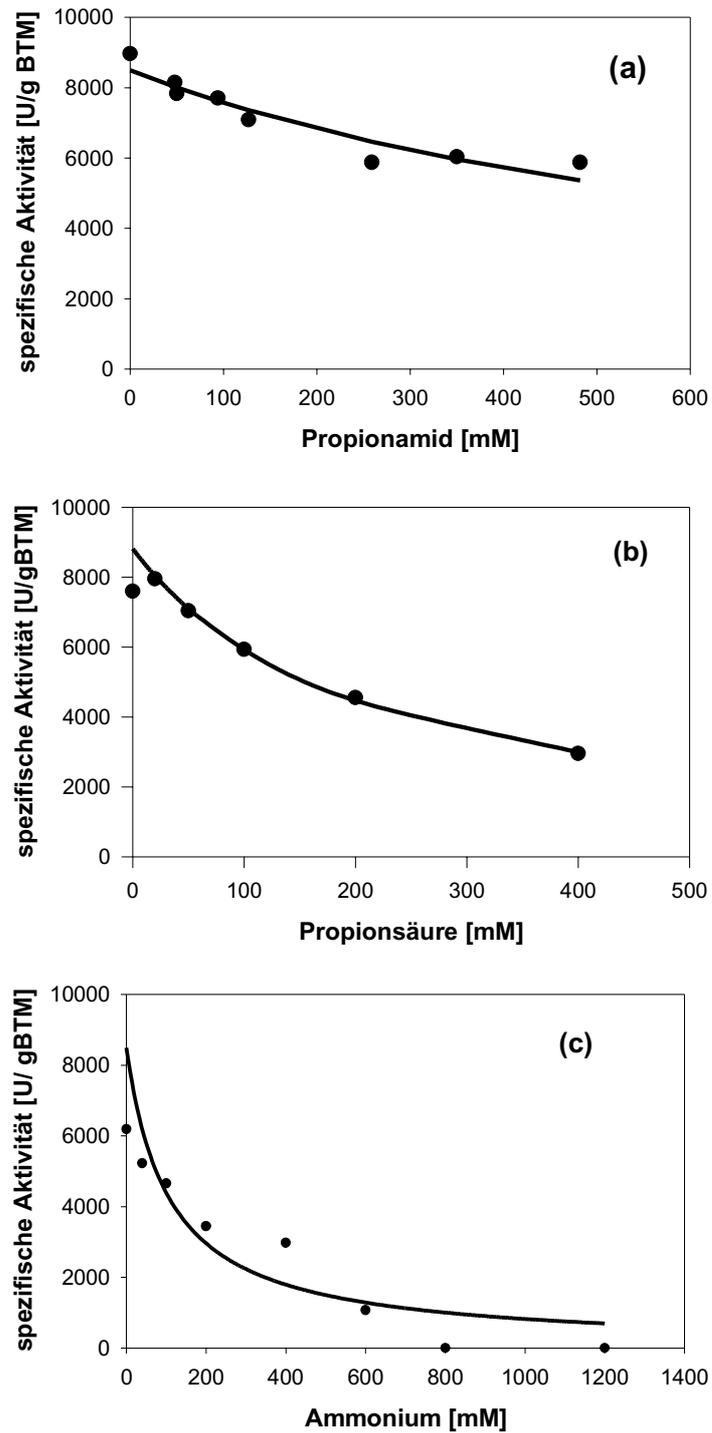


Abbildung 3.23: Darstellung der Änderung der spezifischen Aktivität der Nitrilhydratase im Standardaktivitätstest unter Vorlage von verschiedenen Produktkonzentrationen an (a) Propionamid, (b) Propionsäure, (c) Ammonium. Dabei stellen die Punkte die Meßdaten dar, die durchgezogenen Linien die durch nichtlineare Regression erhaltenen Anpassungen.

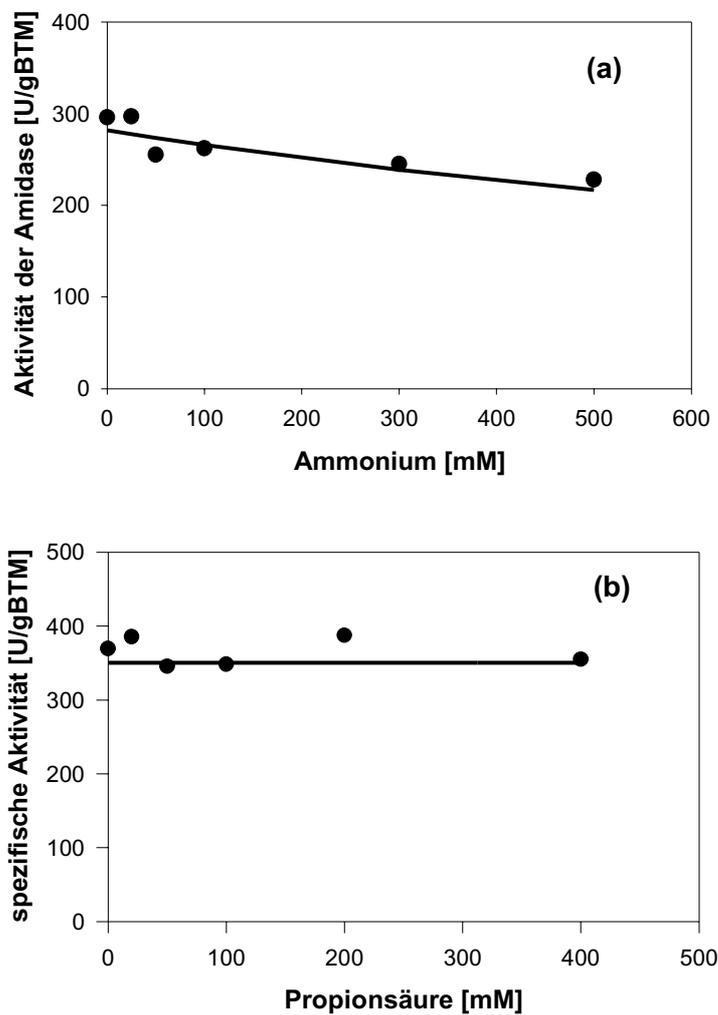


Abbildung 3.24: Darstellung der Änderung der spezifischen Aktivität der Amidase im Standardaktivitätstest unter Vorlage von verschiedenen Produktkonzentrationen an (a) Propionat, (b) Ammonium. Dabei stellen die Punkte die Meßdaten dar, die durchgezogenen Linien die durch nichtlineare Regression erhaltenen Anpassungen.

In Tabelle 3.2 sind die Ergebnisse der nichtlinearen Regression (SigmaPlot 4.01) angegeben.

Unter den untersuchten Substanzen zeigt Ammonium den stärksten inhibitorischen Einfluß auf das jeweilige Enzym. Dieser Umstand ist insbesondere für absatzweise Prozesse von Bedeutung, bei denen eine Akkumulation des Produktes Propionsäure mit einer äquimolaren Anreicherung von Ammonium einhergeht, unter der Voraussetzung, daß sich die inhibitorischen Effekte additiv verhalten

Tabelle 3.2: Geschätzte Inhibitionskonstanten der Produkte für die Kinetiken der Nitrilhydratase und der Amidase

Nitrilhydratase		Amidase	
$K_{I\text{propionamid}}$	125 [mM]	$K_{I\text{propionat}}$	Keine Inhibition
$K_{I\text{propionat}}$	37 [mM]	$K_{I\text{ammonium}}$	89 [mM]
$K_{I\text{ammonium}}$	19,4 [mM]		

3.6.1.2 Dynamische Simulation

Zusätzlich zu der Parameteridentifikation basierend auf Anfangsreaktionsraten wurden die kinetischen Parameter ebenfalls mittels numerischer Integration (ACSL, Mitchell&Ganthier, USA) in Verbindung mit nichtlinearer Regression (OptdesX, DesignSynthesis, USA) abgeschätzt.

Die Gleichungen für die spezifischen Reaktionsraten für die Nitrilhydratase- und Amidasereaktion wurden wie in Gleichung 3.4 und 3.5 angesetzt.

$$r_{\text{NH}} = \frac{r_{\text{max,NH}} \times C_{\text{Nitril}}}{K_{\text{M,Nitril}} \times \left(1 + \frac{C_{\text{Amid}}}{K_{\text{I,Amid}}} + \frac{C_{\text{Säure}}}{K_{\text{I,Säure}}} + \frac{C_{\text{NH}_4}}{K_{\text{I,NH}_4}} \right) + C_{\text{Nitril}} + \frac{C_{\text{Nitril}}^2}{K_{\text{I,Nitril}}}} \quad (3.4)$$

- r_{NH} = Reaktionsrate der Nitrilhydratase [mM/min]
 $r_{\text{max,NH}}$ = maximale Reaktionsrate der Nitrilhydratase [mM/min]
 C_i = Konzentration des Stoffes i zum Zeitpunkt t [mM]
 K_{M} = Mentenkonstante der Nitrilhydratasereaktion [mM]
 $K_{\text{I},i}$ = Inhibitionskonstante des Stoffes i für die Nitrilhydratasereaktion [mM]

$$r_{\text{AD}} = \frac{r_{\text{max,AD}} \times C_{\text{Amid}}}{K_{\text{M,Amid}} \times \left(1 + \frac{C_{\text{NH}_4}}{K_{\text{I,NH}_4}} \right) + C_{\text{Amid}} + \frac{C_{\text{Amid}}^2}{K_{\text{I,Amid}}}} \quad (3.5)$$

- r_{AD} = Reaktionsrate der Amidase [mM/min]
 $r_{\text{max,AD}}$ = maximale Reaktionsrate der Amidase [mM/min]
 C_i = Konzentration des Stoffes i zum Zeitpunkt t [mM]
 $K_{\text{M,Amid}}$ = Mentenkonstante der Amidasereaktion [mM]
 $K_{\text{I},i}$ = Inhibitionskonstante des Stoffes i für die Amidasereaktion [mM]

Für den untersuchten absatzweisen Prozeß gelten folgende Bilanzgleichungen:

$$\frac{dc_{\text{Nitril}}}{dt} = -r_{\text{NH}} \quad (3.6)$$

$$\frac{dc_{\text{Amid}}}{dt} = r_{\text{NH}} - r_{\text{AD}} \quad (3.7)$$

$$\frac{dc_{\text{Säure}}}{dt} = \frac{dc_{\text{NH}_4}}{dt} = r_{\text{AD}} \quad (3.8)$$

c_{Nitril}	=	Propionitrilkonzentration [mM]
c_{Amid}	=	Propionamidkonzentration [mM]
$c_{\text{Säure}}$	=	Propionsäurekonzentration [mM]
c_{NH_4}	=	Ammoniumkonzentration [mM]
r_{NH}	=	Reaktionsrate der Nitrilhydratase [mM/min]
r_{AD}	=	Reaktionsrate der Amidase [mM/min]

Durch numerische Integration der Gleichungen 3.6 bis 3.8 wurden die Konzentrationsverläufe für die beteiligten Substrate und Produkte berechnet. In den Abbildungen 3.25a bis 3.25c sind die resultierenden Konzentrationsverläufe über der Reaktionszeit zusammen mit den experimentellen Daten für variierende Katalysatorkonzentrationen aufgetragen (s. Abschnitt 3.3.8.4). Im Unterschied zum Standardaktivitätstest wurde hier eine Startkonzentration an Propionitril von 1 M eingesetzt.

Bei der Parameteroptimierung in Abbildung 3.25 wurden die Modellparameter gleichzeitig an alle drei Meßdatensätze angepaßt. Simulation und Experiment weisen eine sehr gute Übereinstimmung auf. Die ermittelten Parameter sind in Tabelle 3.3 angegeben. Dabei war zu beachten, daß die Inhibitionskonstante bezüglich Propionat und Ammonium nicht getrennt voneinander geschätzt werden konnten, da die Konzentrationsverläufe für diese Substanzen äquimolar verlaufen. Daher wurde nur ein Summenparameter für Ammoniumpropionat angegeben. Da allerdings aus Abbildung 3.24b zu erkennen ist, daß kein inhibitorischer Einfluß für die Amidase durch Propionat festgestellt werden kann, kann die hier bestimmte Inhibition allein dem Ammonium zugeschrieben werden. Bei der Nitrilhydratase ist jedoch keine solche Zuweisung möglich. Daher können die Inhibitionskonstanten der Nitrilhydratase bezüglich Propionsäure und Ammonium mit Hilfe der vorliegenden Meßdaten nicht geschätzt werden.

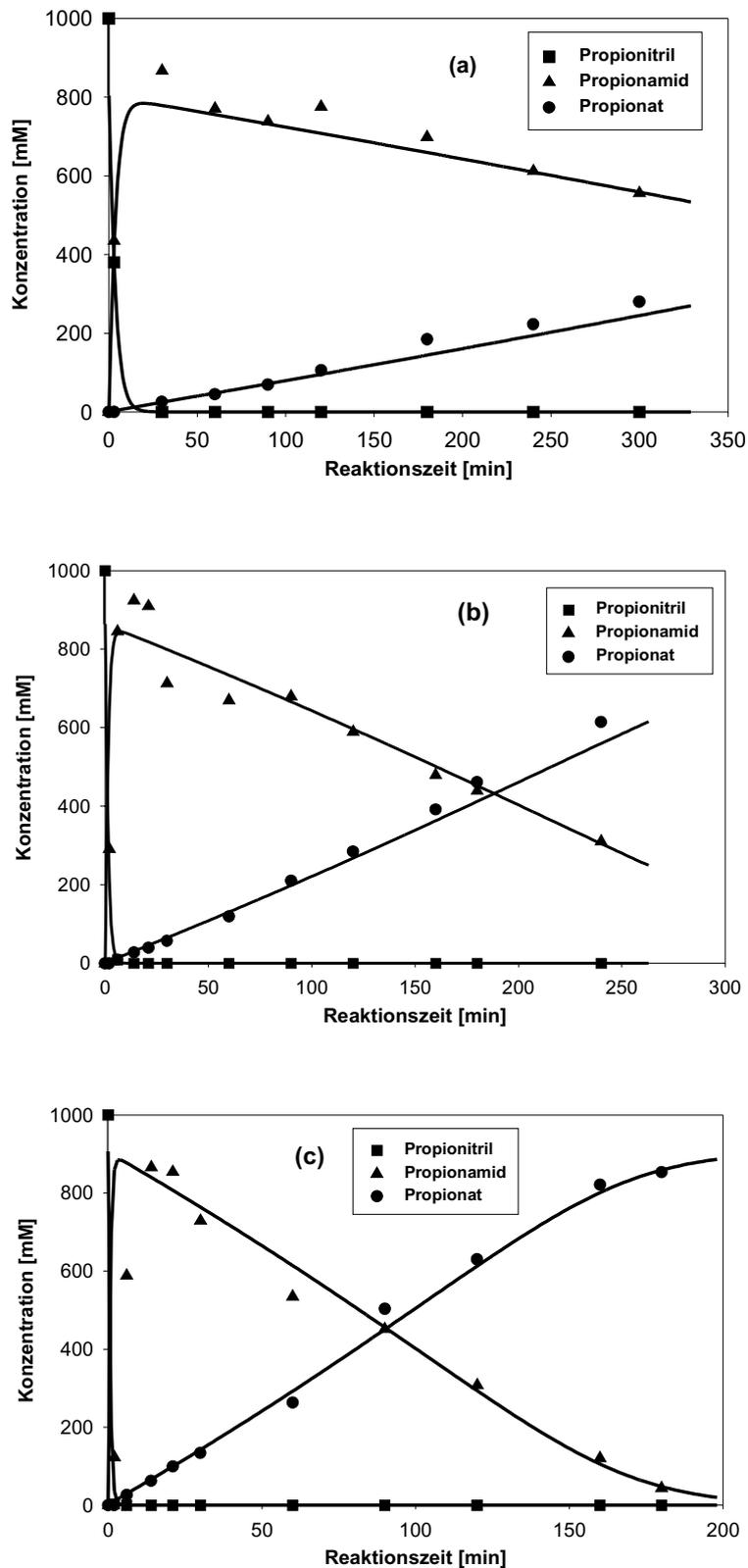


Abbildung 3.25: Konzentrations-Zeit-Verläufe für die Umsetzung von 1 M Propionitril mit freien Zellen. Dabei wurden die Katalysatorkonzentrationen in den einzelnen Ansätzen variiert zu (a) 3.84 g/l BTM, (b) 10.8 g/l BTM und (c) 24 g/l BTM. Die Meßdaten sind mit den jeweiligen, durch numerische Integration erhaltenen Kurvenverläufen aufgetragen.

Tabelle 3.3: Über die Kopplung von numerischer Integration mit nichtlinearer Regression bestimmte kinetische Parameter der Nitrilhydratase- und Amidase-reaktion (basierend auf Abbildung 3.9)

Nitrilhydratase			Amidase		
r_{\max}^*	56752	[U/g BTM]	r_{\max}^*	381	[U/g BTM]
K_M	90	[mM]	K_M	14	[mM]
$K_{I\text{propionitril}}$	7294	[mM]	$K_{I\text{propionamid}}$	908	[mM]
$K_{I\text{propionamid}}$	142	[mM]	$K_{I\text{propionat}}$	Keine Inhibition	[mM]
$K_{I\text{ammoniumpropionat}}$	67	[mM]	$K_{I\text{ammonium}}$	87	[mM]

Im Vergleich zu den mit Anfangsreaktionsraten bestimmten Parametern (vgl. Tabelle 3.1 und 3.2) wurden für die Parameter der Amidase mit dieser Methode nahezu identische Werte geschätzt. Die Nitrilhydratase hingegen zeigt erhebliche Abweichungen unter den Parametern r_{\max}^* , K_M , und $K_{I\text{propionitril}}$. Dies mag darin begründet sein, daß im Bereich der schnellen Dynamik der Nitrilhydratase innerhalb der ersten Prozeßminuten nur eine geringe Anzahl an Meßpunkten vorliegt (vgl. Abbildung 3.25). Damit verbunden konnten die in Tabelle 3.3 angegebenen Parameter der Nitrilhydratase nur mit eingeschränkter Sensitivität bestimmt werden. Wie in Abschnitt 3.3.8.4 erläutert, bewirkt Propionitril in höheren Konzentrationen irreversible Schädigungen des Enzymsystems. Da im hier beschriebenen Versuch ebenfalls eine Beeinflussung der Zellen durch die hohen Propionitrilkonzentrationen zum Zeitpunkt $t = 0$ vorliegen könnte, wodurch die Eigenschaften der Zellmembran bezüglich ihrer Permeabilität für die Substrate und Produkte beeinflusst wurden, könnten die hier bestimmte hohe maximale spezifische Aktivität auch auf einen verbesserten Stofftransport zurückzuführen sein.

Aufgrund der Variation unter den Parametern der Nitrilhydratase für die beiden Schätzmethoden wurde ein weiterer absatzweiser Prozeß mit einer Startkonzentration von 100 mM Propionitril durchgeführt. Bei der Optimierung wurden die Parameter der Produktinhibition aus Tabelle 3.2 konstant belassen, da aus dem vorigen Versuch zu erkennen war, daß es zu keiner signifikant veränderten Abschätzung dieser Parameter kam. Zudem konnten bei der Parameterschätzung basierend auf den Anfangsreaktionsraten auch Aussagen über den Einfluß von Propionat und Ammonium aus getrennten Ansätzen erhalten werden. Dagegen wurden die Parameter r_{\max}^* , K_M und $K_{I\text{Substrat}}$ für die beiden Enzyme freigegeben. Ein Vergleich der dynamischen Simulation mit dem Experiment ist in Abbildung 3.26 dargestellt.

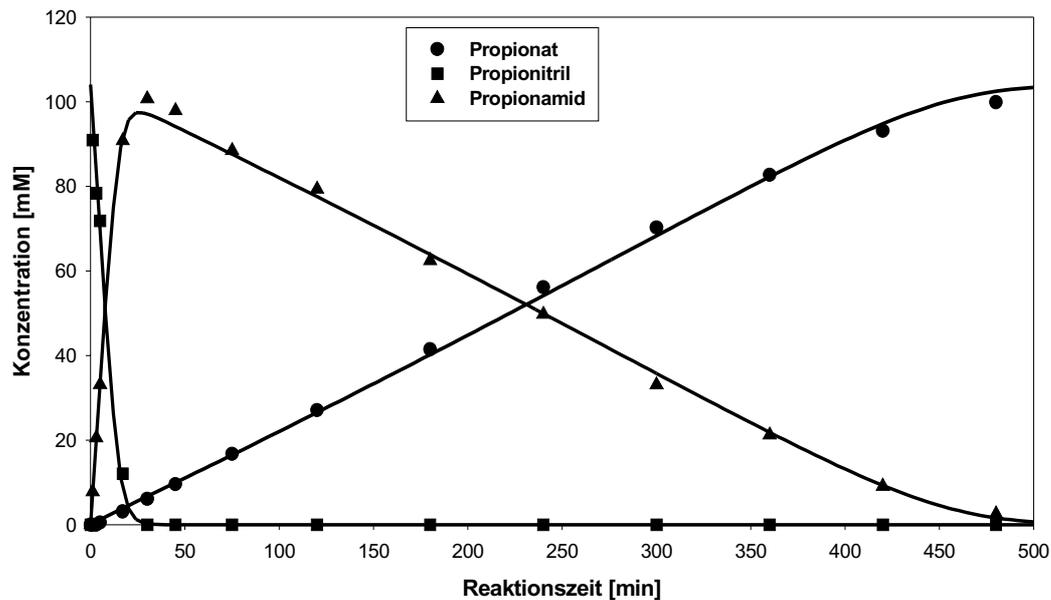


Abbildung 3.26: Konzentrations-Zeit-Verläufe für die Substrate und Produkte der Propionitrilverseifung bei 100 mM Startkonzentration an Propionitril. Die Punkte stellen die gemessenen Konzentrationen dar, die durchgezogenen Linien wurden durch numerische Integration berechnet.

Durch Minimierung der relativen Fehlerquadratsumme mittels des Programmpakets OptesX in Verbindung mit dynamischer Simulation wurde zu den experimentell bestimmten Konzentrations-Zeit-Verläufen eine sehr gute Übereinstimmung erzielt. Es wurden die in Tabelle 3.4 dargestellten Parameter ermittelt.

Tabelle 3.4: Aus Abbildung 3.26 mittels dynamischer Simulation geschätzte Parameter der Kinetiken der Nitrilhydratase und Amidase

Nitrilhydratase			Amidase		
r_{\max}^*	14713	[U/g BTM]	r_{\max}^*	386	[U/g BTM]
K_M	16	[mM]	K_M	2,7	[mM]
$K_{I_{\text{propionitril}}}$	217	[mM]	$K_{I_{\text{propionamid}}}$	279	[mM]

Die mit dieser Methode erhaltenen Parameter sind mit den Werten aus Tabelle 3.1 nahezu identisch. Einzig die Inhibitionskonstante für den Einfluß des Substrates Propionamid bei der Amidasereaktion zeigt eine wesentliche Abweichung zu den Werten in Tabelle 3.1, indem sie hier um einen Faktor 5 geringer geschätzt wurde. Damit wurde in der dynamischen Simulation, im Vergleich zur Parameterschätzung basierend auf den Anfangsreaktionsraten, eine verstärkte Substratüberschußhemmung festgestellt.

Die in Tabelle 3.5 zusammengefaßten kinetischen Parameter aus Tabelle 3.2 und 3.4 wurden für die weiteren Untersuchungen verwendet. Dies begründet sich zum einen darin, daß für die Bestimmung der Parameter r_{\max}^* , K_M und $K_{I\text{Substrat}}$ aus den Konzentrations-Zeit-Verläufen (s. Abbildung 3.26) eine bessere Anpassung als an die Anfangsreaktionsraten (s. Abbildung 3.22) erhalten wurde. Zudem waren die für die Anpassung eingesetzten Meßdaten mit einem geringeren Meßfehler bestimmt als die Anfangsreaktionsraten. Dies liegt zum einen darin begründet, daß der Meßdatensatz für die dynamische Simulation aus einem einzigen experimentellen Ansatz stammt, zum anderen wurden die Anfangsreaktionsraten über eine Linearisierung aus verschiedenen experimentellen Ansätzen gewonnen, was eine höhere Streuung der Daten zur Folge hat.

Dagegen waren einige Inhibitionskonstanten nur über Anfangsreaktionsraten bestimmbar, da in den Anpassungen der Parameter an den Konzentrations-Zeit-Verläufen der inhibitorische Einfluß von Säure und Ammonium nicht zu unterscheiden ist. Allerdings konnte die Inhibition der Amidase-reaktion durch Ammonium (s. Tabelle 3.3) unter der Annahme, daß Propionsäure keinen inhibitorischen Einfluß auf die Rate hat, mit den Ergebnissen aus den Anfangsreaktionsraten (s. Tabelle 3.2) verglichen werden. Auch die Inhibition der Nitrilhydratase durch Propionamid zeigt nahezu identische Werte für die Inhibition unter Verwendung der jeweiligen Anpassungen. Daher wurden in Tabelle 3.5 die Inhibitionskonstanten aus Tabelle 3.2 eingefügt.

Tabelle 3.5: Zusammenfassung der erhaltenen Parameter aus Tabelle 3.2 und Tabelle 3.4

Nitrilhydratase			Amidase		
r_{\max}^*	14713	[U/g BTM]	r_{\max}^*	386	[U/g BTM]
K_M	16	[mM]	K_M	2.7	[mM]
$K_{I\text{propionitril}}$	217	[mM]	$K_{I\text{propionamid}}$	279	[mM]
$K_{I\text{propionamid}}$	125	[mM]	$K_{I\text{propionat}}$	Keine Inhibition	[mM]
$K_{I\text{propionat}}$	37	[mM]	$K_{I\text{ammonium}}$	89	[mM]
$K_{I\text{ammonium}}$	19.4	[mM]			

3.6.2 Simulation eines Fed-batch Prozesses

Die im vorherigen Abschnitt erhaltenen Parametersätze können nun zur Beschreibung und Auslegung von unterschiedlichen Prozeßführungen genutzt werden. Exemplarisch soll dies an dem unter 3.5.1 beschriebenen Datensatz für die Umsetzung in einem absatzweisen Prozeß mit kontinuierlicher Substratzudosage (fed-batch) gezeigt werden. Desweiteren soll die Langzeitstabilität dieses Prozesses unter Abschätzung der Inaktivierungsraten der beteiligten Enzyme untersucht werden.

Für die dynamische Simulation des Fed-Batch Prozesses wurden die in Gleichung 3.4 und 3.5 angegebenen Reaktionsraten für die Nitrilhydratase- und Amidase-reaktion verwendet, wobei die kinetischen Konstanten der Tabelle 3.5 entnommen wurden.

Dabei waren zwei wesentliche Punkte zu beachten. Zum einen war die Konzentration des Katalysators über die Reaktionszeit nicht konstant, da der Zulauf an Substrat die Zellsuspension verdünnte und über die Probennahme der Katalysator aus dem Reaktionsansatz entfernt wurde. Zum zweiten war eine Inaktivierung der Enzyme über die Prozeßdauer mit einzurechnen.

Unter der Annahme, daß die maximale Reaktionsrate proportional der Konzentration an aktiver Nitrilhydratase ist, läßt sich die zeitliche Änderung von $r_{\max,\text{NH}}$ in Gleichung 3.4 durch eine Bilanzierung der Enzymkonzentration an aktiver Nitrilhydratase angeben. Durch eine dimensionslose Darstellung der Nitrilhydratasekonzentration kann $r_{\max,\text{NH}}$ in Gleichung 3.4 durch folgende Gleichung ersetzt werden.

$$r_{\max,\text{NH}}(t) = r_{\max,\text{NH}}^0 \times \frac{c_{\text{NH}}(t)}{c_{\text{NH}}^0} \quad (3.9)$$

$r_{\max,\text{NH}}(t)$	=	maximale Reaktionsrate der Nitrilhydratase zum Zeitpunkt t [mM/min]
$r_{\max,\text{NH}}^0$	=	maximale Reaktionsrate der Nitrilhydratase zum Zeitpunkt t = 0 [mM/min]
$c_{\text{NH}}(t)$	=	Menge an aktiver Nitrilhydratase zum Zeitpunkt t
c_{NH}^0	=	Menge an aktiver Nitrilhydratase zum Zeitpunkt t = 0

Bilanzierung der Enzymkonzentration am Beispiel der Nitrilhydratase

Die zeitliche Änderung der Molmenge an aktivem Enzym Nitrilhydratase läßt sich mit Hilfe der Kettenregel wie folgt darstellen:

$$\frac{d}{dt}(c_{\text{NH}} \times V_{\text{R}}) = \frac{dc_{\text{NH}}}{dt} \times V_{\text{R}} + c_{\text{NH}} \times \frac{dV_{\text{R}}}{dt} = -k_{\text{NH}} \times c_{\text{NH}} \times V_{\text{R}} - F_2 \times c_{\text{NH}} \quad (3.10)$$

c_{NH}	=	Menge an aktiver Nitrilhydratase [g/l]
V_{R}	=	Reaktorvolumen [l]
k_{NH}	=	Geschwindigkeitskonstante [1/h] der Inaktivierungsreaktion erster Ordnung
F_2	=	Ablaufrate [l/h], gemittelt aus dem Probennahmenvolumen über die Prozeßzeit

Dabei sind auf der rechten Seite von Gleichung 3.9 die Stoffsenken durch Inaktivierung und Probennahme aufgeführt. Mit

$$\frac{dV_{\text{R}}}{dt} = F_1 - F_2 \quad (3.11)$$

V_{R}	=	Reaktorvolumen [l]
F_1	=	Zulaufrate [l/h]
F_2	=	Ablaufrate durch Probennahme [l/h]

und durch Auflösen der zeitlichen Änderung der Konzentration der Nitrilhydratase folgt aus Gleichung 3.10

$$\frac{dc_{\text{NH}}}{dt} = -\left(\frac{F_1}{V_R} + k_{\text{NH}}\right) \times c_{\text{NH}} \quad (3.12)$$

c_{NH} = Menge an aktiver Nitrilhydratase [g/l]
 V_R = Reaktorvolumen [l]
 k_{NH} = Inaktivierungskonstante [1/h]
 F_1 = Zulauftrate [l/h]

Indem die Enzymkonzentration an aktiver Nitrilhydratase normiert wird, kann Gleichung 3.11 in eine dimensionslose Darstellung überführt werden.

$$\frac{d\left(\frac{c_{\text{NH}}}{c_{\text{NH}}^0}\right)}{dt} = -\left(\frac{F_1}{V_R} + k_{\text{NH}}\right) \times \frac{c_{\text{NH}}}{c_{\text{NH}}^0} \quad (3.13)$$

c_{NH} = Menge an aktiver Nitrilhydratase [g/l]
 c_{NH}^0 = Menge an aktiver Nitrilhydratase zum Zeitpunkt $t = 0$ [g/l]
 V_R = Reaktorvolumen [l]
 k_{NH} = Inaktivierungskonstante [1/h]
 F_1 = Zulauftrate [l/h]

Es gilt für $t = 0$
$$\frac{c_{\text{NH}}}{c_{\text{NH}}^0} = 1 \quad (3.14).$$

Analog zu Gleichung 3.13 lässt sich die Differentialgleichung für die Konzentration an aktiver Amidase als dimensionslose Größe aufstellen:

$$\frac{d\left(\frac{c_{\text{AD}}}{c_{\text{AD}}^0}\right)}{dt} = -\left(\frac{F_1}{V_R} + k_{\text{AD}}\right) \times \frac{c_{\text{AD}}}{c_{\text{AD}}^0} \quad (3.15)$$

c_{AD} = Menge an aktiver Amidase [g/l]
 c_{AD}^0 = Menge an aktiver Amidase zum Zeitpunkt $t=0$ [g/l]
 V_R = Reaktorvolumen [l]
 k_{AD} = Inaktivierungskonstante [1/h]
 F_1 = Zulauftrate [l/h]

Ebenfalls gilt hier für $t = 0$
$$\frac{c_{\text{AD}}}{c_{\text{AD}}^0} = 1 \quad (3.16)$$

Für die übrigen Bilanzgleichungen gilt:

$$\frac{dc_{\text{Nitril}}}{dt} = -r_{\text{NH}} + \frac{F1 \times c0_{\text{Nitril}}}{V_R} - \frac{F1 \times c_{\text{Nitril}}}{V_R} - \frac{F2 \times c_{\text{Nitril}}}{V_R} \quad (3.17)$$

$$\frac{dc_{\text{Amid}}}{dt} = r_{\text{NH}} - r_{\text{AD}} - \frac{F1 \times c_{\text{Amide}}}{V_R} - \frac{F2 \times c_{\text{Amid}}}{V_R} \quad (3.18)$$

$$\frac{dc_{\text{Säure}}}{dt} = r_{\text{AD}} - \frac{F1 \times c_{\text{Säure}}}{V_R} - \frac{F2 \times c_{\text{Säure}}}{V_R} \quad (3.19)$$

$$\frac{dc_{\text{NH}_4}}{dt} = r_{\text{AD}} - \frac{F1 \times c_{\text{NH}_4}}{V_R} - \frac{F2 \times c_{\text{NH}_4}}{V_R} \quad (3.20)$$

$$\frac{dV_R}{dt} = F1 - F2 \quad (3.20)$$

r_{NH}	=	Reaktionsrate der Nitrilhydratase [mM/h]
r_{AD}	=	Reaktionsrate der Amidase [mM/h]
$F1$	=	Zulaufrate [l/h]
$F2$	=	Ablaufrate durch Probennahme [l/h]
V_R	=	Reaktorvolumen [l]
c_i	=	Konzentration des Stoffes I zum Zeitpunkt t [mM]
$c0_{\text{Nitril}}$	=	Konzentration des Substrates im Zulauf [mM]

Zusätzlich zu den in Tabelle 3.5 aufgeführten Parametern wurden die in Tabelle 3.6 dargestellten Werte für die Simulation des Fed-batch Prozesses verwendet.

Tabelle 3.6: Verwendete Reaktionsbedingungen und Inaktivierungskonstanten für die dynamische Simulation des in Abbildung 3.16a dargestellten Fed-batch Prozesses

Modellparameter			Bemerkung zur Abschätzung der Startwerte der Optimierung
F1	1×10^{-3}	[l/h]	Berechneter Zulauf aus der Zunahme der Molsumme über die Reaktionszeit
F2	3.3×10^{-4}	[l/h]	Ablauf durch Probennahme von 25 mal 1.2 ml, über die Reaktionszeit gemittelt
C_{Nitril}^0	14000	[mM]	Konzentration des Nitrils im Zulauf
k_{NH}	0.0033	[1/h]	Inaktivierungskonstante aus Abbildung 3.6 abgeschätzt
k_{AD}	0.003	[1/h]	Inaktivierungskonstante aus Abbildung 3.6 abgeschätzt
C_{Nitril}	0	[mM]	
C_{Amid}	0	[mM]	
$C_{\text{Säure}}$	0	[mM]	
C_{NH_4}	0	[mM]	
$C_{\text{NH}/\text{NH}_0}$	1		
$C_{\text{AD}/\text{AD}_0}$	1		
V_{R}	0.5	[l]	

Um die Zulauftrate an reinem Nitril exakt zu bestimmen, wurde diese aus den Molsummenänderungen im Bereich zwischen 1230 min und 3030 min berechnet. Es ergab sich ein Wert von 15.6 mM/h. Mit einer Zulaufkonzentration von 14 mol/l und einem geschätzten mittleren Volumen des Reaktors von 550 ml berechnete sich ein konstanter Zulauf von 1×10^{-3} l/h. Die diskontinuierliche Probennahme wurde hier aufgrund der hohen Probenzahl und des geringen konstanten Probenvolumens durch einen mittleren kontinuierlichen Abstrom modelliert. Die Startwerte für die Schätzung der Geschwindigkeitskonstanten für die Inaktivierung der Enzyme wurde aus der Inaktivierung bei Lagerung abgeschätzt.

Um die Inaktivierungskonstanten für den Prozeß zu bestimmen, wurden alle Modellparameter der Reaktionskinetik, die Fließrate sowie die Zulaufkonzentration des Nitrils konstant gelassen. Eine Schätzung der beiden Inaktivierungskonstanten erfolgte durch Minimierung der relativen Fehlerquadratsumme unter Berücksichtigung der in Abbildung 3.27 gegebenen experimentell ermittelten Konzentrationsverläufe.

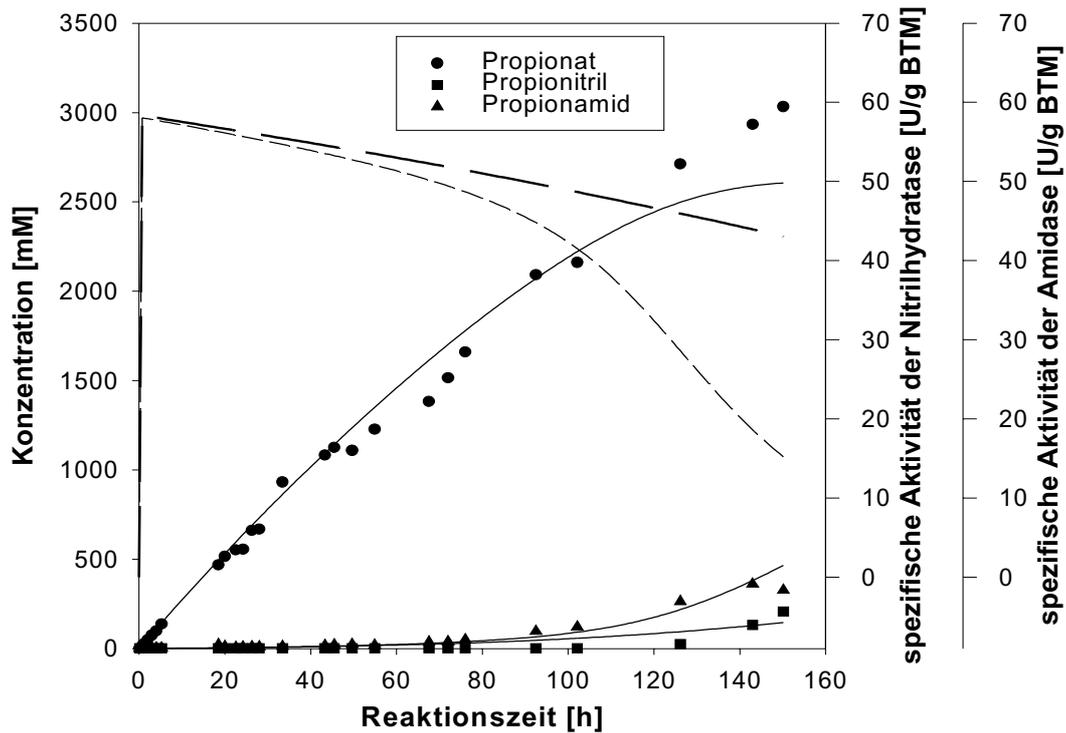


Abbildung 3.27: Konzentrations-Zeit Verläufe bei absatzweiser Prozeßführung mit kontinuierlicher Zudosage von Propionitril (s. Abbildung 3.16a). Die Punkte stehen für die gemessenen Konzentrationen, die durchgezogenen Linien für die berechneten Verläufe der Konzentrationen. Die dicke gestrichelte Linie steht für die berechnete spezifische Aktivität der Nitrilhydratase, die dünne gestrichelte Linie für die berechnete spezifische Aktivität der Amidase.

Wie in der Abbildung 3.27 zu erkennen ist, konnten im Modell tendenziell korrekte Konzentrationsverläufe im Vergleich zu den gemessenen Konzentrationen erhalten werden. Die Beträge der Inaktivierungskonstanten wurden durch die dynamische Simulation für die Nitrilhydrataseaktivität zu $k_{\text{NH}} = 0.015 \text{ 1/h}$ und für die Amidaseaktivität zu $k_{\text{AD}} = 0.012 \text{ 1/h}$ bestimmt.

Somit konnte mit den zuvor bestimmten Parametern auch ein Prozeß beschrieben werden, in dem eine Produktkonzentration von bis zu 3 M erreicht wurde. Allerdings wurde besonders die Nitrilhydrataseaktivität zum Ende des Prozesses hin niedriger berechnet, als aufgrund der Meßdaten angenommen werden konnte. Infolge dessen wurde auch die Konzentration des Endproduktes Propionat zu gering abgeschätzt. Dies könnte darin begründet sein, daß bei der Parameterschätzung der Produktinhibition schon bei 1.2 M Ammonium im Ansatz eine fast vollständige Inhibition der Nitrilhydratase vorlag (s. Abbildung 3.23c), dies aber auf den untersuchten Fed-batch Prozeß nicht übertragbar war. Auch die Parameterschätzung aus den Versuchen mit einer hohen Substratkonzentration zeigten für die Inhibitionskonstante von Ammoniumpropionat einen höheren Wert (s. Tabelle 3.3) und somit eine geringere Inhibition der Nitrilhydratasereaktion, als aus den Parameterschätzungen über Anfangsreaktionsraten zu erwarten war. Dennoch konnten die

experimentell bestimmten Meßwerte durch die dynamische Simulation qualitativ sehr gut beschrieben werden.

3.6.3 Simulation eines kontinuierlichen Prozesses

Eine weitere Abschätzung bezüglich der Inaktivierung des Enzymsystems kann durch die Auswertung der Versuche aus den kontinuierlichen Prozeßführungen erhalten werden. Dabei entsprechen die Bedingungen bezüglich der Konzentrationen der Substrate und Produkte den Bedingungen im Standardansatz (s. Abbildung 3.26), was bei dem Fed-batch Versuch nicht der Fall war.

Dazu wurden die in Abschnitt 3.5.4 beschriebenen Meßwerte aus der jeweiligen kontinuierlichen Prozeßführung mit Zudosage von Propionitril (s. Abbildung 3.20) und Propionamid (s. Abbildung 3.21) für die dynamische Simulation eingesetzt. Dabei konnten die Inhibitionskonstanten für die jeweiligen Enzyme aus den einzelnen Versuchen getrennt bestimmt werden. In den Versuchen wurden für das jeweilige Enzym Bedingungen eingestellt, die bei der Nitrilhydratase eine möglichst geringe Inaktivierung und bei der Amidase eine möglichst hohe Aktivität ergaben. Dabei wurde die Temperatur im kontinuierlich durchströmten Rührkessel für die Nitrilhydratasereaktion auf 6 °C und jeweils entsprechend für die Amidasereaktion auf 30 °C eingestellt.

Allerdings wurden diese Prozeßführungen mit immobilisierten Zellen durchgeführt, weshalb angenommen wurde, daß die ermittelte maximale Reaktionsrate der freien Zellen nicht direkt auf diese Anpassung übertragbar war. Dies konnte auch aus den Versuchen mit unterschiedlichen Immobilisatdurchmessern (s. Abbildung 3.8) abgeschätzt werden, wobei eine geringere spezifische Aktivität gefunden wurde, als aus den vergleichbaren Aktivitätstests mit freien Zellen zu erwarten gewesen wäre. Dies könnte sowohl auf eine Inaktivierung der Zellen durch den Immobilisierungsprozeß zurückgeführt werden, als auch auf eine Stofftransportlimitierung hindeuten. Da somit keine genaue Aussage über die maximale Reaktionsrate der Kinetik der Enzyme getroffen werden konnte, wurde in den folgenden dynamischen Simulationen nicht nur die Inaktivierungskonstanten variiert, sondern auch der Wert für die maximale Reaktionsrate der Nitrilhydratase- und Amidasereaktion.

Die Gleichungen für die spezifischen Reaktionsraten für die Nitrilhydratase- und die Amidasereaktion wurden dann, wie in Gleichung 3.24 und 3.25 beschrieben, angesetzt.

$$r_{\text{NH}} = \frac{r_{\text{max,NH}} \times e^{(k_{\text{NH}} \times t)} \times c_{\text{Nitril}}}{K_{\text{M,Nitril}} \times \left(1 + \frac{c_{\text{Amid}}}{K_{\text{I,Amid}}} + \frac{c_{\text{Säure}}}{K_{\text{I,Säure}}} + \frac{c_{\text{NH}_4}}{K_{\text{I,NH}_4}} \right) + c_{\text{Nitril}} + \frac{c_{\text{Nitril}}^2}{K_{\text{I,Nitril}}}} \quad (3.24)$$

r_{NH}	=	Reaktionsrate der Nitrilhydratase [mM/min]
$r_{\text{max,NH}}$	=	maximale Reaktionsrate der Nitrilhydratase [mM/min]
c_i	=	Konzentration des Stoffes i zum Zeitpunkt t [mM]
K_{M}	=	Mentenkonstante der Nitrilhydratasereaktion [mM]
$K_{\text{I,i}}$	=	Inhibitionskonstante des Stoffes i für die Nitrilhydratasereaktion [mM]
k_{NH}	=	Inhibitionskonstante der Nitrilhydratase [1/h]

$$r_{\text{AD}} = \frac{r_{\text{max,AD}} \times e^{(k_{\text{AD}} \times t)} \times c_{\text{Amid}}}{K_{\text{M,Amid}} \times \left(1 + \frac{c_{\text{NH}_4}}{K_{\text{I,NH}_4}} \right) + c_{\text{Amid}} + \frac{c_{\text{Amid}}^2}{K_{\text{I,Amid}}}} \quad (3.25)$$

r_{AD}	=	Reaktionsrate der Amidase [mM/min]
$r_{\text{max,AD}}$	=	maximale Reaktionsrate der Amidase [mM/min]
c_i	=	Konzentration des Stoffes i zum Zeitpunkt t [mM]
$K_{\text{M,Amid}}$	=	Mentenkonstante der Amidasereaktion [mM]
$K_{\text{I,i}}$	=	Inhibitionskonstante des Stoffes i für die Amidasereaktion [mM]
k_{AD}	=	Inaktivierungskonstante der Amidase [1/h]

Für die Abschätzung wurde eine ideale Durchmischung angenommen. Zudem sollten sämtliche Stofftransportprozesse an den Immobilisatpartikeln und innerhalb des Immobilisates vernachlässigt werden, ebenso wie der Austrag von Biomasse aus dem Reaktionsvolumen. Für den kontinuierlich betriebenen Prozeß gelten dann folgende Bilanzgleichungen:

$$\frac{dc_{\text{Nitril}}}{dt} = -r_{\text{NH}} + D \times c_{\text{Nitril}}^0 - D \times c_{\text{Nitril}} \quad (3.26)$$

$$\frac{dc_{\text{Amid}}}{dt} = r_{\text{NH}} - r_{\text{AD}} - D \times c_{\text{Amid}} \quad (3.27)$$

$$\frac{dc_{\text{Säure}}}{dt} = r_{\text{AD}} - D \times c_{\text{Säure}} \quad (3.28)$$

$$\frac{dc_{\text{NH}_4}}{dt} = r_{\text{AD}} - D \times c_{\text{NH}_4} \quad (3.29)$$

r_{NH}	=	Reaktionsrate der Nitrilhydratase [mM/min]
r_{AD}	=	Reaktionsrate der Amidase [mM/min]
C_i	=	Konzentration des Stoffes i zum Zeitpunkt t [mM]
C_0^{Nitril}	=	Konzentration des Substrates im Zulauf [mM]
D	=	Verdünnungsrate [1/h]

3.6.3.1 Inaktivierung der Nitrilhydratase

Die verwendeten Meßdaten wurden dem in Abbildung 3.20 dargestellten Ansatz mit kontinuierlicher Substratzuführung entnommen. Dabei wurde für die Parameterschätzung der Zeitbereich von 21.4 h bis 106.5 h Reaktionszeit verwendet. Die Zulauftrate lag konstant bei 400 ml/h und somit die Verdünnungsrate bei $D = 2.6$ 1/h. Es wurde angenommen, daß in der Zeit von $t = 0$ bis zu $t = 21.4$ h keine Inaktivierung festzustellen war. Dies ließ sich aufgrund der nahezu konstanten Konzentration an Propionitril innerhalb diese Zeitspanne belegen. Da die Meßwerte für die Propionamidkonzentration stark streuten, wurden diese nicht für die Parameterschätzung verwendet. Die Meßwerte für die Propionsäure zeigten in dem gewählten Bereich keine Veränderung. Es konnte für die Amidasereaktion keine Inaktivierung festgestellt werden. Daher wurden nur die Daten der Propionitrilkonzentration für die Parameterschätzung verwendet.

Es wurden die in Tabelle 3.5 angegebenen Parameter für die dynamische Simulation eingesetzt. Zudem wurden die in Tabelle 3.7 dargestellten Konzentrationen als Startwerte eingesetzt.

Tabelle 3.7: Startkonzentrationen für die dynamische Simulation der maximalen Reaktionsraten und der Inaktivierung der Nitrilhydratase- und Amidasereaktion aus einem kontinuierlichen Prozeß zur Propionitrilverseifung. Die Daten sind der Abbildung 3.20 zum Zeitpunkt $t = 21.4$ h entnommen.

Substanz	Konzentration [mM]
Propionitril	13.72
Propionamid	93.85
Propionat	12.64
Ammonium	12.64

Durch eine Anpassung der Parameter der maximalen Reaktionsraten und der Inaktivierungskonstanten der dynamischen Simulation an den Verlauf der Propionitrilkonzentration, konnten die in Abbildung 3.28 dargestellten Konzentrationsverläufe erhalten werden:

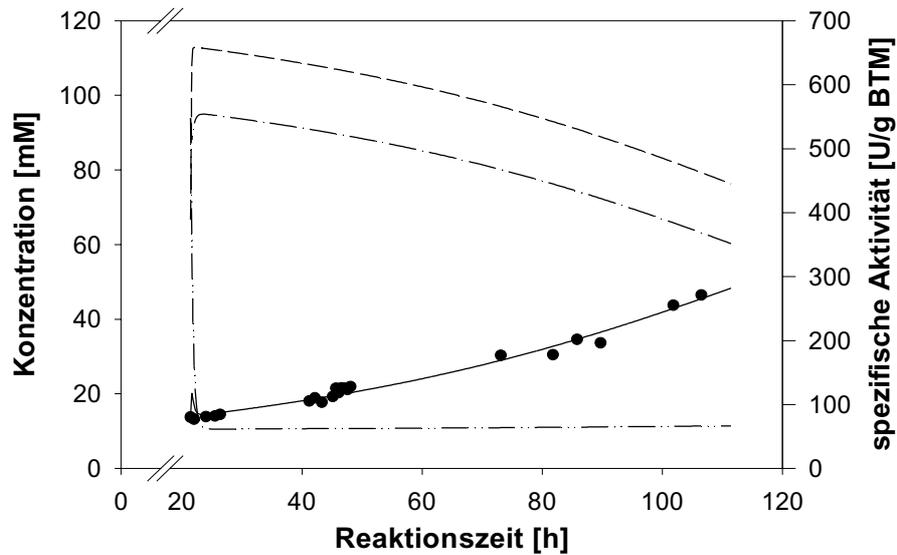


Abbildung 3.28: Konzentrations-Zeit-Verläufe für die Substrate und Produkte bei der kontinuierlichen Prozeßführung der Propionitrilumsetzung aus Abbildung 3.20 im Zeitbereich von 21.4 h bis 106.5 h. Die Punkte stellen die gemessene Konzentration an Propionitril dar, die durchgezogenen Linien wurden durch numerische Integration berechnet, ebenso wie die Konzentration an Propionamid (-.-) und die Propionatkonzentration (-.-.-). Die gestrichelte Linie stellt die spezifische Reaktionsrate der Nitrilhydratase dar.

Über die dynamische Simulation wurden die in Tabelle 3.8 zusammengefaßten Parameter bestimmt.

Tabelle 3.8: Aus Abbildung 3.28 geschätzte Parameter für den kontinuierlich betriebenen Prozeß der Nitrilverseifung.

Parameter		optimierter Wert	
r_{\max}^*	Nitrilhydratase	3428	[U/g BTM]
k	Nitrilhydratase	0.0121	[1/h]
r_{\max}^*	Amidase	89.9	[U/g BTM]
k	Amidase	0	[1/h]

Zur qualitativen Überprüfung der Vorhersagbarkeit des Modells wurde durch numerische Integration der Gesamtprozeß dargestellt, wobei die verwendeten unterschiedlichen Zulaufdaten aus dem in Abbildung 3.20 dargestellten Prozeß entnommen wurden. Es wurden die in Tabelle 3.5 und 3.8 beschriebene Parameter verwendet. Dabei wurden die in Abbildung 3.29 dargestellten Verläufe für die Konzentrationen erhalten.

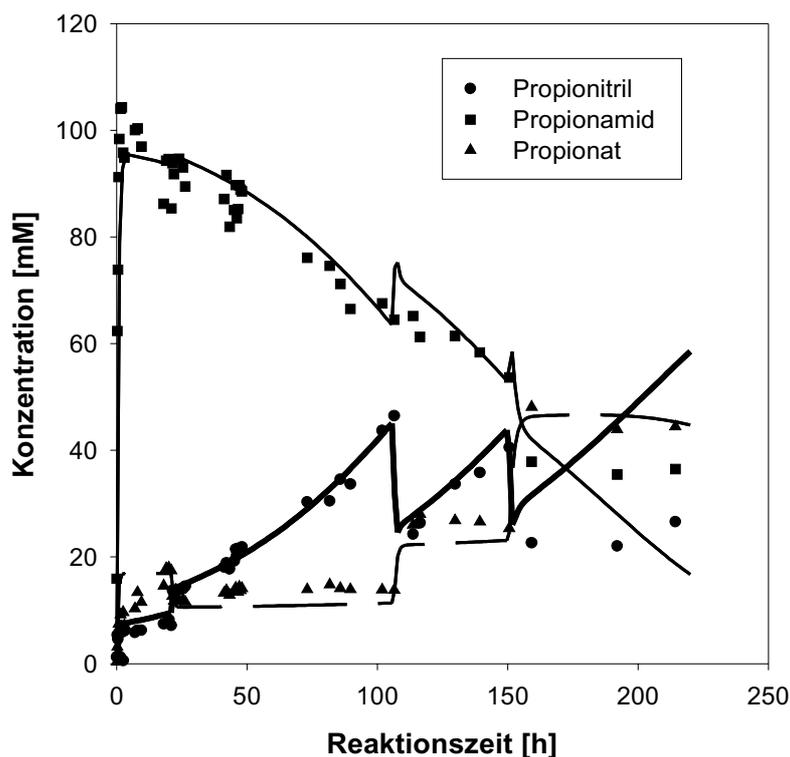


Abbildung 3.29: Konzentrations-Zeit-Verläufe des in Abbildung 3.20 dargestellten kontinuierlichen Prozesses zur Propionitrilverseifung. Die Punkte stellen die Meßdaten dar, die Linien die durch numerische Integration erhaltenen Verläufe der Konzentrationen. Die dickere Linie bezeichnet die Propionitrilkonzentration, die dünnere Linie die Propionamidkonzentration und die gestrichelte Linie die Propionatkonzentration.

Wie aus Abbildung 3.29 zu erkennen ist, konnten die realen Meßdaten zu Beginn des Versuches sehr gut durch die numerische Integration der bestimmten Parametern dargestellt werden. Dabei war festzustellen, daß zum Ende des Versuches eine zu geringe Nitrilhydrataseaktivität und somit auch ein starker Anstieg der Propionitrilkonzentration berechnet wurde. Dagegen zeigte der Verlauf der Propionatkonzentration im gesamten Bereich eine gute Übereinstimmung mit den gemessenen Werten. Somit wurde der Verlauf der Reaktionsrate über die Prozeßzeit offensichtlich sehr gut durch das Modell wiedergegeben, obwohl der Stofftransport im Modell nicht berücksichtigt wurde. Die bestimmten maximalen Raten der Nitrilhydratase und der Amidaseaktion lagen hier um einen Faktor 0.23 niedriger, als die aus den Anfangsreaktionsraten für freie Zellen geschätzten Werte (s. Tabelle 3.5). Dabei war aufgrund der Reaktionstemperatur von 6 °C eine Verringerung der spezifischen Aktivität um den Faktor 0.5 (s. Abbildung 3.5) zu erwarten. Eventuell könnte also eine Stofftransportlimitierung für die Abnahme der spezifischen Aktivität gegenüber den Abschätzungen für freie Zellen angenommen werden. Dies wird in Abschnitt 3.6.2.4 eingehender untersucht. Dabei wurde eine Transportlimitierung für das Substrat vom Bulk an die Immobilisatoberfläche festgestellt. Der Effektivitätskoeffizient für das Verhältnis der beobachtbaren Reaktionsrate zu der maximalen

Reaktionsrate lag dabei bei $\eta_{\text{ext}} = 0.7$. Somit würde sich über die geringere Reaktionstemperatur bei der kontinuierlichen Prozeßführung und die Stofftransportlimitierung durch die Immobilisierung eine Verringerung der maximalen Reaktionsrate um den Faktor 0.35 gegenüber der maximalen Rate der frei suspendierten Zellen im Standardaktivitätstest (s. Tabelle 3.5) ergeben. Da der zur Parameterschätzung herangezogene Meßdatenbereich nach einer Reaktionszeit von 21 h gewählt wurde, kann angenommen werden, daß bis zu diesem Zeitpunkt bereits eine Inaktivierung stattgefunden hatte, die den Unterschied zwischen der berechneten maximalen Reaktionsrate und der über die Temperatur und Stofftransportlimitierung abgeschätzten Rate erklären könnte.

3.6.3.2 Inaktivierung der Amidase

Da die Amidase in dem zuvor untersuchten Prozeß keine Inaktivierung zeigte (s. Tabelle 3.8), wurde die Inaktivierungskonstante aus dem in Abbildung 3.21 dargestellten kontinuierlichen Prozeß für die Propionamidhydrolyse abgeschätzt. Unter den dabei vorgegebenen Prozeßbedingungen konnte eine Inaktivierung der Amidasereaktion durch den Anstieg der Propionamidkonzentration im Reaktor über die Prozeßzeit beobachtet werden (s. Abbildung 3.21). Dabei konnte nach der ersten Umstellung der Zulauftrate bei $t = 336$ h eine nicht ausschließlich mit der Durchflußrate korrelierende Abnahme der Propionamidkonzentration beobachtet werden. Es sollte nach 30 h bei einer Verdünnungsrate von $D = 0.16$ 1/h ein vollständiger Austausch des Reaktormediums erfolgt sein. Jedoch stellte sich das neue Fließgleichgewicht erst nach 100 h ein (s. Abschnitt 3.5.4). Zudem wurde bei geringeren Fließraten ein Freisetzen der immobilisierten Zellen beobachtet, welches zu einer Abnahme der Katalysatorkonzentration führte. Dieser Effekt kann nicht durch das entwickelte Modell für die Kinetik der Amidasereaktion abgebildet werden, da offensichtlich nicht nur eine kinetisch bedingte Dynamik in dem System vorliegt. Daher konnte nur für den ersten Abschnitt des Prozesses mit einer kontinuierlichen Verdünnungsrate von $D = 0.277$ 1/h eine Abschätzung der Inaktivierungskonstanten erfolgen, wobei in dieser Zeit kein Verlust an Biomasse aus dem Reaktor beobachtet wurde.

Für die dynamische Simulation wurden die in Tabelle 3.5 für die Amidasereaktion beschriebenen Parameter verwendet. Als Meßdatensatz wurde der Verlauf der Propionamidkonzentration gewählt, da die Meßwerte der Propionsäurekonzentration stark streuten (s. Abbildung 3.21). Als Bilanzgleichungen für den Prozeß wurden folgende Gleichungen aufgestellt:

$$\frac{dc_{\text{Amid}}}{dt} = D \times c_{\text{Amid}}^0 - r_{\text{AD}} - D \times c_{\text{Amid}} \quad (3.30)$$

$$\frac{dc_{\text{Säure}}}{dt} = r_{\text{AD}} - D \times c_{\text{Säure}} \quad (3.31)$$

$$\frac{dc_{\text{NH}_4}}{dt} = r_{\text{AD}} - D \times c_{\text{NH}_4} \quad (3.32)$$

r_{AD}	=	Reaktionsrate der Amidase [mM/min], siehe Gleichung 3.25
c_i	=	Konzentration des Stoffes i zum Zeitpunkt t [mM]
c_{Amid}^0	=	Konzentration des Substrates im Zulauf [mM]
D	=	Verdünnungsrate [1/h]

Bei der dynamischen Simulation wurde der Parameter für die Inaktivierung abgeschätzt. Da bei der kontinuierlichen Prozeßführung zur Propionamidhydrolyse immobilisierte Zellen eingesetzt wurden, wurde bei dieser Anpassung die spezifische Aktivität der Amidase variiert. Es wurden die in Tabelle 3.9 aufgeführten Startkonzentrationen eingesetzt.

Tabelle 3.9: Startkonzentrationen für die dynamische Simulation der maximalen Reaktionsrate und der Inaktivierung der Amidasereaktion aus einem kontinuierlichen Prozeß zur Propionamidhydrolyse. Die Daten sind der Abbildung 3.21 zum Zeitpunkt $t = 1$ h entnommen.

Substanz	Konzentration [mM]
Propionamid	2.5
Propionat	95.8
Ammonium	95.8

Es wurden durch numerische Integration der Gleichungen 3.30 bis 3.32, Parameteroptimierung der Maximalrate der Amidase bzw. der Inaktivierungskonstanten des Enzyms die in Abbildung 3.30 dargestellten Kurvenverläufe erhalten.

Die Parameterschätzung ergab eine betragsmäßige Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierung von $k = 6.2 \times 10^{-3}$ 1/h und eine maximale spezifische Reaktionsrate von 130 U/g BTM. Die hier bestimmte maximale spezifische Reaktionsrate der Amidase zeigt einen deutlich geringeren Wert im Vergleich zu der in Tabelle 3.5 korrespondierenden spezifischen Maximalrate. Auch in diesem Fall könnte eine Stofftransportlimitierung aufgrund der Immobilisierung der Zellen vorliegen, aber auch durch einen Aktivitätsverlust bei der Immobilisierung selbst könnte diese geringe Aktivität erklärt werden. Da eine Inhibierung durch im Alginate akkumulierte Produkte möglich ist, könnten dadurch veränderte Bedingungen gegenüber den Konzentrationen im Bulk auftreten. Dies könnte aufgrund der Produkthemmung ebenfalls zu einer Verringerung der Aktivität gegenüber den frei suspendierten Zellen führen. Die Inaktivierungskonstante ist mit einem aus Abbildung 3.6 durch Extrapolation der Regressionsgeraden bis zu einer Temperatur von 30 °C zu erhaltenden Wert vergleichbar.

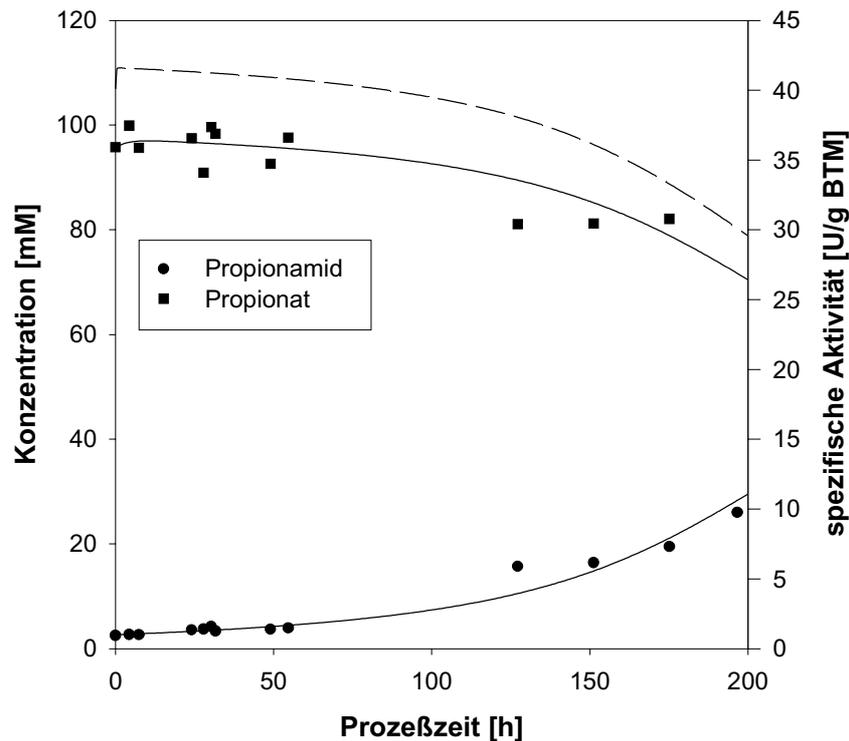


Abbildung 3.30: Konzentrations-Zeit-Verläufe für die Substrate und Produkte bei der kontinuierlichen Prozeßführung aus Abbildung 3.21 im Zeitbereich bis 200 h. Die Punkte stellen die gemessenen Konzentrationen dar, die durchgezogenen Linien wurden durch numerische Integration berechnet. Die gestrichelte Linie stellt die spezifische Reaktionsrate der Amidase dar.

Zusammenfassend kann aus den Parameterschätzungen zu den kontinuierlichen Prozeßführungen mit immobilisierten Zellen abgeschätzt werden, daß die kinetischen Ansätze auch in diesem System anwendbar sind. Die Inhibitionskonstanten konnten aus den Versuchen abgeschätzt werden, wobei die maximale spezifische Reaktionsrate der Nitrilhydratase und der Amidase deutlich geringer geschätzt wurden als in den Versuchen mit freien Zellen. Dies könnte auf eine Stofftransportlimitierung hindeuten, wie sie in Abschnitt 3.6.2.4 genauer untersucht wird.

3.6.4 Abschätzung der Stofftransportlimitierung bei in Kalziumalginat immobilisierten Zellen

Durch die Immobilisierung von Biokatalysatoren kann es zu deutlichen Unterschieden zwischen den beobachtbaren Reaktionsraten des freien und des immobilisierten Katalysators kommen. Diesem Phänomen kann zum einen eine Inaktivierung des Katalysators durch die Prozedur der Immobilisierung zugrunde liegen, zum anderen aber auch eine Stofftransportlimitierung. Dabei kann mit verschiedenen theoretischen Ansätzen die Limitierung des Stofftransportes aus der Lösung an das Immobilisat bzw. im Immobilisat abgeschätzt werden. Da auch in dieser Arbeit Untersuchungen mit

immobilisierten, ruhenden Zellen durchgeführt wurden, werden im weiteren Limitierungen für den äußeren und inneren Stofftransport über den Effektivitätskoeffizienten η abgeschätzt. Dieser beschreibt das Verhältnis der beobachtbaren Reaktionsrate des immobilisierten Katalysators zu der maximal möglichen Reaktionsrate.

$$\eta = \frac{r_{\text{eff}}}{r_{(c_i=c_i^0)}} \quad (3.33)$$

η = Effektivitätskoeffizient [-]
 r_{eff} = effektive Reaktionsrate [mM/min]
 $r_{(c_i=c_i^0)}$ = Reaktionsrate im Pellet bei Vorliegen der Substratkonzentration im Bulk [mM/min]

Zur Abschätzung des Effektivitätskoeffizienten η für den internen Stofftransport wurde der literaturbeschriebene modifizierte Thiele-Modulus ϕ bestimmt (Bailey & Ollis 1986). Dieser beschreibt das Verhältnis zwischen der beobachtbaren Reaktionsrate und dem diffusiven Stofftransport im Immobilisat. In Gleichung 3.34 wird der entsprechende mathematische Zusammenhang dargestellt.

$$\phi = \frac{r}{D_{\text{eff}} \times c_S} \left(\frac{R}{3} \right)^2 \quad (3.34)$$

ϕ = modifizierter Thielemodulus [-]
 r_t = beobachtbare Reaktionsrate [mM/s]
 D_{eff} = effektiver Diffusionskoeffizient [cm²/s]
 c_S = Konzentration im Bulk [mM]
 R = Radius des Immobilisates [cm]

Für den in Abschnitt 3.5.4 dargestellten kontinuierlichen Prozess zur Propionitrilverseifung (s. Abbildung 3.20) konnte bezüglich der Nitrilhydratase zum Zeitpunkt $t = 21.4$ h (s. Abbildung 3.28) eine spezifische Reaktionsrate von $r^* = 650$ U/gBTM bestimmt werden. Dabei lag die Biotrockenmassekonzentration im Immobilisat bei 44 g/l (s. Abschnitt 2.8.5.1), womit sich die Reaktionsrate zu $r = 0.5$ mM/min berechnet. Die Konzentration an Substrat zu diesem Zeitpunkt lag bei $c = 13$ mM für das Substrat Propionitril. Der Radius der verwendeten Immobilisatperlen lag bei $R = 4.5 \times 10^{-4}$ m. Eine Abschätzung des molekularen Diffusionskoeffizienten erfolgte über die Gleichung nach Wilke und Chang (Baerns et al 1987). Dabei wurde der molekulare Diffusionskoeffizient zu $D_m = 1 \times 10^{-5}$ cm²/s bestimmt. Unter der Annahme, daß der effektive Diffusionskoeffizient im Alginate sich nicht wesentlich vom molekularen Diffusionskoeffizienten im Wasser unterscheidet, berechnet sich der modifizierte Thiele-Modulus zu $\phi = 0.86$.

Der Effektivitätskoeffizient η wurde aus dem modifizierten Thiele-Modulus ϕ graphisch ermittelt (s. Abbildung 4.21, (Bailey & Ollis 1986)). Dabei wurde der Effektivitätskoeffizient für eine Reaktion 1. Ordnung zu $\eta = 0.7$ ermittelt. Somit kann eine interne Stofftransportlimitierung festgestellt werden.

Bei immobilisierten Biokatalysatoren kann es neben einer internen Stofftransportlimitierung auch zu einer Limitierung des Stofftransportes aus der Flüssigkeit an die Partikeloberfläche kommen. Der

externe Effektivitätskoeffizienten η_{ext} kann abgeschätzt werden, wenn das Produkt $\eta_{\text{ext}} \times Da$ bekannt ist, wobei die Damköhlerzahl Da II (Baerns et al 1987) das Verhältnis zwischen Reaktionsrate und äußerem Stofftransport darstellt (Gleichung 3.35).

$$Da \text{ II} = \frac{k}{k_1 \times a} \quad (3.35)$$

Da	=	Damköhlerzahl [-]
k	=	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante [1/s]
k_1	=	Stoffübergangskoeffizient [m/s]
a	=	spezifische Oberfläche [1/m]

Der Term $\eta_{\text{ext}} \times Da$ berechnet sich unter der Annahme einer Reaktion 1. Ordnung nach Gleichung 3.36 (Baerns et al 1987).

$$\eta_{\text{ext}} \times Da \text{ II} = \frac{r_{\text{eff}}}{k_1 \times a \times c} \quad (3.36)$$

η_{ext}	=	externer Effektivitätskoeffizient [-]
Da	=	Damköhlerzahl [-]
r_{eff}	=	effektive Reaktionsrate [mM/s]
k_1	=	Stoffübergangskoeffizient [m/s]
a	=	spezifische Oberfläche [1/m]
c	=	Konzentration im Bulk [mM]

Die spezifische Phasengrenzfläche a berechnet sich dabei aus Gleichung 3.37.

$$a = \frac{A_p}{V_p} = \frac{6}{d_p} \quad (3.37)$$

a	=	spezifische Oberfläche [1/m]
A_p	=	Gesamtoberfläche aller Partikel [m ²]
V_p	=	Gesamtvolumen aller Partikel [m ³]
d_p	=	Durchmesser der Partikel [m]

zu $a = 6.6 \times 10^4$ 1/m. Die für die Berechnungen notwendige Stoffübergangszahl k_1 wurde mit Gleichung 3.38 bestimmt (Henzler et al 1982).

$$k_1 = \frac{D_m}{d_p} \times \left(\left(0.67 \times \left(\frac{\varepsilon \times d_p^4}{\nu^3} \right)^{\frac{1}{8}} \times Sh^{\frac{1}{3}} \right) + 2 \right) \quad (3.38)$$

k_1	=	Stoffübergangszahl [m/s]
ε	=	Energiedissipationsrate [m ² /s ³]
ν	=	kinematische Viskosität [m ² /s]
Sc	=	Schmidtzahl [-]
d_p	=	Partikeldurchmesser [m]
D_m	=	molarer Diffusionskoeffizient [cm ² /s]

Die Energiedissipation ε berechnet sich mit der Leistungscharakteristik des Scheibenrührers nach Gleichung 3.39

$$\varepsilon = \frac{P}{m} = \frac{Ne \times \rho \times n^3 \times d_R^5}{m} \quad (3.39)$$

ε	=	Energiedissipation [m^2/s^3]
P	=	Leistung [W]
m	=	Masse [kg]
Ne	=	Newtonzahl [-]
ρ	=	Dichte der Flüssigkeit [kg/m^3]
n	=	Rührerdrehzahl [1/s]
d_R	=	Rührerdurchmesser [m]

Für die Berechnung der Energiedissipation wurde über die Bestimmung der Reynoldszahl zu $Re = 8000$, wodurch unter der beschriebenen Reaktorgeometrie (s. Abschnitt 2.8) eine turbulente Strömung vorlag, eine Newtonzahl von $Ne = 5$ bestimmt. Somit berechnet sich der Wert für die Energiedissipation zu $\varepsilon = 0.43 \text{ m}^2/s^3$. Die kinematische Viskosität wurde mit einem Wert von $\nu = 1 \times 10^{-6} \text{ m}^2/s$ angenommen. Damit berechnet sich die Schmidtzahl zu $Sc = 1 \times 10^3$ unter der Verwendung des oben bestimmten molekularen Diffusionskoeffizienten.

Unter Verwendung dieser Parameter konnte über Gleichung 3.38 der Stoffübergangswert zu $k_l = 3.8 \times 10^{-5} \text{ m/s}$ berechnet werden.

Durch Einsetzen der berechneten Werte in Gleichung 3.36 konnte für den dort beschriebenen Term für $\eta_{ext} \times Da = 0.22$ berechnet werden. Der Effektivitätskoeffizient η_{ext} wurde aus $\eta_{ext} \times Da$ zu $\eta_{ext} = 0.7$ bestimmt (Baerns et al 1987, Abbildung 6.8 S. 115), unter der Annahme, daß zu dem Zeitpunkt $t = 21.4 \text{ h}$ eine Reaktion erster Ordnung vorlag. Dies konnte aufgrund der berechneten Aktivitäten in Abbildung 3.28 angenommen werden.

Somit lag neben der Diffusionslimitierung innerhalb des Immobilisatpartikels auch eine Transportlimitierung aufgrund des Stoffüberganges aus der Lösung an die Partikeloberfläche vor. Dies zusammen könnte zum einen die geringer als erwartet geschätzte maximale Reaktionsrate der Nitrilhydratase- und Amidasereaktion in Abschnitt 3.6.3 erklären. Zum anderen könnte so die in Abschnitt 3.4.1 beschriebene Abhängigkeit der Reaktionsrate vom Durchmesser der Immobilisatperlen erklärt werden, da der Durchmesser der Partikel direkt in die spezifische Oberfläche a (s. Gleichung 3.37) eingeht und somit der bestimmte Term $\eta_{ext} \times Da$ verringert wird. Dies hat eine Verringerung des Effektivitätskoeffizienten, also eine Erhöhung der externen Stofftransportlimitierung, zur Folge. Aber auch der interne Stofftransport hängt vom Radius der Immobilisatpartikel über den modifizierten Thielemodulus ab (s. Gleichung 3.34), wobei ein Ansteigen des Radius der Partikel eine Erhöhung des modifizierten Thielemodulus zur Folge hat, und somit der Effektivitätskoeffizient erniedrigt bzw. die interne Stofftransportlimitierung erhöht wird.

3.7 Optimierung des Mediums für die Zellanzucht

Die erste Kultivierung der Zellen erfolgte mit einem für diesen Stamm angegebenen Medium (Ress-Löschke 1996). Dabei wurde aufgrund der Angaben über den verwendeten Stamm *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002 angenommen, daß das Enzymsystem in den Zellen durch die Zugabe von Induktoren aktivierbar ist. Dies wurde auch für einige der in Tabelle 1.1 und 1.2 dargestellten Nitrilhydratasen und Amidasen beschrieben. Wie in den Untersuchungen zur Kinetik festgestellt wurde, zeigt die Amidase gegenüber der Nitrilhydratase eine deutlich geringere spezifische Aktivität. Für einen industriellen Prozeß wäre daher eine Erhöhung der spezifischen Aktivität der Amidase interessant. Daher sollte untersucht werden, ob durch eine Änderung der Mediumszusammensetzung eine Erhöhung der spezifischen Aktivitäten möglich ist und Vorschläge für eine Optimierung des Mediums erarbeitet werden.

3.7.1 Expression des Enzymsystems

Aufgrund der Angaben des Industriepartners bezüglich der Induzierbarkeit des Enzymsystems und der in der Literatur beschriebenen Induktoren (s. Tabelle 1.1 und 1.2) wurde in Schüttelkolbenexperimenten (s. Abschnitt 2.4.2) der Einfluß von verschiedenen Induktoren auf die spezifische Aktivität der Biomasse untersucht. Dazu wurde Medium 1 (s. Tabelle 2.4) ohne β -Caprolactam und Kobaltchlorid angesetzt und die jeweiligen Komponenten in den weiteren Ansätzen zugegeben. Die Biomasse wurde nach der Aberntung im Standardaktivitätstest auf ihre spezifische Aktivität hin untersucht. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 3.10 dargestellt.

Dabei wurde festgestellt, daß das Enzymsystem bei dem verwendeten Medium auch ohne die Zugabe von speziellen Induktoren im Organismus vorliegt. Die Zugabe von β -Caprolactam erniedrigte die spezifische Aktivität der Amidase im Vergleich zu dem Medium, ohne die Zugabe von Induktoren. Auch durch Phenylpropionitril wurden beide Enzyme in ihrer Aktivität eher gehemmt.

Tabelle 3.10: Einfluß von verschiedenen Induktoren auf die spezifische Aktivität der Biomasse

Induktor	Nitrilhydrataseaktivität [U/g BTM]	Amidaseaktivität [U/g BTM]
ohne	37854	255
0.5 g/l β -Caprolactam	32159	136
1 mM Phenylpropionitril	26515	172
1 g/l Acetamid	1292	0
1 g/l Propionamid	5712	124
1 g/l Harnstoff	3070	0
0.01 g/l Kobaltchlorid	37342	133
0.1 g/l Kobaltchlorid	10815	170

Propionamid, Acetamid und Harnstoff inhibieren in Konzentrationen von 1 g/l die Aktivität der Nitrilhydratase gegenüber dem Ansatz ohne Induktoren um bis zu 90 %, die der Amidase um bis zu 50 %. Die Zugabe von Kobaltchlorid in dem vorgeschlagenen Medium führte bei geringen Konzentrationen zu einer Erniedrigung der spezifischen Amidaseaktivität, bei höheren Konzentrationen auch zu einem Verlust an spezifischer Aktivität der Nitrilhydratase.

Da offensichtlich die Zusammensetzung des Mediums einen deutlichen Einfluß auf die spezifischen Aktivitäten zeigte, wurde aus der Literatur (Layh 1994) ein Medium ausgewählt, das für die Anzucht von *Rhodococcus*stämmen besser geeignet war. Mit diesem wurden die weiteren Untersuchungen zu der Zusammensetzung eines optimierten Mediums durchgeführt.

3.7.2 Einfluß der Wachstumsphase auf die spezifische Aktivität

Da bei der ersten Anzucht mit dem vorgeschlagenen Medium (s. Abschnitt 3.2.1) kein Aktivitätsverlauf über die Prozeßzeit aufgenommen wurde, sollte in einem Vorversuch festgestellt werden, ob die Zeit der Ernte der Biomasse einen Einfluß auf die spezifische Aktivität hat.

Dazu wurde in Schüttelkolbenexperimenten (s. Abschnitt 2.4.2) zu festgesetzten Zeitpunkten Biomasse abgeerntet und die so erhaltenen Zellen auf ihre spezifische Aktivität hin im

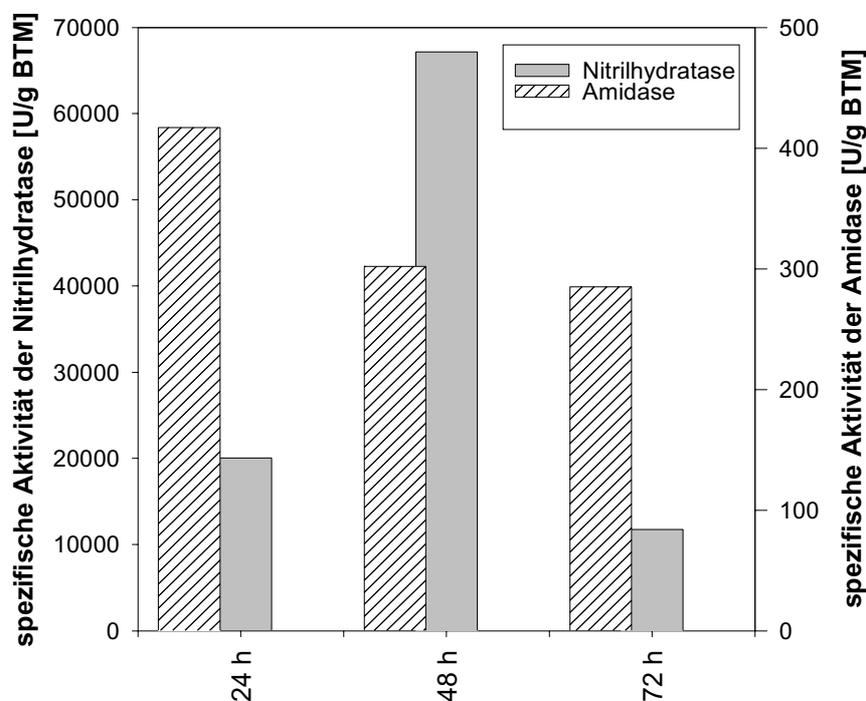


Abbildung 3.31: Verlauf der spezifischen Aktivität des Enzymsystems bei Schüttelkolbenexperimenten über die Prozeßzeit.

Standardaktivitätstest (s. Abschnitt 2.5.8) untersucht. Die dabei erhaltenen spezifischen Aktivitäten für die Nitrilhydratase und die Amidase sind in Abbildung 3.31 dargestellt.

Die spezifischen Aktivitäten lagen nach 48 h Wachstum und Abernten der Zellen bei 65000 U/g BTM für die Nitrilhydratase und bei 450 U/g BTM für die Amidase.

In Schüttelkolbenansätzen mit einer Probennahme nach 24, 48 und 72 h Wachstum konnte eine deutliche Änderung der spezifischen Aktivitäten mit der Prozeßzeit festgestellt werden.

Für die Nitrilhydrataseaktivität wurde ein Maximum nach 48 h Wachstum festgestellt. In den folgenden 24 h sank die spezifische Aktivität wieder stark ab. Die Amidaseaktivität hingegen zeigte nach 24 h ein Maximum, danach sank auch hier die spezifische Aktivität wieder ab.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde eine eingehendere Untersuchung des Zusammenhangs von Wachstum und spezifischer Aktivität der Biomasse, besonders in den ersten 48 h des Wachstums, durchgeführt. In einem Schüttelkolbenexperiment mit dem unter Abschnitt 2.4.1.3 angegebenen Medium 2 wurde wie unter Abschnitt 2.4.2 beschrieben eine Kultivierung durchgeführt. Die erhaltenen Verläufe der bestimmten Parameter wurden in Abbildung 3.32 dargestellt.

Auch hier konnte ein Anstieg der spezifischen Aktivitäten über die Prozeßzeit von 40 h festgestellt werden. Die erhaltenen Aktivitäten waren mit den Aktivitäten aus den Vorversuchen (s. Abbildung 3.31) vergleichbar, wobei die Amidase eine etwas geringere Aktivität nach 24 h Prozeßzeit aufwies. Ein Vergleich der Wachstumskurven mit den Daten aus den Schüttelkolbenexperimenten zeigte eine gute Übereinstimmung.

Dennoch war aus den geschilderten Versuchen ein Anstieg der spezifischen Aktivitäten beider Enzyme bis zum Ende der Kultivierung nach 40 h Prozeßzeit erkennbar. Da sowohl in den Kultivierungen mit Medium 1 (s. 3.2.1) als auch in den oben beschriebenen Versuchen die Glucose als auch das Ammonium nicht vollständig verstoffwechselt wurden, sollte im Folgenden der Einfluß dieser Substanzen auf die spezifischen Aktivitäten gemessen werden.

3.7.3 Einfluß der Glucosekonzentration auf die spezifische Aktivität

Aufgrund der Angaben des Industriepartners sollten Glucosekonzentrationen oberhalb von 2 g/l die Aktivität des Enzymsystems deutlich hemmen. Die zuvor durchgeführten Untersuchungen zeigten zudem eine geringe Verstoffwechslung der Glucose während der Kultivierung.

Daher wurden parallel drei Kultivierungen wie unter Abschnitt 2.4.2 beschrieben mit je 200 ml Medium 2 (s. Tabelle 2.4) und verschiedenen Glucosekonzentrationen im Schüttelkolben angesetzt.

Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurden die Zellen abgeerntet und die spezifische Aktivität der Nitrilhydratase und Amidase über den Standardaktivitätstest bestimmt. Die erhaltenen spezifischen Aktivitäten wurden in Tabelle 3.11 dargestellt.

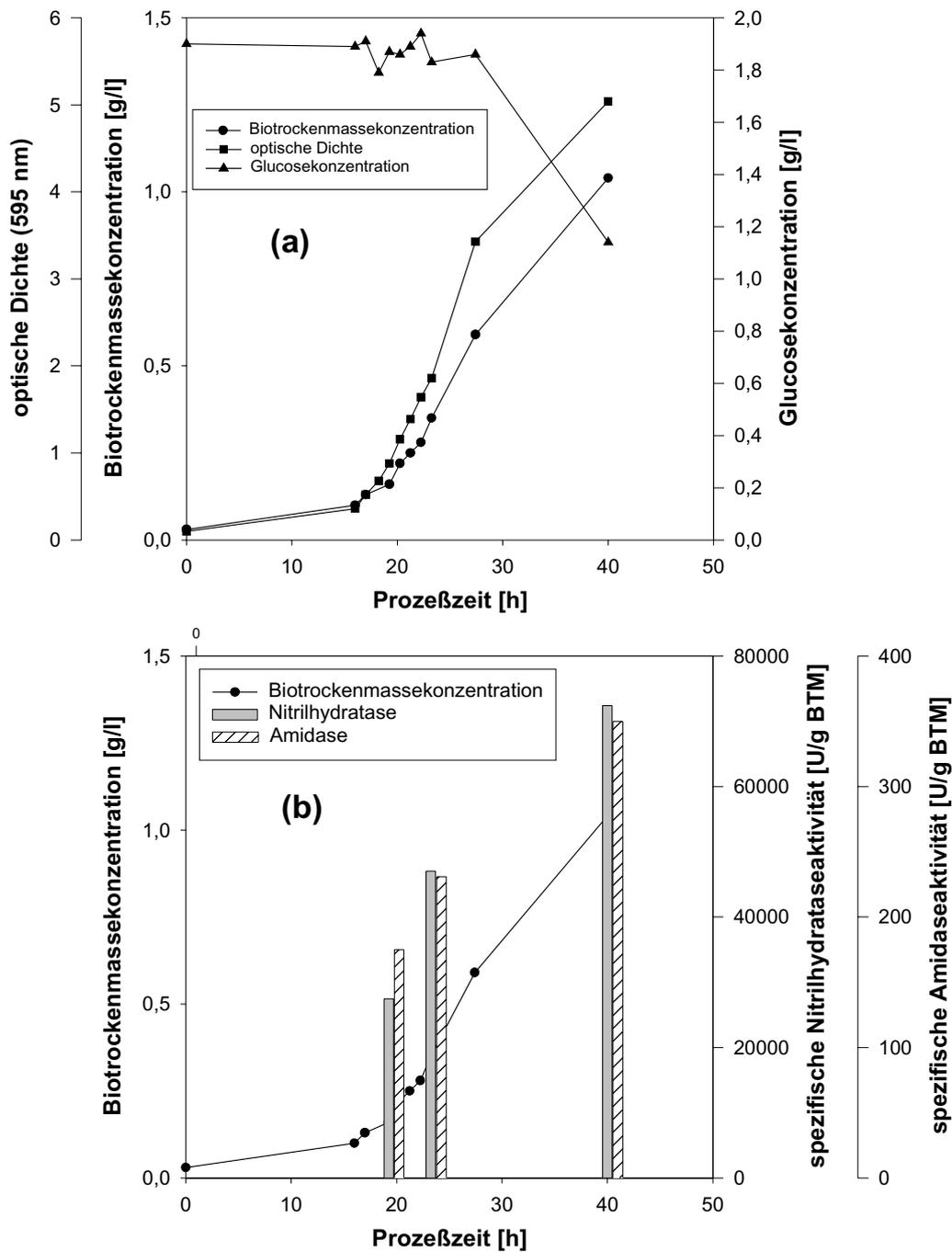


Abbildung 3.32: Kultivierung des Stammes *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002 in Medium 2. Es wurden die optische Dichte, die Biotrockenmassekonzentration und die Glucosekonzentration (a) bzw. die Biotrockenmassekonzentration, die spezifischen Aktivitäten der Nitrilhydratase und der Amidase (b) über der Prozeßzeit aufgetragen.

Wie aus Tabelle 3.11 zu ersehen ist, war die spezifische Nitrilhydrataseaktivität bei einer Glucosekonzentration von 2 g/l am höchsten. Die Amidase war im Ansatz ohne Glucose am aktivsten. Aufgrund der bei allen drei Versuchen in ähnlicher Konzentration erhaltenen Biomassekonzentration,

Tabelle 3.11: Spezifische Aktivität des Enzymsystems bei Kultivierung in Medium 2 mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen

Glucosekonzentration [g/l]	Nitrilhydrataseaktivität [U/g BTM]	Amidaseaktivität [U/g BTM]	Erhaltene Biofeuchtmasse im Schüttelkolben [g/l]
0 g/l	34031	723	13.0
2 g/l	64814	307	12.8
20 g/l	42614	217	13.5

die mit den Versuchen zur Anzucht mit Medium 1 (s. Abbildung 3.2) und Medium 2 (s. Abbildung 3.32) übereinstimmen, wurde angenommen, daß die Glucose auch in diesen Versuchen nicht oder nur zu einem geringen Teil zur Biomasseproduktion verstoffwechselt wurde.

Es konnte gezeigt werden, daß Glucose in einer Konzentration bis zu 20 g/l keinen vollständigen Verlust der Aktivität des Enzymsystems ergab.

In den folgenden Versuchen wurde, aufgrund der hohen spezifischen Nitrilhydrataseaktivität bei einer Kultivierung mit 2 g/l Glucose im Medium, für die Biomasseproduktion der Gehalt an Glucose im Medium beibehalten.

3.7.4 Einfluß von Ammonium auf die spezifische Aktivität

Aus den bisherigen Untersuchungen zur Biomasseproduktion war erkennbar, daß Ammonium bei einem Wachstum auf Hefeextrakt nicht limitierend wirkt. Da Ammonium während der Kultivierung nicht verbraucht, sondern gebildet wird, wurde der Einfluß von Ammonium in Form von Ammoniumsulfat auf die Kultivierung und die resultierende spezifische Aktivität der Enzyme untersucht.

Die aus den Schüttelkolbenexperimenten mit Medium 2 unter Verwendung von verschiedenen Ammoniumsulfatkonzentrationen erhaltenen spezifischen Aktivitäten wurden in Tabelle 3.12 zusammengefaßt.

Es ist aus Tabelle 3.12 zu erkennen, daß Ammoniumsulfat in hohen Konzentrationen bei der Kultivierung einen aktivierenden Einfluß auf die spezifische Amidaseaktivität hat. Die spezifische Nitrilhydrataseaktivität wird durch hohe Ammoniumkonzentrationen eher verringert. Bei einer

Tabelle 3.12: Einfluß von Ammoniumsulfat auf die Aktivität des Enzymsystems

Ammoniumsulfatkonzentration [g/l]	spezifische Nitrilhydrataseaktivität [U/g BTM]	spezifische Amidaseaktivität [U/g BTM]
0	9842	113
2	43326	269
5	23388	298
10	30947	409

Konzentration von 2 g/l konnte eine fünffach höhere spezifische Aktivität der Nitrilhydratase gegenüber dem Ansatz ohne Ammoniumsulfatzugabe festgestellt werden. Auch die spezifische Aktivität der Amidase war nach der Kultivierung in einem Medium ohne zusätzliche Ammoniumzugabe am geringsten. Um eine hohe Nitrilhydrataseaktivität zu erhalten, wurde auch in den weiteren Versuchen eine Ammoniumsulfatkonzentration von 2 g/l im Medium beibehalten.

3.7.5 Einfluß von Eisen auf die spezifische Aktivität

Da die untersuchte Nitrilhydratase ein eisenabhängiges Enzym ist (Hollergschwandner 1999), wurde im weiteren untersucht, ob der Eisengehalt in Medium 2 einen Einfluß auf die Aktivität des untersuchten Enzymsystems hat. Dabei wurde als Salz zwei- und dreiwertiges Eisen in unterschiedlichen Konzentrationen dem Medium zugegeben. Es ergaben sich die in Tabelle 3.13 zusammengefaßten spezifischen Aktivitäten:

Bei einer konstanten Ammoniumsulfatkonzentration von 2 g/l wurde die Konzentration an Eisensulfat in verschiedenen Oxidationsstufen variiert, und es ergab sich eine deutliche Steigerung der spezifischen Aktivitäten der Biomasse gegenüber einem Ansatz ohne Zugabe von Eisensulfat. Dabei nahm die spezifische Amidaseaktivität durch höhere Eisen(III)sulfatkonzentrationen zu, die spezifische Nitrilhydrataseaktivität dagegen ging zurück. Die Verwendung von Eisen(II)sulfat hatte einen eher verringerten Einfluß auf die spezifische Aktivität des jeweiligen Enzyms.

Zusammenfassend kann zur Optimierung des Mediums gesagt werden, daß durch die Verwendung von zusätzlichen Induktoren im Wachstumsmedium ein eher aktivitätsverringender Einfluß auf das Enzymsystem festzustellen war. Obwohl Glucose und Ammonium während der Zellkultivierung nicht verbraucht worden, hat das Fehlen dieser Komponenten in einem Anzuchtmedium einen negativen Einfluß auf die spezifische Aktivität des Ganzzellsystems. Die Zugabe von Eisen(III)sulfat ist ebenfalls für das Erreichen einer hohen spezifischen Aktivität notwendig. Die Zellen sollten in der frühen stationären Wachstumsphase abgeerntet werden. Die Anzucht mit dem Medium 2 (s. Tabelle 2.4) ergab eine deutlich höhere spezifische Aktivität der Nitrilhydratase von 60000 U/g BTM und der Amidase von 400 U/g BTM gegenüber den spezifischen Aktivitäten aus der Anzucht mit Medium 1 (s. Tabelle 3.10).

Tabelle 3.13: Spezifische Aktivität des Enzymsystems nach Kultivierung in Medium 2 mit dem entsprechenden Gehalt an Eisensulfat.

Eisensulfatgehalt	spezifische Nitrilhydrataseaktivität [U/g BTM]	spezifische Amidaseaktivität [U/g BTM]
0 g/l	3563	0
0.2 g/l Fe(III)sulfat	43326	269
0.4 g/l Fe(III)sulfat	31981	484
0.2 g/l Fe(III)sulfat und 0.2 g/l Fe(II)sulfat	40453	205

4 Diskussion

Die Arbeiten zur Entwicklung des hier vorgestellten Prozess zur Verseifung von Propionitril zu der korrespondierenden Säure gliedern sich in vier wesentliche Teile:

Zu Beginn dieser Arbeit wurde der verwendete Mikroorganismus *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002 charakterisiert und bezüglich seines Enzymsystems zur Propionitrilhydrolyse untersucht. Aus der darauffolgenden Kultivierung des Mikroorganismus im Bioreaktor wurde die in den weiteren Untersuchungen eingesetzte Biomasse erhalten. Zudem wurden die Anzuchtbedingungen für die Kultivierung näher untersucht und Vorschläge für eine Optimierung des Wachstumsmediums erarbeitet.

Um die Auslegung der Anlagen und Bedingungen für einen späteren technischen Prozeß beurteilen zu können, wurden im zweiten Teil der Arbeit Eigenschaften der Biomasse untersucht, wie z.B. die Abhängigkeit der Aktivität und der Stabilität des Enzymsystems von Temperatur und pH-Wert.

Im dritten Teil wurde der Biokatalysator sowohl frei suspendiert und auch als Immobilisat unter verschiedenen Grundtypen der Reaktionsführung eingesetzt, wobei die maximalen spezifischen Mengen an Produkt / Biomasse unter den verschiedenen Prozeßführungen abgeschätzt wurden. Aus den Ergebnissen konnten Aussagen über die Auslegung eines bezüglich der Reaktionsbedingungen optimierten Prozesses getroffen werden.

Im weiteren wurden unter Verwendung eines mathematischen Modells zur Abbildung der Reaktionsverläufe die reaktionskinetischen Parameter für das vorliegende Zwei-Enzym-System ermittelt. Mit dem so erhaltenen Parametersatz wurden verschiedene Prozeßführungen mit freien und immobilisierten Zellen modelliert. Unter der Verwendung der Meßdaten aus den unterschiedlichen Prozeßführungen konnte daraufhin die Inaktivierung der Enzymaktivitäten bei verschiedenen Prozeßbedingungen quantifiziert werden.

4.1 Charakterisierung der Biomasse

Um den untersuchten Mikroorganismus in einem größeren Maßstab wirtschaftlich einsetzen zu können, ist es notwendig, diesen mit einer hohen spezifischen Aktivität des Enzymsystems und mit einer hohen Zellkonzentration aus einer Kultivierung im Bioreaktor zu erhalten. Dazu wurden die Kultivierungsbedingungen für den Organismus im Bioreaktor untersucht und in weiteren Versuchen der Einfluß verschiedener Faktoren auf die spezifische Aktivität des Enzymsystems beschrieben.

4.1.1 Stammbestimmung

Der in dieser Arbeit verwendete Mikroorganismus wurde auf seine Gattungszugehörigkeit hin untersucht und zusätzlich bei der DSMZ bestimmt und hinterlegt.

Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Kompletsequenzierung der 16S rDNA wurde eine Homologie > 99 % zu *Nocardioides simplex* ATCC 1956, aber auch zu *Rhodococcus erythreus* DSM 43066 festgestellt (Übereinstimmung: 1426 bp von 1432 bp). Die Ähnlichkeit zu *Rhodococcus erythropolis* (1368 bp von 1471 bp) ist dabei deutlich geringer. Dabei sollte allerdings in Betracht gezogen werden, daß der Vergleich der Sequenzen stark von der Richtigkeit der gemessenen und in den Datenbanken gespeicherten Sequenzen abhängt, wobei schon geringe Abweichungen starke Unterschiede in den Suchergebnissen verursachen (States & Agarwal 1996). Zudem hängt die Darstellung der Verwandtschaft der Stämme auch von der Länge des gesamten in der Datenbank vorliegenden DNA-Stückes ab. Der aufgrund der Datenbankrecherche erstellte Stammbaum der nahe verwandten Mikroorganismen zeigt ein leicht verändertes Verwandtschaftsverhältnis gegenüber der Analyse mit dem BLAST-Algorithmus, da hier alle DNA-Sequenzen in ihrer vollständigen Länge miteinander verglichen wurden. Dadurch wurde eine nähere Verwandtschaft zu *Rhodococcus sp.* J32 bestimmt als zu *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus erythreus* oder *Nocardioides simplex* ATCC 1956.

Die Bestimmung des Organismus durch die DSMZ, die nur eine Teilsequenz der 16S rDNA untersuchte, klassifizierte den Mikroorganismus als *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002. Jedoch wurden bei dieser Bestimmung auch noch andere Charakteristika, wie die chemische Zusammensetzung der Zellmembran und des Mureinsacculus, und die Morphologie für die systematische Einordnung mit einbezogen.

Die von Goodfellow (Goodfellow 1986) zusammenfassend beschriebene Genus *Rhodococcus* wird dabei als sehr eng verwandt zu *Nocardia*, *Corynebacterium* und *Mycobacterium* beschrieben.

Aus der Familie Actinomyceten sind in der Literatur mehrere Vertreter mit nitrilverseifender Eigenschaft beschrieben (Endo & Watanabe 1989), (Nagasawa et al 1986), (Wieser et al 1998), (Yamada & Kobayashi 1996), (Bunch 1998). Jedoch befindet sich die Ordnung der Actinomyceten momentan im Umbruch (Rainey et al 1995), (Goodfellow et al 1998), da immer wieder Stämme als *Rhodococcus* klassifiziert werden, die zuvor anderen systematischen Gruppen zugeordnet wurden. Dazu zählen auch die nitrilverseifenden Stämme wie *Brevibacterium* R312, jetzt *Rhodococcus* R312 (Bigey et al 1995), (Brennan et al 1996), *Corynebacterium* N-772 (Nakajima 1987), jetzt *Rhodococcus* N-772 (Bonnet et al 1997) und auch der derzeitige Produktionsstamm zur Herstellung von Acrylamid, *Rhodococcus rhodochrous* J1 (Mizunashi et al 1998), welcher ebenfalls zuerst aufgrund seiner Morphologie als *Arthrobacter* J1 (Yamada et al 1979) beschrieben wurde. *Rhodococcus* R312 wird zudem als sehr ähnlich zu *Rhodococcus* N-772 beschrieben (Mayaux et al 1990).

4.1.2 Beschreibung der katalytisch aktiven Enzyme

Die in den Genera der *Actinomycetes* und *Pseudomonas* beobachteten nitrilverseifenden Eigenschaften werden auf die Aktivität von Nitrilasen oder aber Nitrilhydratase-Amidase-Systemen in den Zellen zurückgeführt (Bunch 1998). Da bei den Umsetzungen mit Nitrilasen kein oder nur sehr wenig Amid als Zwischenprodukt auftritt (Legras et al 1990), (Kobayashi et al 1998b), in dem vorliegenden Prozeß hingegen Propionamid klar nachweisbar war (s. Abbildung 3.26), wurde angenommen, daß in den Zellen hauptsächlich Nitrilhydratase-Amidase-Aktivitäten für die Nitrilverseifung genutzt werden. Diese Annahme konnte durch Versuche zur Inaktivierung der Nitrilhydratase bei Mehrfachverwendung und der nachfolgenden Überprüfung der Amidaseaktivität unterstützt werden, wobei die Nitrilhydratase inaktiviert, die Amidase dagegen noch aktiv war. In der Diplomarbeit von Hollergschwandner (Hollergschwandner 1999) wurde die Nitrilhydratase isoliert und die β -Untereinheit N-terminal ansequenziert. Bei dem Vergleich der Sequenz mit Proteindatenbanken (BLAST) konnte eine hohe Homologie zu den eisenabhängigen Nitrilhydratase aus *Rhodococcus* R312 festgestellt werden.

4.1.3 Untersuchung zu den Kultivierungsbedingungen für die Bereitstellung des Biokatalysators

4.1.3.1 Verwertung verschiedener C- und N-Quellen

Die Zellanzucht von *Rhodococcus*-Stämmen erfolgt in den Literaturbeschreibungen zumeist in einem Komplexmedium mit Hefe- oder Fleischextrakt oder anderen Komponenten mit einem hohen Gehalt an Aminosäuren und Vitaminen (Mayaux et al 1991), (Nagasawa et al 1988b), (Nagasawa et al 1986), (Kakeya et al 1991). Aber auch der auf Nitrilhydratase- und Amidaseaktivität hin untersuchte Stamm *Pseudomonas chlororaphis* B23 wurde in einem Medium mit Glucose und Hefeextrakt angezüchtet (Ciskanik et al 1995), ebenso wie bei der Anzucht mit Sucrose und Hefeextrakt von Ryuno et al. (Ryuno et al 1988). Eine eingehende Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Bestandteilen im Komplexmedium wurde von Watanabe et al. (Watanabe et al 1987) durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, daß ein Medium mit Hefeextrakt die höchste Aktivität bezüglich der Nitrilhydratase erzielte. Aber auch die Zugabe von Casein-Hydrolysat zusammen mit Thiamin ergab hohe Aktivitäten der Zellen für die genannte Enzymaktivität.

Die Zelldichte bei den Kultivierungen mit Komplexmedien lag bei etwa 2g/l BTM (Watanabe et al 1987) in einem Medium mit 10 g/l Glucose und 1 g/l Hefeextrakt.

In der Literatur sind nur wenige Mineralsalzmedien für *Rhodococcus* beschreiben (Bernet et al 1990), (Linton & Knowles 1986), (Ospiran et al 1999), wobei Glucose und Ammoniumsalze als C- und N-Quelle genutzt wurden. Dabei sind die Mediumskomponenten, das Puffersystem und die Zusammensetzung der Spurenelementlösungen mit den hier verwendeten Medien vergleichbar.

Bei einigen der Wachstumsmedien ohne Komplexbestandteile wird bei der Kultivierung das Nitril als C- und N-Quelle verwendet, was allerdings dazu führt, daß keine hohen Zelldichten erreicht werden. Bei einer absatzweisen Prozeßführung erreichte Bernet et al. (Bernet et al 1990) eine optische Dichte von $OD = 6$ nach ca. 40 h, Nagasawa et al. (Nagasawa et al 1988a) erhielten eine Biotrockenmassekonzentration bis 1 g/l, Linton et al. (Linton & Knowles 1986) eine optische Dichte bis $OD = 0.8$ und Yamada et al. (Yamada et al 1979) eine Biotrockenmassekonzentration von 0.3 g/l. Da zudem der Einsatz des Nitrils im Medium zu einem vollständigen Abbau der Produkte führt (Linton & Knowles 1986), (Yamada et al 1979), erscheint eine Kopplung von Wachstum und nitrilverseifender Reaktion für den hier entwickelten Prozeß ungeeignet.

Das Medium für die Produktion von *Rhodococcus* R312, dessen eisenabhängige Nitrilhydratase konstitutiv exprimiert wird, ist als Mineralmedium mit Glucose als C-Quelle und Ammoniumsulfat als N-Quelle beschrieben (Ospiran et al 1999), (Tourneix et al 1986). Es waren unter Verwendung dieses Mediums Zellkonzentrationen einer $OD = 4$ nach 50 h, was einer $BTM = 0.8$ g/l entsprach (Tourneix et al 1986), bis zu einer $BTM = 6$ g/l (Ospiran et al 1999) zu erhalten. Bei einer Wachstumsrate von $\mu = 0.25$ 1/h und ohne die Verwendung eines Induktors wurde die Nitrilhydratase in der exponentiellen Wachstumsphase gebildet und zum Ende des Wachstums wieder abgebaut, bzw. war vollständig inaktiv. In Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Maestracci et al. (Maestracci 1984) ist die Amidase unter diesen Bedingungen nur gering aktiv.

In dem zu Beginn der Arbeit vorliegenden Medium waren sowohl Hefeextrakt als Komplexbestandteil als auch 2 g/l Glucose enthalten (Ress-Löschke 1996).

Es konnte in Schüttelkolbenexperimenten mit diesem Medium nur eine Biotrockenmassekonzentration von 1 g/l erhalten werden (s. Abschnitt 3.2.1). Daher wurde bei der beschriebenen Kultivierung im Bioreaktor zu zwei Zeitpunkten Hefeextrakt zugegeben (s. Abbildung 3.3). Dadurch konnte eine Biotrockenmassekonzentration von etwa 5 g/l erhalten werden. Die Wachstumsrate unter diesen Kultivierungsbedingungen beträgt $\mu = 0.2$ 1/h.

Die Vergleichbarkeit der bestimmten Zellkonzentrationen mit den Literaturwerten war sehr gut, von einer optischen Dichte von $OD = 1.3$ und einer Zellzahl von 5.7×10^8 /ml für die *Rhodococcus* sp. R312 Zellen (Bui 1984) bis zu 7.9×10^8 Zellen bei einer optischen Dichte von $OD = 2$ für die Zellen von *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002.

Während des Wachstums der Zellen wurde festgestellt, daß die Ammoniumkonzentration im Medium während der Prozeßzeit anstieg, hingegen der Glucosekonzentration im Medium nur sehr langsam zurückging. Erst in der stationären Wachstumsphase wurde die Glucose genutzt (s. Abbildung 3.2 und 3.3).

Bei Wachstum auf Hefeextrakt wird das Kohlenstoffgerüst der darin enthaltenen Aminosäuren als C-Quelle genutzt. Die dabei abgespaltene Aminogruppe wird dann in Form von freiem Ammonium in das Medium abgegeben und nur zu einem geringen Teil als Stickstoffquelle verwendet.

Ein Anstieg der Ammoniumkonzentration im Medium kann auch bei einem Wachstum auf Nitrilen als C-Quelle beobachtet werden, wobei das C-Gerüst zum Wachstum verwendet wird, das entstehende Ammonium aber im Medium verbleibt (Miller & Knowles 1984).

Insgesamt deutet dies, zusammen mit der Beobachtung eines starken Wachstumsschubes aus der stationären Phase nach Zugabe von Hefeextrakt (s. Abbildung 3.3.), auf die Verwendung des Hefeextraktes als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle hin.

Auch Zellen des Stammes *Rhodococcus* R312 wuchsen auf einem Mineralmedium mit Glucose erst nach einer Lag-Phase von etwa 15 h an, wobei im Bioreaktor bereits mit einer Trockensubstanz von 1 g/l gestartet wurde (Ospiran et al 1999). Dies könnte auf eine Umstellung des Stoffwechsels auf die Verwertung von Glucose als Substrat hindeuten, wie sie eventuell auch in der stationären Phase bei Anzucht der Zellen des Stammes *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002 stattfand. Erst in dieser Phase des Wachstums wurde dann die Glucose abgebaut (s. Abbildung 3.32).

Auch bei der Kultivierung des Stammes *Rhodococcus erythropolis* MP50 von Daniel (Daniel 1994) auf einem Medium mit Hefeextrakt und Glucose wurde die Glucose nur zu etwa 10 % verbraucht.

4.1.3.2 Aktivitätsverlauf bei der Kultivierung

Bei der Kultivierung der Zellen des Stammes *Rhodococcus* sp. B312 konnte ein Maximum für die Aktivität der konstitutiv exprimierten Nitrilhydratase in der exponentiellen Phase des Wachstums festgestellt werden (Ospiran et al 1999). Bei Erreichen der stationären Phase des Wachstums konnte praktisch keine Aktivität festgestellt werden. Somit konnte nicht bei der maximal möglichen Zellmasse abgeerntet werden.

Der Aktivitätsverlust der Nitrilhydratase in der Literaturbeschreibung zum Ende der exponentiellen Phase könnte auf die Aktivität von Proteasen zurückgeführt werden, welche jedoch durch die Entfernung von Zinksalzen aus den Anzuchtmedien reduziert werden können (Bernet et al 1990).

Die im verwendeten Medien exprimierte Nitrilhydratase des Stammes *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002 zeigt während der Kultivierung nur bedingt ein solches Aktivitätsprofil. Erst in der späten stationären Phase kommt es zu einer Abnahme der Aktivität.

Neben dem von Bernet et al. (Bernet et al 1990) postulierten proteolytischen Abbau der Enzyme könnte es sich hierbei auch um eine temperaturbedingte Inaktivierung der Enzyme handeln, da die Kultivierung bei 30 °C durchgeführt wurde. Besonders die Nitrilhydratase unterliegt in diesem Temperaturbereich bereits bei Lagerung einer starken Inaktivierung (s. Abschnitt 3.3.5).

Der oben genannte Einfluß von Proteasen auf die Abnahme der Aktivität der Nitrilhydratase bei ruhenden Zellen konnte in diesem Umfang nicht nachgewiesen werden. Auch nach Lagerung bei 11 °C über einen Zeitraum von 12 Tagen waren noch 50 % der Ausgangsaktivität vorhanden. Auch der Rohaufschluß zeigte eine hohe Stabilität gegenüber dem proteolytischen Abbau der Nitrilhydratase (Hollergschwandner 1999). Somit scheint die Proteolyse sowohl während der Kultivierung als auch bei

Verwendung ruhender Zellen nur einen untergeordneten Einfluß auf die Inaktivierung der Nitrilhydratase zu besitzen.

4.1.3.3 Einfluß der Glucosekonzentration auf die Aktivität der Biomasse

Die Untersuchungen zur Medienoptimierung für den Stamm *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002 zeigten eine deutliche Beeinflussung der Aktivität der untersuchten Enzyme und des Wachstums durch Glucose. Die Biomassekonzentration nach 48 h Kultivierungszeit mit und ohne Zugabe von Glucose variierte nur unwesentlich. Allerdings wies die Nitrilhydratase eine wesentlich höhere spezifische Aktivität in einem glucosehaltigen Medium auf.

Die Untersuchungen mit *Rhodococcus* sp. R312 zeigten keinen signifikanten Einfluß der Glucose auf die Bildung der Nitrilhydratase (Tourneix et al 1986). Dagegen wurde die Bildung der Nitrilhydratase in *Pseudomonas chlororaphis* B23 deutlich durch Glucose gehemmt (Yamada et al 1986). Bei der Kultivierung des Stammes *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002 zeigte sich ebenfalls eine Abnahme der spezifischen Aktivität der Nitrilhydratase bei hohen Glucosekonzentrationen.

In einem Medium ohne Glucose ist für die Amidaseraktion von *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002 eine erhöhte Aktivität (s. Abschnitt 3.7.3) nachzuweisen, was in der Literatur in dieser Form noch nicht beschrieben wurde.

4.1.3.4 Einfluß von anorganischen Salzen auf die Aktivität der Biomasse

Bei den Nitrilhydratase-Amidase-Systemen aus *Rhodococcus* (Komeda et al 1996), (Endo & Watanabe 1989), (Nagasawa et al 1986) und *Pseudomonas* (Nishiyama et al 1991), (Nawaz et al 1991) wurde eine Induzierbarkeit bei Kultivierung mit Amiden, Kobaltsalzen und verschiedenen anderen Induktoren beschrieben. Nichtinduzierte Zellen zeigten nur sehr geringe Aktivität. Die eisenabhängige Nitrilhydratase aus *Rhodococcus* sp. R312 zeigte hingegen eine konstitutive Aktivität, allerdings wird in diesen Stämmen die Amidase nur mit einer sehr geringen Grundaktivität beobachtet (Tourneix et al 1986), (Maestracci 1984). Eine Zusammenfassung der Nitrilhydratasen und Amidasen, mit denen das hier untersuchte System vergleichbar ist, sind in Tabelle 1.1 und 1.2 zusammengefaßt.

Für kobaltabhängige Nitrilhydratasen wurde eine Aktivierung durch Kobaltionen im Medium beschrieben (Nagasawa et al 1988b).

Da in dem vorliegenden Stamm neben der eisenabhängigen Nitrilhydratase auch eine solche kobaltabhängige Nitrilhydratase vorliegen könnte, wurde dies durch Induktionsstudien untersucht. Die Zugabe von Kobalt zum Wachstumsmedium bewirkt dabei eine deutliche Aktivitätsabnahme der Amidase gegenüber den in einem Medium ohne Kobalt kultivierten Zellen, die Nitrilhydrataseaktivität zeigt keine Änderung in ihrer Aktivität. In hohen Konzentrationen inhibierte Kobalt die Aktivität der beiden Enzyme deutlich.

Ein entsprechender Effekt wurde für die Amidase aus *Rhodococcus rhodochrous* J1 beobachtet,

welche bei einer Kultivierung in einem Medium ohne Kobalt eine fünffach höhere Aktivität aufwies als bei einem kobalthaltigen Medium. Dabei ist zu beachten, daß in diesem Fall die Amidase mit einer kobaltabhängigen Nitrilhydratase auf einem Operon gekoppelt war (Kobayashi et al 1993b).

Ammonium scheint einen erheblichen Einfluß auf die Aktivität des Enzymsystems von *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002 zu haben, was von Tourneix et al. (Tourneix et al 1986) bei der Anzucht des Stammes *Rhodococcus sp.* 312 nicht in diesem Umfang festgestellt wurde. Besonders die Amidaseaktivität wird mit zunehmender Ammoniumkonzentration im Medium erhöht. Obwohl Ammonium während der Kultivierung durch das Wachstum auf Hefeextrakt entsteht, wurde für das gesamte Enzymsystem bei einer Kultivierung ohne die Zugabe von Ammoniumsulfat nur sehr geringe spezifische Aktivitäten der gewonnenen Biomasse festgestellt.

Anders als bei den Versuchen von Tourneix et al. (Tourneix et al 1986) wurde eine leichte Erhöhung der Amidaseaktivität durch Ammoniumsulfat während des Wachstums der Zellen des Stammes *Rhodococcus sp.* 312 von Maestracci et al. (Maestracci 1984) aufgezeigt. Dabei wurde in diesen Versuchen mit der Zugabe von Acetamid eine sechsfach höhere Aktivität der Amidase gegenüber einer Kultivierung mit der Zugabe von Ammoniumsulfat bewirkt. Allerdings war dabei durch das Ammoniumsulfat im Wachstumsmedium eine konstante Amidaseaktivität über die gesamte Prozeßzeit feststellbar. Hingegen war nach Abbau des Acetamids im Medium keine Aktivität der Amidase mehr meßbar. Yanenko et al. (Yanenko et al 1994) konnten hingegen einen inhibitorischen Einfluß von Ammoniumsulfat im Wachstumsmedium auf die Aktivität des Enzymsystems in *Rhodococcus rhodochrous* M8 nachweisen. Daniel (Daniel 1994) stellte bei der Kultivierung des Stammes *Rhodococcus erythropolis* MP50 auf einem Komplexmedium mit Hefeextrakt ebenfalls eine Steigerung der Amidaseaktivität durch Ammonium fest.

Der positive Einfluß von Eisen(III)sulfat auf die Aktivität der untersuchten Enzyme wurde bisher nur bezüglich der Nitrilhydratase beschrieben (Yamada et al 1986), (Watanabe et al 1987).

In dem hier beschriebenen Fall hat Eisensulfat aber sowohl auf die Nitrilhydratase als auch auf die nicht eisenabhängige Amidase einen großen Einfluß. Dies wurde in Abschnitt 3.7.5 beschrieben, wobei die spezifische Aktivität der Amidase bei höheren Konzentrationen an Eisen(III)sulfat im Kultivierungsmedium anstieg, die spezifische Aktivität der Nitrilhydratase aber eher verringert wurde. Dennoch konnten Aktivitätssteigerungen von Faktor 10 für die Nitrilhydratase gegenüber einem Medium ohne die Zugabe von Eisen(III)sulfat erreicht werden. Dabei zeigten die Zellen bei Kultivierung in einem Medium ohne Eisen keine Amidase-Aktivität.

Dies könnte eventuell auf den Einfluß von Eisen, eventuell in Verbindung mit Ammonium, oder auf die Regulation der Expression des Nitrilhydratase-Amidase-Operons hinweisen, wie er für die kobaltabhängige Nitrilhydratase bereits beschrieben wurde (Kobayashi & Shimizu 1998).

Aber auch die alleinige Reduktion oder Entfernung eines zellinternen Inhibitors der Nitrilhydratase durch diese Mediumskomponenten, wie sie möglicherweise durch die Erhöhung des pH-Wertes erreicht wurde (s. Abschnitt 4.2.1), ist nicht auszuschließen. Dies würde aber die gleichzeitige Aktivierung der Amidase nicht vollständig erklären. Zudem wird ein bekannter Inhibitor der

Nitrilhydratase, NO, durch Eisen komplexiert, allerdings unter *in vitro* Bedingungen mit dem freien Enzym der Nitrilhydratase (Odaka et al 1997). Ob in der Zelle eine solche Komplexierung auftritt, die zudem nicht das NO aus dem aktiven Zentrum entfernt, sondern wie beschrieben, freies NO bindet, ist bisher nicht weiter untersucht worden.

Asano et al. (Asano et al 1982) beschreiben bei einer Amidase aus *Arthrobacter sp.* J-1 ebenfalls eine leichte Aktivierung des gereinigten Enzym durch Eisen(II) und Eisen(III), wobei der Einfluß im Wachstumsmedium nicht untersucht wurde.

4.1.3.5 Organische Induktoren

Die Induktion einer Amidase durch die Zugabe von Acetamid zum Kulturmedium zeigt bei *Rhodococcus sp.* R312 eine signifikante Erhöhung der Aktivität, allerdings fiel im Zuge dessen die Aktivität der Nitrilhydratase stark ab (Tourneix et al 1986). Ein Maximum an Aktivität wurde dabei in der exponentiellen Phase des Wachstums beobachtet, zum Ende der Kultivierung ging die Aktivität der Amidase wieder auf einen niedrigen Grundwert zurück.

Im Vergleich mit einem Medium ohne Acetamid wirkte sich die Zugabe von 1 g/l Acetamid bei *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002 inaktivierend auf die beiden untersuchten Enzyme aus.

Auch die Zugabe von 1 g/l Harnstoff zum Medium erniedrigte die Aktivität beider Enzyme.

Bei der gereinigten Amidase aus *Arthrobacter sp.* J-1 wurde ein starker inhibitorischer Einfluß von Harnstoff auf die Aktivität festgestellt (Asano et al 1982). Hingegen wurde für die Nitrilhydratase aus *Pseudomonas chlororaphis* B23 und *Rhodococcus rhodochrous* J1 eine Induktion während des Wachstums festgestellt (Yamada & Kobayashi 1996), was in dieser Form auf das hier untersuchte Enzymsystem nicht übertragbar war. Auch die 2.5-fache Aktivierung der Amidase in *Rhodococcus rhodochrous* J1, wie sie von Kobayashi et al. (Kobayashi et al 1993b) beschrieben wurde, war nicht festzustellen.

Der vorgeschlagene Induktor β -Caprolactam (Ress-Löschke 1996) wurde auf seine aktivierenden Eigenschaften der nitrilverseifenden Aktivitäten des Stammes *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002 hin untersucht.

Dabei bewirkte der für Nitrilasen beschriebene Induktor β -Caprolactam (Nagasawa et al 1990), (Kakeya et al 1991) in dieser Arbeit keine Erhöhung der spezifischen Aktivität bezüglich der Propionitrilverseifung. Es wurde darüber hinaus sogar eine Verringerung der Amidaseaktivität gegenüber Zellen aus der Kultivierung ohne β -Caprolactam festgestellt. Es wurde beschrieben, daß Nitrilasen kein Zwischenprodukt während der Umsetzung anhäufen, wie es im vorliegenden Fall zu beobachten war. Somit war der Einfluß einer signifikanten Nebenreaktion während der Hydrolyse mit ganzen Zellen durch eine β -Caprolactam-induzierbare Nitrilase auszuschließen.

Kobayashi et al. (Kobayashi et al 1993b) beschreibt für die Induktion der Amidase in *Rhodococcus rhodochrous* J1 eine etwa 1.5-fach höhere Aktivität durch die Zugabe von β -Caprolactam zum Medium. Dies war in den hier durchgeführten Versuchen nicht nachvollziehbar.

Phenylpropionitril und Propionamid erniedrigten die Aktivität der Zellen bezüglich der Nitrilhydratase, wogegen Linton et al (Linton & Knowles 1986)) für *Nocardia rhodochrous* LL100-21 beschreibt, daß es sowohl die Amidase als auch die Nitrilhydratase induzieren soll.

4.1.3.6 Schaumbildung während der Kultivierung

Die bei der Kultivierung auftretenden Probleme mit starker Schaumbildung und dem damit verbundenen Austrag an Zellmasse aus der Fermentationslösung an den Fermenterrand konnten nur schwer durch die Zugabe von Antischaummitteln unterbunden werden. Dieser Effekt wird auch in der Literatur beschrieben und stellt ein generelles Problem bei der Kultivierung von *Rhodococcus* (Nagasawa et al 1986), (Ospiran et al 1999)) und *Pseudomonas* (Ryuno et al 1988) dar. In der Anzucht der *Rhodococcus* sp. R312 Zellen wurde nach etwa 20 h Prozeßzeit aufgrund der Schaumbildung die Begasung des Fermenters so stark verringert, daß der Sauerstoffpartialdruck in der Flüssigkeit auf Null zurückging (Ospiran et al 1999). Es wurden zwar *Pseudomonas*-Stämme dahingehend mutiert, daß sie nur wenig oder keine Glycolipide herstellen (Nagasawa et al 1986), ob dies bei *Rhodococcus*-Stämmen möglich ist, wurde bisher noch nicht untersucht.

Dennoch könnte durch geeignete mechanische Schaumzerstörung die Ausbeute an Biomasse verbessert werden. Auch eine Hochzellichtefermentation mit einem geeigneten Medium könnte die Nutzung des Stammes *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002 für die industrielle Anwendung interessanter machen. Da die Schaumbildung besonders in der späten exponentiellen Phase auftritt, könnte auch eine kontinuierliche Prozeßführung mit exponentiell wachsenden Zellen dabei helfen diese zu verringern.

4.1.3.7 Vorschläge zu einer Optimierung der Herstellungsbedingungen

In Zukunft sollte eine Kohlenstoffquelle genutzt werden, die besser verwertet werden kann als Glucose. Dies ist bei *Rhodococcus rhodochrous* M8 für Succinat oder Citrat beschrieben, wobei durch diese C-Quellen auch die spezifische Aktivität der Zellen erhöht werden konnte (Yanenko et al 1994). In einem optimierten Medium mit Eisen(III)Sulfat und Ammoniumsulfat als anorganische Komponenten sollte ohne Kobaltsalze gearbeitet werden, wie es auch von Bernet et al. (Bernet et al 1990) für die Produktion einer Nitrilhydratase aus *Arthrobacter* sp. J-1 vorgeschlagen wird, wobei Eisensulfate auch das Wachstum positiv beeinflussen. Der Einfluß von zwei- und dreiwertigem Eisen wurde von Watanabe et al. (Watanabe et al 1987) genauer untersucht. Dabei wurde das Optimum der Nitrilhydrataseaktivität bei beiden Eisenionen von 50 - 100 mg/l beschrieben, bei einer Ammoniumsulfatkonzentration von 3 g/l. Dabei sollte aber für die hier ebenfalls notwendige Amidaseaktivität der Zellen die Eisenkonzentration deutlich erhöht werden. Die Verwendung spezifischer organischer Aktivatoren der Nitrilhydratase und besonders der Amidase in verschiedenen Wachstumsphasen sollte näher untersucht werden, da die bisherigen Versuche die Aktivitäten nach Inkubation mit solchen Induktoren erst nach Beendigung des Wachstums abbilden. Besonders die

Untersuchungen der Acetamidzugabe zum Medium, das induzierend auf die Amidase in den Zellen wirken könnte, sollte unter Einsatz einer kontinuierlichen Prozeßführung mit exponentiell wachsenden Zellen weitergeführt werden. Dabei kann unter kontinuierlichen Prozeßbedingungen die zu untersuchende Komponente im Medium zugegeben werden und die abgeernteten Zellen direkt auf eine Erhöhung der Aktivitäten untersucht werden.

Die Anzucht der Zellen zu einer höheren Zelldichte bei Verwendung mechanischen Schaumzerstörers und die Zugabe größerer Mengen an Hefeextrakt sollten ebenfalls untersucht werden.

Durch die geringe Temperaturstabilität der Nitrilhydratase würde eine kontinuierliche Aberntung mit einer Verweildauer der Zellen im Reaktor von weniger als 24 h sicherlich eine Verbesserung der Aktivitätsausbeute mit sich bringen. Dies könnte möglicherweise auch die starke Schaumbildung verringern, da diese erst in der späten exponentiellen Phase auftritt.

4.2 Biochemische Charakterisierung der ruhenden Zellen als Biokatalysator

Die Hydrolyse von Propionitril zu Ammoniumpropionat erfolgt über eine Enzymkaskade aus zwei Enzymen in einem Ganzzellbiokatalysator. Für diese Umsetzung wurden die Schlüsselparameter für einen Einsatz in einem technischen Prozeß bestimmt. Um eine Beeinflussung der bestimmten Parameter durch eventuell vorhandene Unterschiede der Eigenschaften der Zellen aus den unterschiedlichen Kultivierungen zu vermeiden, wurden für alle Untersuchungen zur Charakterisierung der Eigenschaften der ruhenden Zellen dieselbe Zellmasse verwendet, die zu Beginn der Arbeit aus einer Kultivierung mit 70 l Reaktorvolumen erhalten wurde.

4.2.1 Einfluß des pH- Wertes auf die Aktivität und Stabilität des Biokatalysators

Die aus der Kultivierung im Bioreaktor (s. Abschnitt 3.2.2) erhaltenen ruhenden Zellen wurden auf die pH-Abhängigkeit der spezifischen Aktivitäten der Nitrilhydratase und der Amidase hin untersucht.

Dabei wurden bei der Charakterisierung der beiden für die Nitrilhydrolyse genutzten Enzyme des Ganzzellkatalysators im Gegensatz zu den in Tabelle 1.1 und 1.2 beschriebenen Nitrilhydratasen und Amidasen deutliche Unterschiede gefunden. Besonders die pH-Abhängigkeit der Aktivität der Nitrilhydratasen wurde für die eisenabhängigen Enzyme mit einem Optimum in einem Bereich von pH 7.8 beschrieben (s. Tabelle 1.1). Aber auch die kobaltabhängige Nitrilhydratase (niedriges Molekulargewicht) hat ein pH-Optimum von pH 8.8, während die hier verwendete Nitrilhydratase zwischen pH 9 und pH 10 am aktivsten ist (s. Abbildung 3.4).

Dies könnte eventuell auf eine pH-abhängige Veränderung der räumlichen Koordination des aktiven Zentrums durch den pH-Wert des Mediums, wie sie von Scarrow et al. (Scarrow et al 1996) für die gereinigte Nitrilhydratase aus *Rhodococcus sp.* N774 beschrieben wird, und einer dadurch bewirkten Aktivierung des Enzyms zurückgeführt werden. Aber auch durch das Ablösen eines Inhibitors wie einer zellintern gebildeten Säure oder NO (Sari et al 1998) aus dem aktiven Zentrum könnte an dieser deutlichen Aktivitätssteigerung bei pH-Werten über pH 9 beteiligt sein (Kopf et al 1996).

Auch die Lagerstabilität liegt bei dem verwendeten Ganzzellsystem bezüglich der Nitrilhydratase in einem breiten Bereich zwischen pH 7.2 und pH 9, wobei bei Lagerung der ruhenden Zellen die Aktivität bei pH 9 stärker abnimmt ($t_{1/2} = 90$ h) als bei pH 7.2 ($t_{1/2} = 150$ h) (s. Abbildung 3.7).

Wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben wurde, könnte durch den hohen pH-Wert ein zellinterner Inhibitor aus dem aktiven Zentrum der Nitrilhydratase abgelöst worden sein. Ein solcher Inhibitor könnte z.B. eine aliphatische Carbonsäure sein, wie dies in den Untersuchungen zur Reinigung der Nitrilhydratase in Anwesenheit von aliphatischen Säuren, insbesondere Buttersäure, beobachtet wurde (Kopf et al 1996). Dabei konnte sowohl eine reversible Hemmung als auch ein protektiven Einfluß auf die Nitrilhydrataseaktivität durch den Inhibitor festgestellt werden. Da auch die hier untersuchte Nitrilhydratase durch Buttersäure (Hollergschwandner 1999) und Propionsäure inhibiert wird, könnte also auch unter den zellinternen Bedingungen eine Inhibition durch eine solche Säure auftreten. Wenn durch die Erhöhung des pH-Wertes die deprotonierte Form der Säure vorliegt, kann diese nicht mehr in das aktive Zentrum gelangen (Kopf et al 1996). Dadurch geht auch möglicherweise der protektive Einfluß dieses Inhibitors auf das aktive Zentrum verloren, und es kommt zu einer schnelleren Deaktivierung bei hohen pH-Werten im Vergleich mit einem pH-Wert von 7.2.

Die Amidase zeigt dabei in den Untersuchungen ähnliche Eigenschaften, wie die in Tabelle 1.2. beschriebenen Amidasen mit einem breiten pH-Optimum zwischen pH 7 und pH 8.

Aufgrund der unterschiedlichen pH-Optima der beiden Enzyme kann die Gesamtreaktion nicht im alkalischen Milieu durchgeführt werden. In diesem Bereich besitzt zwar die Nitrilhydratase ein Aktivitätsmaximum, die Amidase ist aber unter diesen Bedingungen nicht stabil. Daher ist für die Gesamtreaktion ein Kompromiß bezüglich des pH-Wertes zu finden. Dabei ist zu beachten, daß das Endprodukt Ammoniumpropionat in einem pH-Bereich von pH 7.2 puffert, weshalb bei einer Reaktion bei höheren pH-Werten eine pH-Regelung notwendig wird.

4.2.2 Einfluß der Temperatur auf die Aktivität und Stabilität des Biokatalysators

Der Einfluß der Temperatur bei der Lagerung der Zellen auf die spezifischen Enzymaktivitäten zeigte für die Nitrilhydratase- gegenüber der Amidasereaktion eine deutliche Aktivitätsabnahme bei Temperaturen oberhalb von 20 °C (s. Abbildung 3.6). Wie auch in der Literatur beschrieben (Nagamune et al 1990), (Nitto 1983), ist die Stabilität der Nitrilhydratase bei niedrigen Temperaturen größer, wogegen die Amidase bis in einen Temperaturbereich von 35 °C stabil war.

Dabei ist die Temperaturabhängigkeit der Nitrilhydratasereaktion mit den Literaturwerten für die eisenabhängigen Nitrilhydratasen gut vergleichbar (Scarrow et al 1996). Das dabei auftretende enge Aktivitätsmaximum bei 26 °C wurde für die gereinigte Nitrilhydratase von *Rhodococcus sp.* B312 in einer ähnlichen Form beobachtet, aber nicht weiter kommentiert (Fradet et al 1985). Auch bei der Nitrilhydratase aus *Rhodococcus sp.* wurde kein linearer Anstieg der Aktivität mit der Temperatur festgestellt, sondern eine nichtlineare Zunahme der Aktivität bis zu ihrem Maximum bei 20 °C beobachtet (Hjort 1990).

Die Amidase war in dem hier untersuchten Prozeß zwar das geringer aktive, jedoch das deutlich temperaturstabilere Enzym bezüglich Lagerung und Einsatz unter Prozeßbedingungen. Dies ist auch mit Literaturdaten der Weitspektrumamidasen und den korrespondierenden Nitrilhydratasen vergleichbar (Azza et al 1994).

Allerdings lag die Temperaturabhängigkeit der Aktivität der hier untersuchten Amidase mit einem Maximum bei 35 °C deutlich unter den Werten der gereinigten Amidasen aus den beschriebenen Stämmen (s. Tabelle 1.2), wobei im vorliegenden Fall jedoch Untersuchungen mit ganzen Zellen durchgeführt wurden, die eventuell nicht auf die Angaben für die gereinigten Enzyme übertragbar sind.

4.2.3 Gefriertrocknung der Zellen

Um die Lagerstabilität des Biokatalysators zu verbessern, wurden die Zellen gefriergetrocknet.

Dabei wurden nach Rehydratation der Zellen nur geringe Verluste in der spezifischen Aktivität der Enzyme beobachtet. Die gemessenen Halbwertszeiten der Nitrilhydrataseaktivität von etwa $t_{1/2} = 2 \times 10^4$ h in den gefriergetrockneten Zellen standen dabei in Übereinstimmung mit den Werten von anderen *Rhodococcus*-Stämmen (Bauer et al 1996). Dabei liegt die Halbwertszeit der Enzymaktivität von lyophilisierten Zellen etwa doppelt so hoch, wie bei den im Puffer suspendierten Zellen bei derselben Temperatur. Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit die Aktivität der Amidase untersucht. In Analogie zu der Lagerstabilität bei ruhenden Zellen ist bei einer Lagerung der lyophilisierten Zellen die Amidase ebenfalls stabiler als die Nitrilhydratase. Auch nach einer Lagerzeit von 14 Tagen bei 4 °C traten keine Aktivitätsverluste auf. Die geringen Inaktivierungskonstanten könnten dabei auf die Verringerung des zellinternen proteolytischen Abbaus der Enzyme begründet sein. Auch die Lagerung der feuchten Biomasse bei -20 °C führte nur zu einer sehr geringen Inaktivierung, wobei auch in diesem Fall die zellinternen Reaktionen gestoppt waren.

Es kann somit durch die Gefriertrocknung der Zellen eine Verbesserung der Lagerstabilität bei Temperaturen oberhalb von 0 °C erreicht werden.

4.2.4 Einsatz der Zellen im Zwei-Phasen-System

Für einen industriellen Einsatz sollten bei einer abschnittweisen Prozeßführung möglichst hohe Produktkonzentrationen vorliegen, um eine Anlage optimal auszunutzen und die Reinigung des Produktes zu erleichtern. Da die Produkte der Propionitrilverseifung wesentlich besser löslich sind als das Propionitril selbst, wurde der Einsatz der Zellen in einem Propionitril-Wasser-Gemisch untersucht. Die Verwendung der Zellen in diesem Zwei-Phasen-System hatte zum Ergebnis, daß anscheinend der Kontakt mit der organischen Phase aus Propionitril bei frei suspendierten Zellen eine schnelle Lyse zur Folge hatte, was durch eine Gelbfärbung der organischen Phase aufgrund aus der Zellmembran extrahierter Carotinoide sichtbar wurde (Takaichi et al 1990). Dabei kam die Enzymreaktion ebenfalls zum Erliegen. Ob dabei eine Inaktivierung der Enzyme durch Denaturierung oder durch Einwirken von freigesetzten proteolytischen Komponenten einsetzte (Bernet et al 1990), konnte nicht geklärt werden. Aber auch für Protoplasten von *Rhodococcus*-Zellen in einer 0.5 M Propionitrillösung wird eine sehr

schnelle Lyse (< 1 min) beschrieben, was an der Osmolarität des Nitriles liegen soll (Miller & Knowles 1984).

Bei einem Einsatz von lyophilisierten Zellen mit einem sehr geringen Wasseranteil in der Reaktionslösung konnte dennoch eine geringe Aktivität festgestellt werden, die aber schnell zum Erliegen kam.

Bei immobilisierten Zellen dagegen wurde das Substrat weitgehend umgesetzt. Dies könnte daran liegen, daß die Zellen aufgrund ihrer polymeren Schutzhülle keinen direkten Kontakt mit der organischen Phase hatten (Naoshima et al 1991). Dabei waren aber anscheinend auch die Substrat- und Produktinhibitionen als limitierende Faktoren zu beachten, wobei die Nitrilhydratase unter den Bedingungen im Ansatz nach 10 min praktisch vollständig gehemmt wurde, die Amidase unter diesen Bedingungen aber noch aktiv war (s. Abbildung 3.8).

Ein protektiver Einfluß der intakten Zellhülle auf die Aktivität der Nitrilhydratase und der Amidase in den Zellen des Stammes *Corynebacterium nitrophilus*, beim Einsatz zur Verseifung von Acrylonitrilemulsionen gegenüber dem frei suspendierten Enzym, wurde auch von Battistel et al (Battistel et al 1997) festgestellt.

Auch in anderen Untersuchungen zur Umsetzung von Nitrilen im Zwei-Phasen-System mit verschiedenen nitrilhydrolysierenden Katalysatoren konnten Umsetzungen beobachtet werden (Trost 2000), (Effenberger et al 1997). Dabei wurde aber meist gereinigte Nitrilhydratase verwendet (Trost 2000), (Layh et al 1997), (Nagasawa et al 1993).

Da die beschriebenen log-P-Werte der verwendeten Medien in der Vergleichbarkeit problematisch sind, werden hier stattdessen die $E_T(30)$ Werte beziehungsweise die normierten E_T^N Werte der verwendeten Lösungsmittel miteinander verglichen (Reichardt 1994). Dabei wird die Polarität des Lösungsmittels über die Absorption eines darin gelösten Betainfarbstoffes bestimmt. Die dabei erhaltene empirische Polaritätsskala der Lösungsmittel geht von Wasser mit einem E_T^N -Wert von 1 bis zu Tetramethylsilan mit einem E_T^N Wert von 0 (Reichardt 1997).

Es wurde beschrieben, daß in Lösungen mit einem niedrigen E_T^N -Wert die untersuchte Nitrilhydratase sowohl unter Einsatz von lyophilisierten Zellen als auch der gereinigten Enzyme eine hohe Restaktivität zeigt (Layh et al 1997), (Hughes et al 1998). In weiteren Untersuchungen wurde bei der Röntgenstrukturanalyse von kristallisierter Nitrilhydratase festgestellt, daß die Lösungsmittelmoleküle, besonders Wasser, einen sehr wichtigen stabilisierenden Einfluß auf die Nitrilhydratase haben (Nakasako et al 1999). Darüber hinaus wurde auch beschrieben, daß E_T^N -Werte des Lösungsmittels von über 0.3 zu einer Inaktivierung des Enzyms führten (Layh & Willets 1997), (Effenberger et al 1997). Somit scheint der Einsatz der freien Zellen in einer Propionitrilemulsion mit einem E_T^N -Wert von 0.398 ($\log P = 0.18$) für Propionitril nicht nutzbar für einen technischen Prozeß zu sein.

Der Einsatz der Amidase in einem solchen Zwei-Phasen-System wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Anscheinend wurde aber die Amidasereaktion durch die organische Phase wesentlich weniger beeinflusst als die Nitrilhydrataseaktivität. Die Amidase zeigte dabei in dem Ansatz zur Propionitrilhydrolyse im Zwei-Phasen-System und bei der Umsetzung von bis zu 1 M Substrat eine konstante Aktivität.

4.2.5 Einfluß der Lichteinstrahlung auf die Reaktion

In der Literatur wird eine Lichtabhängigkeit der Aktivität der Nitrilhydratase beschrieben (Endo et al 1999). Der Einfluß von Licht auf die Aktivität der Nitrilhydratase in ruhenden Zellen wurde auch im vorliegenden System beobachtet. Da die Zellen bezüglich der Nitrilhydrataseaktivität unter Lichtabschluß einen Aktivitätsrückgang von mehr als 50 % zeigten (s. Abschnitt 3.3.7), kann auch hier von einer Inhibition durch einen zellinternen Inhibitor, der lichtabhängig im aktiven Zentrum der Nitrilhydratase gebunden ist, ausgegangen werden. Die Amidase zeigte in diesen Versuchen eine konstante Aktivität, wodurch Einflüsse auf die Zellen durch eventuell auftretende denaturierende Bedingungen ausgeschlossen werden konnten.

Dies wird in der Literatur besonders für die Nitrilhydratase aus *Rhodococcus sp.* N-771 und *Rhodococcus sp.* 312 beschrieben (Bonnet et al 1997), (Endo et al 1999). Interessanterweise wird keine Inhibition durch NO für die ebenfalls eisenabhängige Nitrilhydratase aus *Pseudomonas sp.* und die kobaltabhängige Nitrilhydratase aus *Rhodococcus rhodochrous* J1 beschrieben. Diese Enzyme scheinen nicht durch zellinterne Inhibitoren beeinflusst zu werden.

Zudem scheint bei *Rhodococcus sp.* N-771 und *sp.* R312 eine vollständige Inaktivierung bei einer Kultivierung im Dunkeln vorzuliegen (Nagamune et al 1990), was in dem hier beschriebenen System nicht beobachtet wurde.

Darüber hinaus wurde festgestellt, (s. Abschnitt 3.5.4) daß es bei einem kontinuierlichen Einsatz der Zellen zur Nitrilverseifung nach Abdunklung des Reaktionsansatzes über einen Zeitraum von mehreren Stunden zu keiner zusätzlichen Aktivitätsabnahme der Nitrilhydratasereaktion kam. Dies könnte auf die Inhibition oder Deaktivierung der Produktion des Inhibitors durch das vorliegende Propionitril hindeuten. Aber auch die Verdrängung eines Inhibitors durch das Substrat Propionitril ist möglich. Dies könnte auch die hohen Nitrilhydrataseaktivitäten erklären, die aus den Umsetzungen von 1 M Propionitril durch dynamische Simulation erhalten wurden (s. Abschnitt 3.6.1.2), wobei die Amidase in diesen Versuchen eine maximale Reaktionsrate in dem Bereich mit den Ansätzen mit geringerer Substratkonzentration zeigt. Auch die Beobachtung der pH-Abhängigkeit der Nitrilhydratase könnte auf das Ablösen eines zellinternen Inhibitors zurückgeführt werden (s. Abschnitt 4.2.1). Allerdings wurden in dem hier untersuchten System die durch Lagerung unter Lichtabschluß inaktivierten Zellen nach Start der Nitrilverseifung nicht aktiviert, sondern blieben auf einem geringen Aktivitätsniveau von 50 % des Wertes unter Lichteinfluß. Somit war eine Verdrängung des Inhibitors durch Propionitrilkonzentrationen von 100 mM nicht möglich.

4.2.6 Zusammenfassung

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die untersuchten Enzymsysteme deutliche Unterschiede in ihren pH- und Temperaturcharakteristiken aufweisen. Daher sollten die beiden Enzyme entweder getrennt unter den jeweils optimalen Bedingungen eingesetzt, oder ein Kompromiß zwischen den jeweilig optimalen Bedingungen gewählt werden. Dabei ist zu beachten, daß die Amidase das geringer aktive, aber auch das stabilere Enzym darstellt. Somit ist die Einsatzdauer des

Biokatalysators durch die Inaktivierung der Nitrilhydratase beschränkt, die Reaktionsrate jedoch durch die Amidase.

Es konnte festgestellt werden, daß das Substrat Propionitril in hohen Konzentrationen einen inaktivierenden Einfluß auf die Aktivität der Zellen hat. Dieser kann durch die Immobilisierung der Zellen deutlich verringert werden. Es konnten somit bei einer absatzweisen Prozeßführung Propionitrilkonzentrationen bis zu 3 M umgesetzt werden, wobei eine irreversible Schädigung der Nitrilhydratase über der Prozeßzeit auftrat. Daher sollten für einen absatzweisen Prozeß Nitrilkonzentrationen unterhalb der Löslichkeitsgrenze verwendet werden.

Der Einfluß der Belichtung auf die Aktivität der Nitrilhydratase sollte eingehender untersucht werden, da offensichtlich die spezifische Aktivität unter bestimmten Bedingungen deutlich verringert wird.

4.3 Einsatz des Biokatalysators bei verschiedenen Prozeßführungsstrategien

Im Mittelpunkt von technischen Anlagen zur katalytischen Umsetzung der interessierenden Substanzen steht der (Bio-) Reaktor. Ausgehend von wenigen klassischen Grundtypen lassen sich zahlreiche spezielle Reaktormodifikationen ableiten. Unter dem allgemeinen Aspekt der Kostenminimierung sind bei der Wahl des Reaktors folgende Gesichtspunkte zu beachten:

- hohe Mengen an Produkt / Biomasse bei gleichzeitiger hoher Produktkonzentration und Reinheit
- hohe spezifische Katalysatoraktivität und –stabilität
- geringe Herstellungs- und Wartungskosten sowie geringer Raumbedarf

Die charakteristischen Unterschiede zwischen den jeweiligen Reaktortypen ergeben sich aus den örtlichen und zeitlichen Konzentrationsverläufen von Edukt und Produkt im Reaktor. Diese sind in Abbildung 4.1 schematisch dargestellt.

In dieser Arbeit wurden Untersuchungen zum Einsatz des Biokatalysators bei absatzweiser und kontinuierlicher Prozeßführung vorgenommen. Bei der absatzweisen Prozeßführung wurden auch unterschiedliche Zudosagestrategien des Substrates eingesetzt. Für die Verwendung der Zellen in einem kontinuierlichen Prozeß war eine Immobilisierung der Zellen erforderlich. Dieses Immobilisat wurde dann sowohl im Festbettreaktor als auch im kontinuierlich durchströmten Rührreaktor eingesetzt.

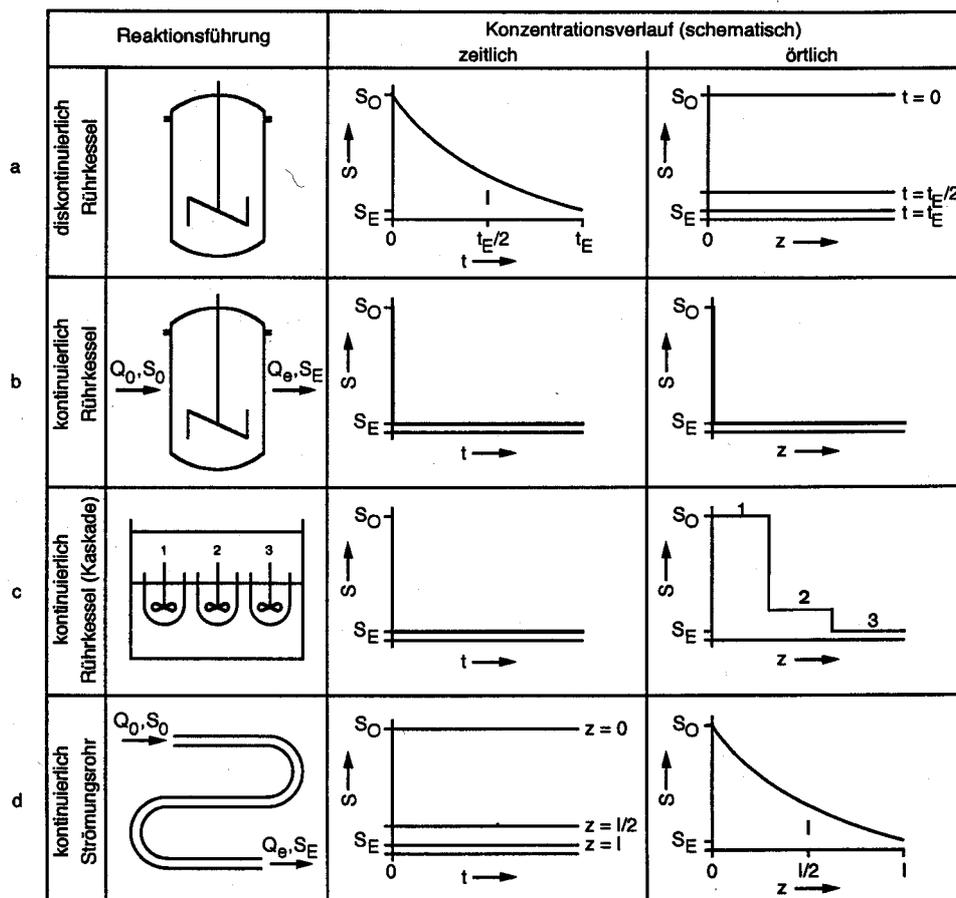


Abbildung 4.1: Grundlegende (ideale) Reaktortypen und Betriebsweisen sowie zugehörige Konzentrationsprofile für ein Substrat (S) als Funktion der (Verweil-)Zeit (t) bzw. des Ortes (z) (mit dem Volumenstrom Q, der Länge l und den Indizes 0 für den Anfang und E für das Ende der Reaktion) (a) Rührkessel – diskontinuierlich; (b) Rührkessel – kontinuierlich; (c) Rührkesselkaskade – kontinuierlich; (d) Strömungsrohr – kontinuierlich. Entnommen aus 'Biokatalysatoren und Enzymtechnologie' (Buchholz & Kasche 1997)

4.3.1 Immobilisierung der Zellen

Um die Wiederverwendbarkeit der Zellen und den Einsatz in verschiedenen Prozeßführungen untersuchen zu können, wurden verschiedene Immobilisierungsmethoden angewandt, wie sie beispielhaft von Fukui et al. (Fukui & Tanaka 1984) und Jack et al. (Jack & Zajic 1977) beschrieben wurden. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Verwendung eines kostengünstigen und ungiftigen Immobilisierungsmaterialies gerichtet, da für den angestrebten Prozeß möglichst geringe Kontaminationen durch toxische oder aus der Produktlösung schwer abtrennbare Komponenten verwendet werden sollten. Zudem sollte für die Immobilisierung ein Kostenanteil von wenigen Prozent des vergleichsweise billigen Endproduktes einberechnet werden (Ress-Löschke 1996).

Durch bereits für *Rhodococcus* und *Pseudomonas* beschriebene Einschlußmethoden (Katchalski-Katir 1993), (Siemann et al 1990) war eine schnelle Entwicklung eines Einschlußverfahrens möglich.

In dieser Arbeit wurden über ein Versprühverfahren Immobilisatperlen hergestellt, wozu eine ähnliche Apparatur verwendet wurde wie von Pommersheim et al. (Pommersheim et al 1994) beschrieben. Durch das Versprühen wurden Immobilisatperlen gewonnen, die einen Partikeldurchmesser von etwa $0.9 \text{ mm} \pm 0.1 \text{ mm}$ aufwiesen, was auch bei anderen Gruppen in ähnlicher Weise bei einer Versprühung des Alginates in die Vernetzerlösung erhalten wurde (Wu et al 1989), (Pommersheim et al 1994).

Zum Vergleich wird in der Literatur beschrieben, daß bei einfachem Eintropfen von Alginat in die Vernetzerlösung Perlen der Größe 2 – 5 mm entstehen, je nach Durchmesser der verwendeten Kanüle (Gilson et al 1990). Weitere Methoden zur Herstellung der Immobilisatperlen durch die sogenannte Jet-Cutting Methode (Prüße et al 1998) oder die Verwendung eines schnell rotierenden Lochrings (Siemann et al 1990) ergaben ebenfalls Perlen mit einem Durchmesser von etwa 0.9 mm.

Die Immobilisatpartikel waren über einen Zeitraum von mehreren Wochen unter Prozeßbedingungen stabil, allerdings konnten keine Phosphatsalze als Puffer verwendet werden, da durch die Ausfällung von Kalziumphosphat das Polymernetzwerk zerstört worden wäre. Dieses wurde auch von der Arbeitsgruppe von Hwang et al. (Hwang & Chang 1989) bei alginatimmobilisierten Zellen des Stammes *Brevibacterium* CH1 zur Acrylamidhydrolyse beobachtet. Auch die Verwendung eines Reaktionspuffers ohne CaCl_2 führte zur Auflösung der Perlen innerhalb weniger Stunden. Die Kinetik der Vernetzung von Alginatperlen wurde im Detail (Gilson et al 1990) untersucht und dabei eine Korrelation zwischen der Zeit bis zur vollständigen Verfestigung und den Parametern des Partikeldurchmessers und der Kalziumkonzentration in der Vernetzerlösung angegeben. Demzufolge genügte eine Lagerzeit von weniger als 15 min im Vernetzer bis zur völligen Aushärtung der Perlen. Bei hohen Ammoniumpropionatkonzentrationen im Bulk zeigte sich allerdings ein langsames Auflösen der Polymermatrix, was zu einer Freisetzung des Biokatalysators führte. Auch scheint Ammoniumpropionat in den Alginatperlen gebunden zu werden (s. Abschnitt 3.5.4), was zu schwer definierbaren Bedingungen für die Prozeßauslegung führt.

Der Einschluß in Alginat wurde als schonende Methode zur Immobilisierung von *Rhodococcus*- und *Pseudomonas*-Stämmen für die Umsetzung von Nitrilen beschrieben (Santoyo & Teruel 1996), (Bernet et al 1987), (Chaptwala et al 1998). Die Hydrolyse von Adiponitril zu 5-Cyanovaleramid unter Verwendung von *Pseudomonas chlororapis* B23 wird mit alginatimmobilisierten Zellen im industriellen Maßstab durchgeführt (Hann et al 1999). *Agrobacterium radiobacter* 8/4 wurde zur Hydrolyse von Bromoxynil mit verschiedenen Methoden immobilisiert, wobei der Einschluß in Alginat die höchste spezifische Aktivität nach der Immobilisierung aufwies (Vekova et al 1995). Die Verwendbarkeit von Alginatimmobilisaten in organischen Lösungsmitteln wurde ebenfalls bereits untersucht (Green et al 1996), wobei das Polymer auch hier eine gute Stabilität zeigte.

Eine Immobilisierung der Zellen in Polyacrylamid umging die Problematik der Zugabe von Calcium zur Reaktionslösung, welches zuerst dem Puffer zugesetzt und dann aus der Produktlösung entfernt werden muß. Allerdings konnte mit dieser Methode nur ein Immobilisatfilm hergestellt werden, der anschließend mechanisch zerkleinert werden mußte. Zudem wurde festgestellt, daß sich die Zellsuspension im Zuge der Polymerisierung stark erwärmte, was bei einer großtechnischen

Herstellung des Immobilisates zu Problemen führen kann, da die Nitrilhydratase bei Temperaturen oberhalb von 20 °C schnell inaktiviert. Eine Kühlung des Ansatzes führte zu langen Polymerisationszeiten und nur teilweiser Aushärtung des Polymeres. Dennoch wird für die industrielle Herstellung von Acrylamid mit *Rhodococcus*-Zellen die Immobilisierung in Acrylamidpolymere genutzt (Katchalski-Katzir 1993).

Ein weiterer Nachteil ist die Toxizität von Acrylamid (DeJongh et al 1999), das als Abrieb des Immobilisates und als freie Substanz in das Endprodukt als Verunreinigung gelangen kann. Da das in dieser Arbeit hergestellte Produkt auch für die Anwendung in der Veterinärmedizin genutzt werden kann, folgt die Forderung, daß nach der Aufreinigung des Ammoniumpropionats keine Verunreinigungen mit Acrylamid mehr auftreten sollten.

Der Vergleich der beiden angewandten Einschlußmethoden ergab geringe Unterschiede in der Aktivität nach der Immobilisierung. Dabei zeigte sich bei der Immobilisierung in Acrylamid eine geringere spezifische Aktivität für die Propionitrilhydrolyse gegenüber den mit Kalziumalginat immobilisierten Zellen. Dies könnte auf die zelltoxischen Eigenschaften des Acrylamids zurückzuführen sein, wobei allerdings auch die unter 4.3.1 beschriebenen Probleme mit der Erwärmung des Immobilisierungsansatzes bei der Polymerisation nicht vernachlässigbar sind. Andere Arbeitsgruppen stellten bei Untersuchungen zum Einschlußverfahren von ganzen Zellen fest, daß die Immobilisierung in Alginat vorteilhaft für die Aktivität der Nitrilhydratase bei *Agrobacterium* ist (Vekova et al 1995). Die Ergebnisse zeigten auch, daß Immobilisate mit κ -Carrageenan eine geringere Aktivität bei der Hydrolyse von Bromoxynil hatten.

4.3.2 Diffusionslimitierung bei Immobilisierung in Kalziumalginat

Die Richtlinien für eine exakte Charakterisierung von Immobilisaten wurde von Wijffels (Wijffels et al 1996) beschrieben.

In der bekannten Literatur wurden Untersuchungen zur Prozeßstabilität der Nitrilhydratase und der Amidase in immobilisierten Zellen jedoch nur grob abgeschätzt. Auch der Einfluß der Größe der Immobilisatperlen und eine damit verbundene Stofftransportlimitierung wurde nicht quantifiziert. Bernet et al. (Bernet et al 1987) erwähnt, daß bei alginatimmobilisierten Zellen des Stammes *Rhodococcus sp.* B312 gegenüber freien Zellen eine geringere Amidaseaktivität für die Hydrolyse von Acrylonitril festgestellt wurde. Eine dabei durchgeführte Abschätzung der Menge an aktiven Zellen in 2 - 3 mm großen Acrylamidstücken ergab eine geschätzte aktive Schichtdicke von etwa 30 μm bei einer Zellgröße von 9 μm und einer homogenen Verteilung der Zellen im Immobilisat. Der Effektivitätskoeffizient für die Stofftransportlimitierung wurde dabei nicht bestimmt.

Daher wurde in dieser Arbeit insbesondere der Effekt der Transportlimitierung für das Substrat Propionitril nach Immobilisierung in Alginat untersucht. Dabei stellte sich ein deutlicher, mit dem Durchmesser der Immobilisatpartikel zunehmender Rückgang der Aktivität ein. Unter der Voraussetzung, daß die Zellen durch die Immobilisierung nicht inaktivierten und auch keine wesentlichen Diffusionslimitierungen durch die Zellmembranen auftraten (Miller & Knowles 1984),

muß von einer Stofftransportlimitierung durch den Einschluß zumindest für den ersten, sehr schnell nitrilverseifenden Schritt ausgegangen werden. Bei der Berechnung des Effektivitätskoeffizienten für den äußeren und inneren Stofftransport von alginatimmobilisierten Zellen wurde festgestellt, daß eine Stofftransportlimitierung aus dem Bulk an die Oberfläche des Immobilisates auftritt, ebenso wie im Immobilisatpartikel bei geringen Substratkonzentrationen im Bereich von K_M eine Limitierung festgestellt werden konnte.

Daher war der Einsatz möglichst kleiner Immobilisatperlen bei unterschiedlichen Prozeßführungen sinnvoll. Zudem hängt der äußere Stofftransport auch von der Geometrie des Reaktors ab. Dabei sollte auf eine gute Durchmischung des Reaktors geachtet werden, was z.B. durch entsprechende Rührerdrehzahlen erreicht werden kann.

4.3.3 Absatzweise Prozeßführung mit immobilisierten Zellen

Unter den in Abbildung 4.1 genannten Möglichkeiten zur Reaktionsführung ist der absatzweise Prozeß bezüglich der notwendigen Regelung am einfachsten durchzuführen. Allerdings erfordert eine gewünschte Wiederverwendung des Biokatalysators nach dem Abtrennen des Reaktors eine einfache Abtrennung des Katalysators aus der Produktlösung, was z.B. durch eine Immobilisierung der Zellen möglich ist.

Wie aus den Untersuchungen zur Verseifung von Propionitril bei Konzentrationen an der Löslichkeitsgrenze und oberhalb davon festgestellt werden konnte, erfolgte unter diesen Bedingungen eine schnelle Inaktivierung der Nitrilhydratase. Daher wurde in den weiteren absatzweisen Prozeßführungen die Wiederverwendung bei einer Nitrilkonzentrationen von 100 mM bestimmt.

Die Untersuchung der Inaktivierung der Enzymreaktionen der hier verwendeten Immobilisate bei mehrfacher Wiederverwendung in der absatzweisen Prozeßführung ergab hohe Aktivitätsverluste der Nitrilhydratase bei beiden Ansätzen.

Eine schnelle Inaktivierung der Nitrilhydratase im Ganzzellsystem wurde auch von Fradet et al. (Fradet et al 1985) beobachtet. Dabei wurde ein proteolytischer Abbau des Enzymes für die von ihm beobachtete schnelle Inaktivierung der Nitrilhydratase während der Reaktion postuliert.

Der Verlauf der spezifischen Aktivitäten der Nitrilhydratase bei mehrfacher Verwendung der polyacrylamid- und alginatimmobilisierten Zellen ist in Abbildung 4.2 dargestellt.

Die Nitrilhydratase wies unter diesen Bedingungen eine Halbwertszeit von etwa 7 - 8 Zyklen im Standardansatz auf. Dabei zeigte sich mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 6.9$ h für das Alginatimmobilisat und $t_{1/2} = 8.3$ h für das Polyacrylamidimmobilisat kein wesentlicher Unterschied in den Inaktivierungsraten der Nitrilhydrataseaktivität. Die Amidase dagegen war in beiden Immobilisaten über die gesamte Zeit von 8 Zyklen gleichbleibend aktiv. Der Vorteil dieser absatzweisen Prozeßführung lag in der hohen Reaktionsrate bezogen auf die eingesetzte Biotrockenmasse.

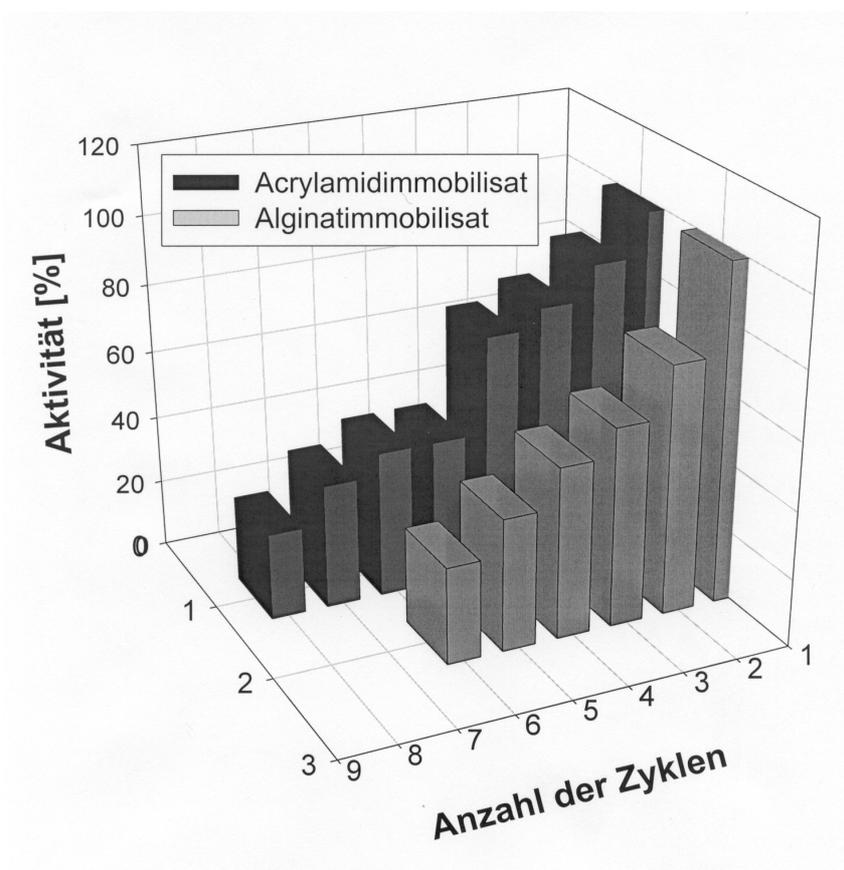


Abbildung 4.2: Vergleich der spezifischen Aktivitäten der Nitrilhydratase bei polyacrylamid- und alginatimmobilisierten Zellen bei einer absatzweisen Prozeßführung mit mehrfacher Wiederverwendung des Immobilisates.

Für den Einsatz der Nitrilhydratase aus *Rhodococcus rhodochrous* J1 zur Acrylamidproduktion wurde eine absatzweise Prozeßführung mit einer pulsweisen Zugabe von Substrat verwendet, wobei eine Produktanreicherung von bis zu 650 g/l bei einer maximalen Substratkonzentration von 65 g/l erhalten wurde (Yamada & Kobayashi 1996). Dabei wurde bei einer Temperatur von 10 °C zu zehn Zeitpunkten über eine Gesamtzeit von 20 h Substrat zugegeben.

Da in den Versuchen mit mehreren Zyklen unter Verwendung immobilisierter ruhender Zellen mehrfach Waschschriffe und Lagerzeiten von mehreren Stunden zwischengeschaltet waren (s. Abschnitt 3.4.1 und 3.4.3), sollte in einem weiteren Versuch geklärt werden, ob eine pulsweise Zugabe von 100 mM Propionitril bis zu einer Konzentration von 600 mM Propionamid im Ansatz die Inaktivierung der Nitrilhydratase bei Umsetzungen von vergleichbaren Nitrlmengen verringern könnte (s. Abbildung 3.12). Zudem wurde in diesem Experiment untersucht, ob die Abnahme der Aktivität der Nitrilhydratase auf eine Abbaureaktion des Enzyms zurückzuführen war.

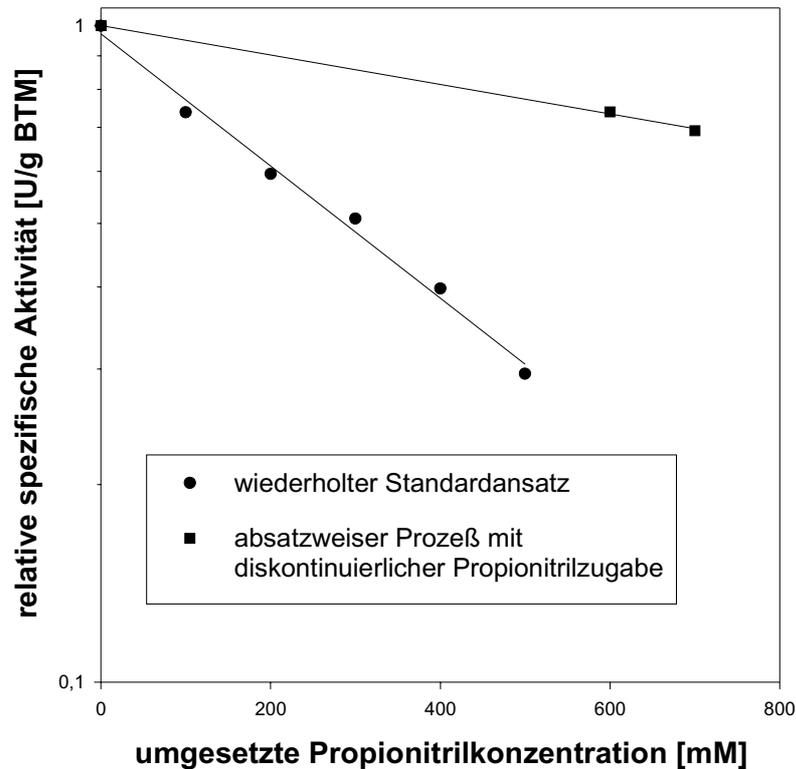


Abbildung 4.3: Vergleich der Inaktivierung der Nitrilhydratase bei Umsatz von Propionitril mit alginatimmobilisierten Zellen im mehrfach wiederholten Standardansatz und bei diskontinuierlicher Zugabe von Propionitril bis zu einer Konzentration von 100 mM, wobei die spezifischen Aktivitäten nach dem Umsatz von 600 und 700 mM Propionitril aus Standardaktivitätstests entnommen wurden.

Wie aus Abbildung 4.3 zu erkennen ist, konnte bei der pulsweisen Zugabe von Propionitril bei der absatzweisen Prozeßführung im Vergleich zu der Wiederverwendung der Zellen im absatzweisen Prozeß eine deutlich geringere Inaktivierungsrate für die Nitrilhydrataseaktivität bei einer vergleichbaren umgesetzten Menge an Substrat festgestellt werden. Es wurde eine Halbwertszeit von $t_{1/2} = 10$ h festgestellt. Dabei lag die spezifische Aktivität der Nitrilhydratase bei einem vergleichbaren Wert zu dem der freien Zellen im absatzweisen Prozeß.

Ein im Zuge dieses Versuches durchgeführter Vergleich der Proteinmenge an Nitrilhydratase von frischen Zellen und der in ihrer Aktivität um etwa 40 % reduzierten Zellen nach Beendigung des oben beschriebenen Versuches zeigte keine Änderung der Proteinkonzentration.

Da eine Abnahme durch proteolytischen Abbau des Enzymes aufgrund der beschriebenen Versuche eher unwahrscheinlich ist, kommt für die Inaktivierung möglicherweise eine irreversible Schädigung des aktiven Zentrums durch die Reaktion als Erklärung in Frage. Dabei könnte ein Verlust des Metallions oder auch eine Dissoziation der Untereinheiten der Nitrilhydratase zu der beobachteten

Inaktivierung führen. Da die Amidase über die gesamte Prozeßzeit konstant aktiv war, kann allerdings eine Lyse der Zellen oder ein erhöhter Protein-turnover in den Zellen ausgeschlossen werden.

Eine Prozeßführung mit einer pulsweisen Substratzugabe würde bei einer vergleichbaren Biomasse im Reaktionsansatz eine höhere Produktmenge über den Gesamtprozeß gegenüber der beschriebenen absatzweisen Substratumsetzung bedeuten. Dabei zeigte die geringer aktive Amidase in dem Substratbereich bis 600 mM mit einer Aktivität von 341 U/g BTM nur eine geringe Substratüberschußhemmung (s. Tabelle 3.5), wobei aber die Nitrilhydratase deutlich langsamer inaktivierte als in den Batchansätzen mit Wiederverwendung der Zellen.

Da reines Propionitril in den Reaktor zugegeben werden konnte, war für diesen Fall auch die Volumenänderung über die Zeit gering. Allerdings könnte es für größere Reaktionsansätze bei der Zugabe von reinem Nitril zu Mischungsproblemen kommen, die auch lokale Zweiphasen-Systeme ergeben könnten, die dann inaktivierend auf die Nitrilhydrataseaktivität wirken könnten (s. Abschnitt 3.3.8).

4.3.4 Absatzweise Prozeßführung mit kontinuierlicher Substratzugabe

Um bei einer absatzweisen Prozeßführung eine Endproduktkonzentration über 1.5 M im Bulk zu erhalten, konnte bei frei suspendierten Zellen kein Zwei-Phasen-System verwendet werden (s. Abschnitt 3.3.8). Aus den Versuchen mit einer pulsweisen Zugabe von Propionitril konnte abgeschätzt werden, daß eine kontinuierliche Zugabe von Propionitril zu einer Produktkonzentration von über 1.5 M führen kann. Daher wurde eine kontinuierliche Zugabe von reinem Propionitril zu einem absatzweisen Reaktionsansatz untersucht.

Da bei diesem Ansatz beide Enzymreaktionen beteiligt waren, wurde ein Kompromiß für die Reaktionstemperatur der temperaturlabilen Nitrilhydratase und der bei niedrigeren Temperaturen geringer aktiven Amidase gesucht. Dies war bei einer Temperatur von 17 °C der Fall, da hier beide Enzyme etwa denselben Betrag für die Inaktivierungsrate bei der Lagerung zeigten.

Die geringe Aktivität der Amidase bei niedrigen Temperaturen wird dagegen speziell bei der Acrylamidherstellung mit immobilisierten Zellen ausgenutzt, da die Weiterreaktion zu Acrylat in diesem Prozess nicht erwünscht ist. Dazu wird der Reaktionsansatz auf eine Temperatur von 6 °C temperiert, bei der die Nitrilhydratase noch hohe Aktivität zeigt (Yamada & Kobayashi 1996).

Es konnten in dem hier untersuchten System durch eine kontinuierliche Zugabe von Propionitril bei einer absatzweisen Prozeßführung Produktkonzentrationen von bis zu 3 M erreicht werden. Es wurde dabei eine maximale apparente Aktivität von 60 U/g BTM beobachtet. Die Halbwertszeit für die Enzyme wurde zu $t_{1/2} = 46$ h für die Nitrilhydratasereaktion und $t_{1/2} = 57$ h für die Amidasereaktion geschätzt. Somit konnte eine deutliche Verbesserung der Halbwertszeit für die Nitrilhydratasereaktion im Vergleich zu den absatzweisen Prozessen mit Wiederverwendung und gepulster Substratzugabe erreicht werden. Die Amidase zeigte dagegen eine recht hohe Inaktivierungsrate, die mit der gemessenen Inaktivierung bei der Lagerung nicht in Übereinstimmung zu bringen war. Da die Zellen

ein weiteres Mal eingesetzt wurden, konnte über eine Gesamtreaktionszeit von insgesamt 366 h eine spezifische Produktmenge von 0.75 mol/g BTM erreicht werden (s. Abschnitt 3.5.1).

Während dieses Versuches wurden die freien ruhenden Zellen aus der Produktlösung abzentrifugiert und ein weiteres Mal verwendet. Dabei wurde festgestellt, daß es zu Verlusten an Zellmasse bei der Zentrifugation kam. Zudem bildete sich an der Oberfläche des Überstandes eine schleimartige Masse, die nicht abzentrifugierbar war.

Aufgrund dieser Probleme wurde der Versuch mit alginatimmobilisierten Zellen wiederholt. Es konnte eine wesentlich einfachere Abtrennung der Biomasse erhalten werden, so daß die Zellen in drei Zyklen eingesetzt werden konnten. Die beobachtbare Reaktionsrate für die Propionamidhydrolyse lag bei 67 U/g BTM, die Gesamtausbeute an Ammoniumpropionat bei 0.56 mol/g BTM. Dabei könnte die geringere Aktivität der immobilisierten Zellen auf die Stofftransportlimitierung zurückgeführt werden. Die geringere Menge an gebildetem Produkt pro eingesetzter Biomassekonzentration ist vermutlich durch die längere Prozeßzeit aufgrund einer geringeren Reaktionsrate begründet. Dabei inaktivierte das Enzymsystem über die längere Reaktionszeit, und es konnte insgesamt nicht dieselbe Produktmenge erhalten werden wie in dem Ansatz mit freien Zellen. Dennoch konnten mit immobilisierten Zellen ebenfalls Produktkonzentrationen von bis zu 3 M Produkt im Bulk erreicht werden (s. Abschnitt 3.5.2).

Offensichtlich waren über eine geeignete Prozeßführung auch im absatzweisen Ansatz Produktkonzentrationen von bis zu 3 M zu erhalten. Bei dieser Produktkonzentration war allerdings auch die Aktivität der Zellen aufgrund der erheblichen Produktinhibition der Reaktion stark verringert. Diese Inhibition war reversibel, da nach dem Waschen der Zellen diese wieder eine höhere Aktivität zeigten. Dabei lag die Halbwertszeit für die Aktivität der frei suspendierten Zellen mit $t_{1/2} = 46$ h unter den Prozeßbedingungen höher als bei der Lagerung. Dies könnte durch einen verringerten proteolytischen Abbau der Enzyme in den Zellen unter Prozeßbedingungen begründet sein. Aber auch eine Enzymstabilisierung durch das entstandene Ammoniumpropionat ist nicht auszuschließen. Durch die Immobilisierung konnte keine wesentliche Veränderung der Inaktivierung erreicht werden. Dennoch konnten die Zellen aufgrund der besseren Abtrennbarkeit länger eingesetzt werden.

4.3.5 Kontinuierliche Prozeßführung im gerührten Reaktor

Für die Versuche zur kontinuierlichen Prozeßführung im gerührten Reaktor unter Verwendung der Alginatimmobilisate wurden die Reaktionstemperaturen für die jeweiligen Enzyme so gewählt, daß für die Nitrilhydratase eine hohe Einsatzdauer möglich war, und die Amidase eine hohe Aktivität zeigte. Bei dieser Prozeßführung konnten über die Veränderung der Zulauftrate die Reaktionsraten der untersuchten Enzyme im Fließgleichgewicht für unterschiedliche sich einstellende Substrat- und Produktkonzentrationen studiert werden (s. Abbildung 4.1). Eine Änderungen der Aktivität über die Zeit lies sich direkt in der Produktkonzentration im Ablauf nachweisen.

Hwang et al. (Hwang & Chang 1989) stellten fest, daß die Temperatur beim Umsatz von Acrylonitril bei Nitrilhydratasen des Stammes *Brevibacterium* CH1 als Polyacrylamidimmobilisat einen großen Einfluß auf die Prozeßstabilität hat. Bei kontinuierlicher Prozeßführung im Rührreaktor und 26 °C zeigte sich eine Halbwertszeit von $t_{1/2} = 24$ h. Dagegen hatte bei einer Prozeßtemperatur von 4 °C die Aktivität nach 10 Tagen noch nicht signifikant abgenommen. Allerdings lag dabei auch nur eine Aktivität der Nitrilhydratase von 20 % gegenüber der Aktivität bei 26 °C vor.

Bei der kontinuierlichen Propionitrilverseifung im Rührreaktor wurde eine Halbwertszeit bezüglich der Nitrilhydrataseaktivität von $t_{1/2} = 57$ h bei einer Temperatur von 6 °C bestimmt. (s. Tabelle 3.8). Dieser Wert liegt deutlich niedriger, als aus den Untersuchungen zur Lagerstabilität zu erwarten war. Dennoch zeigte sich eine höhere Halbwertszeit im Vergleich zum Fed-Batch-Prozeß. Die spezifische Aktivität lag bei maximal 650 U/g BTM. Insgesamt konnten in diesem Prozeß 1.69 mol Produkt/g BTM hergestellt werden. Die Amidase zeigte in diesem Versuch eine konstante Aktivität über die gesamte Prozeßzeit.

Eine starke Abnahme der Aktivität der Amidase, wie sie von Brennan et al. (Brennan et al 1995) bei polyacrylamidimmobilisierten ganzen Zellen des Stammes *Corynebacterium nitrilophilus* bei der kontinuierlichen Hydrolyse von Acrylamid (25 °C, pH 7.0) mit einer Halbwertszeit von nur 4.6 h bezüglich der Amidaseaktivität beobachtet wurde, konnte bei den alginatimmobilisierten Zellen von *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002 nicht festgestellt werden.

Die Halbwertszeit für die Inaktivierung der Amidase bei einer kontinuierlichen Prozeßführung mit alginatimmobilisierten Zellen liegt für 30 °C bei $t_{1/2} = 110$ h. Dieser Wert ist mit den Ergebnissen für die Lagerstabilität der Biomasse vergleichbar, bei einer Extrapolation der Regressionsgeraden in Abbildung 3.6 bis auf 30 °C. Die maximale Aktivität lag dabei bei 40 U/g BTM. Insgesamt wurden in dem Ansatz 1.8 mol Produkt/g BTM gewonnen.

Es zeigte sich bei der kontinuierlichen Amidhydrolyse eine Abnahme des Immobilisatvolumens während der Prozeßzeit, das auf die allmähliche Auflösung der Matrix durch den Einfluß des Produktes Ammoniumpropionat zurückgeführt wurde. Das Auflösen der Polymermatrix beim Einsatz von alginatimmobilisierten Zellen von *Rhodococcus* sp. B312 zur Acrylamidhydrolyse wurde auch von Bernet et al. (Bernet et al 1987) festgestellt. Ob das entstehende Acrylat dabei die Polymermatrix auflöste, wurde nicht weiter untersucht.

Da bei der Umsetzung von Propionitril zu Amid kein Verlust an Immobilisatmasse festzustellen war und auch Ammoniumpropionat während der Umsetzung nur in geringen Konzentrationen entstand, ist anzunehmen, daß das Endprodukt schon bei einer Konzentration von 100 mM Kalzium aus der Matrix herauslösen kann und dabei auch Zellen in das Medium freigesetzt werden. Aufgrund der beobachteten langsamen Abnahme der Propionamidkonzentration nach dem Umstellen der Zulauftrate wurde angenommen, daß Ammoniumpropionat im Alginat angereichert wird. Dabei kommt es zu einer Produkthemmung, die nur langsam über die Abnahme der Ammoniumpropionatkonzentration aus der Polymermatrix zurückgeht. Da besonders Ammonium eine hohe Produktinhibition auf die Amidaseaktion zeigt und als Kation das Kalzium im Alginat ersetzen kann, könnte dies den beobachteten Effekt bewirken.

Dabei wirkt das Alginat über seine geladenen Gruppen wie ein Ionenaustauscher. Diese Eigenschaft des Alginates zur Akkumulation von Kationen ist gut dokumentiert. Besonders die Absorption von Schwermetallen an das Alginat in *Sargassum sp.* wird wirtschaftlich genutzt, da dieses Alginat als preiswerter Ionenaustauscher eingesetzt werden kann (Volesky & Holan 1995).

Auch ein Wachstum von *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002 auf Propionat ist, durch aus dem Immobilisat ausgetretene Zellen, bei geringen Fließraten bei der kontinuierlichen Prozeßführung zu beobachten. Somit scheint ein Einschluß der Zellen in Alginat zumindest für die Propionamidhydrolyse nicht geeignet zu sein.

4.3.6 Kontinuierliche Prozeßführung im Festbett

Der Einsatz einer gereinigten Nitrilhydratase im Festbett wurde von Fradet et al. (Fradet et al 1985) mit einem an DEAE-Cellulose gekoppelten Enzym aus *Rhodococcus sp.* B312 untersucht. Bei einer Temperatur von 5 °C, einer Zulaufkonzentration von 0.1 mM und einer Zulauftrate von 25 ml/h konnte über einen Zeitraum von 15 Tagen ein Vollumsatz beobachtet werden. Dabei wurden im Reaktor 841 U Nitrilhydratase mit einer Aktivität von 307 U/mg Protein eingesetzt.

Bei dem hier untersuchten Zwei-Enzym-System konnte eine mittlere Aktivität der Nitrilhydratase von 92 U/g BTM bei einer Gesamtlaufzeit von 17.5 Tagen bestimmt werden. Dabei ergab sich eine Halbwertszeit von $t_{1/2} = 138$ h und eine über die Reaktionszeit aufsummierte, spezifische Produktmenge von 2.33 mol/g BTM. Der beobachtete Anstieg der Propionamidkonzentration im Ablauf kann auf die Abnahme der Nitrilhydrataseaktivität über die Prozeßzeit zurückgeführt werden. Wie in Abbildung 4.1 dargestellt, ist die Substratkonzentration über der Länge des Reaktors nicht konstant. Zu Beginn des Versuches genügte die Verweilzeit des Zwischenproduktes Propionamid im Festbett aus, um vollständig umgesetzt zu werden. Bedingt durch die allmähliche Inaktivierung der Nitrilhydratase konnte eine Akkumulation des Zwischenproduktes verzeichnet werden. Dies wurde bedingt durch die orts- und zeitabhängige Änderung der Konzentrationsprofile, wobei die zeitabhängige Änderung durch die Inaktivierung der Nitrilhydratase begründet wird.

Bei dem Einsatz des Immobilisates zur Amidhydrolyse im Festbett wurde bis zum Abbruch des Versuches nach 45 Tagen ein Umsatz von 100 % und eine aufsummierte spezifische Produktmenge von 0.4 mol/g BTM erhalten. Die mittlere Aktivität der Säule lag unter diesen Bedingungen bei 6 U/g BTM. Eine Inaktivierung der immobilisierten Zellen konnte in dieser Zeit nicht beobachtet werden.

Der Vorteil einer Umsetzung im Festbett liegt in dem geringen benötigten Reaktorvolumen und in der Möglichkeit, bei einer kontinuierlichen Zugabe von Substrat einen Vollumsatz zu erreichen. Dies ist bei der kontinuierlichen Prozeßführung im Rührreaktor nicht möglich. Zudem konnte eine sehr hohe Prozeßstabilität demonstriert werden. Dabei zeigte besonders die Nitrilhydratase eine deutlich höhere Halbwertszeit als in den gesamten bisherigen Versuchen. Darüber hinaus konnte auch für die Nitrilhydrolyse die höchste Produktmenge pro eingesetzter Biomasse erreicht werden. Die

Propionamidhydrolyse lief im Festbettreaktor über einen Zeitraum von 1050 h mit einem Vollumsatz des Substrates.

4.3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den verschiedenen Prozeßführungen

Für eine Abschätzung geeigneter Reaktorkonzepte für die in dieser Arbeit untersuchte Propionitrilverseifung wurde der Einsatz des Biokatalysators in den wichtigsten Reaktortypen betrachtet.

Zusammenfassend wurden die ermittelten Parameter für alle untersuchten Prozeßführungen in Tabelle 4.1 und 4.2 dargestellt.

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der bei verschiedenen Prozeßführungen erhaltenen Parameter für die Nitrilhydratasereaktion

Nitrilhydratase	Aktivität (apparent) [U/g BTM]	Halbwertszeit der Enzymaktivität [h]	Produkt pro Biomasse [mol/g BTM]	BTM [g/l]	Reaktionszeit [h]	Reaktionsvolumen [ml]
Prozeßführung						
absatzweise	9000	nicht bestimmt	nicht bestimmt	0.77	1	25
absatzweise, wiederholter Einsatz (Immobilisat)	5814	6.94	nicht bestimmt	1.55	8	25
absatzweise, gepulste Substratzugabe (Immobilisat)	9500	10	0.01	2.94	2	50
absatzweise, Fed-batch	75	46	0.75	4	366	500
absatzweise, Fed-batch (Immobilisat)	67	nicht bestimmt	0.56	2.7	450	250
kontinuierlicher Rührreaktor (Immobilisat)	650	57	1.69	1.07	216	100
Festbett/Rohrreaktor (Immobilisat)	92	138	2.33	3	400	20

Aktivität (apparent) = beobachtbare spezifische Reaktionsrate; Produkt pro Biomasse = Summe des entstandenen Produktes über die Reaktionszeit bezogen auf die eingesetzte Biomasse

Tabelle 4.2: Zusammenfassung der bei verschiedenen Prozeßführungen erhaltenen Parameter für die Amidasereaktion

Amidase	spezifische Aktivität [U/g BTM]	Halbwertszeit der Enzymaktivität [h]	Produkt pro Biomasse [mol/g BTM]	BTM [g/l]	Reaktionszeit [h]	Reaktionsvolumen [ml]
Prozeßführung						
absatzweise	350	nicht bestimmt	nicht bestimmt	0.77	1	25
absatzweise, wiederholter Einsatz (Immobilisat)	283	nicht feststellbar	nicht bestimmt	1.55	8	25
absatzweise, gepulste Substratzugabe (Immobilisat)	341	nicht feststellbar	0.01	2.94	2	50
absatzweise, Fed-batch	75	57	0.75	4	366	500
absatzweise, Fed-batch (Immobilisat)	67	nicht bestimmt	0.56	2.7	450	250
kontinuierlicher Rührreaktor (Immobilisat)	40	111	1.8	1.7	1311	150
Festbett/Rohrreaktor (Immobilisat)	6.1	nicht feststellbar	0.4	0.66	1050	25

Aktivität (apparent) = beobachtbare spezifische Reaktionsrate; Produkt pro Biomasse = Summe des entstandenen Produktes über die Reaktionszeit bezogen auf die eingesetzte Biomasse; nicht feststellbar = keine Inaktivierung über die Reaktionszeit

Im Vergleich der in Tabelle 4.1 und 4.2 aufgeführten Prozesse liegt die höchste spezifische Aktivität bei einer absatzweisen Prozeßführung vor. Dabei muß allerdings beachtet werden, daß eine hohe Substratkonzentration die Zellen irreversibel schädigt. Somit können bei dieser Reaktionsführung nur begrenzte Produktkonzentrationen erreicht werden. Die maximal möglich Produktkonzentration kann durch eine weitere Zugabe an Substrat über die Prozeßzeit erhöht werden. Bezüglich des insgesamt gebildeten Produktes bezogen auf die eingesetzte Biomasse war der Einsatz des kontinuierlichen Rohrreaktors am günstigsten. Allerdings wurde die Amidasereaktion beendet, ohne daß eine Inaktivierung feststellbar war, wodurch die maximal mögliche Produktmenge nicht bestimmbar war. Allerdings waren auch die ermittelten spezifischen Aktivitäten bei dieser Prozeßführung im Vergleich zu den spezifischen Aktivitäten im Batchansatz sehr gering.

Der Einsatz der Zellen im kontinuierlichen Rührreaktor ergab dagegen wesentlich höhere spezifische Aktivitäten für beide Enzyme bei einer bezogen auf die Biotrockenmasse kaum geringeren Produktmenge. Wie aus Abbildung 4.1 zu ersehen ist, kann bei der kontinuierlichen Prozeßführung kein Vollumsatz des Substrates erfolgen. Daher müßte für eine geforderte Vollumsetzung ein weiterer Prozeßschritt nachgeschaltet werden. Dies könnte ein kontinuierlicher Festbettreaktor sein, wobei die

entsprechende Dimensionierung durch die Fließrate und die Konzentration an Substraten und Produkten im Ablauf des kontinuierlichen Rührreaktors festgelegt ist.

Zur Optimierung bezüglich der Menge an insgesamt gebildetem Produkt / Biomasse müssten die beiden enzymatischen Schritte in unterschiedlichen Prozeßstufen ablaufen, wobei dann in jeder Stufe die optimalen Reaktionsbedingungen für die jeweilige Umsetzung eingestellt werden könnten.

Um höhere Stabilitäten bezüglich der Nitrilhydrataseaktivität zu bekommen, sollte die Reaktionstemperatur deutlich erniedrigt werden, da die Nitrilhydratase bei 26 °C auch bezüglich der Lagerung nicht stabil ist (s. Abbildung 3.6). Dagegen sollte die Amidasereaktion bei Temperaturen von etwa 30 °C ablaufen, da die Aktivität dadurch weiter erhöht werden könnte, ohne dabei wesentliche Verluste in der Stabilität einzubüßen. Zudem sollte untersucht werden, ob ein höherer pH-Wert (pH 9.5 s. Abschnitt 3.3.3) bezüglich der Nitrilhydratasereaktion für einen angestrebten Prozeß nutzbar ist. Dies würde zwar Probleme mit der Umpufferung des Produktes für die anschließende Amidasereaktion mit sich bringen, aber dennoch eine wesentliche Steigerung der spezifischen Aktivität bezüglich der Nitrilhydratasereaktion ergeben.

Bei der Bewertung der verschiedenen erhaltenen Produktmengen muß auch die Kinetik der einzelnen Enzyme beachtet werden, die eine deutliche Substrat- und Produktinhibition zeigen. Die entsprechenden Kinetiken und ihre Parameter wurden in Abschnitt 3.6 entwickelt und bestimmt.

Die Definition eines optimalen Prozesses hängt von verschiedenen Parametern ab, die in dieser Arbeit keinen Eingang fanden. Darunter sind unter anderem die Kosten für die Produktion der Biomasse, die vorhandenen Ressourcen bezüglich der Bioreaktoren und die Kosten für das Produkt und das Substrat enthalten. Für eine abschließende Beurteilung sind daher die einzelnen Prozeßführungen zu vergleichen und mit den gegebenen Vorbedingungen abzugleichen. Dennoch kann aufgrund der ermittelten Daten für die Inaktivierungskonstanten, die spezifischen Reaktionsraten und den erhaltenen Produktmengen bezogen auf die eingesetzte Biotrockenmasse eine erste Abschätzung über den günstigsten Prozeßführungstyp getroffen werden.

Die zur Verbesserung der Wiederverwendbarkeit der Zellen durchgeführte Immobilisierung führte zu einer Stofftransportlimitierung, wobei der Effektivitätskoeffizient für den externen und internen Stofftransport in Abschnitt 3.6.4 berechnet wurde. Es konnte allerdings ein protektiver Einfluß durch die Immobilisierung festgestellt werden, da auch Umsetzungen im Zwei-Phasen-System möglich waren. Dies könnte ebenfalls auf die Stofftransportlimitierung zurückzuführen sein, wodurch die hohen Substratkonzentrationen im Bulk und nicht im Immobilisatpartikel vorliegen würden.

Das verwendete Immobilisat mit einem Einschluß der Zellen in Kalziumalginate ist nur bedingt für den untersuchten Prozeß verwendbar, da das Endprodukt Ammoniumpropionat die Polymermatrix zerstört. Daher sollten weitere Untersuchungen für ein geeignetes Immobilisierungsverfahren durchgeführt werden. Bauer et al. (Bauer et al 1996) beschreibt dazu einen Prozeß zur

Immobilisierung von *Rhodococcus sp.* in Polyvinylalkohol. Dabei wurden gute Prozeßstabilitäten des Immobilisates bei der Nitrilverseifung gefunden.

4.4 Bestimmung der Reaktionskinetiken des Zwei-Enzym-Systems

4.4.1 Modellbildung

Die mathematische Modellierung der Propionitrilhydrolyse wurde mit dem Ziel verfolgt, die Reaktionsraten der Nitrilhydratase und der Amidase in Abhängigkeit der Substrat- und Produktkonzentration zu beschreiben. Das schließlich erhaltene Modell sollte für die Prozeßsimulation und modellgestützte Verfahrensoptimierung zur Verfügung gestellt werden.

Bei kinetischen Untersuchungen mittels absatzweiser Prozeßführung konnte festgestellt werden, daß die Nitrilhydratasereaktion sowohl durch das Substrat als auch durch die Produkte der Reaktion gehemmt wurde. Im Falle der Produkte konnte eine kompetitive Inhibition angesetzt werden. Dabei war besonders auffällig, daß die Endprodukte der Gesamtreaktion, Ammonium und Propionat, einen stärkeren inhibitorischen Effekt zeigten als das Substrat und Produkt der Nitrilhydratase selbst. Die starke Hemmung der Nitrilhydratase durch Propionat, aber auch durch Propionamid, wurde bei einer gereinigten Nitrilhydratase aus *Rhodococcus sp.* von Hjort et al. (Hjort 1990) qualitativ beschrieben, wobei keine Berechnung der Inhibitionskonstanten erfolgte. Dabei wurde vermutet, daß kurze aliphatische Carbonsäuren in das aktive Zentrum eindringen und als kompetitive Inhibitoren wirken können. Dies wird unter anderem bei der Reinigung der Nitrilhydratase genutzt, da die Buttersäure hier einen Schutz vor Inaktivierung während der Aufarbeitungsschritte ergab (Nagamune et al 1990). Die inhibitorischen Effekte von verschiedenen Carbonsäuren auf die gereinigte Nitrilhydratase aus *Brevibacterium sp.* R312 wurde von Kopf et al. (Kopf et al 1996). eingehend untersucht

Die Reaktionsrate der Amidase wurde besonders durch Ammonium erniedrigt, dagegen hatten die anderen Komponenten der Reaktion nur einen geringen Einfluß auf die Enzymaktivität. Eine von Maestracci et al. (Maestracci 1984) untersuchte aliphatische Amidase aus *Brevibacterium sp.* R312 zeigte eine maximale Reaktionsrate von 11.5 U/mg Protein und einen K_M -Wert von 38 mM bezüglich des Substrates Propionamid. Es konnte dabei gezeigt werden, daß von den untersuchten Substraten Propionamid für dieses Enzym die höchste maximale Reaktionsrate ergab, aber dabei auch die höchste Michaelis-Mentenkonstante hatte, was einer niedrigen Affinität für dieses Substrat entspricht. Das Enzym hatte für Propionamidderivate mit verschiedenen Resten in der α - und β - Position ebenfalls K_M -Werte von 20 - 30 mM, aber mit 1.5 bzw. 0.004 U/mg Protein eine wesentlich geringere spezifische Aktivität. Die maximale spezifische Aktivität nahm außerdem mit zunehmender Kettenlänge des Amides ab, wobei auch Acetamid mit einer geringeren spezifischen Aktivität umgesetzt wurde als Propionamid.

Dennoch lagen in der Literatur keine Parameter für die Inhibition der Produkte vor. Zudem wurde immer die Einzelreaktion untersucht, wobei für den hier entwickelten Prozeß die Dynamik beider Enzymreaktionen mit einem Modell abgebildet werden sollte.

Aufgrund der beobachteten Inhibierungen durch die Substrate und Produkte wurde das kinetische Modell einer Beschreibung der Enzymreaktionen nach Michaelis-Menten dahingehend erweitert, daß der Einfluß des Substrates durch einen Term für die Substratüberschußhemmung berücksichtigt wurde und der Einfluß der Produkte über einen Term für eine kompetitive Inhibition angenommen wurde.

Eine erste Schätzung der Parameter K_M , K_i und r_{max}^* in Gleichung 3.3 erfolgte dann durch nichtlineare Regression des Verlaufes der Anfangsreaktionsraten bei variiertem Substratkonzentration. Die Methoden der nichtlinearen Regression stellen nach Raymond et al. (Raymond & Prvan 1996) eine zuverlässigere Möglichkeit der Parameterschätzung dar als im Vergleich zur linearen Regression. Danach wurden durch die Variation der Produktkonzentrationen der jeweilige Einfluß dieser Stoffe auf die jeweilige Reaktionsrate der Enzyme bestimmt. Dazu wurde die Startkonzentration an Substrat so gewählt, daß diese im Sättigungsbereich des jeweiligen Enzymes und gleichzeitig im Maximum der beobachtbaren Reaktionsrate lag und somit bei der Bestimmung der Anfangsreaktionsraten nicht limitierend war. Unter Verwendung der zuvor bestimmten Parameter konnte dann über nichtlineare Regression die Produktinhibition bestimmt werden, die in Gleichung 3.1 beschrieben wird.

Zusätzlich wurden die Parameter direkt aus den Konzentrations-Zeit-Verläufen mittels dynamischer Simulation bestimmt, wobei die zuvor formulierten reaktionskinetischen Ansätze beibehalten wurden. Dabei sind die zugrundegelegten Meßdaten üblicherweise mit geringeren Fehlern behaftet, als die bereits über eine Linearisierung erhaltenen Anfangsreaktionsraten, da im dynamischen Experiment die Meßwerte einem Versuchsansatz entnommen werden können. Die Werte für die Anfangsreaktionsraten stammen aus einer Serie von verschiedenen Experimenten, wodurch eine Streuung der Meßdaten begünstigt wird.

Eine Parameterschätzung basierend auf Experimenten mit einer eingesetzten Substratkonzentration von 1 M bei Versuchsbeginn und variiertem Katalysatorkonzentration ergab dabei für die Amidase-reaktion gute Übereinstimmungen mit den Werten aus den Anfangsreaktionsraten. Dagegen wurden die Parameter r_{max}^* und K_M für die Nitrilhydratase deutlich höher geschätzt. Dies kann zum einen darin begründet sein, daß im Bereich der Dynamik der Nitrilhydratasereaktion nur wenige Meßpunkte vorlagen. Aber auch ein Einfluß des Substrates Propionitril in den vorliegenden hohen Konzentrationen kann dabei einen Einfluß bewirkt haben. Wie bereits beschrieben wurde, zeigen die Zellen bei hohen Propionitrilkonzentrationen eine Zerstörung der Zellmembran und eine Lyse der Zellen. Daher könnte auch eine Permeabilisierung der Zellen durch das Substrat erfolgt sein, wodurch Propionitril besser in die Zellen gelangen konnte. Da bei den Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit und der Inaktivierung der Zellen unter Lichtabschluß bereits die Anwesenheit eines zellinternen Inhibitors vermutet werden konnte, würde dieser aufgrund der höheren Substratkonzentration in der Zelle eventuell verdrängt, und es ergäbe sich eine scheinbar höhere spezifische Aktivität.

Aufgrund der eingeschränkten Vergleichbarkeit der erhaltenen Parameter erfolgte im weiteren auch eine Parameterschätzung aus den Konzentrations-Zeit-Verläufen einer Umsetzung von 100 mM Propionitril. Ein Vergleich der Ergebnisse der beiden Bestimmungsmethoden über Anfangsreaktionsraten und dynamische Simulation ergab nur geringe Unterschiede in den geschätzten Parametern. Allerdings wurden die Michaelis-Mentenkonstanten über die dynamische Simulation für beide Enzyme geringer geschätzt. Für die Nitrilhydratasereaktion konnte dabei ein vergleichbarer K_M -Wert zu den Parametern des freien Enzyms erhalten werden (Hollergschwandner 1999).

Ein Vergleich der erhaltenen maximalen Reaktionsraten und Michaelis-Mentenkonstanten mit Literaturwerten für die Umsetzung von Propionitril bzw. Propionamid ist hier nur mit den Parametern von gereinigten Enzymen möglich, da für die Umsetzung dieses Substrates mit frei suspendierten Zellen keine Literaturwerte vorliegen.

Zwar sollte der hier bestimmte K_M -Wert unter der Annahme einer freien Diffusion der Substrate und Produkte über die Membran (Miller & Knowles 1984) vergleichbar sein, aber ein Vergleich der Werte für die maximale Reaktionsrate ist nur unter Kenntnis des Proteingehaltes der Zellen sinnvoll.

Um eine Vergleichbarkeit der Literaturwerte von aufgereinigten Enzymen mit den Parametern der Nitrilhydratase aus dem Stamm *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002 zu erhalten, wurde dieses Enzym in der Arbeit von Hollergschwandner aufgereinigt und charakterisiert (Hollergschwandner 1999). Dabei wurde eine spezifische Aktivität von 590 U/mg und ein K_M -Wert von 17.5 mM bestimmt. Dabei lag der bestimmte K_M -Wert im Bereich des K_M -Wertes der freien Zellen mit 16 mM (s. Tabelle 3.5).

Der Vergleich der maximalen Reaktionsrate der Nitrilhydratase in freien Zellen mit dem aufgereinigten Enzym der Nitrilhydratase zeigte dabei unerwartet hohe Aktivitäten des reinen Proteins.

Die freien Zellen zeigten eine maximale Reaktionsrate im Standardaktivitätstest von etwa 14000 U/g BTM (s. Tabelle 3.5) und einen Proteingehalt im Rohaufschluß von 0.23 g Protein/g BTM. Die gelelektrophoretische Untersuchung des Rohaufschlusses zeigte, daß ein sehr großer Anteil (ca. 80-90% w/v) des auf diese Art zu gewinnenden Enzyms die Nitrilhydratase darstellte (s. Abbildung 3.13). Dies ergibt, zusammen mit der Aktivität des reinen Enzyms von 590 U/mg Protein (Hollergschwandner 1999) einen Unterschied zwischen den Aktivitäten der freien Zellen und dem gereinigten Enzym um etwa einem Faktor 6.

Das könnte ein weiterer Hinweis auf das Ablösen eines Inhibitors sein, der hier durch die Aufreinigung des Enzymes entfernt wurde, was in einer höheren spezifischen Aktivität resultierte.

Allerdings scheint das gereinigte Enzym keine Substratüberschußhemmung zu zeigen. Propionamid hatte sogar eher einen aktivierenden Einfluß auf die Aktivität der Nitrilhydratase.

Eine vergleichende Gegenüberstellung der Literaturwerte für die apparenten Michaelis-Mentenparameter K_M und r_{max}^* ist in Tabelle 4.3 zusammengefaßt.

Tabelle 4.3: Literaturwerte für die kinetischen Parameter für gereinigte Nitrilhydratasen aus verschiedenen Organismen

Stamm	K_M [mM]	r_{max}^* [U/mg]	Reaktionsbedingungen	Literatur
<i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM 13002	17.5	560	26 °C, pH 7.2	(Hollergschwandner 1999)
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> J1	1.92	1600	20 °C, pH 7	(Nagasawa et al 1991)
<i>Rhodococcus</i> sp. 312 Mutante A4	6	307	an DEAE immobilisiertes Enzym 25 °C, pH 7	(Fradet et al 1985)
<i>Rhodococcus</i> . Sp.	6	433	37 °C, pH 7	(Hjort 1990)
<i>Rhodococcus</i> sp. N-774		691	30 °C, pH 7.8	(Nagamune et al 1990)
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> B23	29.4	1840	20 °C pH 7	(Nagasawa et al 1987)

Wie aus Tabelle 4.3 zu ersehen ist, zeigen die beschriebenen Nitrilhydratasen deutliche Unterschiede bezüglich ihrer Aktivität und Affinität zum Substrat Propionitril. Besonders auffällig ist die hohe Aktivität der kobaltabhängigen Nitrilhydratase aus *Rhodococcus rhodochrous* J1 und der eisenabhängigen Nitrilhydratase aus *Pseudomonas chlororaphis* B23. Die Nitrilhydratasen aus den übrigen *Rhodococcus*-Stämmen scheinen ähnliche maximale Reaktionsraten zu zeigen, wobei die immobilisierte Nitrilhydratase aus *Rhodococcus* sp. 312 Mutante A4 nicht auf eine Stofftransportlimitierung aufgrund der Immobilisierung hin untersucht wurde. Die Affinität der hier untersuchten Nitrilhydratase zu Propionitril scheint im Vergleich eher gering zu sein.

Ein Vergleich der Amidaseaktivitäten mit Literaturwerten des Stammes *Rhodococcus* sp. R312 ergibt eine deutlich höhere Aktivität und Affinität für Propionamid bei den hier verwendeten Zellen. Maestracci et al. (Maestracci 1984) beschreiben einen K_M -Wert von 38 mM und eine Aktivität von 5.2 U/g BTM.

Dagegen wurde für die Amidase aus *Rhodococcus rhodochrous* J1 eine Aktivität von 830 U/g BTM und ein K_M -Wert von 0.48 mM bei 25 °C und pH 7.8 festgestellt (Kobayashi et al 1993b). Der Einfluß der Reaktionsprodukte auf die Amidasereaktion wurde bei beiden genannten Untersuchungen nicht näher beschrieben.

4.4.2 Anwendung des Modells auf verschiedene Prozeßführungen

4.4.2.1 Absatzweiser Prozeß mit kontinuierlicher Substratzudosage

Die bisherigen Parameteranpassungen erfolgten über Datensätze, in denen die Inaktivierung der Enzymreaktionen aufgrund der kurzen Reaktionsdauer von maximal einer Stunde zu vernachlässigen war. Für den untersuchten Fed-batch Prozess mit einer Prozeßzeit von mehreren Tagen (s. Tabelle 4.1) wurde eine erhebliche Inaktivierung der Enzyme festgestellt, welche durch eine Bilanzierung der Enzyme Rechnung getragen wurde.

Durch das daraus für diese Prozeßführung erhaltene Differentialgleichungssystem und die Verwendung der zuvor bestimmten Parameter konnte der Verlauf der Konzentrationen der Edukte und Produkte sehr gut abgebildet werden (s. Abbildung 3.2.7).

Dabei wurde die Nitrilhydratasereaktion mit einer etwas geringeren Reaktionsrate angenommen, als dies die Meßdaten erkennen ließen. Dies könnte darauf hindeuten, daß die Inhibition durch die Endprodukte Propionat und Ammonium zu hoch geschätzt wurde. Aus den Bestimmungen der Produktinhibition über Anfangsreaktionsraten war besonders Ammonium mit einem starken inhibitorischen Einfluß auf die Enzymaktivitäten ermittelt worden. Dagegen ergab die Abschätzung der Parameter über dynamische Simulation aus Konzentrations-Zeit-Verläufen für die Inhibition durch Ammoniumpropionat einen deutlich geringeren Einfluß des Endproduktes auf die Nitrilhydratasereaktion. Möglicherweise verursacht also das Vorhandensein von Ammoniumpropionat eine geringere Inhibition auf die Rate der Nitrilhydrolyse als die einzelnen Komponenten Ammonium und Propionat. Einen weiteren Hinweis auf diesen Zusammenhang könnte durch die Parameterschätzungen aus den Untersuchungen zur Verseifung einer 1 M Substratkonzentration erhalten werden, wobei ein deutlich höherer Wert für die Inhibitionskonstante abgeschätzt wurde als im Vergleich zu den jeweiligen Einzelkomponenten.

4.4.2.2 Kontinuierlicher Prozeß im Rührreaktor

Um die Inaktivierung des Enzymsystems unter den jeweilig optimierten Bedingungen abschätzen zu können, wurden die benötigten Bilanzgleichungen für einen ideal durchmischten Rührkessel aufgestellt, wobei für die Reaktionsraten der zu untersuchenden Enzyme die kinetische Ansätze aus Abschnitt 3.6.1.2 übernommen wurden. Der Einfluß der Immobilisierung und die damit verbundene Stofftransportlimitierung wurde vereinfachend durch eine Variation der maximalen Reaktionsrate berücksichtigt. Mit den dabei abgeschätzten Parameterwerten für r_{\max}^* und der jeweiligen Inaktivierungskonstante k konnten die Verläufe der gemessenen Konzentrationen gut abgebildet werden, was auf eine gute Übereinstimmung der simulierten Reaktionsraten mit den tatsächlich im System vorhandenen Raten schließen läßt.

Dabei zeigte die Parameterschätzung für die Propionitrilverseifung einen niedrigeren Wert für die maximale Reaktionsrate der Nitrilhydratasereaktion, als aufgrund der Reaktionstemperatur von 6 °C aus den Versuchen zur Temperaturabhängigkeit geschlossen werden konnte (s. Abbildung 3.29). Aufgrund der Bestimmung der Stofftransportlimitierung bei immobilisierten Zellen konnte diese zusätzliche Verringerung des Parameters r_{\max}^* durch eine Diffusionslimitierung erklärt werden. Allerdings scheint die Nitrilhydratasereaktion auch einen nicht im Modell enthaltenen Effekt zu zeigen, da zum Ende des Prozesses hin die Aktivität der Nitrilhydratase deutlich zu gering geschätzt wurde. Möglicherweise könnte ein alternativer reaktionskinetischer Ansatz der Inaktivierung in Abhängigkeit der Nitrilkonzentration zu einer verbesserten Angleichung der Simulation an das Experiment führen. Der berechnete Verlauf der Konzentration an Propionat über die gesamte Prozeßzeit zeigte eine sehr gute Übereinstimmung mit den Meßdaten, wobei die Inaktivierungskonstante für die Amidase-reaktion zu $k = 0$ abgeschätzt wurde.

Analog zur Abschätzung der Inaktivierung der Nitrilhydratase wurde die Inaktivierungskonstante k und der Parameter r_{\max}^* der Amidase-reaktion über nichtlineare Regression in Verbindung mit dynamischer Simulation geschätzt. Die betragsmäßige Inaktivierungskonstante wurde dabei zu $k = 6.2 \times 10^{-3} \text{ 1/h}$ bestimmt. Ein Vergleich mit der Inaktivierungskonstanten aus den Versuchen zur Lagerung der ruhenden Zellen zeigt einen nahezu identischen Wert (s. Abschnitt 4.3.5).

Dagegen zeigte die geschätzte maximale Reaktionsrate einen deutlich geringeren Wert, als daß er alleine durch die Stofftransportlimitierung hätte erklärt werden können. Es ist denkbar, daß es durch die Anreicherung von Ammoniumpropionat in der Alginatmatrix zu einer stärkeren Inhibition durch die Produkte kommt, als dies aus den Konzentrationen im Bulk abzuschätzen war (s. Abschnitt 4.3.5).

4.4.3 Abschließende Wertung der dynamische Simulation

Mit Hilfe des zuvor erstellten Modells für das Zwei-Enzym-System und durch die Bilanzierung war es möglich, verschiedene Prozeßführungen mathematisch zu beschreiben. Die dabei erhaltenen simulierten Konzentrations-Zeit-Verläufe zeigten generell eine zufriedenstellende Übereinstimmung mit den experimentell ermittelten Konzentrationen. Dabei wurde der gesamte Parametersatz über zwei verschiedene Schätzmethode ermittelt und eine gute Übereinstimmung der berechneten Konzentrationsverläufe mit den gemessenen Daten aus einer absatzweisen Prozeßführung zur Propionitrilverseifung festgestellt. Die Übertragbarkeit der reaktionskinetischen Ansätze auf weitere Prozeßführungen wurde an den realen Daten einer absatzweisen Prozeßführung mit kontinuierlicher Zudosage von Substrat überprüft und hierbei eine gute Übereinstimmung der simulierten Konzentrationsverläufe mit dem Experiment bis in einen Konzentrationsbereich des Produktes von über 3 M festgestellt. Zudem wurde aus kontinuierlichen Prozeßführungen die jeweilige Inaktivierung der Enzyme abgeschätzt.

Der Vergleich der ermittelten Parameter mit Literaturwerten ergab für die gereinigte Nitrilhydratase eine Ähnlichkeit zu den eisenabhängigen Nitrilhydratasen aus anderen *Rhodococcus*-Stämmen. Die Parameter der Amidase-reaktion zeigten nur geringe Ähnlichkeiten mit den Literaturwerten vergleichbarer Enzyme aus *Rhodococcus*-Stämmen.

5 Ausblick

Die Bereitstellung der Zellen des Stammes *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002 beinhaltet noch bedeutende Verbesserungspotentiale für einen späteren Einsatz zur großtechnischen Nitrilverseifung. Zum einen sollte die festgestellte Erhöhung der spezifischen Aktivitäten über die Kultivierungsdauer (s. Abschnitt 3.7.3) durch eine Zellanzucht im Chemostat optimiert werden. Bei dieser Prozeßführungsstrategie kann über die Verdünnungsrate die Wachstumsrate konstant eingestellt werden, wodurch die einzelnen Wachstumsphasen und die jeweiligen spezifischen Aktivitäten über einen längeren Zeitraum beobachtet werden können. Auch der Einfluß von Induktoren auf die Aktivität könnte in einer kontinuierlichen Prozeßführung genauer untersucht werden, was besonders im Fall von Induktoren interessant ist, die in einer absatzweisen Prozeßführung durch die Zellen abgebaut werden. Zudem könnte auch die spezifische Aktivität der temperatursensitiven Nitrilhydratase dadurch erhöht werden, daß die Zellen nur über einen kurzen Zeitraum bei der Temperatur der Kultivierung gehalten werden.

Darüberhinaus könnte im Chemostat auch eine Reduzierung der Schaumbildung bei der Kultivierung des Stammes erreicht werden, da erst in der späten exponentiellen Phase des Wachstums verstärkt eine Schaumbildung auftritt.

Über eine Untersuchung zur Verwertung von verschiedenen Kohlenstoffquellen für die Kultivierung und den Einfluß einer Erhöhung der Hefeextraktkonzentration könnten höhere Zelldichten erreicht werden, wie dies in den Untersuchungen zur Kultivierung der Zellen im Bioreaktor bereits festgestellt wurde (s. Abschnitt 3.2.2). Dabei sollte die Kohlenstoffquelle anders als im Fall der Glucose möglichst vollständig über die Prozeßzeit verbraucht werden.

Bei der Kultivierung sollte besonders auf die Unterdrückung der Inhibition der Nitrilhydratase durch eventuelle zellintern gebildete Substanzen und einer Vermeidung der Proteolyse der gewünschten Enzyme geachtet werden. Deshalb sollte auch eine exakte Definition der in dieser Arbeit postulierten inhibierenden Komponente für die Nitrilhydratasereaktion durchgeführt werden.

Die Aktivierung der Amidase mit weiteren Induktoren wie z.B. Eisen und Acetamid sollte ebenfalls in Abhängigkeit vom Wachstum untersucht werden. Da dies der langsamste Schritt für einen Einsatz zur Propionitrilhydrolyse in der technischen Anwendung ist, könnten auch gentechnische Veränderungen des Stammes durch Mutagenese und das Wachstum auf einem Selektivmedium mit dem entsprechendem Amid als C-Quelle in Erwägung gezogen werden. Da eine aliphatische Amidase bereits kloniert vorliegt (s. (Trott 2000)), könnte durch das Einbringen eines entsprechenden Plasmides in die *Rhodococcus*-Zellen die Amidaseproduktion wesentlich erhöht werden. Entsprechende Vektoren für den Transfer zwischen *Escherichia coli* und *Rhodococcus* sind in der Literatur bereits beschrieben worden (Singer & Finnerty 1988).

Die bei der Charakterisierung des Biokatalysators festgestellte Erhöhung der spezifischen Nitrilhydrataseaktivität bei hohen pH-Werten sollte daraufhin untersucht werden, ob diese bei einer Umpufferung der Reaktionslösung bestehen bleibt. Dies könnte zu einer Erhöhung der spezifischen Aktivität der Nitrilhydratase beitragen. Zudem sollte der Einfluß der Belichtung der Zellen auf die Aktivität der Nitrilhydratase eingehender untersucht werden, da dies ebenfalls zu einem Nachweis möglicher inaktivierender Komponenten führen kann. Auch eine Perforation der Zellen und die Unterdrückung von proteolytischen Reaktionen in den ruhenden Zellen könnte dabei zu einer Stabilisierung des Enzymsystems genutzt werden. Eine eingehende Untersuchung der beobachteten Inaktivierung der Nitrilhydratase durch hohe Propionitrilkonzentrationen könnte weitere Hinweise für eine Stabilisierung der Nitrilhydratase während ihres Einsatzes liefern.

Die Auswertung der Daten zur Verwendung der immobilisierten Zellen unter verschiedenen Prozeßführungen muß mit den Vorgaben und Möglichkeiten des Industriepartners abgeglichen werden. Aufgrund dieser Auswertung kann dann der entsprechende Prozeß durch die vorhandenen reaktionskinetischen Modelle und Parametersätze optimal ausgelegt werden.

Der Einfluß der Propionitrilkonzentration im Bulk und die Dauer der Exposition der Zellen gegenüber dieser Konzentration sollten zudem weiter untersucht werden, da dies offensichtlich eine Auswirkung auf die Reaktionsrate der Nitrilhydratase hat.

Eventuell sollten die beiden Reaktionen in getrennten Ansätzen unter den jeweils optimalen Bedingungen durchgeführt werden. Dabei könnte auch eine weitere Verwendung des Immobilisates aus den Ansätzen zur Propionitrilverseifung nach der Inaktivierung der Nitrilhydratase in den Ansätzen zur Propionamidhydrolyse für eine Steigerung der Ausnutzung des Katalysators genutzt werden. Dabei zeigte die Amidase unter den Bedingungen der Nitrilhydrolyse praktisch keine Inaktivierung.

Aufgrund der festgestellten Produktinhibierung sollte zudem eine Immobilisierungsmethode entwickelt werden, bei der eine Akkumulation der Endprodukte Ammonium und Propionat vermieden werden kann. Dabei scheint Acrylamid als Trägermaterial für das Immobilisat besser geeignet zu sein, wobei eine weitere Optimierung dieser Immobilisierungsmethode für einen Einsatz im technischen Prozeß jedoch notwendig ist.

Aufgrund der Beobachtung, daß die festgestellte Inaktivierung der Nitrilhydratase offenbar nicht auf einem proteolytischen Effekt beruht, sollte untersucht werden, ob eine Begasung des Substratmediums mit Stickstoff oder Helium einen angenommenen Oxidationsvorgang im aktiven Zentrum der Nitrilhydratase verringern oder sogar verhindern kann.

Durch das entwickelte kinetische Modell für das untersuchte Zwei-Enzym-System kann nun leicht eine modellgestützte Auslegung möglicher interessierender Reaktorkonzepte für die Propionitrilverseifung durchgeführt werden. Dabei könnte hier auch der ermittelte Einfluß der Immobilisierung auf den Stofftransport und die beobachtete Katalysatorinaktivierung in ein erweitertes Prozeßmodell aufgenommen werden.

6 Zusammenfassung

Die wesentliche Zielsetzung dieser Arbeit bestand in der Bereitstellung der Grundlagen für einen Prozeß zur mikrobiellen Hydrolyse von Propionitril zu Ammoniumpropionat. Das Hauptaugenmerk war dabei auf die Charakterisierung des Stammes *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002 bezüglich seiner Kultivierung und seiner nitrilverseifenden Eigenschaften gerichtet. Um eine Beurteilung des Prozeßverhaltens zu ermöglichen wurden eine analytische Methode zur Bestimmung der entstehenden Substrat- und Produktkonzentrationen entwickelt. Für eine Abschätzung der Eignung unterschiedlicher Reaktorkonzepte für die Propionitrilhydrolyse konzentrierte sich die Arbeit im weiteren auf den Vergleich des Einsatzes des Biokatalysators unter verschiedenen Prozeßführungsstrategien. Durch reaktionskinetische Modellierung des Zwei-Enzym-Systems und durch die anschließende Parameteridentifikation konnte ein funktionaler Zusammenhang der Reaktionsrate von den Konzentrationen der Substrate und Produkte hergestellt werden.

Zu Beginn der Arbeit wurde der verwendete Mikroorganismus auf seine Gattungszugehörigkeit hin untersucht und als Patentstamm bei der DSMZ hinterlegt. Dabei wurde der Stamm als *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002 klassifiziert. Zur Bereitstellung einer geeigneten Menge an homogener Biomasse wurde der Stamm in einem Maßstab von 70 l im Bioreaktor kultiviert. In weiteren Untersuchungen erfolgte eine Optimierung des Wachstumsmediums, wobei eine dreifache Steigerung der spezifischen Aktivität der so erhaltenen Biomasse gegenüber der Kultivierung im Ausgangsmedium erreicht werden konnte.

Die Untersuchung der nitrilverseifenden Eigenschaften ergab, daß in dem untersuchten Stamm ein Zwei-Enzym-System aus einer eisenabhängigen Nitrilhydratase und einer Amidase in den Zellen vorlag. In absatzweisen Umsetzungen mit ruhenden Zellen wurden die beiden Enzyme auf ihre pH- und Temperaturoptima bezüglich der Aktivität des Enzymsystems untersucht. Dabei wurde das pH-Optimum für die Nitrilhydratase bei einem pH-Wert von 9.5 und für die Amidase bei 7.5 bestimmt. Das Temperaturoptimum lag für die Nitrilhydratase bei 26 °C und für die Amidase bei 35 °C, wobei die Enzyme oberhalb der jeweiligen Temperatur schnell inaktivierten.

Es wurde festgestellt, daß die Aktivität der Nitrilhydratase auch von der Belichtung des Ansatzes abhängt, was auf einen zellintern gebildeten Inhibitor zurückgeführt wurde.

Der Einsatz der Zellen zur Verseifung von Propionitril in einem Konzentrationsbereich an und oberhalb der Löslichkeitsgrenze hatte eine schnelle Inaktivierung der freien Zellen zur Folge. Durch Immobilisierung der Zellen konnte deren Toleranz gegenüber Propionitril, das ab einer Konzentration von 1.5 M eine zweite Phase bildet, deutlich verbessert werden und bei einer absatzweisen Prozeßführung Nitrilkonzentrationen bis über 1 M umgesetzt werden. Dabei konnte festgestellt werden, daß die schnelle Inaktivierung besonders der Nitrilhydratase nicht auf einer Proteolyse des Enzymes beruhte, sondern offensichtlich eine Beeinflussung des nativen Zustandes des Enzymes durch das Lösungsmittel Propionitril vorlag.

Der Biokatalysator wurde mit verschiedenen Methoden immobilisiert, wobei der Einschluß in Kalziumalginat als ein geeignetes schonendes Einschlußverfahren identifiziert wurde. Bei der Untersuchung des Einflusses der Immobilisierung auf die spezifische Aktivität wurde eine moderate äußere Stofftransportlimitierung mit einem Effektivitätskoeffizienten von $\eta_{\text{ext}} = 0.7$ bestimmt. Dabei wurde kein Stofftransportwiderstand im Immobilisatpartikel selbst festgestellt.

Der Biokatalysator wurde in absatzweiser Prozeßführung mit konstanter Substratzugabe (Fed-batch), im kontinuierlichen Rührreaktor sowie im Festbett eingesetzt. Dabei konnten im Fed-batch Prozeß Produktkonzentrationen von bis zu 3 M Ammoniumpropionat erhalten werden. Im kontinuierlichen Betrieb konnten Prozeßzeiten von bis zu 16 Tagen für die Nitrilhydratasereaktion im Festbettreaktor und von 54 Tagen für die Amidasereaktion im Rührreaktor demonstriert werden. Die maximale spezifische Produktmenge, die über die Reaktionszeit zu erhalten war, lag für die Nitrilhydratasereaktion im Festbettreaktor bei 2.33 mol/g BTM und für die Amidasereaktion bei 1.8 mol/g BTM im kontinuierlich durchströmten Rührkessel.

Dabei lag die maximale Halbwertszeit der Nitrilhydratase bei 6 °C im Festbettreaktor bei 138 h, wobei für die Amidasereaktion bei 30 °C im Chemostat eine Halbwertszeit von 111 h berechnet wurde. Bei einer Reaktionstemperatur von 6 °C konnte dabei über eine Prozeßzeit von 216 h keine Inaktivierung der Amidase festgestellt werden.

In dieser Arbeit wurde ein Reaktionsmodell für das Zwei-Enzym-System erstellt. Anschließend wurden sämtliche Modellparameter über zwei verschiedene Schätzmethoden, über Anfangsreaktionsraten und mittels dynamischer Simulation in Verbindung mit nichtlinearer Regression, bestimmt. In beiden Fällen konnte eine gute Übereinstimmung der berechneten Konzentrationsverläufe mit den Meßdaten aus einer absatzweisen Prozeßführung festgestellt werden. Die maximalen spezifischen Reaktionsraten der Enzyme lagen bei 14713 U/g BTM für die Nitrilhydratase und 386 U/g BTM für die Amidase. Die Michaelis-Mentenkonstanten bezüglich der Substrate wurden zu $K_M = 16$ mM für die Nitrilhydratase und $K_M = 2.7$ mM für die Amidase bestimmt. Beide Enzyme zeigten mit zunehmender Konzentration sowohl eine Inhibition durch das jeweilige Substrat als auch durch die entstehenden Produkte. Dabei wurde die Nitrilhydratasereaktion besonders durch das Endprodukt Ammoniumpropionat gehemmt.

Eine Anwendbarkeit der reaktionskinetischen Ansätze unter dynamischen Bedingungen wurde anhand eines Fed-batch-Prozesses überprüft und eine gute Übereinstimmung der simulierten Konzentrationsverläufe mit den Meßdaten ermittelt. Mit Hilfe des Reaktionsmodells konnten die Inaktivierungskonstanten für die verzeichneten Aktivitätsverluste der Nitrilhydratase und der Amidase im kontinuierlich betriebenen Rührkessel zu $k = 0.012$ [1/h] für die Nitrilhydratasereaktion und $k = 0.0062$ für die Amidasereaktion ermittelt werden.

7 Literaturverzeichnis

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410
- Ambler, R. P., Auffret, A. D., Clarke, P. H. 1987. The amino acid sequence of the aliphatic amidase from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* 215:285-290
- Asano, Y., Tachibana, M., Tani, Y., Yamada, H. 1982. Purification and characterization of amidase which participates in nitrile degradation. *Agric. Biol. Chem.* 46:1175-1181
- Azza, S., Bigey, F., Arnaud, A., Galzy, P. 1994. Cloning of the wide spectrum amidase gene from *Brevibacterium* sp. R312 by genetic complementation. Overexpression in *Brevibacterium* sp. and *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 122:129-136
- Azza, S., Moreau, J. L., Chebrou, H., Arnaud, A., Galzy, P. 1993. N-terminal amino acid sequence of mutant strain *Brevibacterium* sp. adipamidase. *Antonie Van Leeuwenhoek* 64:35-38
- Baerns, M., Hofmann, H., Renken, A. 1987. *Chemische Reaktionstechnik*. Stuttgart: Thieme Verlag
- Bailey, J. E., Ollis, D. F. 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals*. New-York: McGraw-Hill, Inc.
- Battistel, E., Bernardi, A., P., M. 1997. Enzymatic decontamination of aqueous polymer emulsions containing acrylonitril. *Biotechnol. Lett.* 19:131-134
- Bauer, A., Layh, N., Syldatk, C., Willetts, A. 1996. Polyvinyl alcohol-immobilized whole-cell preparations for the biotransformations of nitriles. *Biotechnol. Lett.* 18:343-348
- Beard, T., Cohen, M. A., Parratt, J. S., Turner, N. J. 1993. Stereoselective hydrolysis of nitriles and amides under mild conditions using a whole cell catalyst. *Tetrahedron: Asymmetry* 4:1085-1104
- Beard, T. M., Page, M. I. 1998. Enantioselective biotransformations using *Rhodococci*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 74:99-106
- Becke, F., Flieg, H., Päßler, P. 1971. Eine allgemeine Methode zur Herstellung von Carbonsäureamiden aus den entsprechenden Nitrilen, II. *Liebigs Ann. Chem.* 749:198-201
- Bernet, N., Arnaud, A., Galzy, P. 1990. Optimization of culture conditions of *Brevibacterium* sp. A4 for the production of nitrile hydratase. *Biocatalysis* 3:259-267
- Bernet, N., Thiery, A., Maestracci, M., Arnaud, A., Rios, G. M., Galzy, P. 1987. Continuous immobilized cell reactor for amide hydrolysis. *J. Industr. Microbiol.* 2:129-136
- Bigey, F., Janbon, G., Arnaud, A., Galzy, P. 1995. Sizing of the *Rhodococcus* sp. R312 genome by pulsed-field gel electrophoresis. Localization of genes involved in nitrile degradation. *Antonie Van Leeuwenhoek* 68:173-179
- Bommarius, A. S., Schwarm, M., Drauz, K. 1998. Biocatalysis to amino acid based pharmaceuticals-examples and perspectives. *J. Mol. Cat. B-Enzymatic* 5:1-11
- Bonnet, D., Artaud, I., Moali, C., Petre, D., Mansuy, D. 1997. Highly efficient control of iron-containing nitrile hydratases by stoichiometric amounts of nitric oxide and light. *FEBS Lett.* 409:216-220
- Böttger, E. C. 1996. Approaches for identification of microorganisms. *ASM News* 62:247-250
- Bradford, M. M. 1976. A rapide and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the priciples of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 75:248-254

- Brennan, B. A., Cummings, J. G., Chase, D. B., Turner, I. M., Jr., Nelson, M. J. 1996. Resonance raman spectroscopy of nitrile hydratase, a novel iron-sulfur enzyme. *Biochem.* 35:10068-10077
- Brennan, M. R., Armitage, Y. C., Mortimer, M. G., Huges, J., Ramsden, D. K. 1995. Amidase active whole cells of *Corynebacterium nitrophilus* for ammonium acrylate production. *Biotechnol. Lett.* 17:513-518
- Buchholz, K., Kasche, V. 1997. *Biokatalysatoren und Enzymtechnologie*. Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft mbH.
- Bui, K., Maestracci, M., Thiery, A., Arnaud, A., Galzy, P. 1984. A note on the enzymatic action and biosynthesis of a nitrile-hydratase from a *Brevibacterium sp.*. *J. Appl. Bacteriol.* 57:183-190
- Bunch, A. W. 1998. Biotransformation of nitriles by *Rhodococci*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 74:89-97
- Chaptwala, K. D., Babu, G. R., Vijaya, O. K., Kumar, K. P., Wolfram, J. H. 1998. Biodegradation of cyanides, cyanates and thiocyanates to ammonia and carbon dioxide by immobilized cells of *Pseudomonas putida*. *J. Industr. Microbiol. Biotechnol.* 20:28-33
- Chebrou, H., Bigey, F., Arnaud, A., Galzy, P. 1996a. Amide metabolism: a putative ABC transporter in *Rhodococcus sp. R312*. *Gene* 182:215-218
- Chebrou, H., Bigey, F., Arnaud, A., Galzy, P. 1996b. Study of the amidase signature group. *Biochim. Biophys. Act.* 1298:285-293
- Ciskanik, L. M., Wilczek, J. M., Fallon, R. D. 1995. Purification and characterisation of an enantioselective amidase from *Pseudomonas chlororaphis* B23. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:998-1003
- Claiborne, A., Yeh, J. I., Mallett, T. C., Luba, J., Crane, E. J., 3rd, et al. 1999. Protein-sulfenic acids: diverse roles for an unlikely player in enzyme catalysis and redox regulation [In Process Citation]. *Biochem.* 38:15407-15416
- Cohen, M. A., Sawden, J., Turner, N. J. 1990. Selective hydrolysis of nitriles under mild conditions by an enzyme. *Tetrahedron Lett.* 31:7223-7226
- Cook, J. L. 1999. Internet Biomolecular Resources. *Anal. Biochem.* 268:165-172
- Cravatt, B. F., Giang, D. K., Mayfield, S. P., Boger, D. L., Lerner, R. A., Gilula, N. B. 1996. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384:83-87
- Crespo, J. P. S. C., Moura, M. J., Carrondo, M. J. T. 1990. Some engineering parameters for propionic acid fermentation coupled with ultrafiltration. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 24/25:613-625
- Daniel, H. J. 1994. Untersuchung von Wachstum und Enzymaktivität der Amidase von *Rhodococcus erythropolis* MP50 im Bioreaktor. *Diplomarbeit*. Universität Stuttgart.
- Dellweg, H. 1987. *Biotechnologie*. Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft mbH.
- DeJongh, J., Nordin-Andersson, M., Ploeger, B. A., Forsby, A. 1999. Estimation of systemic toxicity of acrylamide by integration of in vitro toxicity data with kinetic simulations. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 158:261-268
- Dordick, J. S., Y., K., Sergeeva, M. V. 1998. The evolution of biotransformation technologies. *Current Microbiol.* 1:311-318

- Draughon, F. A., Mobley, D. C., Safley, L. M., Backus, W. R. 1982. Effect of calcium propionat and sodium diacetate on fungi in stillage. *J. Food. Sci.* 44:1018-1019
- Effenberger, F., Graef, B. W., Oßwald, S. 1997. Preparation of (S)-naproxen by enantioselective hydrolysis of racemic naproxen amide with resting cells of *Rhodococcus erythropolis* MP50 in organic solvents. *Tetrahedron: Asymmetry* 8:2749-2755
- Endo, I., Odaka, M., Yohda, M. 1999. An enzyme controlled by light: the molecular mechanism of photoreactivity in nitrile hydratase. *TIBTECH* 17:244-248
- Endo, T., Watanabe, I. 1989. Nitrile hydratase of *Rhodococcus sp. N-774*. Purification and amino acid sequences. *FEBS Lett.* 243:61-64
- Ettinger, R. A., DeLuca, H. F. 1995. The vitamid D₃ hydroxylase-associated protein is a propionamide-metabolizing amidase enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 316:14-19
- Farnaud, S., Tata, R., Sohi, M. K., Wan, T., Brown, P. R., Sutton, B. J. 1999. Evidence that cysteine-166 is the active site nucleophile of *Pseudomonas aeruginosa* amidase: crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the enzyme. *J. Biochem.* 340:711-714
- Fawcett, J. K., Scott, J. E. 1960. A rapid and precise method for the determination of urea. *J. Clin. Path.* 13:156-159
- Fennell, T. R., MacNeela, J. P., Turner, M. J., Swenberg, J. A. 1991. *Hemoglobin adduct formation by acrylonitrile in rats and mice* Oxford: Oxford Universal Press.
- Firmin, J. L., Gray, D. O. 1976. The biochemical pathway for the breakdown of methyl cyanide (Acetonitrile) in bacteria. *J. Biochem.* 158:223-229
- Fournand, D., Bigey, F., Arnaud, A. 1998. Acyl transfer activity of an amidase from *Rhodococcus sp. strain R312*: formation of a wide range of hydroxamic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2844-2852
- Fradet, H., Arnaud, A., Rios, G., Galzy, P. 1985. Hydratation of nitriles using a bacterial nitrile-hydratase immobilized on DEAE-Cellulose. *Biotech. Bioeng.* 27:1581-1585
- Fukui, S., Tanaka, A. 1984. Application of biocatalysts immobilized by prepolymer methods. *Adv. Ecol. Eng.* 29:1-33
- Gabriel, J., Vekova, J., Vosahlo, J. 1996. High-performance liquid chromatographic study of the aromatic nitrile metabolism in soil bacteria. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 681:191-195
- Gargas, M. L., Andersen, M. E., Teo, S. K. O., Batra, R., Fennell, T. R., Kedderis, G. L. 1995. A physiologically based dosimetry description of acrylonitrile and cyanoethylene oxide in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 134:185-194
- Gilson, C. D., Thomas, A., Hawkes, F. R. 1990. Gelling mechanism of alginate beads with and without immobilised yeast. *Process Biochem. Int.*:104-108
- Goodfellow, M. 1986. *Genus Rhodococcus* Vol. 2. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Goodfellow, M., Alderson, G., Chun, J. 1998. Rhodococcal systematics: problems and developements. *Antonie van Leeuwenhoek* 74:3-20
- Green, K. D., Gill, I. S., Khan, J. A., Vulfson, E. N. 1996. Microencapsulation of yeast cells and their use as a biocatalyst in organic solvents. *Biotech. Bioeng.* 49:535-543

- Hann, E. C., Eisenberg, A., Fager, S. K., Perkins, N. E., Gallagher, F. G., et al. 1999. 5-Cyanovaleramide production using immobilized *Pseudomonas chlororaphis* B23. *Bioorg. Med. Chem.* 7:2239-2245
- Hashimoto, Y., Nishiyama, M., Horinouchi, S., Beppu, T. 1994. Nitrile hydratase gene from *Rhodococcus* sp. N-774 requirement for its downstream region for efficient expression. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58:1859-1865
- Henzler, H.-J. 1982. Verfahrenstechnische Auslegungsunterlagen für Rührbehälter als Fermenter. *Chem.-Ing.-Techn.* 54(5):461-476.
- Hjort, C. M., Godtfredsen, S.E., Emborg, C. 1990. Isolation and characterization of a nitrile-hydratase from a *Rhodococcus* sp. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 48:217-228
- Hoagland, R. E., Zablutowicz, R. M. 1995. *Rhizobacteria* with exceptionally high aryl scylamidase activity. *Pesticide Biochem. Physiol.* 52:190-200
- Hollergschwandner, C. 1999. Untersuchungen zur Reinigung und Charakterisierung einer Nitrilhydratase aus *Rhodococcus erythropolis* LU8297. Diplomarbeit. Universität Stuttgart.
- Huang, W., Jia, J., Cummings, J., Nelson, M., Schneider, G., Lindqvist, Y. 1997. Crystal structure of nitrile hydratase reveals a novel iron centre in a novel fold. *Structure* 5:691-699
- Hughes, J., Armitage, Y. C., Symes, K. C. 1998. Application of whole cell rhodococcal biocatalysts in acrylic polymer manufacture. *Antonie Van Leeuwenhoek* 74:107-118
- Huitson, J. J. 1968. Cereals preservation with propionic acid. *Process Biochem.* 31-32
- Hwang, J. S., Chang, H. N. 1989. Biotransformation of Acrylonitrile to Acrylamide using immobilized whole cells of *Brevibacterium CH1* in a recycle fed-batch reactor. *Biotech. Bioeng.* 34:380-386
- Indlekofer, M. 1996. *Modellgestützte Entwicklung kontinuierlicher Prozesse zur lipasekatalysierten Racematspaltung in organischen Lösungsmitteln* Vol. 436. Düsseldorf: VDI-Verlag. pp. 139-141
- Jack, T. R., Zajic, J. E. 1977. The immobilization of whole cells. *Adv. Biochem. Eng.* 5:126-145
- Jallageas, J.-C., Arnaud, A., Galzy, P. 1980. Bioconversions of nitriles and their applications. *Adv. Biochem. Eng.* 14:1-32
- Takeya, H., Sakai, N., Sugai, T., Hiromichi, O. 1991. Microbial hydrolysis as a potent method for the preparation of optically active nitriles, amides and carboxylic acids. *Tetrahedron Letters* 32:1343-1346
- Katchalski-Katzir, E. 1993. Immobilized enzymes-learning from past successes and failures. *Trends Biotechnol* 11:471-478
- Kawase, Y., Mooyoung, M. 1987. Solid turbulent fluid heat and mass-transfer - a unified model on the energy dissipation rate concept. *Cem. Eng. Biochem. Eng. J.* 36:31-40.
- Kelly, M., Kornberg, H. L. 1962. Amidase from *Pseudomonas aeruginosa*: a multiheaded enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 64:190-191
- Kelly, M., Kornberg, H. L. 1964. Purification and properties of acyltransferase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. J.* 93:557-566
- Kobayashi, M., Fujiwara, Y., Goda, M., Komeda, H., Shimizu, S. 1997. Identification of active sites in amidase: evolutionary relationship between amide bond- and peptide bond-cleaving enzymes. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A* 94:11986-11991

- Kobayashi, M., Goda, M., Shimizu, S. 1998a. The catalytic mechanism of amidase also involves nitrile hydrolysis [published erratum appears in FEBS Lett 1999 Feb 12;444(2-3):296]. *FEBS Lett.* 439:325-328
- Kobayashi, M., Goda, M., Shimizu, S. 1998b. Nitrilase catalyzes amide hydrolysis as well as nitrile hydrolysis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 253:662-666
- Kobayashi, M., Komeda, H., Nagasawa, T., Nishiyama, M., Horinouchi, S., et al. 1993a. Amidase coupled with low-molecular-mass nitrile hydratase from *Rhodococcus rhodochrous J1*. Sequencing and expression of the gene and purification and characterization of the gene product. *Eur. J. Biochem.* 217:327-336
- Kobayashi, M., Komeda, H., Nagasawa, T., Yamada, H., Shimizu, S. 1993b. Occurrence of amidases in the industrial microbe *Rhodococcus rhodochrous J1*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57:1949-1950
- Kobayashi, M., Nagasawa, T., Yamada, H. 1989. Nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous J1*. Purification and characterization. *Eur. J. Biochem.* 182:349-356
- Kobayashi, M., Nagasawa, T., Yamada, H. 1992. Enzymatic synthesis of acrylamide: a success story not yet over. *TIBTECH* 10:402-408
- Kobayashi, M., Shimizu, S. 1994. Versatile nitrilases: nitrile-hydrolysing enzymes. *FEMS Microbiol. Lett.* 120:217-224
- Kobayashi, M., Shimizu, S. 1998. Metalloenzyme nitrile hydratase: structure, regulation, and application to biotechnology. *Nat. Biotechnol.* 16:733-736
- Komeda, H., Kobayashi, M., Shimizu, S. 1996. A novel gene cluster including the *Rhodococcus rhodochrous J1* nhlBA genes encoding a low molecular mass nitrile hydratase (L-NHase) induced by its reaction product. *J. Biol. Chem.* 271:15796-157802
- Kopf, M. A., Bonnet, D., Artaud, I., Petre, D., Mansuy, D. 1996. Key role of alkanolic acids on the spectral properties, activity, and active-site stability of iron-containing nitrile hydratase from *Brevibacterium R312*. *Eur. J. Biochem.* 240:239-244
- Kuwahara, M., Yanase, H., Ishida, Y., Kikuchi, Y. 1980. Metabolism of aliphatic nitriles in *Fusarium solani*. *J. Ferment. Technol.* 58:573-577
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lane, D. J. 1991. *16S/23S rRNA sequencing* Chichester: John Wiley & Sons. pp. 115-175.
- Layh, N. 1994. Untersuchung nitrilhydrolysierender Enzymsysteme - Gezielte Anreicherung abbauaktiver Bakterien, sowie Einsatz von Ruhezellen oder gereinigtem Enzym für Biotransformationen. Dissertation. pp. 32 - 33. Universität Stuttgart.
- Layh, N., Hirrlinger, B., Stolz, A., Knackmuss, H. J. 1997. Enrichment strategies for nitrile-hydrolysing bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47:668-674
- Layh, N., Willets, A. 1997. pers. comm.
- Legras, J. L., Chunzel, G., Arnaud, A., Galzy, P. 1990. Natural nitriles and their metabolism. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 6:83-108
- Lewis, V. P., Yang, S. T. 1992. Propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici*: Effects of growth substrate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 8:104-110

- Liese, A., Filho, M. V. 1999. Production of fine chemicals using biocatalysis. *Current. Biotechnol.* 10:595-603
- Linton, E. A., Knowles, C. J. 1986. Utilization of aliphatic amides and nitriles by *Nocardia rhodochrous* LL100-21. *J. Gen. Microbiol.* 132:1493-1501
- Lowe, H., Rice, P. M., Dew, R. E. 1989. Nucleotide sequence of the aliphatic amidase regulatur gene (*amiR*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Letters* 246:39-43
- Lueck, E. 1980. Propionic acid. In: Antimicrobial food additives. New York: Springer. pp. 175-182.
- Maestracci, M., Thiery, A., Bui, K. Arnaud, A., Galzy, P. 1984. Activity and regulation of an amidase (acrylamide amidhydrolase, EC 3.5.1.4) with a wide substrate spectrum from a *Brevibacterium* sp.. *Arch. Microbiol.* 138:315-320
- Mayaux, J. F., Cerebelaud, E., Soubrier, F., Yeh, P., Blanche, F., Petre, D. 1991. Purification, cloning, and primary structure of a new enantiomer- selective amidase from a *Rhodococcus* strain: structural evidence for a conserved genetic coupling with nitrile hydratase. *J. Bacteriol.* 173:6694-6704
- Mayaux, J. F., Cerebelaud, E., Soubrier, F., Faucher, D., Petre, D. 1990. Purification, cloning, and primary structure of an enantiomer-selective amidase from *Brevibacterium* sp. strain R312: structural evidence for genetic coupling with nitrile hydratase. *J. Bacteriol.* 172:6764-6773
- Mayer, B., Hemmens, B. 1997. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *TIBS* 22:477-481
- Miller, J. M., Knowles, C. J. 1984. The cellular location of nitrilase and amidase enzymes of *Brevibacterium* R312. *FEMS Microbiol. Lett.* 21:147-151
- Mizunashi, W., Nishiyama, M., Horinouchi, S., Beppu, T. 1998. Overexpression of high-molecular-mass nitrile hydratase from *Rhodococcus rhodochrous* J1 in recombinant Rhodococcus cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49:568-572
- Moreau, J. L., Azza, S., Arnaud, A., Galzy, P. 1993. Purification and characterisation of an Adipamidase from a Mutant Strain of *Brevibacterium* sp. Involved in Dinitrile Degradation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57:294-296
- Moreau, J. L., Azza, S., Bigey, F., Arnaud, A., Galzy, P. 1994. Application of high-performance liquid chromatography to the study of the biological transformation of adiponitrile. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* 656:197-202
- Muschelknauz, E. 1991. Untersuchungen von Beanspruchungsmechanismen für den Zellaufschluß. Universität Stuttgart.
- Nagamune, T., Kurata, H., Hirata, M., Honda, J., Koike, H., et al. 1990. Purification of inactivated photoresponsive nitrile hydratase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168:437-442
- Nagasawa, T., Kobayashi, M., Yamada, H. 1988a. Optimum culture conditions for the production of benzonitrilase by *Rhodococcus rhodochrous* J1. *Arch. Microbiol.* 150:89-94
- Nagasawa, T., Nakamura, T., Yamada, H. 1990. ϵ -Caprolactam, a new powerful inducer for the formation of *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitrilase. *Arch. Microbiol.* 155:13-17
- Nagasawa, T., Nanba, H., Ryuno, K., Takeuchi, K., Yamada, H. 1987. Nitrile hydratase of *Pseudomonas chlororaphis* B23. Purification and characterization. *Eur. J. Biochem.* 162:691-698

- Nagasawa, T., Ryuno, K., Yamada, H. 1986. Nitrile hydratase of *Brevibacterium R312*--purification and characterization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139:1305-1312
- Nagasawa, T., Shimizu, H., Yamada, H. 1993. Superiority of the third generation catalyst, *Rhodococcus rhodochrous J1* nitrile hydratase for industrial production of acrylamid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40:189-195
- Nagasawa, T., Takeuchi, K., Yamada, H. 1988b. Occurrence of a cobalt-induced and cobalt-containing nitrile hydratase in *Rhodococcus rhodochrous J1*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155:1008-1016
- Nagasawa, T., Takeuchi, K., Yamada, H. 1991. Characterization of a new cobalt-containing nitrile hydratase purified from urea-induced cells of *Rhodococcus rhodochrous J1*. *Eur. J. Biochem.* 196:581-589
- Nagashima, S., Nakasako, M., Dohmae, N., Tsujimura, M., Takio, K., et al. 1998. Novel non-heme iron center of nitrile hydratase with a claw setting of oxygen atoms. *Nat. Struct. Biol.* 5:347-351
- Nakajima, Y., Doi, T., Satho, Y., Fujiwara, A., Watanabe, I. 1987. Photoactivation of nitrile hydratase in *Corynebacterium sp. N-774*. *Chem. Lett.*:1767-1770
- Nakasako, M., Odaka, M., Yohda, M., Dohmae, N., Takio, K., et al. 1999. Tertiary and quaternary structures of photoreactive Fe-type nitrile hydratase from *Rhodococcus sp. N-771*: roles of hydration water molecules in stabilizing the structures and the structural origin of the substrate specificity of the enzyme. *Biochem.* 38:9887-9898
- Naoshima, Y., Munakata, Y., Nishiyama, T., Maeda, J., Kamezawa, M., et al. 1991. Asymmetric bioreduction of keto esters by immobilized baker's yeast entrapped in calcium alginate beads in both water and organic/water solvent systems. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 7:219-224
- Nawaz, M. S., Chaptwala, K. D., Wolfram, J. H. 1989. Degradation of acetonitril by *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2267-2274
- Nawaz, M. S., Davis, J. W., Wolfram, J. H., Chapatwala, K. D. 1991. Degradation of organic cyanides by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 28-29:865-875
- Nishiyama, M., Horinouchi, S., Kobayashi, M., Nagasawa, T., Yamada, H., Beppu, T. 1991. Cloning and characterization of genes responsible for metabolism of nitrile compounds from *Pseudomonas chlororaphis B23*. *J. Bacteriol.* 173:2465-2472
- Nitto, C. I. C. 1983. Process for producing acrylamide/or methacrylamid from the nitriles utilizing microorganisms at low temperature. UK: Nitto Chemical Industry Co
- Noguchi, T., Hoshino, M., Tsujimura, M., Odaka, M., Inoue, Y., Endo, I. 1996. Resonance Raman evidence that photodissociation of nitric oxide from the non-heme iron center activates nitrile hydratase from *Rhodococcus sp. N-771*. *Biochem.* 35:16777-16781
- Novo, C., Tata, R., Clemente, A., Brown, P. R. 1995. *Pseudomonas aeruginosa* aliphatic amidase is related to the nitrilase/cyanide hydratase enzyme family and Cys166 is predicted to be the active site nucleophile of the catalytic mechanism. *FEBS Lett.* 367:275-279
- Odaka, M., Fujii, K., Hoshino, M., Noguchi, T., Tsujimura, M., et al. 1997. Activity regulation of photoreactive nitrile hydratase by nitric oxide. *J. Am. Chem. Soc.* 119:3785-3791
- Ogawa, J., Shimizu, S. 1999. Microbial enzymes: new industrial applications from traditional screening methods. *TIBTECH* 17:13-21

- Ospiran, I., Jarret, C., Strauss, U., Kroutil, W., Orru, R. V. A., et al. 1999. Large-scale preparation of a nitrile-hydrolysing biocatalyst *Rhodococcus R312*. *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic* 6:555-560
- Patricelli, M. P., Lovato, M. A., Cravatt, B. F. 1999. Chemical and mutagenic investigations of fatty acid amide hydrolase: evidence for a family of serine hydrolases with distinct catalytic properties. *Biochem.* 38:9804-9812
- Pearson, W. R. 1990. Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol.* 183:63-98
- Playne, M. J. 1985. *Propionic and butyric acid* Vol. 3. New York: Pergamon. pp. 731-759.
- Pommersheim, R., Schreimeir, J., Vogt, W. 1994. Immobilization of enzymes by multilayer microcapsuls. *Macromol. Chem. Phys.* 195:1557-1567
- Preuss, G., Willme, B., Grass, U., Nolte, J., Zullei-Seibert, N. 1996. Untersuchungen an Modellökosystemen zum Verhalten von Bromoxynil bei der Grundwasseranreicherung. *Vom Wasser* 86:407-420
- Prüße, U., Fox, B., Kirchhoff, M., Bruske, F., Breford, J., Vorlop, K.-D. 1998. New process (Jet Cutting Method) for the production of spherical beads from highly viscous polymer solutions. *Chem. Eng. Technol.* 21:29-33
- Rainey, F. A., Burghardt, J., Kroppenstedt, R. M., Klatte, S., Stackebrandt, E. 1995. Phylogenetic analysis of the genera *Rhodococcus* and *Nocardia* and evidence for the evolutionary origin of the genus *Nocardia* from within the radiation of *Rhodococcus* species. *Microbiol.* 141:523-528
- Raymond, J. R., Prvan, T. 1996. A simulation study on designing experiments to measure the K_M of Michaelis-Menten kinetics curves. *J. Theor. Biol.* 178:239-254
- Reichardt, C. 1994. Solvatochromic Dyes. *Chem. Rev.* 94:2335-2342
- Reichardt, C. 1997. Lösungsmittelpolarität - Was ist das? *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 45:759-763
- Reppe, W. 1956. IV. Welterdölkongreß Rom. *Angew. Chem.* 68:44-46
- Ress-Löschke, M. 1996. Pers. Komm..
- Ruttloff, H. 1994. *Industriell bedeutsame Enzympräparate tierischer und pflanzlicher Herkunft* Hamburg: Behr's Verlag. pp.183-192.
- Ryuno, K., Nagasawa, T., Yamada, H. 1988. Isolation of advantageous mutants of *Pseudomonas chlororaphis* B23 for the enzymatic production of acrylamid. *Biol. Chem.* 52:1813-1816
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467
- Santoyo, A. B., Teruel, M. L. A. 1996. Immobilization of *Pseudomonas sp.* BA2 by entrapment in calcium alginate and its application for the production of L-alanin. *Enzyme Microbiol. Technol.* 19:176-180
- Sari, M. A., Moali, C., Boucher, J. L., Jaouen, M., Mansuy, D. 1998. Detection of a nitric oxide synthase possibly involved in the regulation of the *Rhodococcus sp R312* nitrile hydratase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250:364-368
- Scarrow, R. C., Brennan, B. A., Cummings, J. G., Jin, H., Duong, D. J., et al. 1996. X-ray spectroscopy of nitrile hydratase at pH 7 and 9. *Biochem.* 35:10078-10088
- Schütte, H. 1986. Aufschluß von Mikroorganismen mit der Schwingarmmühle MM2. In *Analytika Forum*. München.

- Schütte, H., Kula, M.-R. 1986. Einsatz von Rührwerkskugelmühlen und Hochdruckhomogenisatoren für den technischen Zellaufschluß. *BTF Biotechforum*. 3:68-79.
- Shimizu, S. 1997. Screening of novel microbial enzymes: 3 Nitrile Hydratase and Nitrilases. In *New enzymes for organic synthesis: screening, supply and engineering*, ed. F. H. Arnold. pp. 56-87. Berlin ; Heidelberg: Springer
- Siemann, M., Müller-Hurtig, R., Wagner, F. 1990. *Characterization of the rotating nozzle-ring technique for the production of small spherical biocatalysts* Amsterdam: Elsevier Science. pp. 275-282.
- Singer, M. E., Finnerty, W. R. 1988. Construction of an *Escherichia coli*-*Rhodococcus* shuttle vector and plasmid transformation in *Rhodococcus* sp.. *J. Bacteriol.* 170:638-645
- Soubrier, F., Levi-Schil, S., Mayaux, J.-F., Petre, D., Arnaud, A., Cronzet, J. 1992. Cloning and primary structure of the wide-spectrum amidase from *Brevibacterium* sp. R312: high homology to the amiE product from *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 116:99-104
- Spicher, G. 1993. *Getreide, Getreideerzeugnisse, Backwaren* Paderborn: Behr's Verlag. pp. 419-428.
- Stackebrandt, E. 1998. *The enormous diversity and biotechnological potential of naturally occurring bacteria* Vol. Studies in Organic Chemistry. Amsterdam: Elsevier. pp. 37-46.
- States, D. J., Agarwal, P. 1996. Compact encoding strategies for DNA sequence similarity search. *Ismb*. 4:211-217
- Stouthamer, A. H. 1979. *The search for correlation between theoretical and experimental growth yields* Vol. 21. Baltimore: University Park Press. pp. 1-47.
- Sugiura, Y., Kuwahara, J., Nagasawa, T., Yamada, H. 1987. Nitrile hydratase: the first non-heme iron enzyme with a typical low-spin Fe(III)-active center. *J. Chem. Soc. USA* 109:5848-5850
- Takaichi, S., Ishidsu, J.-i., Seki, T., Fukada, S. 1990. Carotenoid pigments from *Rhodococcus rhodochromus* RNMS1: two monocyclic carotenoids, a carotenoid monoglycoside and carotenoid glycoside monoesters. *Agric. Biol. Chem.* 54:1931-1937
- Theil, F. 1997. *Enzyme in der organischen Synthese* Heidelberg, Berlin, Oxford: Spectrum Akad Verlag
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniac, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nuc. Ac. Res.* 24:4876-4882
- Thompson, L. A., Knowles, C. J., Linton, E. A., Wyatt, J. M. 1988. Microbial biotransformations of nitriles. *Chem. Britain*:900-902
- Tourneix, D., Thiery, A., Maestracci, M., Arnaud, A., Galzy, P. 1986. Regulation of nitrile-hydratase synthesis in a *Brevibacterium* sp. *Antonie Van Leeuwenhoek* 52:173-82
- Trost, E.-M. 2000. Nitrilase und Nitrilhydratase in einem thermophilen *Bacillus* Stamm. Diplomarbeit. Universität Stuttgart.
- Trott, S. 2000. Genetik und biochemische Aspekte der enantioselektiven Amidasen aus *Rhodococcus erythropolis* und *Agrobacterium tumefaciens* D3. Dissertation. Universität Stuttgart
- Tsujimura, M., Dohmae, N., Odaka, M., Chijimatsu, M., Takio, K., et al. 1997. Structure of the photoreactive iron center of the nitrile hydratase from *Rhodococcus* sp. N-771. Evidence of a novel post-translational modification in the cysteine ligand. *J. Biol. Chem.* 272:29454-29459

- Tsujimura, M., Odaka, M., Nagashima, S., Yohda, M., Endo, I. 1996. Photoreactive nitrile hydratase: the photoreaction site is located on the alpha subunit. *J. Biochem. (Tokyo)* 119:407-413
- Vekova, J., Pavlu, L., Vosahlo, J., Gabriel, J. 1995. Degradation of Bromoxynil by resting and immobilized cells of *Agrobacterium radiobacter* 8/4 Strain. *Biotech. Lett.* 17:449-452
- Volesky, B., Holan, Z. R. 1995. Biosorption of heavy metals. *Biotechnol. Prog.* 11:235-250
- Watanabe, I., Satoh, Y., Enomoto, K., Seki, S., Sakashita, K. 1987. Optimal conditions for cultivating of *Rhodococcus sp. N-774* and for conversion of acrylonitrile to acrylamid by resting cells. *Agric. Biol. Chem.* 51:3201-3206
- Wieser, M., Takeuchi, K., Wada, Y., Yamada, H., Nagasawa, T. 1998. Low-molecular-mass nitrile hydratase from *Rhodococcus rhodochrous J1*: purification, substrate specificity and comparison with the analogous high-molecular-mass enzyme. *FEMS Microbiol. Lett.* 169:17-22
- Wijffels, R. H., Buitelaar, R. M., Bucke, C., Poulsen, P. B., Lilly, M. D., et al. 1996. *Guidelines for the characterization of immobilized cells* Amsterdam: Elsevier Science B.V. pp. 831-834.
- Wu, Z. G., Shi, Z. Q., Lu, Z. N., Yang, H., Shi, F. Y., et al. 1989. In vitro culture and transplantation of encapsulated human fetal islets as an artificial endocrine pancreas. *ASAIO Trans* 35:736-8
- Wyatt, J. M., Linton, E. A. 1988. The industrial potential of microbial nitrile biochemistry. In *Ciba Geigy Symposium*, ed. J. W. Sons. pp. 32-39. Vol. 140
- Yamada, H., Asano, Y., Hino, T., Tani, Y. 1979. Microbial utilization of acrylonitrile. *J. Ferment. Technol.* 57:8-14
- Yamada, H., Kobayashi, M. 1996. Nitrile hydratase and its application to industrial production of acrylamid. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60:1391-1400
- Yamada, H., Ryuno, K., Nagasawa, T., Enomoto, K., Watanabe, I. 1986. Optimum culture conditions for production by *Pseudomonas chlororaphis B23* of nitrile hydratase. *Agr. Biol. Chem.* 50:2859-2865
- Yanenko, A. S., Astaurova, O. B., Gerasimova, T. V., Polyakova, I. N., Pogorelova, T. E., Paukov, V. N. 1994. The biology of the actinomycetes 1994. In *Proceedings of the ninth international Symposium on the Biology of the Actionomycetes*, ed. V. G. Debabov, Y. V. Dudnik, V. N. Danilenko. pp. 139-144. Moskau.
- Yang, S.-T., Zuhu, H., Li, Y. 1993. Continuous propionat production from whey permeate using a novel fibrous bed reactor. *Biotech. Bioeng.* 43:1124-1130
- Zambryski, P., Tempe, J., Schell, J. 1989. Transfer and function of T-DNA genes from agrobacterium Ti and Ri plasmids in plants. *Cell* 56:193-201

8 Anhang

8.1 Basenabfolge der 16S rDNA von *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002.

Darstellung der Basenabfolge der in Abschnitt 3.1 beschriebenen 16S rDNA des Stammes *Rhodococcus erythropolis* DSM 13002. Die folgende Komplettssequenz wurde für die Stammbestimmung eingesetzt.

Basenabfolge

1.....10	11.....20	21.....30	31.....40	41.....50	
TTAACACATG	CAAGTTCGAG	CGGTAAGGCC	TTTCGGGGTA	CACGAGCGGC	1-50
GAACGGGTGA	GTAACACGTG	GGTGATCTGC	CCTGCACTTC	GGGATAAGCC	51-100
TGGGAAACTG	GGTCTAATAC	CGGATATGAC	CTCAGGTTGC	ATGACTTGGG	101-150
GTGGAAAGAT	TTATCGGTGC	AGGATGGGCC	CGCGGCCTAT	CAGCTTGTTG	151-200
GTGGGGTAAT	GGCCTACCAA	GGCGACGAC	GGGTAGCCGA	CCTGAGAGGG	201-250
TGACCGGCCA	CACTGGGACT	GAGACACGGC	CCAGACTCCT	ACGGGAGGCA	251-300
GCAGTGGGGA	ATATTGCACA	ATGGGCGAAA	GCCTGATGCA	GCGACGCCGC	301-350
GTGAGGGATG	ACGGCCTTCG	GGTTGTAAAC	CTCTTTCAGC	AGGGACGAAG	351-400
CGCAAGTGAC	GGTACCTGCA	GAAGAAGCAC	CGGCTAACTA	CGTGCCAGCA	401-450
GCCGCGGTAA	TACGTAGGGT	GCAAGCGTTG	TCCGGAATTA	CTGGGCGTAA	451-500
AGAGTTCGTA	GGCGGTTTGT	CGCGTCGTTT	GTGAAAACCA	GCAGCTCAAC	501-550
TGCTGGCTTG	CAGGCGATAC	GGGCAGACTT	GAGTACTGCA	GGGGAGACTG	551-600
GAATTCTTGG	TGTAGCGNTG	AAATGCGCAG	ATATCAGGAG	GAACACCGGT	601-650
GGCGAAGGCG	GGTCTCTGGG	CACTAACTGA	CGCTGAGGAA	CGAAAGCGTG	651-700
GGTAGCGAAC	AGGATTAGAT	ACCCTGGTAG	TCCACGCCGT	AAACGGTGGG	701-750
CGCTAGGTGT	GGGTTCCCTC	CACGGAATCC	GTGCCGTAGC	TAACGCATTA	751-800
AGCGCCCCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCGAG	GCTAAAACCTC	AAAGGAATTG	801-850
ACGGGGGCCC	GCACAAGCGG	CGGAGCATGT	GGATTAATTC	GATGCAACGC	851-900
GAAGAACCTT	ACCTGGGTTT	GACATATACC	GGAAAGCTGC	AGAGATGTGG	901-950
CCCCCCTTGT	GGTCGGTATA	CAGGTGGTGC	ATGGCTGTCTG	TCAGCTCGTG	951-1000
TCTTGAGATG	TTGGGTTAAG	TCCCGCAACG	AGCGCAACCC	CTATCTTATG	1001-1050
TTGCCAGCAC	GTTATGGTGG	GGACTCGTAA	GAGACTGCCG	GGGTCAACTC	1051-1100
GGAGGAAGGT	GGGGACGACG	TCAAGTCATC	ATGCCCCTTA	TGTCCAGGGC	1101-1150
TTCACACATG	CTACAATGGC	CAGTACAGAG	GGCTGCGAGA	CCGTGAGGTG	1151-1200
GAGCGAATCC	CTTAAAGCTG	GTCTCAGTTC	GGATCGGGGT	CTGCAACTCG	1201-1250
ACCCCGTGAA	GTCGGAGTCG	CTAGTAATCG	CAGATCAGCA	ACGCTGCGGT	1251-1300
GAATACGTTC	CCGGGCCTTG	TACACACCGC	CCGTACGTC	ATGAAAGTCG	1301-1350
GTAACACCCG	AAGCCGGTGG	CTTAACCCCT	TGTGGGAGGG	AGCCGTCGAA	1351-1400
GGTGGGATCG	GCGATTGGGA	CGAAGTCGTA	ACAAGGTAGC	CGTACCGGAA	1401-1450
GGTGCGGTTG	GATCACCTCC	TT			1451-1472

8.2 Abkürzungen

Die folgenden Abkürzungen sind allgemein gültig. Spezielle Abkürzungen in Formeln und Gleichungen werden gesondert an den entsprechenden Stellen erklärt.

Abkürzung	
°C	Grad Celsius
μ	spezifische Wachstumsrate
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
μm	Mikrometer
Å	Angström
ad.	aufgefüllt auf...
APS	Ammoniumpersulfat
atü	Atmosphärenüberdruck
BFM	Biofeuchtmasse
bid	bidestilliert
bp	Basenpaare
BTM	Biotrockenmasse
bzw.	beziehungsweise
ca.	cirka
cm	Zentimeter
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
DEAE	Di-ethyl-aminoethyl-
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoynucleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
E. C.	Enzyme Commission
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ee-Wert	Enantiomerenüberschuß
E_{T}	Energy of Transition
et al.	und andere
E_{T}^{N}	Normierter E_{T} -Wert
g	Gramm
h	Stunde
h^{-1}	Pro Stunde
H_2O	Wasser
HPLC	Hochdruckflüssig Chromatographie
Inc.	Incorporated
kb	Kilobasenpaare
K_{i} [mM]	Inhibitionskonstante

K_M [mM]	Michaelis-Mentenkonstante
l	Liter
LB	Luria-Bretani
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
mol	Mol
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NI	Normliter
Nm	Newtonmeter
NO	Stickstoffmonoxid
N-Quelle	Stickstoffquelle
OD	optische Dichte
PCR	Polymerasechainreaction
PDB	Protein data base
pmol	Picomol
pO_2	Sauerstoffpartialdruck
r^*	Spezifische Reaktionsrate
RNA	Ribonucleinic acid
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
s.	siehe
SDS	Sodiumdodecyl
sec	Sekunde
SL	Spurenelementlösung
sp.	Species
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TEAE	Triethylamin
U	Unit
UF	Umrechnungsfaktor
Upm [1/min]	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Gesamtvolumen
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
w/v	Gewicht pro Gesamtvolumen
w/w	Gewicht pro Gesamtgewicht
Y_{CO_2}	Molenbruch Kohlendioxid
Y_{O_2}	Molenbruch Sauerstoff
