

Mikrobielle Herstellung von *cis*-Dihydrodihydroxybenzoaten als Bausteine für die chemische Synthese

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

Vorgelegt von
Edina Payer
aus Budapest

Hauptberichter: Prof. Dr. H.-J. Knackmuss
Mitberichter: PD Dr. Hiltrud Lenke
Tag der mündlicher Prüfung: 23.07.2002

Fraunhofer Institut für Grenzflächen und Bioverfahrenstechnik
2002

Ich erkläre hiermit, dass ich die Dissertation, abgesehen von den ausdrücklich bezeichneten Hilfsmitteln und den Ratschlägen der namentlich aufgeführten Personen, selbstständig verfasst habe.

Stuttgart, den 29.05.2002



Peter Ellen

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	5
1 Summary	6
2 Einleitung	8
2.1 Einsatz von Biokatalysatoren	8
2.2 Technische Herstellung von Phenol	9
2.3 Mikrobieller Abbau von Aromaten: Möglichkeit der Nutzung von Oxygenasen für Hydroxylierungsreaktionen	11
2.4 Biotechnische Herstellung von Phenol	16
2.5 Zielsetzung	21
3 Material und Methoden	22
3.1 Bakterienstämme	22
3.2 Nährmedien	23
3.2.1 Mineralmedium	23
3.2.2 Komplexmedium	24
3.3 Stammerhaltung	24
3.4 Benzoate	25
3.5 Zellanzuchten	25
3.6 Bioreaktoren	26
3.7 Messung des Bakterienwachstums	27
3.8 Proteinbestimmung nach Biuret	27
3.9 Trockengewichtbestimmung	28
3.10 Bestimmung von D-Glucose und D-Fructose	29
3.11 Hochdruckflüssigkeitschromatographie	31
3.12 Einengen von Kulturmedien	34
3.13 Extraktion mit Ethylacetat	34
3.14 Ionenpaarextraktion	35
3.15 Adsorption an Amberlite-Produkte	36
3.16 Adsorption an Anionenaustauscher	36
3.17 Adsorption an Cyclodextrine-Polymer TH 106 BA	38
3.18 Chemikalien	38
4 Experimente und Ergebnisse	39
4.1 Untersuchung zur Herstellung von Dihydrodihydroxybenzoat (DHB) im Hinblick auf die technische Phenolherstellung	39
4.1.1 Herstellung von Dihydrodihydroxybenzoat (DHB) mit <i>Ralstonia eutropha</i> B9	39
4.1.2 Herstellung von DHB mit <i>Pseudomonas putida</i> Idaho BDH2	48
4.1.3 Aufarbeitung von DHB aus Fermentationslösung	51
4.2 Herstellung verschiedener substituierter Dihydrodihydroxybenzoate	83

4.2.1 Herstellung von 4-Fluor- und 3,5-Difluor-DHB mit <i>Ralstonia eutropha</i> B9	88
4.2.2 Herstellung von 3-Methyl-, 4-Methyl-, 3,4-Dimethyl-, 4-Brom-, und 4-Ethyl-DHB	91
4.2.3 Herstellung von 4-Chlor-DHB mit <i>Pseudomonas putida</i> Idaho BDH2	96
4.2.4 Fällung der Na-Salze der substituierten DHBs mit Isopropanol	100
4.3. Versuche mit Toluol	102
4.3.1 Löslichkeit vom Toluol	102
4.3.2 Umsetzung von Toluol zu DHB durch <i>Pseudomonas putida</i> BDH2	108
4.3.3 Umsetzung von Toluol zu DHB durch <i>Pseudomonas putida</i> BGXM1	112
5 Diskussion	117
5.1 Biotechnische Herstellung von Phenol aus Toluol	117
5.2 Technische Herstellung von DHB und substituierten DHB	122
5.2.1 Fedbatch-Fermentation zur Herstellung von DHB aus Benzoat	123
5.2.2 Fedbatch-Fermentation zur Herstellung von substituierten DHB	127
5.3 Aufarbeitung von DHB aus Fermentationslösungen	135
5.3.1 Extraktionen	136
5.3.2 Adsorption	136
5.3.3 Fällung mit Isopropanol	139
5.4 Ziele und Ergebnisse	141
6 Literaturverzeichnis	143
7 Anhang	149

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient [$M^{-1} \times cm$]
ΔE	Extinktionsänderung
λ	Wellenlänge [nm]
μ_{max}	maximale Wachstumsrate [h^{-1}]
3-Methyl-DHB	3-Methyl-Dihydrodihydroxybenzoat
3,4-Dimethyl-DHB	3,5-Dimethyl-Dihydrodihydroxybenzoat
3,5-Difluor-DHB	3,5-Difluor-Dihydrodihydroxybenzoat
4-Chlor-DHB	4-Chlor-Dihydrodihydroxybenzoat
4-Fluor-DHB	4-Fluor-Dihydrodihydroxybenzoat
4-Methyl-DHB	4-Methyl-Dihydrodihydroxybenzoat
Abb.	Abbildung
BSA	Rinderserumalbumin
DHB	Dihydrodihydroxybenzoat, <i>cis</i> -Cyclohexa-3,5-dien-1,2-diol-1-carboxylat
Na-DHB	Na-Salz von DHB
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Fa.	Firma
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IGB	Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik
LB (II)	Luria-Bertani Medium
$\log P_{OW}$	Logarithmus des Verteilungskoeffizienten des Lösungsmittels zwischen n-Octanol und Wasser
OD_{λ}	Optische Dichte (Wellenlänge λ)
<i>Ps.</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Ps. put.</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Ralst. eu.</i>	<i>Ralstonia eutropha</i>
rpm	round per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
R_t	Retentionszeit [min]
TBAH	Tetrabutylammoniumhydroxid
t_d	Verdopplungszeit
UV	Ultraviolett
UV/Vis	Ultraviolett/Visible
$Y_{P/C}$	Ertragskoeffizient (g Produkt/g Cosubstrat)
$Y_{C/S}$	cometabolischer Ausbeutekoeffizient (g Produkt/g Substrat)

1 Summary

The aim of the work was to develop a biotechnological process for the synthesis of phenol from toluene. This process contained two steps: in the first biotransformation step, toluene is transformed to dihydrodihydroxybenzoate (DHB, *cis*-cyclohexa-3,5-diene-1,2-diol-1-carboxylate), which is further converted to phenol through acidification in the second step.

At the beginning of the research, most of the available bacteriological strains were not able to perform the transformation of toluene into DHB. Therefore, the conversion of benzoate as a metabolite of toluene oxidation was investigated particularly with regard to the industrial requirement. A new process has been developed, during which it was possible to produce DHB in high concentration (approximately 300 mmol·l⁻¹). The process is based on the transformation of benzoate through a fedbatch-fermentation with a mutant strain *Ralstonia eutropha* B9 which is blocked in the benzoic acid catabolism. To achieve this purpose it was important to reduce the Na-K-phosphate buffer concentration from 50 mmol·l⁻¹ to 1 mmol·l⁻¹. It was also necessary to use an auxiliary substrate, whose degradation did not alter the pH of the solution during the process. With such a high concentration of DHB it was possible at the end of the fedbatch-fermentation to isolate the DHB in a pure crystal form after a simple precipitation with isopropanol.

The two steps-process was also successfully applied to synthesize DHB derivatives. 4-Fluoro-DHB; 3,5-difluoro-DHB; 3-methyl-DHB; 4-methyl-DHB; 3,4-dimethyl-DHB; and 4-chloro-DHB were produced in 1 to 5 g scale with a purity of 81 to 95 % in 1,4 l fedbatch fermentations. The unsubstituted DHB was also produced in 60 g scale with a purity of 95 % in 1,4 l fedbatch fermentation. The fluorine derivatives of DHB were produced with *Ralstonia eutropha* B9 (Reiner & Hegeman, 1971). Whited *et al.*, (1986) have reported the production of the methyl derivatives of DHB with a strain *Pseudomonas putida* BGXM1 which therefore was used for the DHB production. To achieve the 4-substituted chlorine derivative a new strain named *Pseudomonas putida* Idaho BDH2 (A. Germer, 2001 Institute of Microbiology, University of Stuttgart) was used. The novel characteristic of the latter strain is its capacity to transform directly toluene to DHB. In order to perform the required genetical modification of the strain it was necessary to block two DHB-dehydrogenases.

Pseudomonas putida Idaho BDH2 was tested in view of a technical process. According to the statement of A. Germer the production of 25-40% DHB from toluene was possible when

toluene was offered as the only substrate in the medium. However, the DHB which accumulated was further metabolized by the strain accompanied by biomass formation.

In the present work only 4% DHB was produced by *Pseudomonas putida* Idaho BDH2 when the growth medium was supplemented with glucose and mineral salts in addition to toluene. In contrast to this, when toluene was used as a sole substrate in the medium, the yield and the rate of the transformation was higher (A. Germer, 2001 Institute of Microbiology, University of Stuttgart).

Better yields and rates were reached with strain *Pseudomonas putida* BGXM1 (Whited *et al.*, 1986), in which the catabolism of 4-methylbenzoic acid is blocked. Initially, the strain was used for the production of 4-methyl-DHB but later it was found that it can also produce DHB from toluene.

In conclusion, the production of phenol from toluene is theoretically possible. Most of the tested strains, were able to oxidize toluene to DHB but none of them was qualified for the production in technical scale. In the present research work a novel method was developed to produce DHB derivatives from different substituted benzoates, which might be interesting for the commercially production of such compounds as synthons or fine chemicals.

2 Einleitung

2.1 Einsatz von Biokatalysatoren

Biotechnische Verfahren werden von der chemischen Industrie bereits seit Beginn des vergangenen Jahrhunderts erfolgreich zur Herstellung von organischen Lösungsmitteln (z.B. Ethanol, Butanol), organischen Säuren (z.B. Citronensäure), seit Mitte der 40er Jahre zur Produktion von wichtigen Pharmaka wie Antibiotika und Steroiden und seit den 60er Jahren zur Produktion von Aminosäuren und Vitaminen eingesetzt. Die Produkte wurden von lebenden wachsenden Mikroorganismen unter sterilen Bedingungen produziert und dabei in das umgebende Medium ausgeschieden oder intrazellulär angereichert. Neben diesen Biosynthese-Verfahren besteht eine Alternative darin, nur einzelne Stoffwechselreaktionen zu nutzen, d.h. Biotransformationen mit nicht mehr wachsenden Zellen oder mit isolierten Enzymen durchzuführen. Industriell wurden solche gezielten chemischen Umwandlungsreaktionen - jedoch ohne Kenntnis der chemischen oder biologischen Grundlagen - erstmalig 1815 zur Essigherstellung genutzt.

Die Vorteile eines biologischen gegenüber einem chemischen Synthese-Verfahren sind einerseits die geringen Katalysatormengen, die im Verhältnis zum Substrat benötigt werden. Andererseits besitzen Biokatalysatoren eine hohe Substratspezifität, Regioselektivität, Stereoselektivität und Reaktionsspezifität, deren Eigenschaften eine bedeutende Rolle für die Verwendung in der chemischen Industrie spielen. Biokatalysatoren arbeiten daneben in der Regel im physiologischen pH-Bereich, bei niedrigen Temperaturen und in wässrigen Lösungen. Für die chemische Industrie besteht damit die Möglichkeit, solche Biotransformationsprozesse für neue sowie bereits bekannte Produkte zu nutzen. In einzelnen Fällen können solche Reaktionen auch für den produktionsintegrierten Umweltschutz genutzt werden, wenn sich Abfallprodukte der chemischen Industrie durch Biokatalysatoren in Wertstoffe umwandeln lassen.

Der Einsatz von Biokatalysatoren ist bisher nur auf eine überschaubare Anzahl von Reaktionen beschränkt. Ihre Nachteile sind z.B. die teure und aufwändige Herstellung des Biokatalysators, wenn isolierte Enzyme eingesetzt werden, die häufig mangelnde Stabilität, die schwierige Rückgewinnung und damit die eingeschränkte Wiederverwendbarkeit. Bei vielen Verbindungen ist die Anwendung in einem wässrigen System nicht möglich. Trotzdem hat die chemische Industrie ohne Zweifel die Bedeutung der Biokatalyse erkannt, besonders in der stereoselektiven organischen Synthese. Bei der Etablierung industrieller

Biotransformationsverfahren hat nicht mehr ausschließlich die bessere Machbarkeit gegenüber den chemischen Verfahren, sondern auch der Faktor der besseren Umweltverträglichkeit eine Bedeutung. So werden z.B. durch die zunehmende Substitution chemischer Hydrolyseprozesse durch enzymatisch katalysierte Reaktionen hohe Salzfrachten vermieden, die bei der Neutralisation auftreten.

Mit der Optimierung der Herstellung und der Stabilisierung der Biokatalysatoren durch den Einsatz moderner molekular- und gentechnischer Methoden (z.B. rationales und evolutives Design von Proteinen) verbunden mit der Unterstützung der Bioinformatik eröffnen sich neue Wege für die Biokatalyse. Gene bzw. Enzyme wurden aus extremophilen und "nicht-kultivierbaren" Mikroorganismen verfügbar, DNA-Datenbanken wurden einfacher handhabbar, dadurch wurde die Herstellung von "maßgeschneiderten" Ganzzellkatalysatoren ermöglicht. Unter "maßgeschneiderten" Biokatalysatoren versteht man rekombinante Bakterienstämme, in denen Gensequenzen, die für die gewünschten Enzyme kodieren, aus unterschiedlichen Quelle kombiniert werden (Syldatk, 2000).

Die selektive Hydroxylierung von Aromaten gehört in der chemische Industrie zu einem bislang nicht befriedigend gelösten Problem, für das der Einsatz von hydroxylierenden Enzymsystemen ein Alternative darstellen kann.

2.2 Technische Herstellung von Phenol

Über 90% des Phenols wird weltweit mit dem sogenannten Hock-Verfahren hergestellt (Abb. 2.1). Bei diesem Verfahren wird zunächst Benzol mit Propylen in Gegenwart von H_2SO_4 zu Cumol umgesetzt. Dieses wird zu Hydroperoxid oxidiert und anschließend wird durch eine Spaltung dieser Verbindung in einer Schwefelsäurelösung Phenol und als Nebenprodukt Aceton gewonnen. Der Nachteil des Prozesses liegt in seiner Mehrstufigkeit und der starken Abhängigkeit seiner Effektivität vom Bedarf des Nebenproduktes Aceton (pro t Phenol entsteht 0,62 t Aceton, Weissermel, 1994).

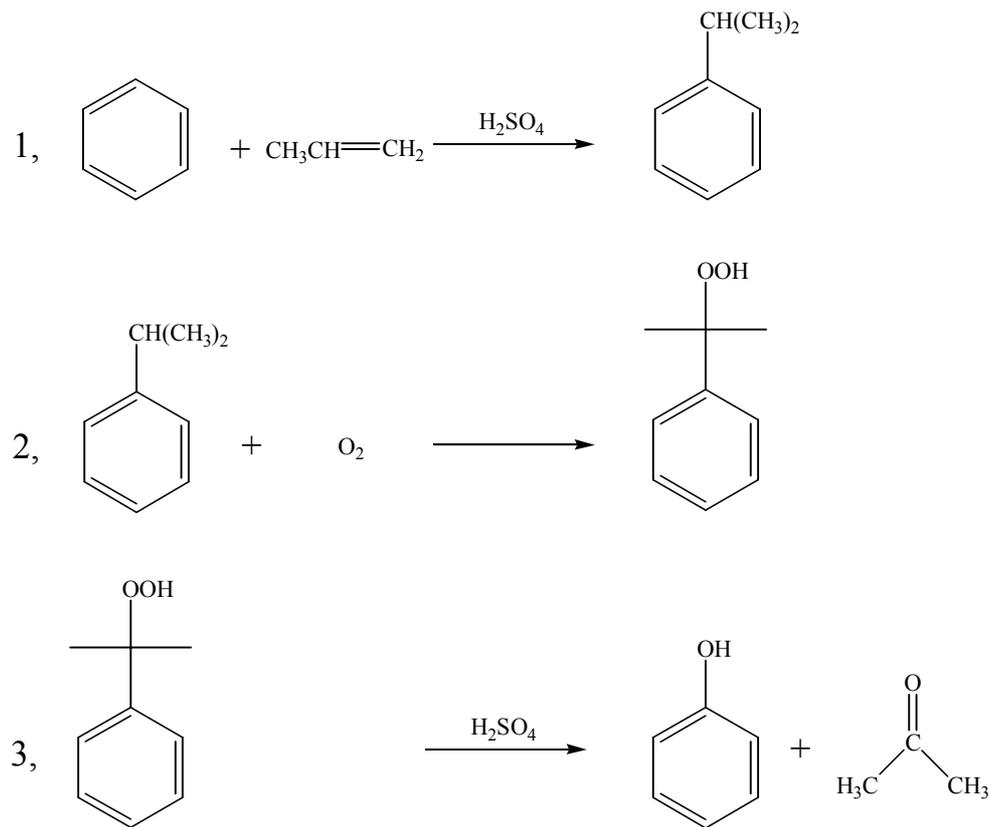


Abbildung 2.1 Technische Herstellung von Phenol mit dem Hock-Verfahren
(Streitwieser, 1980)

Aufgrund der genannten Nachteile wird nach Alternativen gesucht, um Phenol zu synthetisieren.

Um die Bildung von Nebenprodukten bei der Hydroperoxid-Spaltung wie z.B. α -Methylstyrol oder Mesityloxid gering zu halten, wird die Oxidation des Cumols nur bis zu einem Hydroperoxidgehalt von 35-40 % durchgeführt.

Die einstufige, selektive Hydroxylierung von Benzol zu Phenol ist auf chemischem Wege ein bisher nur unbefriedigend gelöstes Problem und deshalb eine wissenschaftlich und ökonomisch attraktive Aufgabenstellung. Durch Screening, Selektion und gezielte Weiterentwicklung wurden titan- und vanadiumhaltige Katalysatoren gefunden, die unter geeigneten Reaktionsbedingungen (in Methanol bei 70 °C) die einstufige Hydroxylierung von Benzol mit wässrigem Wasserstoffperoxid zu Phenol katalysieren. Dabei kann Phenol bei einem Benzolumsatz von 10% mit einer Phenolselektivität von bis zu 84% geliefert werden (Lemke, 2001).

Als alternative Methode wurde die Oxidation von Benzol mit N_2O entwickelt. Bei der großtechnischen Herstellung von Adipinsäure (ein Vorprodukt von Nylonkunstfasern) aus einer Mischung von Cyclohexanon, Cyclohexanol und Salpetersäure fallen aquimolare Mengen Lachgas an. Dieses kann mit Benzol in sehr hohen Ausbeuten zu Phenol umgesetzt werden. Die nachfolgende Hydrierung ergibt wiederum ein Gemisch aus Cyclohexanon/ol, das mit Salpetersäure zu Adipinsäure umgesetzt werden kann (Monsanto-Prozess). Dieser Kreisprozess optimiert die Ausnutzung von Salpetersäure als Oxidationsmittel.

Nach dem heutigen Stand der Technik muss N_2O vor dem Einleiten in die Atmosphäre aufwendig katalytisch zersetzt werden. Die Verwendung dieses Abfallproduktes als Einsatzstoff umweltfreundlicher Synthesen (wie z.B. die Oxidation von Benzol zu Phenol) stellt daher einen bedeutenden Beitrag zur nachhaltigen Ressourcenschonung dar (http://www.rwth-aachen.de/tchk/Ww/fk_gc.html).

2.3 Mikrobieller Abbau von Aromaten: Möglichkeit der Nutzung von Oxygenasen für Hydroxylierungsreaktionen

Unsere Umwelt ist reich an natürlichen und synthetischen aromatischen Verbindungen und nach dem heutigen Stand der Wissenschaft ist in der Regel der Abbau dieser Verbindungen mikrobiologisch möglich. In der Literatur ist schon lange beschrieben, dass manche Bakterien aromatische Verbindungen als Kohlenstoff- und Energiequelle verwenden können (Dorn *et al.*, 1974; Shields *et al.*, 1989; Gottschalk und Knackmuss, 1993; Smith 1990; Ramos *et al.*, 1995). Organische Lösungsmittel wirken toxisch, da sie sich in die Membran der Bakterienzellen einlagern und dadurch ein Verlust der Membranfunktionen verursachen. Hierdurch wird der Zellmetabolismus geschädigt, das Wachstum inhibiert und es kann sogar zum Zelltod kommen. Um diese Membrantoxizität zu umgehen, werden diese Verbindungen den Bakterien normalerweise über die Gasphase zugeführt. Die Toxizität organischer Lösungsmittel korreliert mit deren hydrophoben Charakter, der mit dem $\log P_{OW}$ -Wert beschreibbar ist. Der $\log P_{OW}$ -Wert entspricht dem Logarithmus des Verteilungskoeffizienten des Lösemittels zwischen n-Octanol und Wasser. Lösungsmittel, deren $\log P_{OW}$ -Wert zwischen 1 und 5 liegt, gehören zu den Verbindungen mit der höchsten Toxizität. Je niedriger der $\log P_{OW}$ -Wert ist, desto toxischer ist das Lösemittel. Toluol hat z.B. einen $\log P_{OW}$ -Wert von 2,66 und Benzol einen von 2,12 (Rippen, 1996), also wirkt Toluol weniger toxisch auf Mikroorganismen als Benzol (Kobayashi, 2000).

In den letzten Jahren wurden allerdings zunehmend Bakterien beschrieben, die solche Lösungsmittel tolerieren können. Ausgangspunkt war die Isolierung eines toluoltoleranten Bakterienstammes, der in Gegenwart von bis 50% (v/v) Toluol wachsen konnte (Cruden *et al.*, 1992).

Bei vielen Bakterien, die sich durch eine erhöhte Toleranz gegenüber membranaktiven Lösungsmitteln auszeichnen, sind nach Adaptation Veränderungen in den Membranen festgestellt worden. So wurde eine *cis-trans*-Isomerisierung von ungesättigten Fettsäuren bei *Pseudomonas putida* Stämmen beobachtet, welche in Gegenwart toxischer Toluolkonzentrationen kultiviert und entsprechend adaptiert wurden (Weber *et al.*, 1994; Heipieper *et al.*, 1995; Pinkart *et al.*, 1996; Ramos *et al.*, 1997)

Ein ähnlicher Adaptationsmechanismus wurde auch bei Kultivierung eines *Pseudomonas putida* Stammes in Gegenwart hoher Phenolkonzentrationen festgestellt (Heipieper *et al.*, 1992). Darüber hinaus wurde eine Zunahme der gesättigten Fettsäuren (Weber *et al.*, 1994; Pinkart *et al.*, 1996), sowie eine Modifikation der Lipopolysaccharide festgestellt (Weber und de Bont, 1996; Ramos *et al.*, 1997).

Des Weiteren wurden auch Exportsysteme beschrieben, die Toluol aus den Zellen herausschleusen können, allerdings sind diese Prozesse energieabhängig (Fukumori *et al.*, 1998; Isken *et al.*, 1996; Kieboom *et al.*, 1998; Rojas *et al.*, 2001)

Der initiale Abbau von Aromaten bei diesen Stämme wird in der Regel durch Mono- oder Dioxygenasen katalysiert (Abb. 2.2). In beiden Fälle kommt es schließlich zur Bildung von 1,2-Dihydroxyaromaten (an Brenzcatechin im Falle von Benzol). Die Hydroxyaromaten werden durch eine *ortho*- oder *meta*-Spaltung weiter umgesetzt und die entstehenden Metabolite über weitere Enzymreaktionen in den Tricarbonsäure-Cyclus geleitet. Wenn der Ring zwischen den zwei hydroxylierten C-Atomen geöffnet wird, dann spricht man von einer *ortho*-Spaltung, und wenn es zwischen einem hydroxylierten und einem nichthydroxylierten Kohlenstoffatom passiert, spricht man von einer *meta*-Spaltung (Schlegel, 1985).

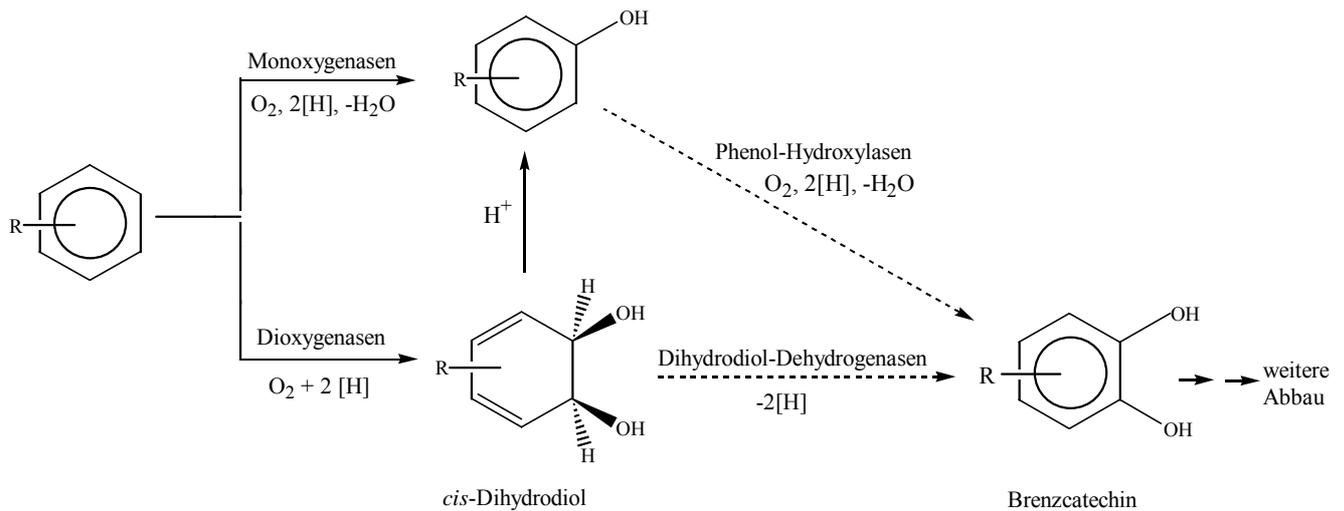


Abbildung 2.2 Initialer mikrobieller Abbau von Aromaten durch initiale Mono- und Dioxygenase-Reaktionen

Wegen ihrer Bedeutung in dieser Arbeit werden die Abbauwege von Toluol näher erläutert. Bisher wurden in der Literatur 5 verschiedene Stoffwechselwege beschrieben, sie sind in der Abbildung 2.3 dargestellt.

Im ersten Weg wird Toluol an der Seitenkette durch eine sogenannte Xylol- oder Toluol-Monooxygenase zu Benzylalkohol oxidiert und dann weiter durch eine Benzylalkohol-Dehydrogenase zu Benzaldehyd umgesetzt. Der Benzaldehyd unterliegt einem weiteren Umsatz durch eine Benzaldehyd-Dehydrogenase und es entsteht Benzoesäure. Diese wird durch die Benzoesäure-1,2-Dioxygenase zu Dihydrodihydroxybenzoesäure (DHB) umgewandelt. Das Dihydrodihydroxybenzoesäure wird durch eine Dihydrodihydroxybenzoesäure-Dehydrogenase weiter zu Brenzcatechin umgesetzt. Das Brenzcatechin wird anschließend durch eine Brenzcatechin-2,3-Dioxygenase in *meta*-Stellung gespalten und über weitere Enzymschritte in den Tricarbonsäurecyclus (TCC) geschleust. Über diesen Weg baut der Bakterienstamm *Pseudomonas putida* mt-2 Toluol vollständig ab (http://umbbd.ahc.umn.edu/tol/tol_map.html).

Bei den anderen Abbauwegen des Toluols erfolgt die initiale Oxidation durch die Hydroxylierung am aromatischen Ring mit Hilfe einer Mono- oder Dioxygenase. Im Stoffwechselweg des Stammes *Pseudomonas putida* F1 wird das aromatische Ringsystem durch eine Toluol-2,3-Dioxygenase aktiviert, in dem zwei Hydroxygruppen in das Molekül integriert werden und sich dadurch Toluol-2,3-*cis*-dihydrodiol bildet. Nach einer Dehydrogenierung zu 3-Methylbrenzcatechin erfolgt auch hier wiederum eine *meta*-Spaltung

durch die Brenzcatechin-2,3-Dioxygenase, und durch weitere Enzymsysteme werden die Metabolite in den TCC weitergeleitet.

Die bisher beschriebenen Toluol-Monooxygenasen können den aromatischen Ring an allen drei möglichen Stellen regiospezifisch angreifen, wodurch sich *ortho*-, *meta*- oder *para*-Kresol bildet. Es wurden drei Stämme beschrieben, die Toluol-Monooxygenasen in ihren Stoffwechselwegen haben: Der Stamm *Burkholderia cepacia* G4 besitzt eine Toluol-2-Monooxygenase, *Pseudomonas picketti* PKO1 eine Toluol-3-Monooxygenase und der Stamm *Pseudomonas mendocina* KR1 eine Toluol-4-Monooxygenase. Im Fall von *o*- und *m*-Kresol verläuft der weitere Abbau über das Intermediat 3-Methylbrenzcatechin, welches durch eine Brenzcatechin-2,3-Dioxygenase gespalten und anschließend weiter abgebaut wird (http://umbbd.ahc.umn.edu/tol/tol_map.html).

Im Falle des Bakterienstammes *Pseudomonas mendocina* KR1 wird das entstandene *p*-Kresol zu 4-Hydroxybenzoat umgesetzt, welches durch eine weitere Monooxygenase zu Protocatechuat oxidiert wird. Protocatechuat unterliegt einer Ringspaltung und wird über weitere Enzymreaktionen vollständig abgebaut (http://umbbd.ahc.umn.edu/tol/tol_map.html).

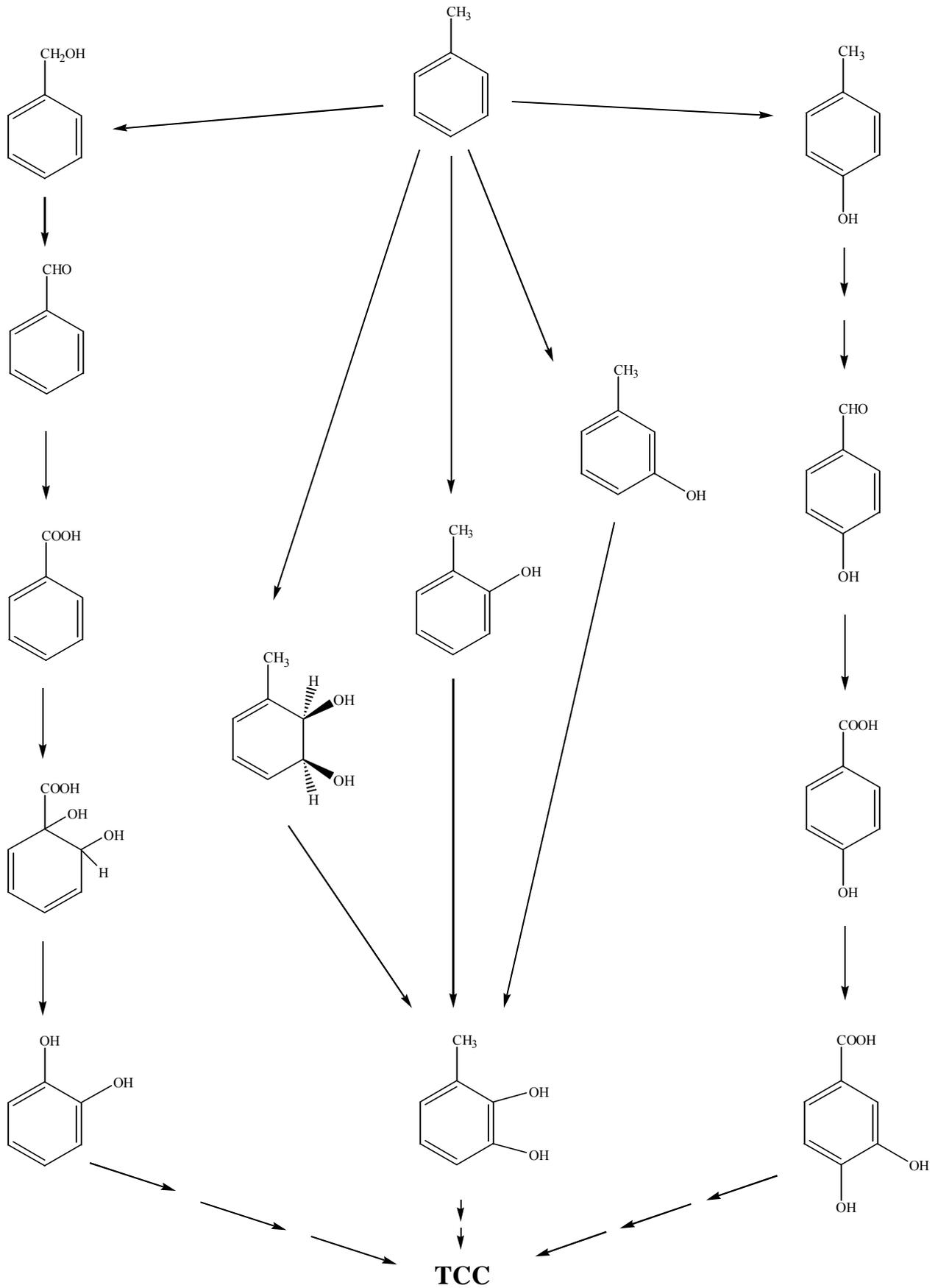
P. putida mt-2*P. putida* F1*B. cepacia* G4*P. picketti* PKO1*P. mendocina* KR1

Abbildung 2.3 Verschiedene mikrobielle Abbauege von Toluol

2.4 Biotechnische Herstellung von Phenol

Die biotechnische Herstellung von Phenol ist theoretisch aus Benzol oder aus Toluol möglich. Beide Substrate haben ähnliche physikalische und chemische Eigenschaften, aus verfahrenstechnischen Gründen gibt es also hinsichtlich der Fütterung der Substrate keinen wesentlichen Unterschied bei der Verwendung dieser Stoffe.

Es gibt prinzipiell drei mögliche Wege, um Phenol auf biotechnischem Wege zu produzieren:

1. Benzol wird durch eine Dioxygenase zu *cis*-Cyclohexa-3,5-diene-1,2-diol umgesetzt, welches sich unter sauren Bedingungen und spontaner Wasserabspaltung zu Phenol umwandelt (Abb. 2.4/A).
2. Benzol wird durch eine Monooxygenase direkt zu Phenol oxidiert (Abb. 2.4/B).
3. Toluol wird enzymatisch zu *cis*-Cyclohexa-3,5-dien-1,2-diol-1-carboxylat (Dihydrodihydroxybenzoat, DHB) oxidiert, und anschließend unter sauren Bedingungen nach spontaner Decarboxylierung und H₂O-Abspaltung zu Phenol umgesetzt (Abb. 2.4/C).

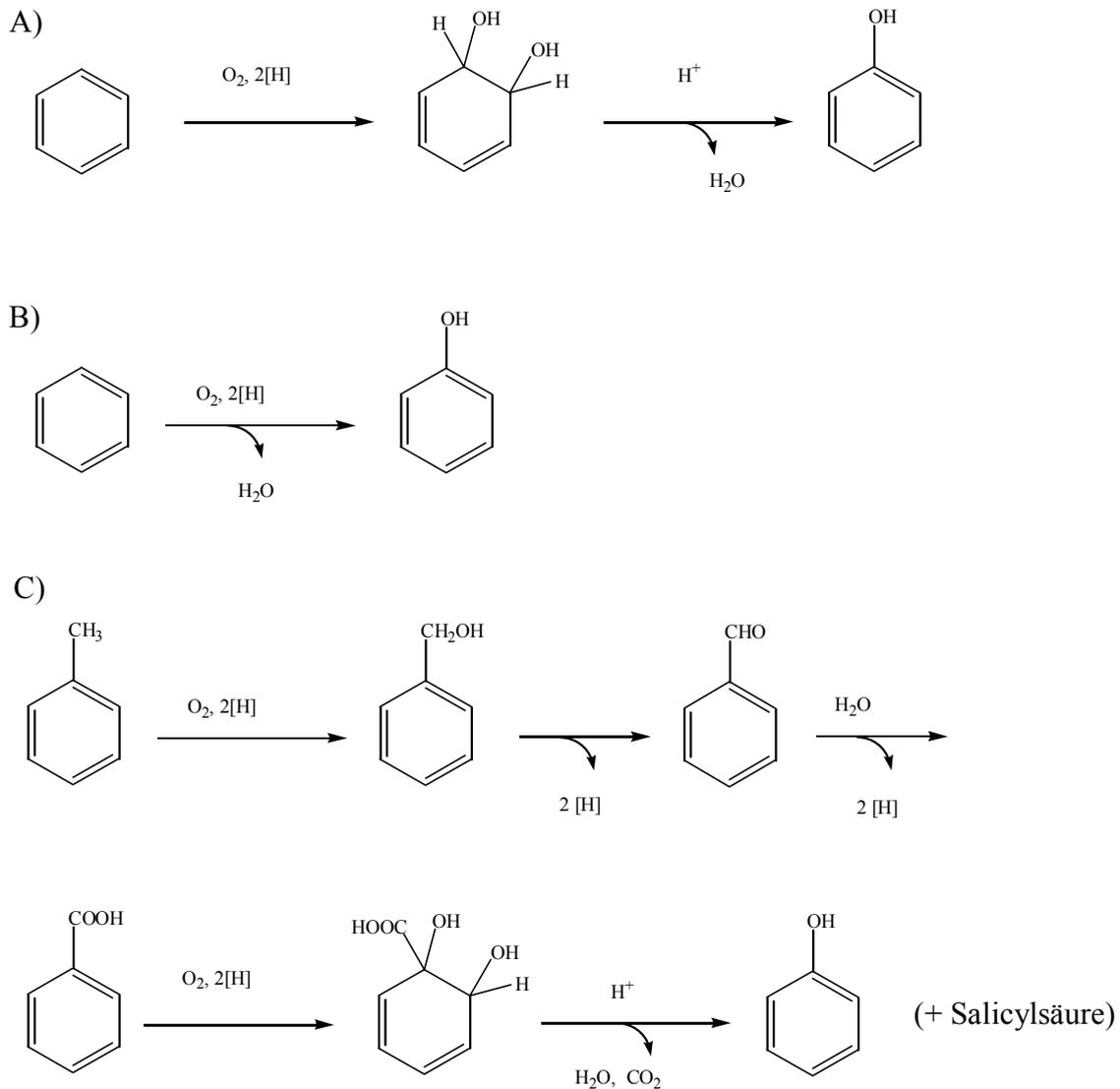


Abbildung 2.4 Biotechnische Herstellung von Phenol aus Benzol bzw. aus Toluol

In einem Vorprojekt wurden zunächst die Wege ausgehend von Benzol näher untersucht. Dabei sollten Bakterienstämme konstruiert werden, die Benzol tolerieren und gleichzeitig in der Lage sind, Benzol zu *cis*-Cyclohexa-3,5-diene-1,2-diol bzw. zu Phenol zu hydroxylieren. Andererseits sollte untersucht werden, ob Phenol aus Toluol herstellbar ist. Hierbei sollten toluoltolerante Bakterienstämme zum Einsatz kommen. Basierend auf den Ergebnissen des Vorprojektes und den Angaben aus der Literatur hat Toluol als Ausgangssubstanz gegenüber Benzol die folgenden Vorteile:

- Bakterienstämme tolerieren Toluol besser als Benzol. Es wurden in der Literatur Stämme beschrieben, die Toluol tolerieren, aber nicht Benzol (Cruden *et al.*, 1992; Inoue und Horikoshi, 1989; Ramos *et al.*, 1995).
- Der Umsatz von Toluol zur Benzoesäure liefert genauso viele Reduktionsäquivalente, wie für die Oxidation von Benzoesäure zu Dihydrodihydroxybenzoat benötigt werden. Das bedeutet theoretisch, dass für den Biotransformationsprozess kein Auxiliarsubstrat zugegeben werden muss. Im Fall von Benzol dagegen müsste in jedem Fall kontinuierlich ein Auxiliarsubstrat zur Bereitstellung der Reduktionsäquivalente zugesetzt werden.

Wie vorher ausgeführt, kann der Abbau von Toluol über unterschiedliche Abbauewege erfolgen (Abb. 2.3). In dieser Arbeit kamen Bakterienstämme zum Einsatz, die Toluol über Benzoat und Dihydrodihydroxybenzoat verstoffwechseln (Abb. 2.5, Smith, 1990).

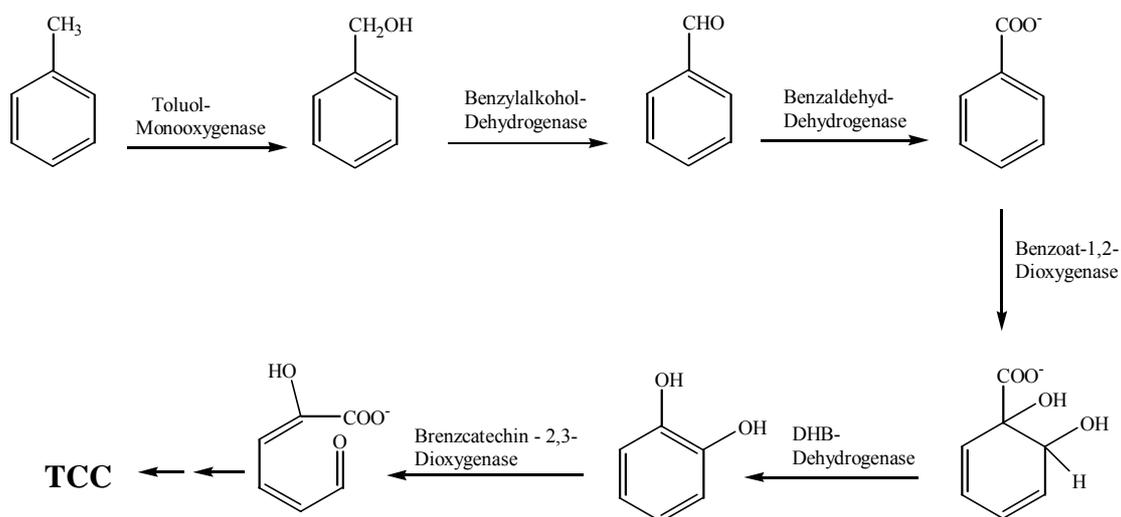


Abbildung 2.5 Enzyme aus der Anfangsphase der Biodegradation von Toluol

Durch genetische Veränderungen ist es möglich, einzelne Enzyme in dieser Stoffwechselkette zu blockieren oder inaktivieren, und dadurch die Anreicherung einzelner Metabolite zu ermöglichen. Weil die Enzyme substratspezifisch sind, werden nur bestimmte Substrate umgesetzt beziehungsweise nur stereochemisch ähnliche Verbindungen können mit demselben Enzym transformiert werden.

Das Verfahren, Phenol aus Toluol zu herstellen, sollte aus einem biologischen und einem chemischen Verfahrensschritt bestehen. Aufgrund der Toxizität von Phenol würde die Akkumulation von Phenol die transformierenden Bakterien inaktivieren, deshalb sollte erst

das untoxische Dihydrodihydroxybenzoat (DHB) durch die Bakterien aus Toluol hergestellt werden, und anschließend durch Zugabe von Säure das DHB zu Phenol umgewandelt werden (s. Abb. 2.6).

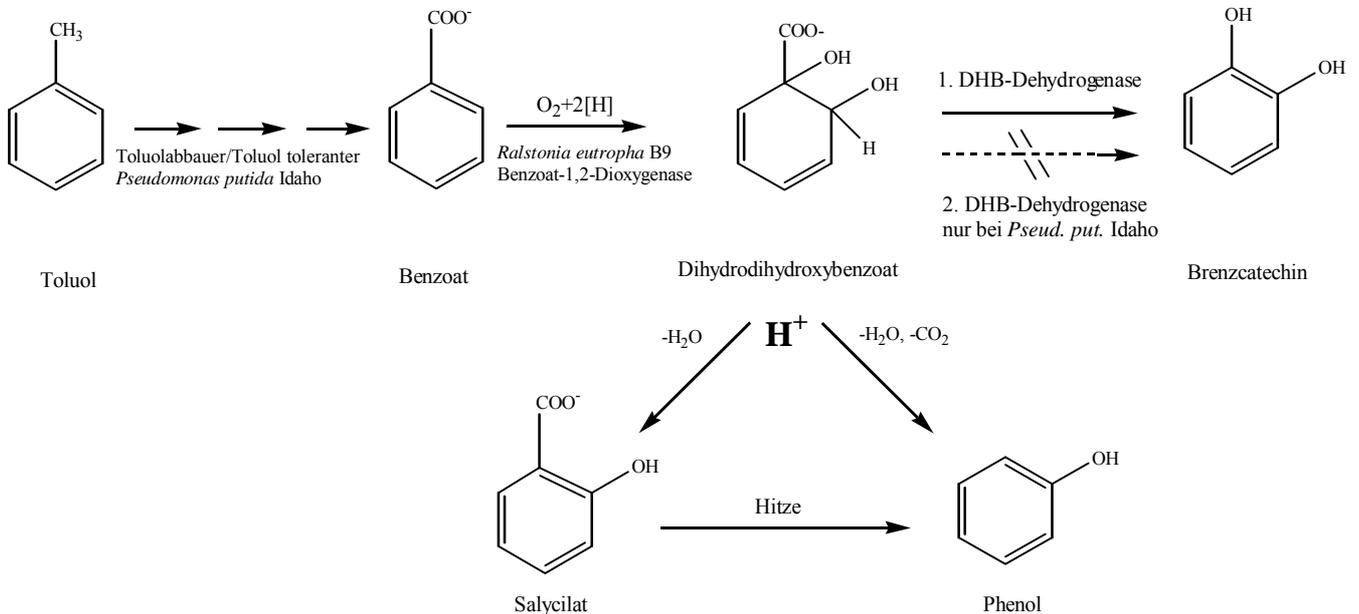


Abbildung 2.6 Biotechnische Herstellung von DHB und seine Umwandlung durch Säure zu Phenol

Für die Herstellung von DHB aus Toluol war es nötig, einen neuen Bakterienstamm zu konstruieren, der die entsprechenden Gene für die Enzyme besitzt. Es gab zwei Möglichkeiten für die genetische Modifizierung:

- In einen Stamm, der schon fähig ist, Benzoat zu DHB zu oxidieren, sollten die für die Toluoloxidation fehlenden Gene (Toluol-Monooxygenase, Benzylalkohol-Dehydrogenase und Benzaldehyd-Dehydrogenase) transferiert werden.
- In einem toluolverwertenden, toluoltoleranten Bakterienstamm sollte die DHB-Dehydrogenase (DHB-DH) blockiert werden.

Für die erste Möglichkeit wurde der Stamm *Ralstonia eutropha B9* benutzt. Der Stamm wurde als *Alcaligenes eutrophus B9* von Reiner und Hegeman (1971) beschrieben und später umbenannt. Es handelt sich um ein Derivat des Wildstammes *Ralstonia eutropha 335*, der Benzoat als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten kann. Er metabolisiert Benzoat über Brenzcatechin und den sogenannten 3-Oxoacidat Weg (Abb. 2.7). Die Mutante A.

eutrophus B9 bzw. *R. eutropha* B9 ist in der Umsetzung von DHB zu Brenzcatechin blockiert und kann auch nicht *cis-cis*-Muconat zu Muconolacton umsetzen.

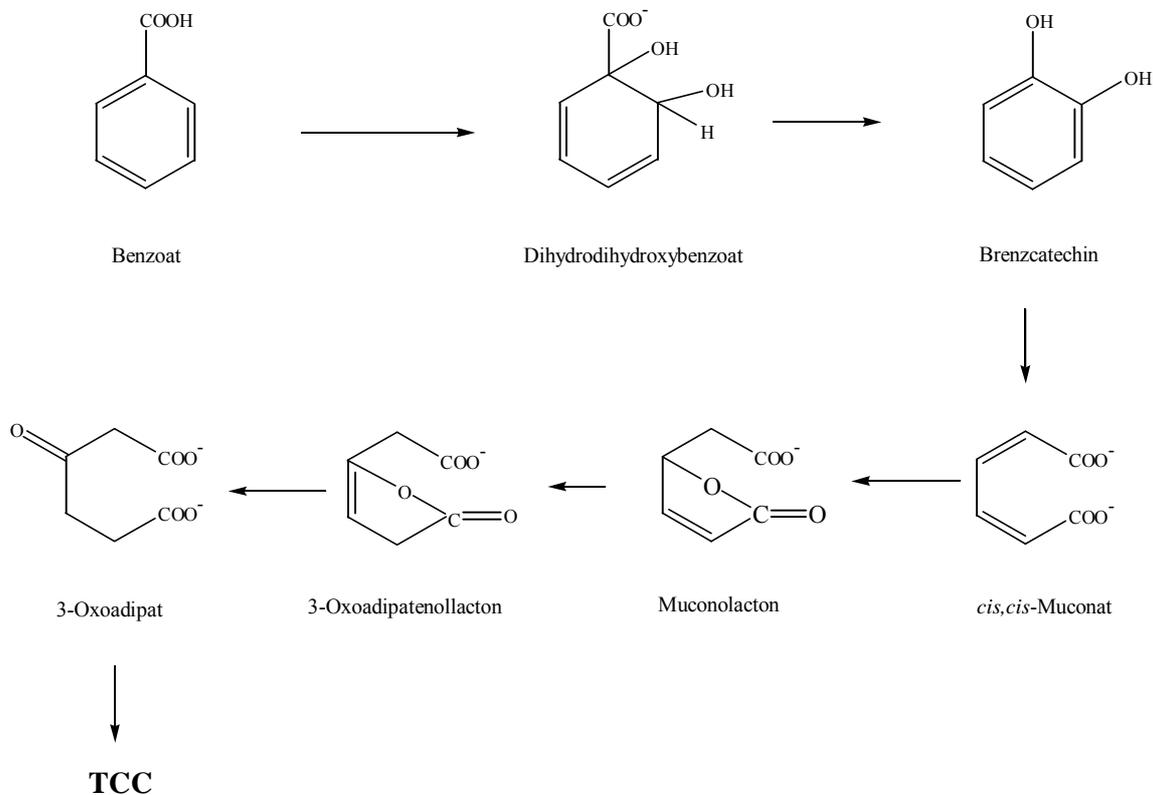


Abbildung 2.7 Mikrobieller Abbau von Benzoat durch *Ralstonia eutropha* 335

Der Stamm *Ralstonia eutropha* B9 ist an der Stelle der DHB-Dehydrogenase (DHB-DH) blockiert, kann also Benzoat nur bis zu DHB umsetzen. Wegen der defekten DHB-DH kann weder Toluol noch Benzoat als Substrat verwertet werden.

Für die zweite Möglichkeit wurde der Toluol verwertende Stamm *Pseudomonas putida* Idaho benutzt, um den Abbauweg von Toluol an der Stelle der DHB-Dehydrogenase zu unterbrechen und dadurch eine Akkumulation von DHB zu erreichen (Abb. 2.6). Dieser Stamm kann Toluol sowie auch *m*-Xylol, *p*-Xylol, 1,2,4-Trimethylbenzol und 3-Ethyltoluol als Wachstumssubstrat verwerten, und zeichnet sich dadurch aus, dass er in einem Zweiphasensystem mit 50 % Toluol oder *p*-Xylol (v/v) wachsen kann (Cruden *et al.*, 1992).

2.5 Zielsetzung

In einer Zusammenarbeit zwischen dem Fraunhofer-Institut für Grenzflächen und Bioverfahrenstechnik und dem Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart sollte ein bioverfahrenstechnischer Prozess zur Herstellung von Phenol aus Toluol entwickelt werden. Dieses Verfahren sollte aus zwei Schritten bestehen: die biotechnische Produktion von Dihydrodihydroxybenzoat und dessen chemische Umwandlung zu Phenol nach Zugabe von Säure. Hierfür musste ein Bakterienstamm konstruiert werden, der in der Lage ist, Toluol zu Dihydrodihydroxybenzoat umzusetzen.

Da das genetische Stammkonstrukt für die Untersuchung zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch nicht zur Verfügung stand und vom Universitätspartner zur Verfügung gestellt werden sollte, wurden zunächst Untersuchungen zur biotechnischen Herstellung von Dihydrodihydroxybenzoat (DHB) ausgehend von Benzoat durchgeführt.

Weiteres Ziel der Untersuchungen war es, eine Aufreinigungsmethode von DHB aus Fermentationslösungen zu erarbeiten. Bei erfolgreicher Etablierung der biotechnischen Herstellung von DHB sowie einer Aufarbeitungsmethode sollte das Produktionsverfahren auf weitere substituierte DHBs übertragen werden.

Am Ende der Untersuchungen sollte außerdem die Herstellung von DHB aus Toluol mit einem neu konstruierten Bakterienstamm, der vom Institut für Mikrobiologie zu Verfügung gestellt wurde, näher untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Bakterienstämme

In dieser Arbeit werden die folgenden Bakterienstämme verwendet.

- ***Ralstonia eutropha* B9**: Bei diesem Bakterienstamm handelt es sich um eine Stoffwechselmutante von *Ralstonia eutropha* 335, einem Benzoatverwerter. Der Wildtyp kann Benzoat vollständig zu CO₂ und H₂O oxidieren, *Ralstonia eutropha* B9 dagegen ist nach dem ersten Oxidationsschritt im Benzoat-Katabolismus blockiert und häuft DHB im Medium an (Reiner & Hegeman, 1971).

Die Kultivierung zur Stammerhaltung erfolgte auf LB(II)-Agarplatten.

- ***Pseudomonas putida* Idaho BDH2**: Bei diesem Stamm handelt es sich um einen genetisch modifizierten Stamm von *Pseudomonas putida* Idaho, einem toluoltoleranten Toluolverwerter. Der Wildtyp kann Toluol auch in einem Zweiphasensystem (bis 50% Toluol) verwerten (Cruden *et al.*, 1992).

In diesem Wildstamm wurden von A. Germer (persönliche Mitteilung) zwei DHB-Dehydrogenasen blockiert. Der genetisch modifizierte Stamm hat die Bezeichnung *Pseudomonas putida* Idaho BDH2 erhalten.

Die Kultivierung zur Stammerhaltung erfolgte auf LB(II)-Agarplatten mit 100 µg/ml Streptomycin.

- ***Pseudomonas putida* BGXM1**: Bei diesem Stamm handelt es sich um einen genetisch modifizierten Stamm von *Pseudomonas putida* BG1, einem 4-Methylbenzoatverwerter. Nach Behandlung mit N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin ist eine Mutante entstanden, die mit 4-Methylbenzoat (p-Toluat) nicht wachsen konnte. Der Wildtyp kann Benzoat vollständig zu CO₂ und H₂O oxidieren, während die Mutante *Pseudomonas putida* BGXM1 nach dem ersten Oxidationsschritt im Benzoat-Katabolismus blockiert ist und DHB in nicht-stöchiometrischen Mengen im Medium anhäuft (Whited *et al.*, 1986).

Die Kultivierung zur Stammerhaltung erfolgte auf Minimalmedium-Agarplatten mit 5 mmol·l⁻¹ Fructose und 2,5 mmol·l⁻¹ *p*-Toluidinsäure (4-Methylbenzoesäure).

3.2 Nährmedien

3.2.1 Mineralmedium

Für die Anzuchten und Reaktorversuche wurde die von Dorn *et. al* (1974) beschriebene Mineralsalzlösung benutzt, wobei die Konzentration des Phosphatpuffers (pH = 7,4) entweder 50 mmol·l⁻¹ oder 1 mmol·l⁻¹ betrug.

Na/K-Phosphat-Puffer (50 mmol·l⁻¹)

Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	7,0 g
KH ₂ PO ₄	1,4 g
Ca(NO ₃) ₂ * 4 H ₂ O	0,005 g
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,02 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1 g
Fe(III)NH ₄ -Citrat	0,001 g
Spurenelementlösung SL6 (nach Pfennig und Lippert, 1966)	0,1 ml
Bidest. Wasser	ad 1 l

Für feste Nährböden wurde dem Medium 15 g/l Agar zugefügt.

Spurenelementlösung SL6 nach Pfennig

ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	100 mg
MgSO ₄ * 4 H ₂ O	30 mg
H ₃ BO ₃	300 mg
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	200 mg
CuCl ₂ * 2 H ₂ O	10 mg
NiCl ₂ * 6 H ₂ O	20 mg
NaMoO ₄ * 2H ₂ O	30 mg
Bidest. Wasser	ad 1 l

3.2.2 Komplexmedium

Als Komplexmedium wurde Luria-Bertani-(II) Medium (= LB-Medium) (pH = 7,0) mit der folgenden Zusammensetzung verwendet.

Trypton	10	g
Hefeextrakt	5	g
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	1	g
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	0,1	g
Bidest. Wasser	ad 1	l

Für feste Nährböden wurde dem Medium 15 g/l Agar zugefügt.

3.3 Stammerhaltung

Die Stämme wurden monatlich einmal auf frische Agarplatten übertragen. Bei Stämmen, mit denen gerade Experimente ausgeführt wurden, erfolgte jedoch eine wöchentliche Übertragung auf frisches Medium. Nach der Inokulation wurde 1-2 Tage bei 30 °C wachsen gelassen und anschließend im Kühlschrank (4 °C) gelagert.

Die drei Stämme wurden unterschiedlich kultiviert:

Ralstonia eutropha B9 auf LB-(II)-Platte,

Pseudomonas putida Idaho auf Minimalmedium-Platte, die 5 mmol·l⁻¹ Glucose und 100 µg/ml Streptomycin enthielt,

Pseudomonas putida BGXM1 auf Minimalmedium-Platte, die 5 mmol·l⁻¹ Fructose und 2,5 mmol·l⁻¹ 4-Methylbenzoesäure (*p*-Toluidinsäure) enthielt.

Als Sicherung wurden die Stämme auch bei -70 °C gelagert. Dafür wurden frisch gewachsene Zellen von einer Agarplatte entnommen und in 1 ml NaCl-Lösung (0,9 %) resuspendiert. Diese Bakterienlösung wurde mit 1 ml sterilem Glycerin vermischt und in Kryo-Röhrchen (Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark) in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.4 Benzoate

Die folgenden substituierten Benzoesäuren wurden bei den Umsatz- und Reaktorversuchen verwendet:

◆ 4-Fluorbenzoesäure	Fa. Merck	(> 99%)
◆ 3,5-Difluorbenzoesäure	Fa. Lancaster	(> 97%)
◆ 3-Methylbenzoesäure	Fa. Fluka	(> 99%)
◆ 4-Methylbenzoesäure	Fa. Fluka	(> 98%)
◆ 3,4-Dimethylbenzoesäure	Fa. Merck	(> 96%)
◆ 4-Brombenzoesäure	Fa. Fluka	(> 99 %)
◆ 4-Ethylbenzoesäure	Fa. Lancaster	(> 99%)
◆ 4 Chlorbenzoesäure	Fa. Fluka	(> 97 %)

Die Benzoesäuren wurden je nach Löslichkeit im bidest. Wasser aufgelöst (Konzentration 20-500 mmol·l⁻¹) und der pH mit NaOH-Plätzchen auf einen Wert von 6,5-8 eingestellt.

3.5 Zellanzuchten

Die Kulturen wurden in 100-, 300-, 1000 ml Schikanenkolben gezüchtet. Die Kolben enthielten jeweils 20% ihres Nennvolumens an Kulturflüssigkeit, bei Anzuchten in 3 l Kolben wurde 400 ml Kulturmedium eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei allen drei Stämmen bei 30 °C auf einem Rotationsschüttler bei 100 rpm.

Für Umsatzversuche mit ruhenden Zellen wurden die Stämme in einem Medium angezüchtet, das das Induktionsmittel enthielt. Die Inkubation erfolgte bei allen drei Stämmen bei 30 °C auf einem Rotationsschüttler bei 100 rpm. Die Kulturen wurden abzentrifugiert (bis 10 ml Volumen: 20 Min, 6000 rpm, T = 10°C, Typ: 3K-1, Fa. Beckmann; über 100 ml Volumen: 8000 rpm, 20 Min., 10 °C, Typ: CH-J2 ME, Fa. Beckmann) und mit ca. 50 ml Phosphatpuffer (50 mmol·l⁻¹) gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden erneut abzentrifugiert (20 Min, 6000 rpm, T = 10°C, Typ: 3K-1, Fa. Beckmann) und mit einer Pasteurpipette je nach Zellenmenge in 1-2 ml Phosphatpuffer (50 mmol·l⁻¹) resuspendiert.

3.6 Bioreaktoren

Die Versuche in größerem Maßstab wurden in Bioreaktoren mit 1,5 l Arbeitsvolumen durchgeführt. Zwei verschiedene Typen vom Fermenter wurden verwendet:

Der Biostat-R-Reaktor bestand aus einem Rührkessel und einem Metalldeckel mit der entsprechenden Anschlussstellen der Firma B. Braun Biotech International, Melsungen. Das Bedienungs-, Kontroll- und Heizsystem war wie im Folgenden ausgeführt:

Pumpen	Watson-Marlow 101U (2 UpM), Fa. Verder
Rührer	IKA-Rührwerk Typ RE 162, Fa. Janke & Kunkel GmbH
Rührkessel	Fa. B. Braun Biotech International, Melsungen
pH-Elektrode	Typ 465 35 SC PK9, Fa. Mettler-Toledo
pH-Kontrolle	Liquisys-P, Fa. E+H Conducta
Sauerstoffelektrode	polarographisch, Typ 322 756 701/72311, Fa. Ingold
Sauerstoffmeßgerät	MCS-E-System, Fa. B. Braun Melsungen AG
Wärmetauscher	D8/L Fisons, Fa. Haake
Durchflußmesser	Fa. Platon
Waage	Typ 2200 S+, Fa. Sartorius
Zeitschaltuhr	Variomat-ER, Fa. Diehl

Die Kulturflüssigkeit wurde auf 30 °C temperiert, mit 300 rpm gerührt und von 1,6-2,0 l Luft/Min durchströmt. Die Messung des gelösten Sauerstoffs erfolgte durch eine polarografische Messung, die Sauerstoffregelung wurde manuell je nach Luftsättigung des Mediums durchgeführt. Der Wert der Luftsättigung wurde möglichst zwischen 50-80% gehalten. Die Messung des pH erfolgte durch eine pH-Elektrode und wurde mit 1 M HCl bzw. 1 M NaOH automatisch auf $\text{pH} = 7,4 \pm 1$ geregelt.

Das Gerät Biostat-M ist ein Tischreaktor, der ein Bedienungs- und Steuerungsmodul der Firma B. Braun Biotech International (Melsungen) enthält. Die weiteren Elemente des Systems stammen von anderen Firmen, wie im Folgenden ausgeführt:

Pumpen	Watson-Marlow 101U (2 UpM), Fa. Verder
Fermenter	Typ 880072, Fa. B. Braun Biotech International, Melsungen
Sauerstoffelektrode	polarographisch, Typ 322 756 701/72311, Fa. Ingold

pH-Elektrode	Typ 465 35 SC PK9, Fa. Mettler-Toledo
Thermometer	Pt-100, Firma B. Braun Biotech International, Melsungen
Meßeinheit	Typ 70 20.1, Fa. B. Braun Biotech International, Melsungen
Waage	Typ L2200 S+, Fa. Sartorius
Zeitschaltuhr	Variomat-ER, Fa. Diehl

Die Kulturflüssigkeit wurde auf 30 °C temperiert, mit 500 rpm gerührt und von 1,6 l Luft/Min durchströmt. Die Messung des gelösten Sauerstoffs erfolgte durch eine polarografische Messung, die Sauerstoffregelung wurde automatisch auf 50 % Luftsättigung eingestellt. Die Messung des pH-Wertes erfolgte durch eine pH-Elektrode, der pH wurde mit 1 M HCl bzw. 1 M NaOH automatisch auf $\text{pH} = 7,4 \pm 1$ geregelt.

Bei beiden Reaktoren erlaubte eine Waage die genaue Messung der Substrat- sowie der Cosubstratzugabe.

Um die Kultur auf Kontaminationen zu testen, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Fermentation Zellen aus dem Reaktor entnommen. Es wurde jeweils 0,5 ml Probe 1:10; 10²; 10³; 10⁴; 10⁵; 10⁶ und 10⁷ mit Phosphatpuffer (50 mmol·l⁻¹) verdünnt und aus den zellhaltigen Lösungen wurden jeweils 0,1 ml auf Komplexmedium-Agarplatten (s. Kapitel 3.2.2) ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 30 °C inkubiert und am nächsten Tag nach der Morphologie der Kolonien ausgewertet.

3.7 Messung des Bakterienwachstums

Die optische Dichte von Zellsuspensionen wurde mit einem Spektralphotometer (DU-50, Fa. Beckmann) bei $\lambda = 546 \text{ nm}$ gemessen. Die Extinktion wurde in Einmalküvetten (Schichtdicke 1 cm) bestimmt und, wenn der Wert 0,4 überschritt, die Suspension mit Phosphatpuffer (50 mmol·l⁻¹, pH = 7,4) verdünnt. Als Leerwert diente der Phosphatpuffer.

3.8 Proteinbestimmung nach Biuret

Um bei einer Enzymreaktion die spezifische Aktivität zu messen, ist es nötig, den Proteingehalt der Zellsuspensionen zu bestimmen. Hierfür wurde die Bestimmung nach Biuret

verwendet bei der die Zellen nicht mechanisch aufgeschlossen werden müssen. Die folgenden Lösungen sind erforderlich:

<u>Lösung A:</u> NaOH	1,6 g
H ₂ O bidest.	20 ml

<u>Lösung B:</u> Kalium-Natrium-Tartrat	0,6125 g
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0,125 g
KJ	0,3125 g
NaOH	0,5 g

Für die Eichkurve wurde Rinderserumalbumin (Stammlösung 1 mg/ml) in den folgenden Konzentrationen verwendet: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg/ml.

Zu 1,5 ml der Proteinlösung wurde 0,15 ml Lösung A zugegeben und 5 Minuten im Reagenzglas mit Aludeckel in einem 100 °C-Wasserbad gekocht. Unter Leitungswasser wurde die Lösung abgekühlt, 2 ml Lösung B zugegeben, gut gemischt und anschließend 1-2 Minuten lang bei 37 °C inkubiert.

Im Fall von Zellsuspensionen (15-20 ml) wurden diese zunächst abzentrifugiert (8000 rpm, 20 Min., 10 °C, Typ: CH-J2 ME, Fa. Beckmann), das jeweilige Pellet mit 0,3 % NaCl-Lösung gewaschen und erneut abzentrifugiert (6000 rpm, 20 Min, 10 °C, Typ: 3K-1, Fa. Beckmann). Mit Wasser wurden die Proben auf 1,5 ml Volumen aufgefüllt, und wie oben beschrieben, mit den Lösungen A und B behandelt. Nach der Inkubation bei 37 °C wurden die Ansätze noch einmal abzentrifugiert (20 Min, 6000 rpm, T = 10°C, Typ: 3K-1, Fa. Beckmann), um einen klaren Überstand zu erhalten.

Die Proteinlösungen und die Überstände wurden in Einmalküvetten (Schichtdicke 1 cm) mit einem Spektralphotometer (Typ: DU-50, Fa. Beckmann) bei einer Wellenlänge von 546 nm gemessen. Als Leerwert diente eine entsprechend behandelte Probe von bidest. Wasser.

3.9 Trockengewichtbestimmung

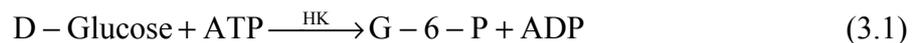
Die Zellen wurden in 3 l Schikanenkolben mit unterschiedlicher Menge von Kohlenstoff- und 5 mmol·l⁻¹ Na-Benzoesäure als Induktionsmittel gezüchtet und die optische Dichte mittels Spektralphotometer bestimmt. 200 ml aus der Zellsuspension wurde abzentrifugiert (8000 rpm, 20 Min, 10 °C, Fa. Beckmann), mit 5 ml 0,3 % NaCl-Lösung gewaschen und erneut im

Zentrifugenröhrchen abzentrifugiert. Die gewaschenen Zellen wurden beim 95 °C bis zur Gewichtskonstanz (mind. 24 Stunde lang) im Trockenschrank (Typ: F115, Fa. WTC-Binder) getrocknet. Anschließend kühlten sie in einem nicht evakuierten Exsikkator über Trocknungsmittel (Silica Blue) ab.

3.10 Bestimmung von D-Glucose und D-Fructose

Die Zuckerkonzentration wurde mit enzymatischen Testsystemen bestimmt (Testkit Fa. Boehringer Mannheim):

D-Glucose wurde im ersten Schritt durch das Enzym Hexokinase (HK) und ATP zu D-Glucose-6-phosphat (G-6-P) unter gleichzeitiger Bildung von ADP phosphoryliert.



Im Gegenwart des Enzyms Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) wurde G-6-P von NADP zu D-Gluconat-6-phosphat oxidiert. Es entsteht NADPH.



Die während der Reaktion gebildete NADPH-Menge ist der Glucose-Menge äquivalent. NADPH ist Messgröße und wird aufgrund seiner Absorption bei 340 nm bestimmt.

Die Proben aus Ansätzen (zirka 1 ml) wurden abzentrifugiert (1200 rpm, 3 Min, Raumtemperatur) und, wenn es nötig war, mit Phosphatpuffer (50 mmol·l⁻¹, pH = 7,4) verdünnt. 50 µl Probe wurde mit 850 µl bidest Wasser und 500 µl Triethanolaminpuffer gemischt und nach zirka 3 Minuten die Extinktion gemessen (E₁).

Die Reaktion wurde mit der Zugabe der Mischung HK und G6P gestartet und nach 10-15 Minuten erneut die Extinktion gemessen (E₂).

$$c = \frac{V \cdot MG}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot \Delta E[\text{g/l}] \quad (3.3)$$

V = Testvolumen [ml]

v = Probevolumen [ml]

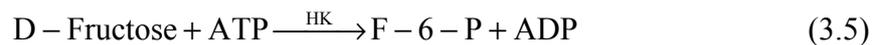
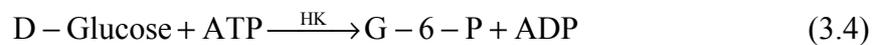
MG = Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz [g/mol]

D = Schichtdicke [cm]

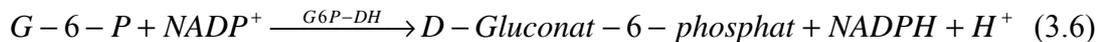
ε = Extinktionskoeffizient von NADPH bei 340 nm, $\varepsilon = 6,3$ [$\text{l}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]

$\Delta E = E_2 - E_1$

Mit dem D-Fructose-Test ist es möglich, D-Glucose und D-Fructose nebeneinander zu bestimmen. D-Glucose und D-Fructose werden durch das Enzym Hexokinase (HK) und ATP zu D-Glucose-6-phosphat (G-6-P) und D-Fructose-6-phosphat (F-6-P) unter gleichzeitiger Bildung von ADP phosphoryliert.



In Gegenwart des Enzyms Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) wurde G-6-P von NADP zu D-Gluconat-6-phosphat oxidiert. Es entsteht NADPH.



Während der Reaktion bildet sich stöchiometrisch die gleiche Menge NADPH, wie zuvor D-Glucose in der Probe war. Weil NADPH ein Adsorptionsmaximum beim 340 nm hat, ist bei dieser Wellenlänge mittels Spektralphotometer seine Konzentrationsbestimmung möglich. Wenn dieser Reaktion abgelaufen ist, wird F-6-P durch Phosphoglucose-Isomerase (PGI) in G-6-P umgewandelt.



Während dieser Reaktion erfolgt auch eine Umwandlung von NADP zu NADPH, die stöchiometrisch der D-Fructose-Menge äquivalent ist.

Die Proben aus den Ansätzen (zirka 1 ml) wurden abzentrifugiert (1200 rpm, 3 Minuten, Raumtemperatur) und gegebenenfalls mit Phosphatpuffer ($50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH = 7,4) verdünnt. 50 μl Probe wurde mit 850 μl bidest Wasser und 500 μl Triethanolaminpuffer gemischt und die Extinktion nach zirka 3 Minuten gemessen (E_1).

Die Reaktion wurde mit der Zugabe der Mischung HK und G6P gestartet und die Extinktion nach 10-15 Minuten erneut gemessen (E_2).

Die weitere Reaktion wurde bei den D-Fructose-haltigen Proben mit der Zugabe von Phosphoglucose-Isomerase erreicht. Dieses Enzym wandelt nämlich die Fructose zu Glucose um, dadurch erhöht sich die Extinktion der Lösung. Nach 10-15 Minuten wurde die Extinktion erneut gemessen (E_3).

Die Konzentration der D-Glucose oder D-Fructose wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$c = \frac{V \cdot MG}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot \Delta E [\text{g/l}] \quad (3.8)$$

V = Testvolumen [ml]

v = Probevolumen [ml]

MG = Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz [g/mol]

D = Schichtdicke [cm]

ε = Extinktionskoeffizient von NADPH bei 340 nm, $\varepsilon = 6,3 \text{ [l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$

ΔE = $E_3 - E_2$

3.11 Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Die Cosubstrate und Produkte bei den Umsätzen und Reaktorversuchen wurden mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) analysiert. Die Reverse-Phase-Adsorptionschromatographie wurde mit RP-8-Silica-Säulen (Korngröße 5 μm , LiChroCART, Fa. Merck) durchgeführt. Die mobile Phase bestand aus einer Mischung von Methanol und 0,25%iger Phosphorsäure (aus 85%iger Phosphorsäure verdünnt), deren Zusammensetzung durch ein Gradientenprogramm gesteuert wurde. Die Flussrate bei den Messungen betrug 1 ml/min. In Tabelle (3.1) sind die durchschnittlichen Retentionsvolumina der analysierten Verbindungen dargestellt.

Es wurde ein HPLC-Anlage der Fa. Gynkotec verwendet, die mit den folgenden Geräten ausgestattet war:

Degaser:	DEGASYS, DG 1310, Fa. Gynkotec
Autosampler:	GINA 50, Fa. Gynkotec
Pumpe:	Model 480, Fa. Gynkotec
Ofen:	STH 585, Fa. Gynkotec
Detektor:	UVD 340S, Fa. Gynkotec
Auswertesoftware	Chromleon, Version 6.20, Fa. Gynkotec
Rechner:	Optiplex GX1, Fa. Dell

Tabelle 3.1 Ablauf und Fließmittelzusammensetzung im HPLC-Gradientenprogramm sowie Retentionsvolumina der Substrate und Produkte

Substrat	Gradientenprogramme		Retentionsvolumen (ml)**	
	Zeit (min)	Anteil Methanol(%)*	Substrat	Produkt***
Benzoat	0,00-1,50	15	5,40	1,38
	1,51-5,50	50		
	5,51-8,50	15		
4-Fluorbenzoat	0,00-3,30	15	5,70	1,57
	3,30-15,50	50		
	15,51-20,00	15		
3,5-Difluorbenzoat	0,00-3,00	15	8,20	1,36
	3,10-5,00	30		
	5,10-9,50	50		
	9,51-13,00	15		
3-Methylbenzoat	0,00-3,30	15	6,8	3,6
	3,31-1,5	50		
	1,51-14,4	15		
4-Methylbenzoat	0,00-3,30	15	6,50	2,55
	3,30-15,50	50		
	15,51-20,00	15		
3,4-Dimethylbenzoat	0,00-1,50	15	8,00	4,10
	1,51-10,50	50		
	10,51-13,6	15		
4-Chlorbenzoat	0,00-3,30	15	11,55	5,30
	3,31-16,50	50		
	16,50-21,00	15		
4-Ethylbenzoat	0,00-3,30	15	12,20	6,75
	3,31-16,50	50		
	16,50-21,00	15		
4-Brombenzoat	0,00-3,30	15	10,10	4,40
	3,31-15,50	50		
	15,51-17,50	15		

- * Die Angaben stellen den Anteil an Methanol dar, der auf 100% mit 0,26%iger Phosphorsäure ergänzt wurde.
- ** Für die Auftrennung wurden Fertigsäulen (Korngröße 5 μm , LiChroCART, Fa. Merck) verwendet. Die Flussrate betrug 1 ml/min.
- *** Bei den Produkte handelt es sich jeweils um das korrespondierende Dihydrodihydroxybenzoat.

3.12 Einengen von Kulturmedien

Nach der Fermentation war es für die Aufarbeitung des jeweiligen Produktes nötig, das Fermentationsmedium aufzukonzentrieren. Um das Produkt vor spontanen Folgereaktionen zu schützen, wurde dieser Schritt in einem Rotationsverdampfer bei 30 °C durchgeführt. Das Fermentationsmedium wurde in der Regel auf etwa 1/10 des ursprünglichen Volumens eingengt.

Gerät:

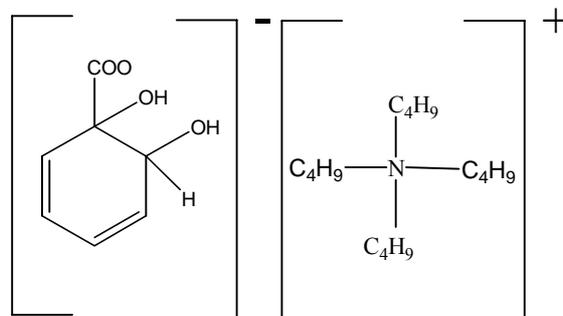
Rotationsverdampfer:	Rotavapor, RE 121, Fa. Büchi
Wasserbad:	Model 461, Fa. Büchi
Kühler:	Ultratemp FP40, Fa. Julabo
Vakuumpumpe:	Model B-173, Fa. Büchi

3.13 Extraktion mit Ethylacetat

Basierend auf den Untersuchungen von Reineke (1976) wurde das eingengte Fermentationsmedium im Eisbad gekühlt und mit konz. HCl auf pH = 2 angesäuert. Anschließend wurde die wässrige Lösung 2-3 mal rasch mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Das Verhältnis Ethylacetat zu wässriger Phase war je nach Versuch 1:1; 1:3; 2:3. Die Ethylacetat-Phasen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt (100 mbar, 30 °C). Der feste Rückstand wurde in 1-2 ml Wasser aufgenommen, im Eisbad mit NaOH Plätzchen neutralisiert und anschließend das Natriumsalz der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure (Dihydrodihydroxybenzoat, DHB) mit Isopropanol (Verhältnis 1:10) ausgefällt. Der Niederschlag wurde im Vakuum abfiltriert und die erhaltenen Kristalle wurden anschließend bis zur Gewichtskonstanz im Exsikkator auf Trockenmittel getrocknet.

3.14 Ionenpaarextraktion

Das hergestellte DHB war wegen seiner polaren Eigenschaften mit organischem Lösungsmittel schwer extrahierbar. Als alternative Methode wurde die Ionenpaarextraktion eingesetzt, wobei im Falle negativ geladener Metabolite das quartäre Tetrabutylammoniumhydroxid (TBAH) als Ionenpaarbildner zu der zu extrahierenden Lösung gegeben wurde (Abb.3.1). Anstelle von TBAH wurde außerdem Alamin-336 verwendet. Alamin-336 ist ein tertiäres Amin mit zwei C₈- und einer C₁₀-Alkylkette, ein zähflüssiger und wasserunlöslicher Stoff. Nach Literaturangaben (Brändström *et. al.*, 1969) sollte DHB ein nicht geladenes Ionenpaar mit dem TBAH bzw. Alamin-336 bilden und sich dadurch besser extrahieren lassen.



Ionenpaar mit Tetrabutylammoniumhydroxid

Abbildung 3.1 Ionenpaarextraktion mit Tetrabutyl-ammoniumhydroxid

Bei der Extraktion mit TBAH wurde 10 ml Chloroform mit 0,25 g TBAH gemischt. 10 ml einer etwa 100 mmol·l⁻¹ DHB-Lösung (nicht eingengtes Fermentationsmedium) wurde zweimal mit jeweils 10 ml Chloroform-TBAH-Gemisch extrahiert. In der wässrigen Phase wurde die DHB-Konzentration mittels HPLC bestimmt, um dadurch die extrahierte DHB-Menge berechnen zu können.

Bei der Extraktion mit Alamin-336 wurden 8,5 ml Alamin-336 mit 6,5 ml organischem Lösungsmittel (Toluol, Chloroform, 1-Decanol oder 1-Diisobutylketon) gemischt. 10 ml einer ca. 300 mmol·l⁻¹ DHB-Lösung (aus nicht eingengtem Fermentationsmedium) bzw. 10 ml mit kristallinem DHB hergestellte DHB-Lösung (ca. 70 mmol·l⁻¹) wurde mit dem Lösungsmittelgemisch im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Die DHB-Konzentration wurde in

der wässrigen Phase vor und nach der Extraktion mittels HPLC bestimmt, um dadurch die extrahierte DHB-Menge berechnen zu können.

3.15 Adsorption an Amberlite-Produkte

Als alternative Aufarbeitungsmethode wurde versucht, DHB an verschiedene Adsorbentien unspezifisch zu binden und danach mit Lösungsmittel zu desorbieren.

Die folgende Materialien wurden verwendet:

- **Amberlite XAD1600T**: Divinylbenzol-Polymer
- **Amborsorb 563** : Kohlenstoff-Adsorbens
- **Amberlite XAD7HP** : Acryl-Polymer

Jeweils 5 g des entsprechenden Adsorbens wurde in eine Glassäule mit Fritte (Porengröße 3) gefüllt. Zunächst wurde das Material mit Methanol (entsprechend einer Menge von 20 Bettvolumen) gespült. 15 ml DHB-Fermentationslösung mit relativ hohem Salzgehalt (ca. 120 mmol·l⁻¹) wurde langsam auf die Säule gegeben und durchtropfen gelassen. Nach der Adsorption wurde die Säule langsam mit 10 ml bidest. Wasser gespült. Bei den Adsorbens Amberlite XAD1600T und Amberlite XAD7HP wurde im ersten Schritt das beladene Säulenmaterial mit einer Lösung bestehend aus 10% Acetatpuffer und 90 % Methanol eluiert. Die zweite Elution erfolgte mit einer Lösung bestehend aus 50% Acetatpuffer und 50 % Methanol. Bei dem Adsorbens Amborsorb 563 diente Methanol als Elutionsmittel.

Zwischen den einzelnen Schritten (Spülung mit Methanol, Adsorption, Spülung, Desorption) wurde das Adsorbens durch Filtration von der jeweiligen Lösung abgetrennt.

3.16 Adsorption an Anionenaustauscher

Das DHB hat auf Grund seiner aziden COOH-Funktion eine Affinität zu Anionenaustauschern. Um diese Eigenschaft auszunutzen, wurden mehrere Anionenaustauscher auf ihre Bindefähigkeit getestet:

- **Amberjet 4400:** quartäres Amin (Divinylbenzol/Styrol-Copolymer):
starker Anionenaustauscher
- **Amberlite IRA-458:** modifiziertes quartäres Amin (Acryl-Copolymer):
starker Anionenaustauscher
- **Amberlite IRA-67:** modifiziertes tertiäres Amin (Acryl-Copolymer):
schwacher Anionenaustauscher

Von den drei verschiedenen Amberlite-Produkten wurden bei Vorversuchen jeweils 20 g mit 30 ml 100 mmol·l⁻¹ Essigsäure konditioniert. Nach Abfiltrieren wurde mit 30 ml bidest. Wasser gewaschen. 20 ml einer 30 mmol·l⁻¹ DHB-Lösung (mit geringem Salzgehalt) wurde aus einer Fermentationslösung durch Verdünnung mit bidest. Wasser hergestellt, zum jeweiligen abfiltrierten, konditionierten Anionenaustauscher gegeben und anschließend 15 Minuten gerührt. Nach der Adsorption wurden die Anionenaustauscher abfiltriert und mit 30 ml bidest. Wasser gespült. Nach Abtrennen der Spüllösung wurde das DHB mit 30 ml 1 M NaOH-Lösung eluiert.

Um die Adsorptionskinetik zu bestimmen, wurden jeweils 20 g der jeweiligen Anionenaustauscher mit 20 ml Essigsäure (0,5 mol/l) konditioniert und danach mit 30 ml bidest. Wasser gewaschen. 20 ml DHB-Lösung aus einem Fermentationsmedium mit geringen Salzgehalt (s. Kapitel 4.1.1) wurden auf das Material gegeben, mit einem Magnetstab gerührt und alle 3-5 Minuten Proben genommen. Die DHB-Konzentration im Überstand wurde mittels HPLC (s. Kapitel 3.11) bestimmt. Zwischen den einzelnen Schritten wurde der Anionenaustauscher durch Filtration von der jeweiligen Lösung abgetrennt.

Um die Adsorptions- und Desorptionsisothermen zu bestimmen, wurden jeweils 20 g des jeweiligen Anionenaustauschers im Becherglas mit 20 ml Essigsäure (0,5 mol/l) konditioniert und danach mit 30 ml bidest. Wasser gewaschen. Jeweils 20 ml DHB-haltiges Medium mit geringem Salzgehalt und verschiedenen Konzentrationen an DHB (10; 20; 50; 100; 150; 250; 300; 400; 500 mmol·l⁻¹) wurden auf das Material gegeben, mit einem Magnetstab gerührt und nach 15 Minuten eine Probe genommen. Die DHB-Konzentration im Überstand wurde mittels HPLC (s. Kapitel 3.11) bestimmt und basierend auf dem gemessenen Konzentrationsunterschied die Beladung des Anionenaustauschers berechnet. Nach der Adsorption wurde DHB mit 20 ml 1 M NaOH desorbiert und im Eluat die DHB-Konzentration gemessen.

3.17 Adsorption an Cyclodextrine-Polymer TH 106 BA

150 ml $15 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ultrafiltrierte DHB-haltige Lösung (enthält Proteine nur unter 1000 kDa), die aus einem verdünnten Fermentationsmedium mit $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer stammte, wurde mit 3, 6, oder 15 g Cyclodextrine-Polymer gemischt. Über Nacht wurde mit einem Magnetrührstab gerührt und mittels HPLC die DHB-Konzentration in dem abfiltrierten Überstand gemessen.

Die Ultrafiltration wurde mittels eines Filtermoduls (Typ. Nr. 600313/0,4 l) der Fa. Berghof (Reutlingen) bei 10 bar und Raumtemperatur durchgeführt. Als Filter wurde Ultracell™ (regenerierte Zellulose, Porengröße $0,22 \mu\text{m}$, NMGG: 1000 kDa) verwendet.

3.18 Chemikalien

Es wurden handelsübliche Chemikalien der Firmen Fluka (Buchs, Schweiz), Lancaster (Mühlheim am Main), Merck (Bruchsal), R-Biopharm (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) verwendet. Die Adsorbentien und Anionenaustauscher stellte die Firma Rohm&Haas freundlicherweise zur Verfügung. Alamin-336 wurde von Degussa-Hüls geliefert. Das Cyclodextrin-Polymer TH 106 BA wurde von T. Höfler (Fraunhofer-Institut für Grenzflächen und Bioverfahrenstechnik) zur Verfügung gestellt.

4 Experimente und Ergebnisse

4.1 Untersuchung zur Herstellung von Dihydrodihydroxybenzoat (DHB) im Hinblick auf die technische Phenolherstellung

*4.1.1 Herstellung von Dihydrodihydroxybenzoat (DHB) mit *Ralstonia eutropha* B9*

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein biotechnisches Verfahren zur Herstellung von Phenol auf der Basis von Toluol zu entwickeln. Wie in der Einleitung ausgeführt, gibt es drei verschiedene Möglichkeiten der Phenolherstellung, bei denen entweder Benzol oder Toluol als Ausgangsverbindung (Cosubstrat) dient. Aufgrund der internen Cofaktorregenerierung bei der Oxidation von Toluol und der Tatsache, dass Bakterien gegenüber Toluol toleranter sind als gegenüber Benzol, stellte der Weg ausgehend von Toluol den Erfolg versprechendsten dar. Die Herstellung von Phenol aus Toluol basiert auf einem zweistufigen Prozess, bei dem zunächst Dihydrodihydroxybenzoat (DHB) aus Toluol bakteriell gebildet wird. Anschließend wird das DHB durch Zugabe von Säure chemisch zu Phenol umgewandelt. Der Stamm, der die Umwandlung von Toluol zu DHB durchführen kann, stand zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch nicht zur Verfügung. Deshalb wurde zunächst der Stamm *Ralstonia eutropha* B9 für die Optimierung der Herstellung und Gewinnung von DHB verwendet. *Ralstonia eutropha* B9, früher als *Alcaligenes eutrophus* B9 beschrieben, ist eine Mutante des Benzoatverwerters *Ralstonia eutropha* 335. Der Stamm B9 ist nach dem ersten Oxidationsschritt im Benzoatkatabolismus blockiert und häuft DHB im Medium an (Johnson und Stanier, 1971).

Reiner und Hegeman (1971) haben als Erste die Verbindung Dihydrodihydroxybenzoat (DHB) identifiziert. Der Stamm *Ralstonia eutropha* B9 wurde mit Succinat als Wachstumssubstrat kultiviert und mit dem Cosubstrat Benzoat induziert. Nach der Umsetzung wurde DHB durch Extraktion mit Ethylacetat aus dem Medium isoliert, und dieses durch seine spektroskopischen und analytischen Eigenschaften charakterisiert. Der Schmelzpunkt von DHB liegt bei 85 °C, sein UV-Spektrum zeigt bei pH = 7 in Wasser ein Absorptionsmaximum bei $\lambda_{\text{max}} = 262 \text{ nm}$ ($\epsilon = 3350$).

Die Herstellung von DHB wurde zunächst im Schüttelkolbenmaßstab untersucht. Der Stamm *Ralstonia eutropha* B9 wurde in Komplexmedium (s. Kapitel 3.2.2) gezüchtet, weil beim direkten Übergang von einer Agarplatte in Minimalmedium mit Succinat (s. Kapitel 3.2.1)

kein Wachstum erfolgte. Der Stamm wurde in Minimalmedium mit $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Succinat als Wachstumssubstrat im Verhältnis 1:40 transferiert. Der Stamm kann nach Literaturangaben (Reiner & Hegeman, 1971) Fructose oder Succinat als Wachstumssubstrat und Energiequelle verwerten. Für die ersten Versuche wurde Succinat verwendet. Über die Verwendung als Wachstumssubstrat hinaus wird Succinat für die Oxidation des Cosubstrats Benzoat benötigt und liefert für die mischfunktionelle Dioxygenase die erforderlichen Reduktionsequivalente (s. Abb. 2.5). Da die Benzoat-Dioxygenase nicht konstitutiv exprimiert wird, wurden den Anzuchtulturen (s. Kapitel 3.5) jeweils $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Benzoat zugesetzt. Um den toxischen Einfluss des Benzoats auf das Wachstum der Zellen und den Umsatz des Cosubstrats zu untersuchen, wurde Benzoat in vier verschiedenen Konzentrationen zu den Bakterienkulturen gegeben: 5, 10, 15 oder $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Bei Konzentrationen von 5 und $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ war im Vergleich zu einer Kontrolle ohne Benzoat kein Unterschied im Wachstumsverhalten feststellbar. Nach 15 Stunden war in beiden Fällen die gesamte Benzoatmenge zu DHB als einzigem Produkt umgesetzt. Allerdings lief die Reaktion bei $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Benzoat schneller. Bei einer Benzoatkonzentration von $15\text{-}20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ erfolgte innerhalb von 24 Stunden kein Wachstum und dadurch auch keinen Umsatz von Benzoat. Aus diesen Grund erfolgte die Bakterienanzucht immer mit $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ oder $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Benzoat. Wegen der relativ niedrigen Toxizitätsgrenze des Cosubstrats Benzoat (ca. $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) empfahl es sich, die Reaktorversuche (s. Kapitel 3.6) im sogenannten Fedbatch-Prozess durchzuführen. Gegenüber dem klassischen Batch-Prozess, in dem die entsprechenden Substanzen von Anfang an vorgelegt werden, sollten bei diesem Verfahren die Substanzen während des Prozesses so zudosiert werden, dass die Konzentrationen einen gewissen Level nicht überschreiten. Nach Beendigung der Zugabe wird das Edukt, wie im Batch-Prozess, annähernd auf Null abgebaut (Storhas, 1994).

Des Weiteren konnte davon ausgegangen werden, dass Benzoat in einer Zulaufkonzentration von $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ bei Fedbatch-Prozessen zudosiert werden kann.

Nach den Literaturangaben (Johnson und Stanier, 1971) sollte der Stamm *Ralstonia eutropha* B9 das Benzoat in stöchiometrischer Menge zu DHB umsetzen. Die Umsatzaktivität des Stammes wurde in Schüttelkolbenversuchen mit ganzen Zellen bestimmt.

Die Zellen wurden in Komplexmedium (s. Kapitel 3.2.2) angezogen und anschließend in Minimalmedium (s. Kapitel 3.2.1) im Verhältnis 1:40 transferiert. Sie wurden über Nacht mit $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Succinat und $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Benzoat als Induktionsmittel inkubiert. Nach der Zellernte erfolgte die Umsetzung von Benzoat mit sogenannten Ruhezellen (Abb. 4.1).

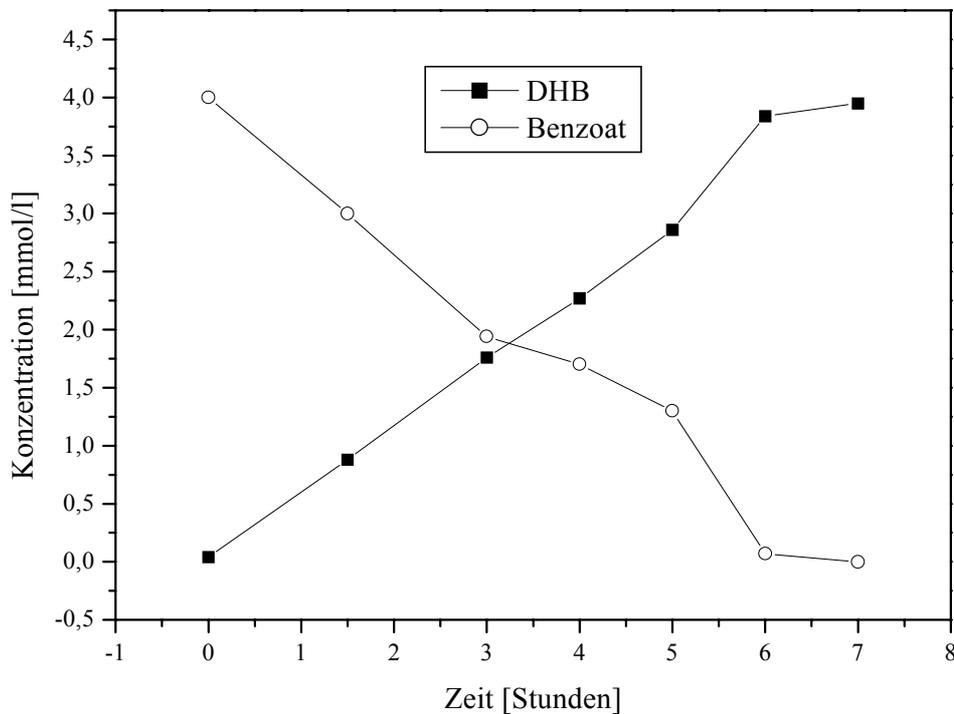


Abbildung 4.1 Umsetzung von Benzoat zu DHB mit *Ralstonia eutropha* B9

Der Stamm wurde in 20 ml Komplexmedium angezüchtet. Die Zellen wurden in Minimalmedium (20 ml) transferiert und im Gegenwart von $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Succinat und $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Benzoat über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden am nächsten Tag geerntet und der Umsatz von $4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Benzoat im Gegenwart von $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Succinat mit diesen Ruhezellen durchgeführt.

Bei Fedbatch-Fermentationen tritt oft das Problem auf, dass das entstandene Produkt ab einer bestimmten Konzentration auf die Zellen toxisch wirkt. Um die Toxizitätsgrenze von DHB für den Umsatz von Benzoat bei *Ralstonia eutropha* B9 zu bestimmen, wurden Wachstumsversuche bei unterschiedlichen DHB-Konzentrationen durchgeführt. Dabei wurde eine Vorkultur von *Ralstonia eutropha* B9 in Komplexmedium (s. Kapitel 3.2.2) gezüchtet, die im Verhältnis von 1:40 ($\text{OD}_{546\text{nm}} \approx 1$) in Minimalmedium (s. Kapitel 3.2.1) mit $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Succinat und verschiedenen DHB-Konzentrationen (25 , 75 und $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) transferiert wurde. Anschließend wurde das Wachstum von *Ralstonia eutropha* B9 verfolgt. Bei allen Bakterienkulturen mit DHB war kein Unterschied im Wachstumsverhalten zu einer Kontrolle ohne DHB feststellbar. *Ralstonia eutropha* B9 kann also mindestens $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHB im Medium ohne Beeinträchtigung des Wachstums tolerieren.

Basierend auf den Untersuchungen im Schüttelkolbenmaßstab wurden mit dem Stamm *Ralstonia eutropha* B9 Versuche in einem Bioreaktor (s. Kapitel 3.6) durchgeführt (Abb. 4.2). Für die Reaktorversuche wurde am Vortag ein Komplexmedium (s. Kapitel 3.2.2) hergestellt, mit dem die Anzucht im Reaktor gestartet wurde. Als Medium für die Massenkultivierung wurde $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer mit Mineralsalzen und Succinat als Kohlenstoff- und Energiequelle anstelle von Komplexmedium verwendet, weil die spätere Produktaufarbeitung einfacher ist, wenn der Matrixeffekt der Lösung am kleinsten ist. Als Induktionsmittel wurde $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Benzoat zu Beginn der Fermentation zugegeben. Die weitere Cosubstratzugabe erfolgte erst nach 14 Stunden, wenn das zugegebene Benzoat schon vollständig zu DHB umgesetzt war. Der Stamm wuchs mit einer Wachstumsrate (μ_{\max}) von $0,46 \text{ h}^{-1}$ und einer Verdopplungszeit (t_d) von 1,5 Stunden in den ersten 15 Stunden auf $\text{OD}_{546 \text{ nm}} = 3,6$ (entspricht $1,2 \text{ g/l}$ Trockenmasse, s. Kapitel 3.9). Anschließend wurde Succinat mit einer Rate von $1,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ zugegeben, um die Reduktionsäquivalente für die Oxidation des Benzoats zur Verfügung zu stellen. Anschließend nahm die Biomasse nur noch geringfügig zu, die Succinatzugabe war also so dosiert, dass ein Biomasseerhalt gesichert war. Ebenso reichten die Mengen aus, um die kontinuierliche Bildung des DHB zu ermöglichen, wie in Abb. 4.2 zu erkennen ist. Der Umrechnungsfaktor für die Trockengewichtbestimmung bei *Ralstonia eutropha* B9 beträgt bezogen auf $\text{OD}_{546 \text{ nm}} = 1$, was einer Trockenmasse von $0,35 \text{ g/l}$ entspricht (s. Kapitel 3.9).

Am Ende der Fermentation wurde eine braune Färbung der Fermentationslösung beobachtet, die auf die Akkumulation von verschiedenen Metaboliten zurückzuführen war, die durch Autooxidation und Polymerbildung die Lösung dunkel färbten. Es könnte sich hierbei z.B. um Brenzcatechin gehandelt haben, was aber bei der HPLC-Analyse (s. Kapitel 3.11) nicht beobachtet werden konnte. Allerdings ist hierbei zu berücksichtigen, dass die Proben am Ende der Fermentation stark verdünnt werden mussten und Brenzcatechin einen niedrigen molaren Extinktionskoeffizienten besitzt.

Die Zugabe von Benzoat erfolgte entsprechend den Benzoatumsatzraten, die regelmäßig durch HPLC-Messungen bestimmt wurden. Im Durchschnitt lag die Umsatzrate bei $2,3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, deshalb wurde möglichst nicht mehr als $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Benzoat (Endkonzentration des Benzoats im Reaktor nach der Zugabe) auf einmal zugegeben. Da die Kontrolle der Zugabe über Nacht schwierig war, kam es einmal vor, dass eine Überdosierung des Benzoats erfolgte (Abb. 4.2, Zeitpunkt 45 Stunden). Diese zufällige Überdosierung lieferte aber die wichtige Information, dass unter diesen Bedingungen im Reaktor die Zellen sogar $16 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ tolerieren können, eine Menge, die vorher im Schüttelkolbenversuch schon zu toxisch war.

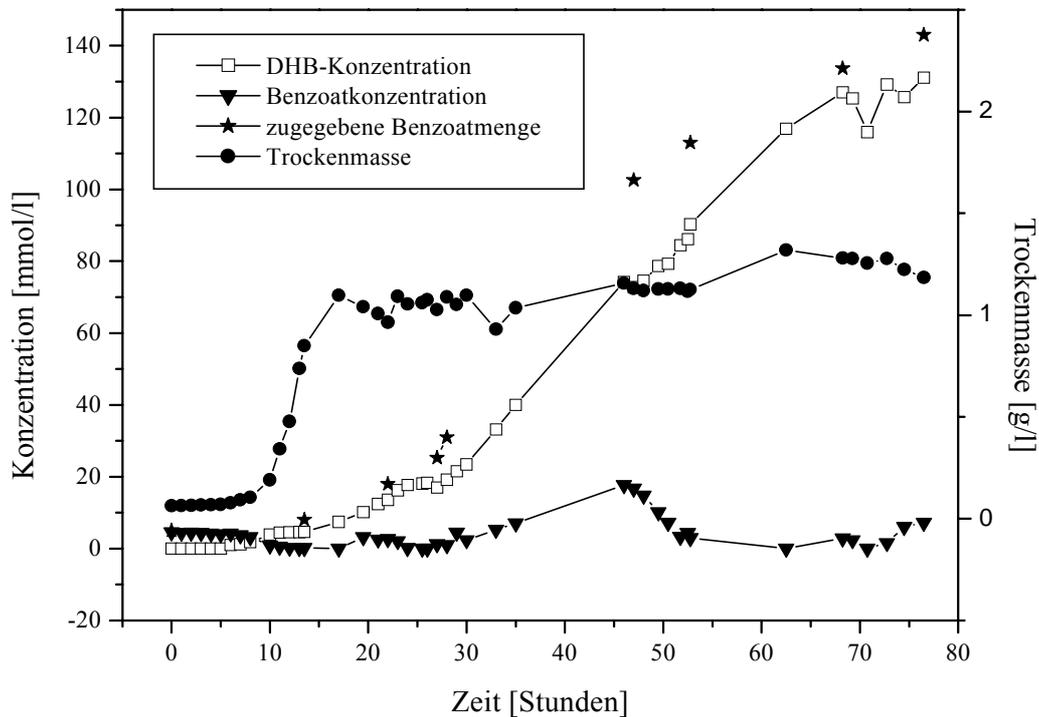


Abbildung 4.2 Fedbatch-Fermentation von Benzoat mit *Ralstonia eutropha* B9 in $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer und mit Succinat als Auxiliarsubstrat

1400 ml $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer wurde in einem 2 l Reaktor (s. Kapitel 3.6) mit 40 ml Vorkultur (Komplexmedium ohne Induktionssubstrat, s. Kapitel 3.2.2) beimpft. Die Ausgangskonzentrationen im Reaktor waren die folgenden: $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Succinat und $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Benzoat, Mineralsalzmedium verdünnt (s. Kapitel 3.2.1). Während des gesamten Versuchs wurde die Benzoatkonzentration mittels HPLC (s. Kapitel 3.11) gemessen und so nachdosiert, dass sie eine Konzentration von $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ nicht überschritt. Succinat wurde im Durchschnitt mit ca. $1,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ dosiert.

In Intervallen von 2-3 Stunden wurden Benzoat bzw. Succinat entsprechend mit ca. $1,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (Benzoat) bzw. $1,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (Succinat) zugegeben. In Abb. 4.2 ist die zugegebene Benzoatmenge dargestellt, die aus der Konzentration und Volumen der zufließenden Benzoatlösung berechnet wurde (s. Kapitel 3.6).

Bei den ersten Versuchen wurde Succinat als Kohlenstoffquelle verwendet, aber mit der Zeit wurde klar, dass ein anderes Substrat, das nicht im Na-Salz-Form vorliegt, für die technische Anwendung günstiger ist. Das Problem dabei ist, dass nach dem Abbau pro Mol Na_2 -Succinat zwei Mol NaOH übrig bleiben, was bei einer mehrtägigen Fermentation eine starke pH-

Änderung verursacht. Trotz der hohen Pufferkapazität des $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffers musste der pH-Wert ständig mit 5 mol/l HCl-Lösung auf 7,4 reguliert werden. Das führte dazu, dass nach 2-3 Tagen die Salzkonzentration so hoch war, dass die Zellen suboptimale Lebensbedingungen hatten, was zur Abnahme der Umsatzrate von $0,3$ auf $0,05 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ führte. Der Stamm setzte Benzoat 72 Stunden lang mit einer durchschnittlichen Umsatzrate von $0,3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (max. Umsatzrate : $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) um. Da mit der Abnahme der Umsatzrate auch die Biomasse ($\text{OD}_{546\text{nm}}$) im Reaktor deutlich abnahm, wurde der Versuch abgebrochen (Abb. 4.2).

Die durchgeführte Fermentation ist mit zwei Koeffizienten zu beschreiben. Der sogenannte Ertragskoeffizient ($Y_{P/C}$) bestimmt aus der umgesetzten Cosubstratmenge (Benzoat) und der entstandenen Produktmenge (DHB) den Ausbeutefaktor der Umsetzung (4.1).

$$Y_{P/C} = \frac{\text{Produkt} [\text{mmol/l}]}{\text{Cosubstrat}_{\text{eingesetztes}} [\text{mmol/l}] - \text{Cosubstrat}_{\text{Rest}} [\text{mmol/l}]} \quad (4.1)$$

Bei diesem Versuch wurde aus $151 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Benzoat $140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHB gebildet. Mit einer Restcosubstratmenge von $7 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ergibt sich $Y_{P/C} = 0,97$.

Der cometabolische Ausbeutekoeffizient ($Y_{C/S}$) weist auf die verbrauchte Substratmenge (Succinat) hin, die für die Herstellung von 1 mmol DHB nötig war (4.2).

$$Y_{C/S} = \frac{Y_{P/C} \cdot \text{Cosubstrat}_{\text{eingesetztes}}}{\text{Substrat}} \quad (4.2)$$

Bei diesem Versuch wurde $60 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Succinat für die Herstellung von $140 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHB verbraucht, was ein $Y_{C/S} = 2,44$.

Nicht nur wegen des Osmoseproblems, sondern auch wegen der Schwierigkeiten bei der Aufarbeitung ist es nötig geworden, eine neue Fermentationsmethode zu entwickeln. Wie später erklärt wird (s. Kapitel 4.1.3.5), ist es für die Aufarbeitung auch ungünstig, wenn das Medium am Ende der Fermentation zu viel Salze (Phosphate, NaCl) enthält. Aus diesem Grund wurde die Konzentration des Phosphatpuffers im Fermenter von $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ auf $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ reduziert. In Vorversuchen im Schüttelkolbenmaßstab zeigte sich, dass die Wachstumsrate mit Fructose und die Umsatzraten von Benzoat gleich groß waren.

Um das Problem mit der pH Kontrolle im Fermenter zu lösen, wurde außerdem das verwendete Substrat geändert. Unter optimalen Bedingungen sollte Fructose als Auxiliarsubstrat vollständig bis zu CO₂ abgebaut werden und es blieben wie im Falle des Succinates kein NaOH übrig. Die HCl-Titrierlösung wurde nicht mehr an den Reaktor angeschlossen. DHB ist etwas azider als Benzoat, deshalb wurde eine 1 M NaOH-Lösung benötigt, um die leichte pH-Änderung auszugleichen. Es hat die Handhabung der pH-Kontrolle wesentlich vereinfacht: die Korrosion durch HCl-Lösung an den Reaktorteilen und die Unfallgefahr war geringer geworden.

Was erstaunlich bei diesem Verfahren war, ist die Tatsache, dass die durchschnittliche Umsatzrate für Benzoat höher war (0,48 g·l⁻¹·h⁻¹ anstelle von 0,3 g·l⁻¹·h⁻¹), und in manchen Zeiträumen erreichte sie sogar einen Wert von 0,92 g·l⁻¹·h⁻¹. Die Zellen waren auch länger aktiv und die Fermentation konnte 7 Tage anstelle von 3 Tagen mit guten Benzoatumsatzraten betrieben werden. Die maximale Produktkonzentration war bei diesem Verfahren mit 300 mmol·l⁻¹ doppelt so hoch wie bei der alten Methode. Am Ende der Fermentation hat das Medium nur die unbedingt nötige Salzkonzentration enthalten, was die weitere Aufarbeitung wesentlich vereinfacht hat (s. Kapitel 4.1.3.7).

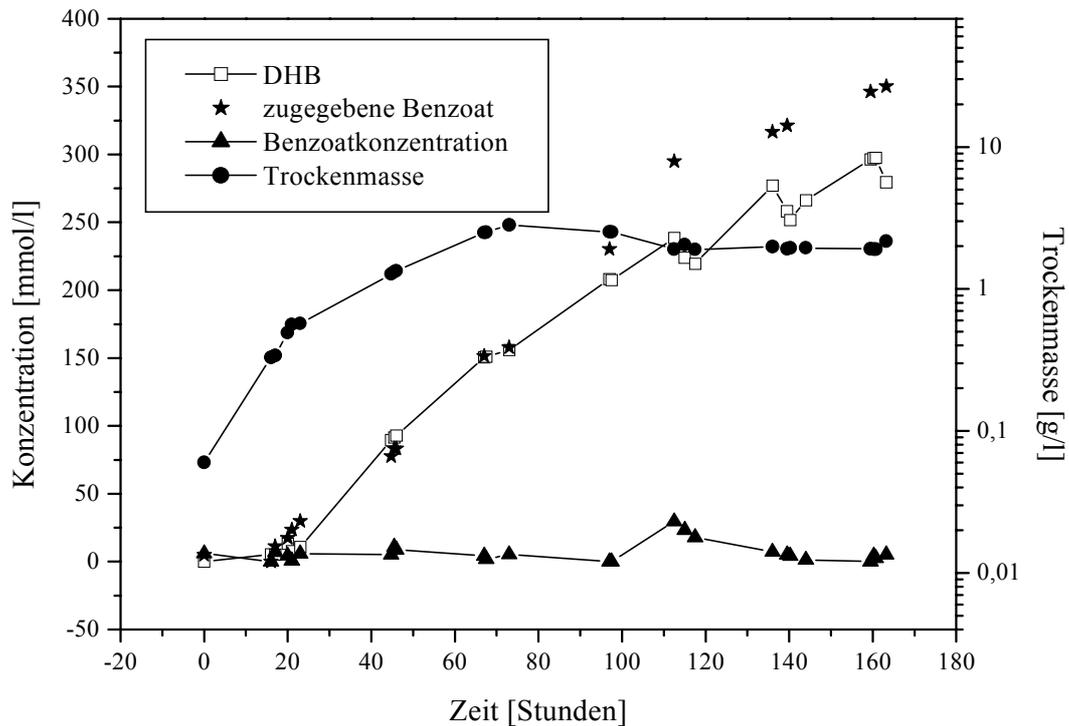


Abbildung 4.3 Fedbatch-Fermentation von Benzoat mit *Ralstonia eutropha* B9 in $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer und mit Fructose als Auxiliarsubstrat

1400 ml $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer wurde in einem 2 l Reaktor mit 40 ml Vorkultur (Komplexmedium ohne Induktionssubstrat) beimpft. Die Ausgangskonzentrationen im Reaktor waren die folgenden: $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Fructose und $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Benzoat, verdünntes Mineralsalzmedium (s. Kapitel 3.2.1). Während des gesamten Versuchs wurde die Benzoatkonzentration mittels HPLC (s. Kapitel 3.11) gemessen und so nachdosiert, dass sie eine Konzentration von $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ nicht überschritt. Fructose wurde im Durchschnitt mit ca. $0,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ dosiert.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen in Schüttelkolben toleriert *Ralstonia eutropha* B9 in den Fedbatch-Fermentationen das Cosubstrat Benzoat relativ gut. Deshalb konnte der Stamm in manchen Fällen eine Überdosierung von $30\text{-}40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ überleben. Um jedoch die Zellen ohne Aktivitätsverlust möglichst lange verwenden zu können, empfiehlt es sich, die Benzoatkonzentration zwischen $5\text{-}15 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ zu halten. Auf die Aktivität des Benzoat-Dioxygenase-Enzymes zeigt eine zu niedrige Konzentration des Cosubstrates dagegen einen negativen Einfluss; sie sollte ständig über $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ sein. Wenn die Fermentationslösung für 1-2 Stunden kein Benzoat mehr enthielt, reduzierte sich die Umsatzrate sofort deutlich. Nach erneuter Zugabe von Na-Benzoesäure dauerte es einige Stunden, bis die Zellen ihr Enzym wieder

auf ihre höchste Kapazität induziert hatten. Diese Fütterungsstrategie hatte auch einen positiven Effekt auf die Aktivität der Benzoat-Dioxygenase. War die Benzoatkonzentration zu niedrig ($< 5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) wurde Benzoat mit geringerer Aktivität ($0,16 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) als bei höheren Konzentrationen ($0,67 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) umgesetzt. Das bedeutet also, dass während der gesamten Fermentation eine ständige Kontrolle der Benzoatkonzentration nötig wäre, was mit der vorhandenen apparativen Ausstattung nicht zu realisieren war.

In Intervallen von 2-3 Stunden wurden Benzoat bzw. Fructose entsprechend mit ca. $1,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (Benzoat) bzw. $0,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (Fructose) zugegeben. In Abb. 4.3 ist die zugegebene Benzoatmenge dargestellt, die aus Konzentration und Volumen der zufließenden Benzoatlösung berechnet wurde (s. Kapitel 3.6).

Bei diesem Versuch wurde aus $350 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Na-Benzoat $297 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHB hergestellt. Mit einer Restsubstratmenge von $4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ergibt sich $Y_{P/C} = 0,85$ (Gleichung 4.1). Für die Herstellung von $297 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHB wurde $142 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Fructose verbraucht. Das ergibt $Y_{C/S} = 2,08$ (Gleichung 4.2).

Das Benzoat wurde bei beiden oben beschriebenen Fermentationen (Abb. 4.2 und Abb. 4.3) bis ca. 25 bzw. 70 Stunden stöchiometrisch zu DHB umgesetzt, danach sank die Ausbeute auf ca. 85%. Es stellte sich die Frage, ob für den Ausbeuteverlust eventuell eine Kontamination verantwortlich war. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden aus dem Reaktor Proben entnommen und mittels Verdünnungsausstrich (s. Kapitel 3.6) geprüft. Bis zum Ende der Fermentation konnte keine Kontamination festgestellt werden.

Als weiterer Grund für die Abnahme der Ausbeute wurde vermutet, dass sich der Stamm während der langen Fermentation genetisch verändert hatte. So könnten Revertanten in der Lage sein, ein Teil des Benzoates abzubauen. Um dies zu klären, wurden am 5. Tag der Fermentation Zellen aus dem Reaktor entnommen, gewaschen und mit diesen ein Benzoatumsatz-Versuch durchgeführt (Abb. 4.4).

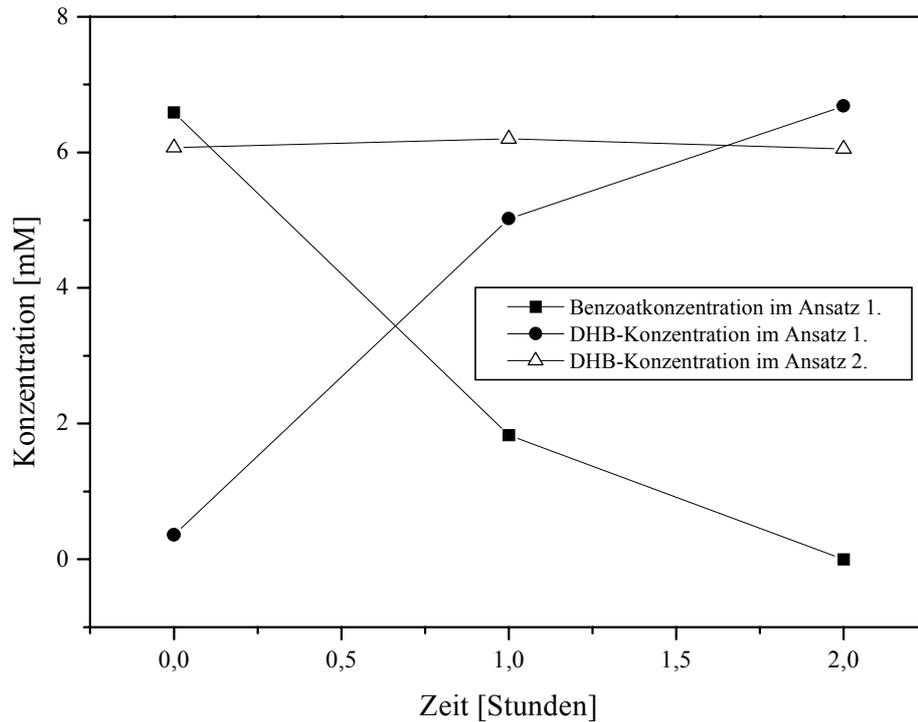


Abbildung 4.4 Umsatz von Benzoat mit Zellen vom *Ralstonia eutropha* B9, die nach 140 h der Fermentation (s. Abb. 4.3) entnommen wurden

100 ml Lösung wurden aus dem Reaktor entnommen, abzentrifugiert, einmal mit Phosphatpuffer ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) gewaschen und erneut abzentrifugiert. Folgende Substrate wurden mit den resuspendierten Zellen (je 1 ml, s. auch Kapitel 3.5) durchgeführt. Ansatz 1: $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Benzoat + $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Fructose in $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer, Ansatz 2: $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHB + $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Fructose in $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer. Die Ansätze wurden bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ geschüttelt und stündlich die Benzoat- bzw. DHB-Konzentration mittels HPLC (s. Kapitel 3.11) gemessen.

Mit diesem Versuch zeigte sich, dass es nicht zur Bildung von Revertanten gekommen war. Benzoat wurde stöchiometrisch zu DHB umgesetzt, im Ansatz mit DHB wurde kein Umsatz dieser Verbindung festgestellt.

4.1.2 Herstellung von DHB mit *Pseudomonas putida Idaho BDH2*

Für die Herstellung von DHB sollte als Ausgangssubstrat Toluol verwendet werden. Von A. Germer (pers. Mitteilung) wurde durch genetische Modifikation ein Bakterienstamm konstruiert (*Pseudomonas putida Idaho BDH2*), bei dem zwei nachgewiesene DHB-

Dehydrogenasen blockiert wurden. Bei dem Wildtypstamm handelt es sich um einen toluoltoleranten Toluolverwerter (Cruden *et. al.*, 1992). Der Stamm sollte also DHB aus Toluol bzw. Benzoat produzieren können. In Vorversuchen im Schüttelkolben zeigte sich, dass dieser tatsächlich Benzoat zu DHB umsetzt. Aus $2,86 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Benzoat wurde $1,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHB gebildet.

In Vorversuchen wurde bei diesem Stamm die Toleranz gegenüber Benzoat geprüft. Es wurden Zellen in Minimalmedium mit $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Glucose und $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Benzoat als Induktionsmittel gezüchtet und mit den nach Zentrifugation gewonnenen Zellen bei verschiedenen Benzoat-Konzentrationen (5, 10, 15, 20 und $30 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) Umsatzversuche durchgeführt (s. Kapitel 3.5).

In den Ansätzen mit 5, 10 und $15 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ wurde Benzoat mit gleicher Umsatzrate ($1,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) umgesetzt, bei $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ lief der Umsatz langsamer ($0,7 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) und bei $30 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ war kein Umsatz von Benzoat feststellbar.

Um diesen genetisch veränderten Bakterienstamm mit *Ralstonia eutropha* B9 zu vergleichen wurde eine Fedbatch-Fermentation analog dem in Kapitel 4.1.1 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Es wurde Minimalmedium mit $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer (s. Kapitel 3.2) verwendet und als Auxiliarsubstrat diente Glucose (Abb. 4.5).

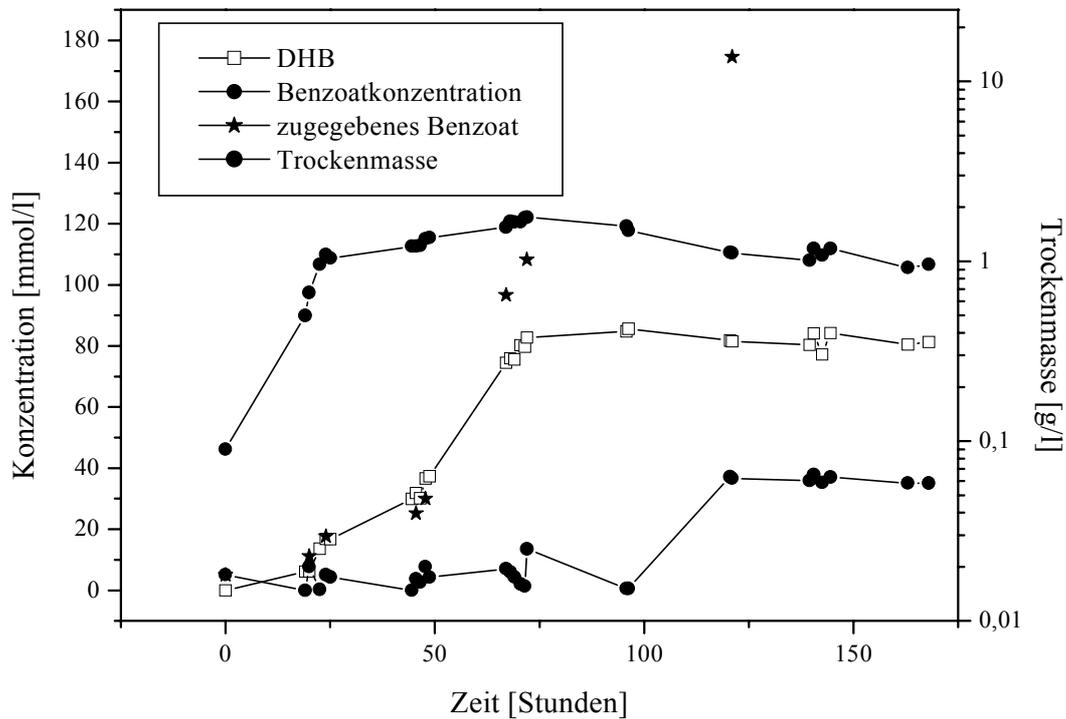


Abbildung 4.5 Fedbatch-Fermentation von Benzoat mit *Pseudomonas putida* Idaho BDH2 in $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer und mit Glucose als Auxiliarsubstrat

1400 ml $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer wurde in einem 2 l Reaktor mit 40 ml Vorkultur (Komplexmedium ohne Induktionssubstrat) beimpft. Die Ausgangskonzentrationen im Reaktor waren die folgenden: $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Glucose und $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Na-Benzoesäure, Mineralsalzmedium verdünnt (s. Kapitel 3.2.1). Während des gesamten Versuchs wurde die Benzoatkonzentration mittels HPLC gemessen und so nachdosiert, dass sie eine Konzentration von $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ nicht überschritt. Glucose wurde im Durchschnitt mit ca. $1,6 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ dosiert.

Innerhalb von 24 Stunden hatten die Zellen eine $OD_{546 \text{ nm}} = 2,6$ erreicht (entspricht einer Trockenmasse von $1,2 \text{ g/l}$) und bis zum Zeitpunkt von 72 Stunden lief die Umsetzung von Benzoat problemlos. Dann wurde ca. $13 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Benzoat ins Medium gegeben, was die Zellen innerhalb von 24 Stunden umsetzten. Überraschenderweise war aber nur eine geringe Menge von DHB ($3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) entstanden. Die weitere Benzoatzugabe erfolgte über Nacht, während der die aktuelle Umsatzrate nicht kontrollierbar war. Dabei kam es zu einer Überdosierung von Cosubstrat. Danach fand eine weitere Umsetzung des Cosubstrates vermutlich wegen der Inaktivierung der Zellen an den letzten 2 Tagen des Versuchs nicht mehr statt. Da der Bakterienstamm erst gegen Ende der Arbeit zur Verfügung stand, konnten aus zeitlichen Gründen nach 5 Reaktorversuchen keine weiteren Fermentationen durchgeführt werden, um die Produktion von DHB zu optimieren.

In Intervallen von 2-3 Stunden wurde Benzoat bzw. Glucose entsprechend mit ca. $1,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (Benzoat) bzw. $1,6 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (Glucose) zugegeben. In Abb. 4.5 ist die zugegebene Benzoatmenge dargestellt, die aus Konzentration und Volumen der zufließenden Benzoatlösung berechnet wurde (s. Kapitel 3.6).

Bei diesem Versuch wurde $78 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHB aus $174 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Benzoat gebildet. Mit einer Restsubstratmenge von $34 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ergibt sich $Y_{P/C} = 0,56$ (Gleichung 4.1). Für die Herstellung von $78 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHB wurde $214,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Glucose verbraucht, was ein $Y_{C/S} = 0,36$ ergibt (Gleichung 4.2).

Um die Fermentationen mit *Ralstonia eutropha* B9 und *Pseudomonas putida* Idaho BDH2 zu vergleichen, wurden die charakteristischen Daten der Fermentationen berechnet (Tab. 4.1).

Tabelle 4.1 Vergleich von Fermentationen mit Benzoat als Cosubstrat

Daten / Stamm	<i>Ralstonia eutropha</i> B9	<i>Pseudomonas putida</i> Idaho BDH2
Maximale Umsatzrate [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$]	0,92	0,36
Durchschnittliche Umsatzrate [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$]	0,48	0,18

Im Vergleich zum Stamm *Ralstonia eutropha* B9 war folgendes zu beobachten:

- Bei derselben Mineralsalzzugabe (limitierende Faktor beim Wachstum) erreichte der Stamm B9 eine höhere $\text{OD}_{546 \text{ nm}}$ (s. Kapitel 3.7) als der Stamm BDH2
- Werden die Umsatzraten auf die aktuelle Trockenmasse bezogen, so hatte der B9 eine deutlich höhere Aktivität als BDH2 (Tabelle 4.1)
- Die DHB-Ausbeute der Fermentation war mit B9 signifikant höher

4.1.3 Aufarbeitung von DHB aus Fermentationslösung

Wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben, konnten mit *Ralstonia eutropha* B9 in Fedbatch-Fermentationen große Mengen an DHB gebildet werden. Nach der Fermentation liegt das Produkt allerdings in einem wässrigen Medium vor, was die Aufarbeitung des gut wasserlöslichen Produktes erschwert. Die Aufarbeitungsproblematik ist durch die

Zusammensetzung der Kulturlösung bedingt. Sie besteht aus einem Gemisch löslicher und unlöslicher Substanzen (verschiedene Salze, lysierte Zellen, Reste von Substrat oder Cosubstrat und Proteine) und dem gewünschten Produkt sowie Nebenprodukten. Damit haben die Komponenten des Stoffgemisches sämtliche nur denkbaren physikalisch-chemischen Eigenschaften.

Für die Entwicklung ökonomischer Produktionsverfahren zur technischen Isolierung und Reindarstellung von Fermentationsprodukten sind die besten Trennmethode nutzlos, wenn eine Maßstabvergrößerung nicht möglich ist. Deshalb sollte ein Aufbereitungsverfahren entwickelt werden, das auch großskalig einsetzbar ist.

Der erste Schritt beim sogenannten "down-stream processing" ist die Trennung der Zellen von der wässrigen Lösung. Diese kann im Labormaßstab durch Zentrifugation oder Filtration durchgeführt werden. Aus Zeit- und Kostengründen ist bei technischen Prozessen auch die Zentrifugation allein anwendbar. Als zweiter Schritt ist die Anreicherung des Rohproduktes wichtig, wobei eine Volumenreduktion wünschenswert ist. Der dritte Schritt besteht schließlich in der Aufreinigung des Zielprodukts.

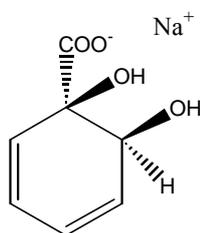
Durch Zentrifugation war es auch bei den vorliegenden Fermentationen möglich, den größten Teil der Zellen nach der Fermentation vom Medium zu trennen. Es können aber Proteine aus den lysierten Zellen in der Lösung verbleiben, die die Aufarbeitung erschweren. In den meisten Verfahren benutzt man eine relativ hohe Phosphatpufferkonzentration, die in der Aufarbeitung, besonders im Aufreinigungsschritt, zu Problemen führen kann. Wie schon in Kapitel 4.1.1 erwähnt, wurde für die aktuelle Problematik ein neues Verfahren entwickelt, das den hohen Salzgehalt des zellfreien Kulturüberstands verringert. Daneben war es sinnvoll, mit solchen Zellen, Substraten und Cosubstraten zu arbeiten, die einen schnellen und vor allem vollständigen Abbau des Substrats bzw. Umsatz des Cosubstrats erlauben, so dass möglichst wenig Nebenprodukte entstehen und wenige Zellen lysieren. Wie im vorherigen Kapitel erläutert, konnte das Ziel erreicht werden. Es wurde eine relativ hohe Produktkonzentration mit wenig störenden Salzen in der Lösung erreicht. Dadurch konnte die Fermentation in relativ kurzen Inkubationszeiten beendet werden. So war es möglich, den Matrixeffekt auf ein Minimum zu reduzieren.

Um DHB aufzureinigen, wurden verschiedene Methoden verwendet: Extraktion mit organischen Lösungsmitteln mit oder ohne Zugabe von Ionenpaarbildern, Adsorption an unspezifische Adsorbentien und Anionenaustauscher sowie Fällung mit Isopropanol.

4.1.3.1 Stabilität des *cis*-Cyclohexa-3,5-dien-1,2-diol-1-carboxylates

(Dihydrodihydroxybenzoat, DHB) in der Fermentationslösung

Bevor die Aufarbeitungsmethoden näher untersucht wurden, war es wichtig, die Stabilität von DHB unter verschiedenen Bedingungen zu prüfen. DHB (Dihydrodihydroxybenzoat) liegt als Na-Salz (Abb.4.1) vor. Es bildet farblose Kristalle mit silbrigem Glanz und löst sich sehr gut in Wasser (s. Anhang, Bild 1). In Mikroorganismen entsteht es als Metabolit beim Abbau von Benzoat oder in den Abbauwegen von Stoffen, die über Benzoat als Zwischenprodukt abgebaut werden. Ein chemische Synthese dieser Verbindung wurde bisher nicht beschrieben.



cis-Dihydrodihydroxybenzoat Na-Salz

Abbildung 4.6 Dihydrodihydroxybenzoat (DHB) Na-Salz

Aus den Fermentationen war zu schließen, dass DHB unter neutralen Bedingungen stabil ist. Dadurch, dass während der Fermentation das Medium durch ständige Kontrolle auf pH = 7,4 eingestellt wurde, hatte die Lösung während der Fermentation und nach Abtrennung der Zellen einen nahezu neutralen pH-Wert. Bei diesem neutralen pH wurde die Stabilität des DHB bei unterschiedlichen Temperaturen getestet.

Für die Untersuchungen wurden jeweils 3x10 ml DHB-Lösung (ca. 2,3 mmol·l⁻¹), die aus einer Fermentation (s. Kapitel 4.1.1) stammten, in Vials gefüllt und gasdicht verschlossen. Ein Vial wurde bei -4 °C eingefroren und nach 3 Tagen aufgetaut. Ein Vial wurde bei 30 °C und ein Vial bei Raumtemperatur inkubiert. Aus allen drei Vials wurden nach 3 Tage Proben entnommen und HPLC-Analysen (s. Kapitel 3.11) durchgeführt.

Es wurde festgestellt, dass die Verbindung bei Raumtemperatur, bei 30 °C und bei -4 °C auch über einem längeren Zeitraum stabil geblieben war. Die Langzeitstabilität bei 30 °C war eine wichtige Information für die Fermentationen, die bei dieser Temperatur durchgeführt wurden.

Es war also davon auszugehen, dass ein eventueller Verlust an DHB nicht auf mangelnde Stabilität zurückzuführen war.

Bei manchen Aufarbeitungsmethoden, z.B. bei der Extraktion mit organischem Lösungsmittel, ist es erforderlich, die DHB-haltige Lösung anzusäuern. Deshalb wurde bei Raumtemperatur getestet, wie die Verbindung auf niedrige pH-Werte reagiert. Für den Test wurde jeweils 3x10 ml DHB-Lösung (ca. 110 mmol·l⁻¹) in 20 ml Vials gefüllt, gasdicht verschlossen und der pH-Wert mit konzentrierter HCl auf 2, 4, oder 6 eingestellt. Die Lösungen wurden ständig gerührt und deren DHB-Konzentrationen stündlich bestimmt (s. Kapitel 3.11). Es wurde festgestellt, dass die Verbindung sich rasch in Phenol und Salicylat umwandelt, wenn der pH-Wert unter 4 lag (Abb. 4.7 und Abb. 4.8). Die Umwandlung von DHB war bei pH = 2 (17,9 mmol·l⁻¹·h⁻¹) deutlich schneller als bei pH = 4 (4,5 mmol·l⁻¹·h⁻¹).

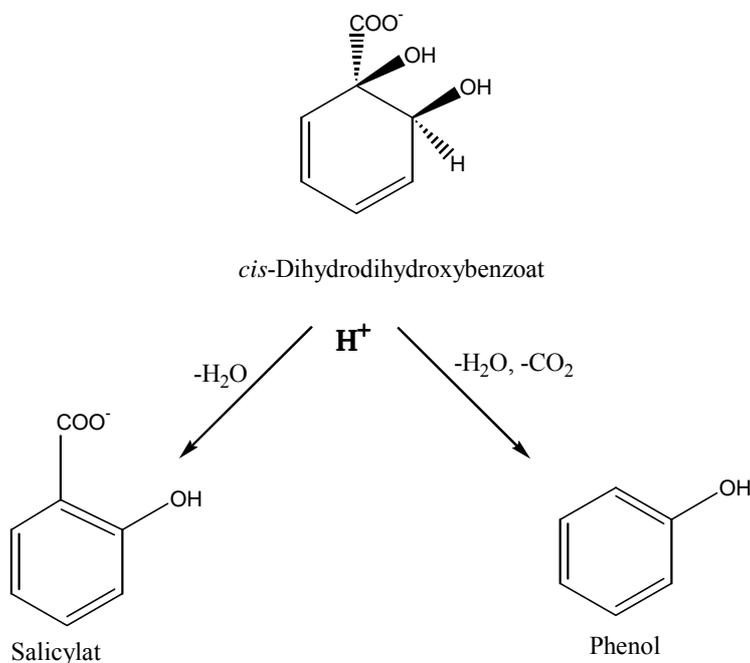


Abbildung 4.7 Umwandlung von DHB unter sauren Bedingungen in ein Gemisch von Phenol und Salicylat

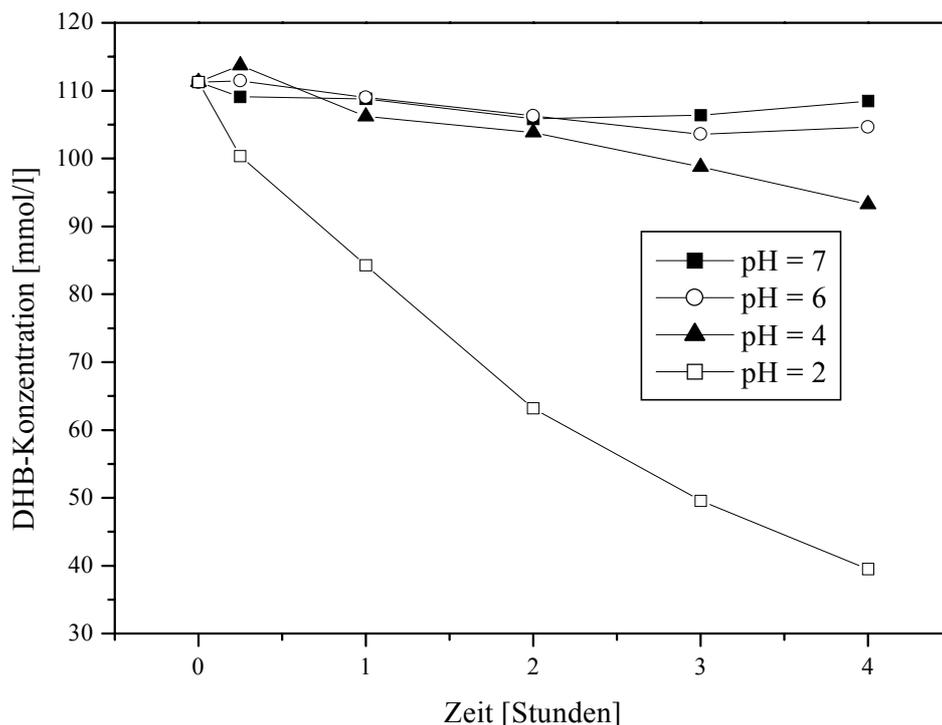


Abbildung 4.8 Stabilität von DHB bei verschiedenen pH-Werten im sauren Bereich und bei Raumtemperatur

Jeweils 3x10 ml DHB-Lösung (ca. $110 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) wurden in 20 ml Vials gefüllt und mit konz. HCl auf pH 2, 4, oder 6 eingestellt. Die Lösungen wurden mit einem Magnetrührstab ständig gerührt und die DHB-Konzentration stündlich mit der HPLC (s. Kapitel 3.11) gemessen.

Um zu untersuchen, in welchem Verhältnis das DHB zu Salicylat und Phenol umgewandelt wird, wurden 10 ml einer $110 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHB-Lösung in ein 20 ml Vial gefüllt, gasdicht verschlossen und der pH-Wert mit konzentrierter HCl auf 2 eingestellt. Die Lösung wurde ständig gerührt und die DHB-, die Salicylat- und die Phenolkonzentration wurde stündlich gemessen. Es wurde festgestellt, dass aus DHB 50 % Salicylat und 50 % Phenol in stöchiometrischen Mengen entstehen (Abb. 4.9).

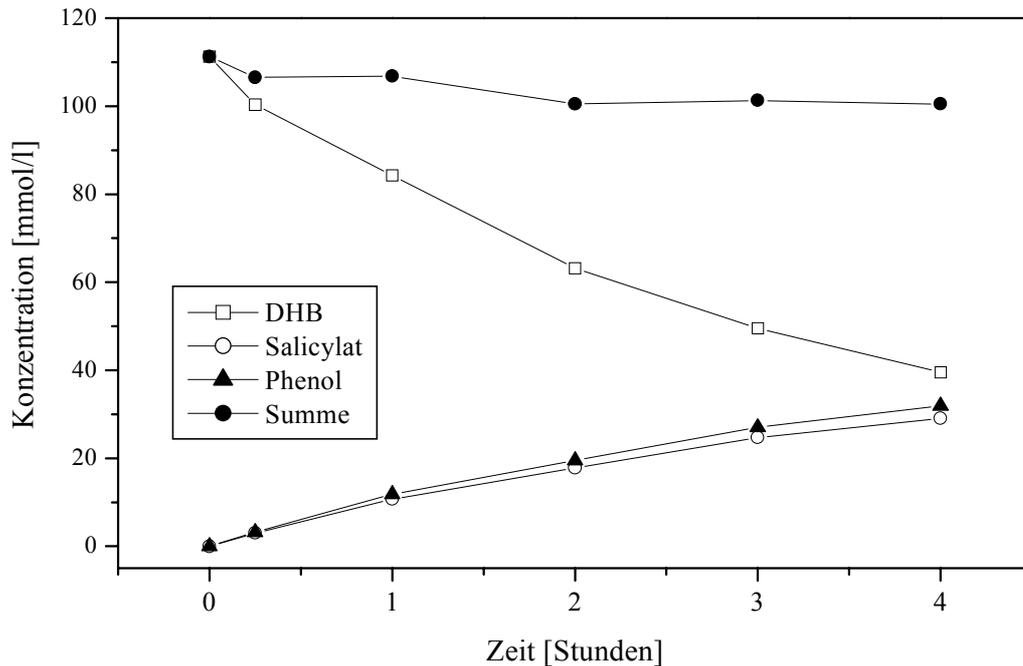


Abbildung 4.9 Umwandlung von DHB zu Salicylat und Phenol beim Raumtemperatur und pH = 2

10 ml DHB-Lösung (ca. $110 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) wurde in ein 20 ml Vial gefüllt und mit konz. HCl auf einen pH-Wert von 2 eingestellt. Die Lösung wurde mit einem Magnetrührstab ständig gerührt und die DHB-, die Salicylat- und die Phenolkonzentration stündlich mit der HPLC gemessen (s. Kapitel 3.11).

Aus diesem Versuch war die Halbwertszeit des DHB zu berechnen. Die Konzentration an DHB sinkt in 2,6 Stunden von $110 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ auf $55 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Dies entspricht einer Halbwertszeit des DHB von 2,6 Stunden bei Raumtemperatur und pH = 2.

Das Fermentationsmedium enthält trotz der Abtrennung der Zellen durch Zentrifugation immer noch Zellen und Stoffe, die für andere Bakterien ein Wachstum ermöglichen. Um dies zu verhindern, bietet es sich an, die DHB-Lösung nach der Zentrifugation durch Hitze zu sterilisieren. Um das Verhalten des DHB unter diesen Bedingungen zu untersuchen, wurde jeweils 1 ml DHB-Lösung ($2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) in Vials gefüllt und mittels HPLC (s. Kapitel 3.11) die genaue Konzentration bestimmt. Die Vials wurden mit gasdichten Deckeln wieder verschlossen und bei $120 \text{ }^\circ\text{C}$ 20 Min. autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde die Konzentration der entstandenen Produkte mittels HPLC erneut gemessen.

Es wurde festgestellt, dass DHB unter diesen Bedingungen nicht stabil ist. Es wandelt sich genauso wie im saurem pH-Bereich in Salicylat und Phenol um (Abb. 4.10).

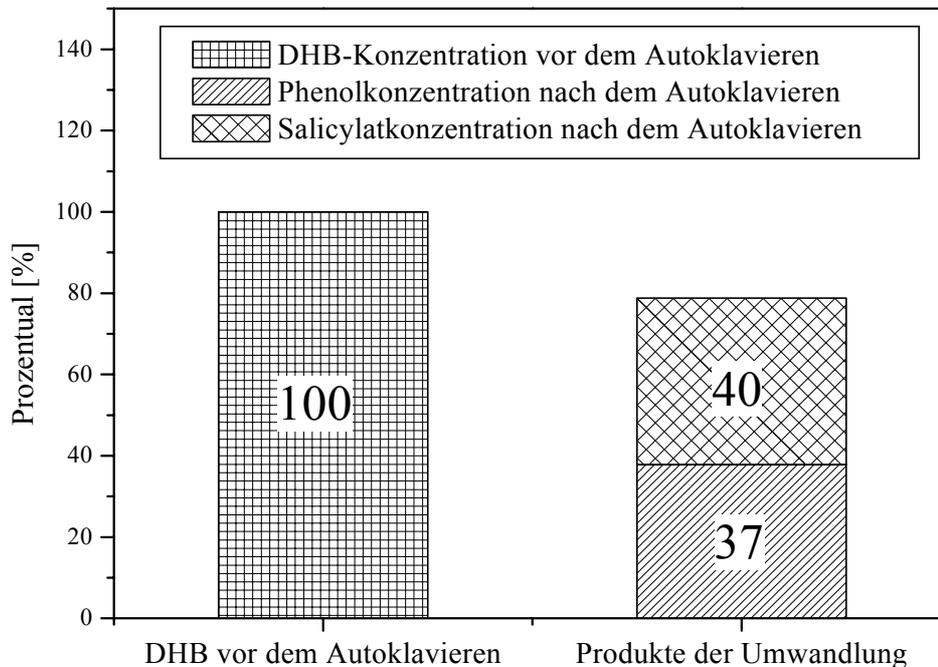


Abbildung 4.10 Umwandlung von DHB beim Autoklavieren

Jeweils 1 ml DHB-Lösung ($2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) wurde in ein Vial gefüllt und mittels HPLC (s. Kapitel 3.11) die genaue Konzentration bestimmt. Die Vials wurden mit neuen gasdichten Deckeln wieder verschlossen und bei $120 \text{ }^\circ\text{C}$ 20 Min. autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde die Konzentration der entstandenen Produkte mittels HPLC (s. Kapitel 3.11) erneut gemessen. Die Bilanzlücke ergibt sich daraus, dass ein Teil des Phenols in der Gasphase des Reaktionsgefäßes befand.

Um die Lösungen vor dem Bewachsen mit Mikroorganismen zu schützen, wurden diese statt zu autoklavieren für eine kurzfristige Lagerung von 2-3 Tagen bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt, für eine längerfristige Lagerung dagegen bei $-40 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren.

4.1.3.2 Extraktion mit Ethylacetat

Als klassische Aufarbeitungsmethode kann man eine Flüssig-Flüssig Extraktion mit mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösungsmitteln verwenden. Nach Abtrennung der

Zellen wird das Fermentationsmedium mit dem organischen Lösungsmittel vermischt und anschließend werden die organische und wässrige Phase voneinander getrennt. Das Produkt verteilt sich unterschiedlich zwischen den zwei flüssigen Phasen. Das Verhalten der gelösten Stoffe ist mit dem Verteilungsgesetz von *Nernst* zu beschreiben:

$$\frac{C_1}{C_2} = k \quad (4.3)$$

Wenn der Stoff (S) sich zwischen der organischen Phase (B) und der wässrigen Phase (W) verteilt, gilt für das Gleichgewicht:

$$k = \frac{[S]_B^0}{[S]_W^0} \quad (4.4)$$

Da Dihydrodihydroxybenzoesäure (die freie Säure von DHB) sehr polar ist, ist es mit organischen Lösungsmitteln schwer zu extrahieren. Nach Literaturangaben (Reineke, 1976) erleichtert die Ansäuerung der wässrigen Phase den Übergang von DHB in die Ethylacetatphase, daneben tritt aber auch der negative Einfluss des sauren pH-Bereichs auf. DHB ist unter sauren Bedingungen instabil (s. Abb. 4.8), und trotz rascher Extraktion bei ständiger Kühlung entsteht während des Prozesses immer etwas Salicylsäure und Phenol. Die Phenolkontamination des Produktes ist einfach zu entfernen, in dem sein Na-Salz einige Stunden (Tage) offen stehen gelassen wird und das Phenol sich verflüchtigt. Dagegen Salicylat bleibt in dem Produkt als Restkontamination zurück.

Bei den Extraktionsversuchen spielte eine Rolle, bei welchen Bedingungen die Fermentationen ausgeführt wurden. Zwei Faktoren wurden variiert: die Phosphatpufferkonzentration des Mediums und die Kohlenstoff- und Energiequelle für die Bakterien. Beide Faktoren hatten einen Effekt auf die Extrahierbarkeit mit Ethylacetat. Bei Extraktionen mit organischen Lösungsmitteln kann man allgemein sagen: je höher der Salzgehalt der zu extrahierenden Lösung, desto höher ist der Aussalzeffekt von der wässrigen Phase in die organische Phase. Wenn der Salzgehalt des Fermentationsmediums schon am Anfang der Fermentation $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ war, erhöhte sich dieser beim Einengen der Lösung um einen Faktor von 8-10 weiter. Wenn die Kohlenstoff- und Energiequelle Na_2 -Succinat war, wurde durch die pH-Regulation während des Succinatabbaus die Na^+ -Salzkonzentration und damit auch der Aussalzeffekt noch weiter erhöht.

Einen anderen Effekt hatten die Metabolite, die aus der Kohlenstoffquelle stammten. Die Zellen waren nicht immer fähig, die Kohlenstoff- und Energiequelle (z.B. Succinat) vollständig zu CO₂ abzubauen, deshalb akkumulierten sich die verschiedenen Metabolite (z.B. Oxalsäure, Fumarsäure bzw. ihre Salze) im Medium. Diese Metabolite sind bei pH = 2 wegen ihrer DHB-ähnlichen Eigenschaften auch mit Ethylacetat extrahierbar, was eine Verunreinigung des DHB verursacht. Schon während der Fermentation war also darauf zu achten, dass alle Metabolite des Succinatabbau vollständig umgesetzt waren. Voraussetzung war, dass sie in der HPLC-Analyse (s. Kapitel 3.11) detektierbar waren. Im Falle von Fructose konnten mit dieser Analysetechnik keine Metabolite festgestellt werden.

Bei den Extraktionen wurde die wässrige Phase zweimal mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Extraktionsausbeute ist in Tabelle 4.2 dargestellt.

Tabelle 4.2 Extraktionsversuch von DHB mit Ethylacetat

Phosphatpuffer* [mmol·l ⁻¹]	DHB-Konzentration [mmol·l ⁻¹]	Substrat	Ethyl-Acetat : wässrige Phase Verhältnis	Effektivität der zweifachen Extraktion [%]	Ausbeute der Fällung [%]
ca. 100	231	Fructose	1:1	21	48
ca. 750	621	Na ₂ - succinat	1:1	70	56

* Phosphatpufferkonzentration des Mediums nach Einengen

Um die Effektivität der Ethylacetatextraktion näher zu untersuchen, wurden zwei verschiedene eingeeengte Fermentationsmedien zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die Lösungen hatten durch das Einengen der Fermentationsmedien (s. Kapitel 3.12) unterschiedliche Phosphatpuffer- und DHB-Konzentrationen.

Im ersten Fall wurde die Extraktion (s. Kapitel 3.13) mit einer Fermentationslösung durchgeführt, in der die Phosphatpufferkonzentration während der Fermentation 50 mmol·l⁻¹ betrug. Das Medium wurde nach Abtrennung der Zellen auf die Hälfte des Volumens eingeeengt (s. Kapitel 3.12). Deshalb erhöhte sich die Phosphatpufferkonzentration auf ca. 100 mmol·l⁻¹. Die DHB-Konzentration der Lösung betrug nach dem Einengen ca. 231 mmol·l⁻¹. Metabolite waren offensichtlich nicht entstanden und die Fructose wurde vollständig

abgebaut. Durch die zweifache Extraktion wurden 21% des DHB aus der wässrigen Lösung extrahiert. Das entspricht ca. 0,05 mmol DHB / ml Ethylacetat.

Im zweiten Fall wurde wieder eine Fermentationslösung mit $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer verwendet, allerdings wurde hier die Lösung im Verhältnis 1:15, bezogen auf das Ausgangsvolumen, eingengt. Nach dem Einengen hatte die Lösung also eine deutlich höhere Phosphatpufferkonzentration (ca. $750 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Die DHB-Konzentration war in dieser Lösung ca. $621 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, Succinat wurde vollständig abgebaut. Aufgrund der Verwendung von Succinat wurde durch die pH-Kontrolle während des Succinatabbaus die Salzkonzentration erhöht. Durch die zweifache Extraktion wurden in diesem Fall 70 % des DHB aus der wässrigen Lösung extrahiert. Das entspricht 0,44 mmol DHB / ml Ethylacetat.

Die beste Extraktion war also erreichbar, wenn die Lösung einen relativ hohen Salzgehalt und eine möglichst hohe DHB-Konzentration hatte. Die DHB-Konzentration wurde immer in der wässrigen Phase gemessen (s. Kapitel 3.11) und mit Hilfe dieser Angaben der Verteilungskoeffizient k berechnet (s. Gleichung 4.4).

Tabelle 4.2 Verteilungskoeffizienten

$[\text{S}]_{\text{B}}^0$ [mol/l]	$[\text{S}]_{\text{W}}^0$ [mol/l]	$[\text{S}]_{\text{B}}^0 / [\text{S}]_{\text{W}}^0$	Salzgehalt der wässrigen Phase
0,050	0,181	0,2762	niedrig
0,183	0,438	0,4178	hoch

Wenn die Salz- und DHB-Konzentration in der wässrigen Phase hoch war, ging DHB besser in die Ethyl-Acetatphase über. Dies entspricht einem höheren Verteilungskoeffizienten ($[\text{S}]_{\text{B}}^0 / [\text{S}]_{\text{W}}^0$).

Als Nachteil erwies sich bei dieser Aufarbeitungsmethode, dass sich das DHB bei $\text{pH} = 2$ schnell zu Phenol und Salicylat umwandelt, was die Herstellung eines reinen Produktes in technischen Maßstab unmöglich macht.

4.1.3.3 Extraktion mit Ionenpaarbildnern

Die Ionenpaarextraktion ist ein Aufarbeitungsmethode für geladene Fermentationsprodukte, die mit organischen Lösungsmitteln schwer oder gar nicht extrahierbar sind. Zwei

verschiedene Substanzen wurden als Ionenpaarbildner für DHB verwendet: Tetrabutylammoniumhydroxid (TBAH) und Alamin-336 (s. Kapitel 3.14).

TBAH ist ein quartäres Ammoniumion, das mit negativ geladenen Verbindungen, wie z. B. DHB, ein nicht geladenes Ionenpaar bildet und sich dadurch in apolare Lösungsmittel, wie z. B. Chloroform, extrahieren lässt (Brändström *et al.*, 1969).

Als weiterer Ionenpaarbildner wurde Alamin-336 verwendet. Hierbei handelt es sich um ein tertiäres Amin mit C₈- und C₁₀-Alkylgruppen.

Bei der Extraktion von DHB mit TBAH wurde 10 ml Chloroform mit 0,25 g TBAH gemischt. 10 ml einer 100 mmol·l⁻¹ DHB-Lösung (nicht eingeeengtes Fermentationsmedium) wurden zweimal jeweils mit 10 ml einer Chloroform-TBAH-Mischung extrahiert. In der wässrigen Phase wurde die Restkonzentration von DHB mittels HPLC bestimmt (s. Kapitel 3.11) und dadurch die extrahierte DHB-Menge berechnet. Der Versuch wurde zunächst mit Fermentationslösungen mit 50 mmol·l⁻¹ Phosphatpuffer (s. Kapitel 4.1.1) durchgeführt. Nach mehrfacher Extraktion wurde keine Abnahme der DHB-Konzentration in der wässrigen Phase beobachtet. Als Störungsfaktor bei der Extraktion wurde der Matrixeffekt des Mediums vermutet. In der DHB-Lösung gab es neben DHB andere negativ geladene Ionen wie z. B. Cl⁻ oder H₂PO₄²⁻. Diese Ionen bildeten vermutlich auch Ionenpaare mit dem TBAH, wodurch die aktiven Regionen der TBAH-Moleküle blockiert wurden und die Bindung von DHB an TBAH verhinderten.

Um diese Problem zu umgehen, wurden Extraktionen mit solchen DHB-haltigen Fermentationsmedien durchgeführt, bei denen der Phosphatgehalt geringer war. Die Fermentationen wurden mit 1 mmol·l⁻¹ Phosphatpuffer ausgeführt (s. Kapitel 4.1.1). Mit mehrfachen Extraktionen war auch in diesem Fall keine Abnahme der DHB-Konzentration zu beobachten.

Mit TBAH war also DHB weder aus dem "hoch" noch aus dem "gering" mit Salz belasteten Medium extrahierbar. Der Misserfolg lag also nicht an der Konkurrenz der negativ geladenen Ionen, sondern vermutlich an der mangelnden Ionenpaarbildung.

Um den Matrixeffekt von Anfang an auszuschließen, wurden mit Alamin-336 nur DHB-Lösungen getestet, in denen der Salzgehalt relativ niedrig war. Es wurden 8,5 ml Alamin-336 mit jeweils 6,5 ml eines organischen Lösungsmittels (Toluol, Chloroform, 1-Decanol, 1-Diisobutylketon) gemischt. 10 ml einer ca. 300 mmol·l⁻¹ DHB-Lösung (nicht eingeeengte Fermentationsmedium) bzw. 10 ml einer 70 mmol·l⁻¹ DHB-Lösung wurden mit der Alamin-

Lösungsmittel-Mischung ausgeschüttelt. Die DHB-Konzentration wurde in der wässrigen Phase vor und nach der Extraktion mittels HPLC bestimmt und die extrahierte DHB-Menge berechnet.

Trotz des niedrigen Salzgehaltes besonders in der $70 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHB-Lösung wurde während der Extraktion im Fall von Toluol und Chloroform keine Abnahme an DHB in der wässrigen Phase beobachtet (Abb. 4.11). Im Fall von 1-Decanol und Diisobutylketon nahmen die Konzentration an DHB zwar geringfügig ab. Die Ausbeute war aber so gering, dass diese Extraktionsmethode für einen technischen Prozess ungeeignet war. Beim Alamin-336 war vermutlich auch die unzureichende Ionenpaarbildung für diesen Ergebnis verantwortlich.

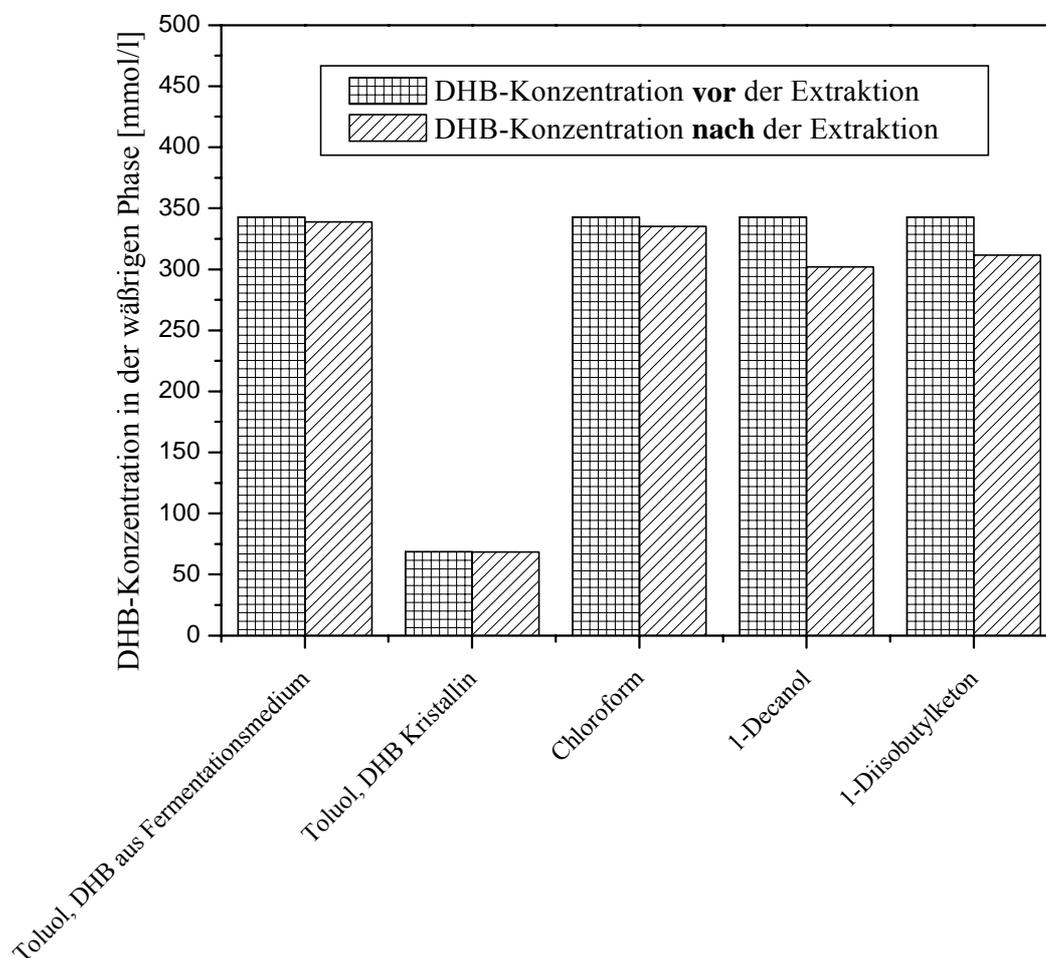


Abbildung 4.11 Reaktivextraktion von DHB mit Alamin-336 und verschiedenen Lösungsmitteln

10 ml einer $300 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHB-Lösung (s. Kapitel 4.1.1) wurden mit der Mischung aus 8,5 ml Alamin-336 und 6,5 ml organischen Lösungsmittel (Toluol, Chloroform, 1-Decanol oder 1-Diisobutylketon) im Scheidetrichter

ausgeschüttelt. 10 ml einer aus DHB-Kristallen hergestellten Lösung (ca. $70 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) wurden mit der Mischung aus 8,5 ml Alamin-336 und 6,5 ml Toluol ausgeschüttelt. Die DHB-Konzentration wurde vor und nach der Extraktion in der wässrigen Phase mittels HPLC bestimmt (s. Kapitel 3.11).

4.1.3.4 Adsorptionsversuche

Die Aufreinigung eines Produktes aus einer Fermentationslösung ist prinzipiell auch durch Adsorption möglich. Ein solches Verfahren besteht aus 3 Schritten: Bindung des Produktes an das Adsorbens, Spülung des Adsorbens zum Entfernen von Verunreinigungen und anschließend die Elution des Produktes. Ein Material ist als Adsorbens verwendbar, wenn die Zielkomponente gegenüber anderen Komponenten selektiv an dieses bindet. Die Selektivität des Materials ist durch spezifische Bindungsstellen an der Oberfläche bestimmt.

Das Verhalten des Adsorbanten an der Adsorbensoberfläche kann man mit der Adsorptionskinetik und Adsorptionskapazität beschreiben. Die Kinetik hängt von der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen der Oberfläche und der Zielkomponente ab, die Kapazität ist durch die Zahl der Bindungsplätze bestimmt. Die adsorbierte Menge eines Stoffes ist abhängig von dessen Konzentration in der Lösung und der Temperatur (T), die in der Regel konstant gehalten wird. So wird der Zustand des Gleichgewichts durch die sogenannten Adsorptionsisothermen beschrieben.

Garcia und Kim (1993) beschrieben, dass (+)-*cis*-(1S,2S)-Dihydroxy-3-chlorcyclohexa-3,5-dien mit einem pyrolysierten Polymer als Adsorbens aus einem Fermentationsmedium aufzureinigen ist. Die Elution erfolgte bei dieser Methode mit einem Ethylacetat-Ethanol-Gemisch. Das Produkt kristallisierte nach dem Einengen aus dem Lösungsmittelgemisch aus. Basierend auf diesen Angaben wurden Versuche mit verschiedenen analogen Adsorbentien durchgeführt. Da DHB relativ polar ist, wurden basierend auf Informationen der Firma Rohm & Haas die folgenden Adsorbentien zur Sorption von DHB getestet:

- **Amberlite XAD1600T : Divinylbenzol-Polymer, Makronetz (macroreticular)**
- **Ambersorb 563 : kohlenstoffhaltig**
- **Amberlite XAD7HP : Polyacrylester, Makronetz, nichtionisch**

Aus chronologischen Gründen wurde bei den ersten Versuchen eine DHB-Lösung aus Fermentationen verwendet, in denen die Salzkonzentration hoch war (s. Kapitel 4.1.1) Jeweils

5 g des entsprechenden Adsorbens wurden in eine Glassäule mit Fritte (Porengröße 3) gefüllt (s. Kapitel 3.15). Zunächst wurde das Material mit Methanol (entsprechend einer Menge von 20 Bettvolumen) durchspült, um die Verunreinigungen des Materials zu entfernen bzw. die Säule zu konditionieren. 15 ml der DHB-Fermentationslösung ($120 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) wurden auf das Säulenmaterial gegeben und langsam durchtropfen gelassen. Nach der Adsorption wurde das Säulenmaterial mit 10 ml bidest. Wasser gespült, um Verunreinigungen z. B. durch Salze zu entfernen. Anschliessend wurde das Säulenmaterial im ersten Schritt mit einer Lösung bestehend aus 10 % Acetatpuffer und 90 % Methanol eluiert. Die zweite Elution wurde mit einer Lösung bestehend aus 50% Acetatpuffer und 50 % Methanol durchgeführt (s. Abb. 4.12).

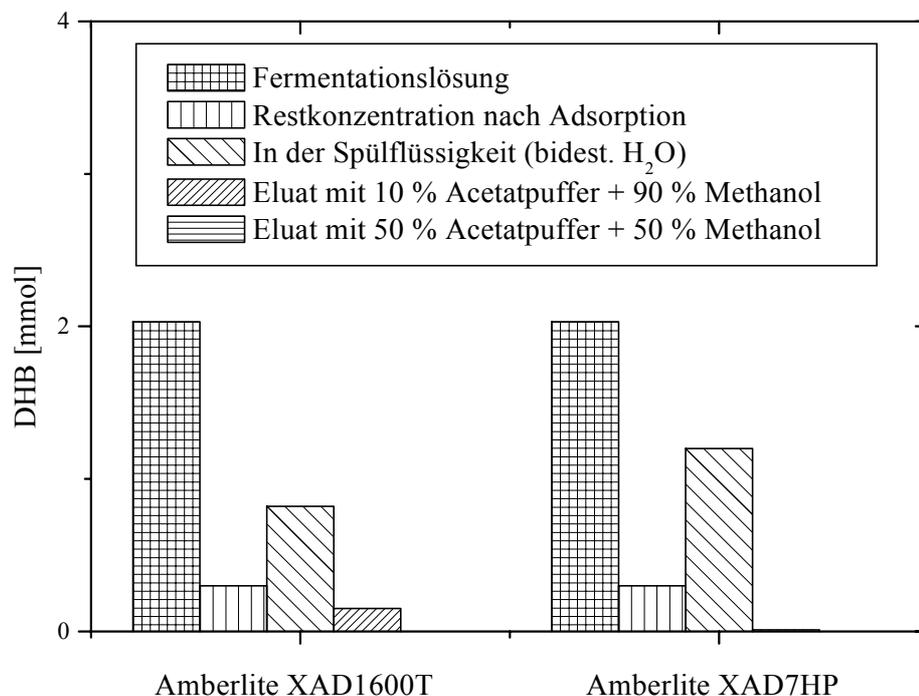


Abbildung 4.12 Adsorption von DHB (aus Fermentationslösung mit hohem Salzgehalt) an Amberlite XAD1600T bzw. Amberlite XAD7HP und Desorption mit Acetatpuffer-Methanol-Gemischen

Jeweils 5 g des entsprechenden Adsorbens wurde in eine Glassäule mit Fritte (Porengröße 3) gefüllt. Zunächst wurde das Material mit Methanol (entsprechend einer Menge von 20 Bettvolumen) durchspült. 15 ml DHB-Fermentationslösung mit relativ hohem Salzgehalt ca. $120 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ wurde langsam auf die Säule gegeben und langsam durchtropfen gelassen. Nach der Adsorption wurde das Säulenmaterial mit 10 ml bidest. Wasser

gespült. Im ersten Schritt wurde das Säulenmaterial mit einer Lösung bestehend aus 10 % Acetatpuffer und 90 % Methanol eluiert. Die zweite Elution erfolgte mit einer Lösung bestehend aus 50% Acetatpuffer und 50 % Methanol.

Mit dem Adsorbens Ambersorb 563 wurde der oben beschriebene Versuch entsprechend durchgeführt, allerdings wurde hier das DHB mit reinem Methanol eluiert (s. Kapitel 3.15 und Abb. 4.13).

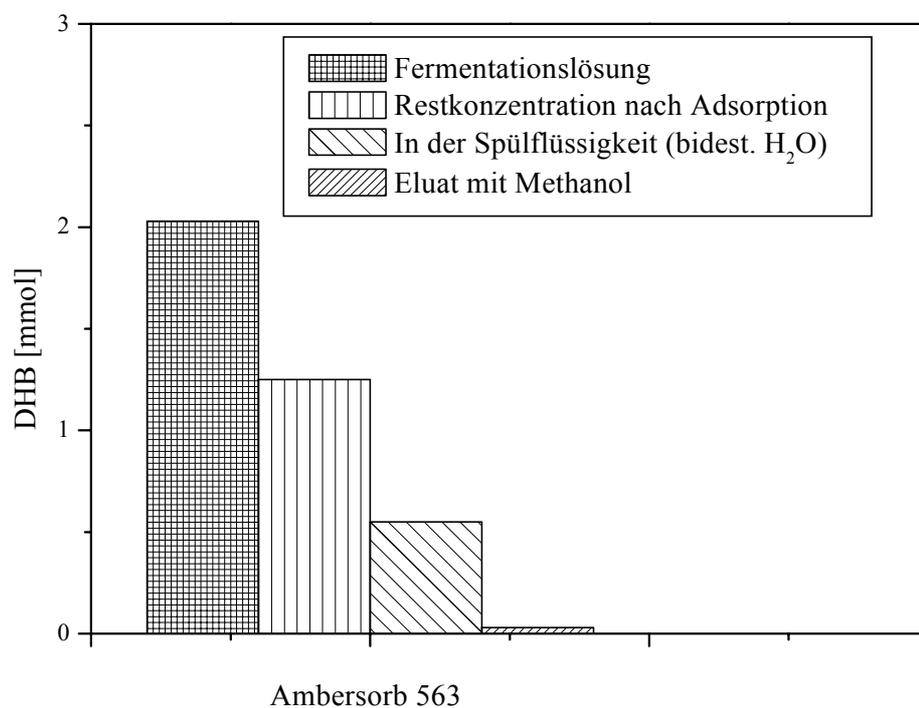


Abbildung 4.13 Adsorption von DHB aus Fermentationslösung mit hohem Salzgehalt an Ambersorb 563 und Desorption mit Methanol

5 g des Adsorbens wurde in eine Glassäule mit Fritte (Porengröße 3) gefüllt. Zunächst wurde das Material mit Methanol (entsprechend einer Menge von 20 Bettvolumen) durchspült. 15 ml DHB-Fermentationslösung mit relativ hohem Salzgehalt ca. $120 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ wurde auf die Säule gegeben und langsam durchtropfen gelassen. Um die Verunreinigungen des Fermentationmediums zu entfernen, wurde nach der Adsorption das Säulenmaterial mit 10 ml bidest. Wasser gespült. Anschließend wurde das Säulenmaterial mit 10 ml Methanol eluiert.

Wie aus der Abbildung (4.13) ersichtlich ist, war kaum eine Adsorption von DHB an dem Adsorbens Ambersorb 563 festzustellen. Bei den Adsorbentien Amberlite XAD1600T und

Amberlite XAD7HP war die Adsorption um den Faktor 4 höher und 85 % des DHB wurden gebunden (s. Abb. 4.12). Beim Spülschritt mit bidest. Wasser wurde allerdings bei alle drei Adsorbentien festgestellt, dass der größte Teil des gebundenen DHB (40-60 %) schon desorbiert war. Das sprach für eine schwache Adsorption des DHB an das jeweilige Adsorbens. Um das Produkt DHB aber in möglichst reiner Form zu erhalten, war dieser Spülschritt unbedingt notwendig.

Um zu untersuchen, ob DHB aus Fermentationslösungen mit geringem Salzgehalt mit diesen Adsorbentien (Amberlite XAD1600T, Amberlite XAD7HP und Ambersorb 563) besser aufgereinigt werden kann, wurden die gleichen Versuche (s. Kapitel 3.15) mit einer gering salzhaltigen DHB-Fermentationslösung ($120 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, s. Kapitel 4.1.1) durchgeführt (Abb.4.14 und Abb. 4.15).

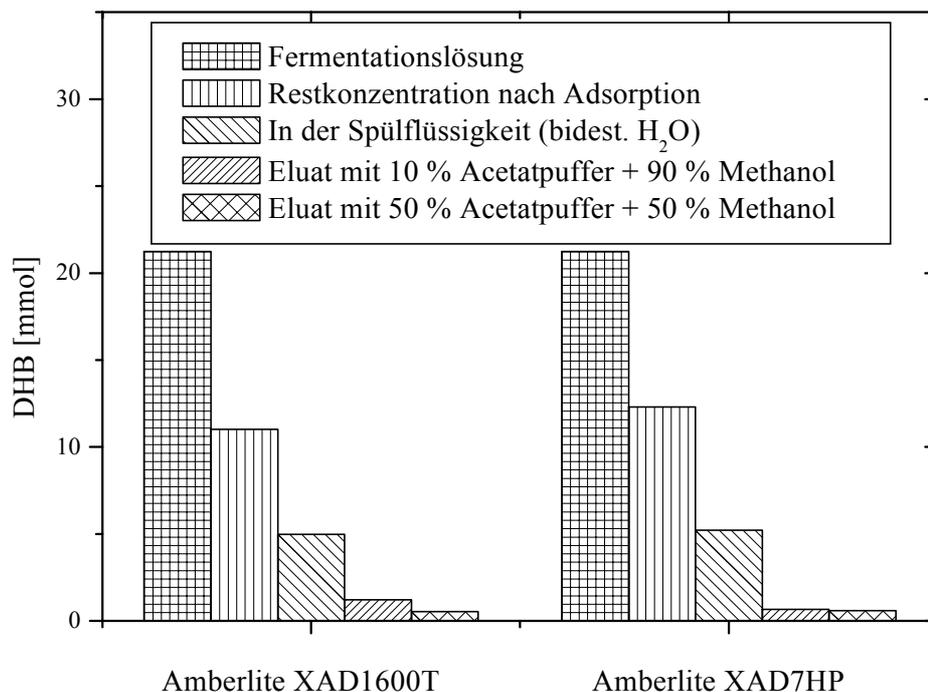


Abbildung 4.14 Adsorption von DHB aus Fermentationslösung mit geringem Salzgehalt an Amberlite XAD1600T bzw. Amberlite XAD7HP und Desorption mit Acetatpuffer-Methanol-Gemischen

Jeweils 5 g des entsprechenden Adsorbens wurden in eine Glassäule mit Fritte (Porengröße 3) gefüllt. Zunächst wurde das Material mit Methanol (entsprechend einer Menge von 20 Bettvolumen) durchspült. 15 ml DHB-Fermentationslösung mit relativ geringem Salzgehalt ca. $120 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ wurde auf die Säule gegeben und langsam durchtropfen gelassen. Nach der Adsorption wurde das Säulenmaterial mit 10 ml bidest. Wasser gespült. Im

ersten Schritt wurde mit einer Lösung bestehend aus 10 % Acetatpuffer und 90 % Methanol das Säulenmaterial eluiert. Die zweite Elution erfolgte mit einer Lösung bestehend aus 50% Acetatpuffer und 50 % Methanol.

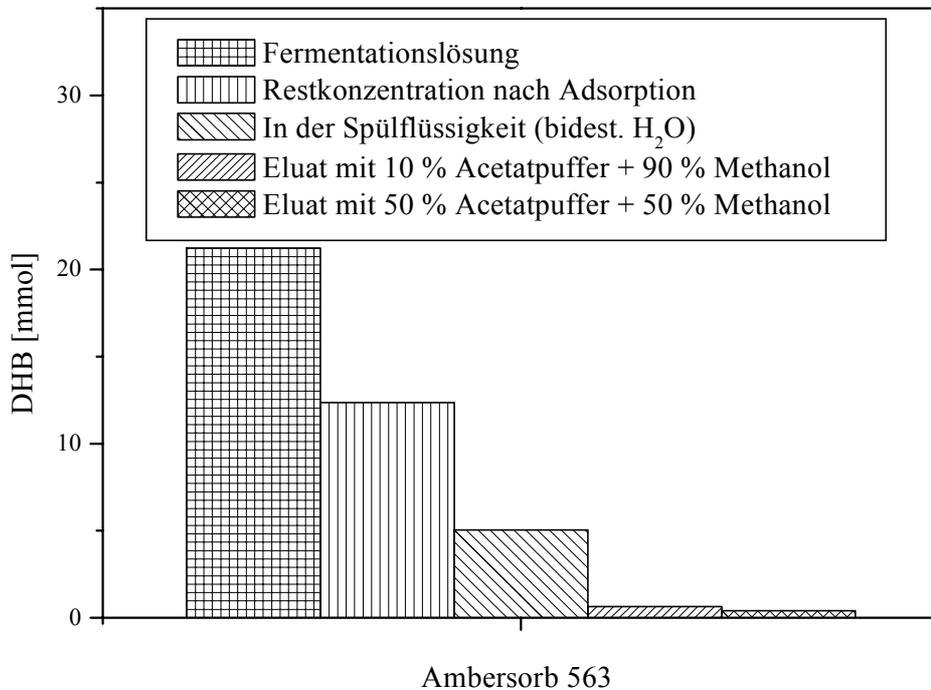


Abbildung 4.15 Adsorption von DHB aus Fermentationslösung mit geringem Salzgehalt an Amborsorb 563 und Desorption mit Methanol

5 g des Adsorbens wurden in eine Glassäule mit Fritte (Porengröße 3) gefüllt. Zunächst wurde das Material mit Methanol (entsprechend einer Menge von 20 Bettvolumen) durchspült. 15 ml DHB-Fermentationslösung mit relativ geringem Salzgehalt ca. $120 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ wurde langsam auf die Säule gegeben und langsam durchtropfen gelassen. Nach der Adsorption wurde das Säulematerial mit 10 ml bidest. Wasser gespült und mit 10 ml Methanol eluiert.

Die Versuche mit der niedriger salzhaltigen DHB-Lösung führten auch nicht zum Erfolg. Es waren keine nennenswerte Unterschiede zu den Versuchen mit der relativ stark salzhaltigen DHB-Fermentationslösung erkennbar. Die Verwendung dieses Adsorbens stellt also keine geeignete Aufarbeitungsmethode dar, unabhängig davon, ob die Lösung viel oder wenig Salze enthielt. Um eine bessere Bindung von DHB zu erreichen, wäre es vermutlich besser gewesen, dass XAD-Material vor der Adsorption mit einer ausreichenden Menge an Wasser zu spülen. Allerdings wurde auch keine Bindung von DHB festgestellt, wenn das Material

ohne Methanolspülung verwendet wurde. Aus anderen Untersuchungen ist bekannt, dass das *cis*-Dihydrodiol der Naphthalin-2-carbonsäure auch nicht an diese XAD-Materialien bindet, auch wenn das jeweilige Material zuvor mit Ethanol und anschließend mit Wasser gespült wurde.

4.1.3.5 Anionenaustauscher

Ionenaustauscher sind natürliche oder künstlich hergestellte organische oder anorganische Stoffe, die aus einer Elektrolytlösung Ionen aufnehmen und dafür eine äquivalente Stoffmenge anderer Ionen gleicher elektrischer Ladung abgeben können. Je nach Ladungsvorzeichen der austauschbaren Ionen unterscheidet man zwischen Kationen- oder Anionenaustauschern.

Ionenaustauscher sind keiner bestimmten Stoffgruppe zuzuordnen. Man unterscheidet zwischen organischen und anorganischen, darunter zwischen natürlichen und synthetischen Ionenaustauschern. Anorganische Ionenaustauscher kommen in der Natur z.B. als Zeolithe vor, die man auch künstlich herstellen kann (Sasil®). Organische Ionenaustauscher kommen in der Natur z.B. in Form von Huminsäuren vor, sind aber auch künstlich herstellbar wie z.B. die Kunstharz-Ionenaustauscher (Amberlite®).

Zur Aufreinigung von DHB wurden verschiedenen Kunstharz-Anionenaustauscher verwendet (Tabelle 4.3). Sie bestehen aus einem dreidimensionalen, wasserunlöslichen makromolekularen Gerüst (Matrix), welches zahlreiche negativ geladene Gruppen (Ankergruppen) trägt. Aus Gründen der Elektroneutralität enthält der Austauscher eine äquivalente Menge von Gegenionen, die beide zusammen als funktionelle Gruppe bezeichnet werden (Blume, 2000).

Tabelle 4.3 Typen von Anionenaustauschern (Blume, 2000)

Anionenaustauscher		
Funktionelle Gruppe		Austauschertyp
Ankergruppe	Gegenion	
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{---H}_2\text{C---N}^{\oplus} \\ \quad \backslash \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}$ tertiäre Amino-Gruppe	Cl ⁻ oder OH ⁻	neutral oder schwach basisch
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{---H}_2\text{C---N}^{\oplus} \\ \quad \backslash \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}$ quartäre Amino-Gruppe (Typ 1)	Cl ⁻ oder OH ⁻	neutral oder stark basisch
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{---H}_2\text{C---N}^{\oplus} \\ \quad \backslash \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{OH} \end{array}$ quartäre Amino-Gruppe (Typ 2)	Cl ⁻ oder OH ⁻	neutral oder stark basisch

Aus den Anionenaustauschertypen, die in der Tabelle 4.3 aufgelistet sind, wurden, basierend auf Informationen der Firma Rohm & Haas, die folgende Marken für die Aufreinigung des DHB getestet:

- **Amberjet®-4400** : quartäres Amin (Typ 1), Divinylbenzol/Styrol-Copolymer, Cl⁻-Form, Gel-Matrix, stark basisch
- **Amberlite®-IRA458** : modifiziertes quartäres Amin (Typ 1), Acryl-Copolymer, Cl⁻-Form, Gel-Matrix, stark basisch
- **Amberlite®-IRA67** : modifiziertes tertiäres Amin, Acryl-Copolymer, Cl⁻-Form, Gel-Matrix, schwach basisch

(www.rohmhaas.com/ionexchange)

Um die drei Anionenaustauscher für die Aufarbeitung von DHB zu testen, wurden zunächst Vorversuche durchgeführt. Bei den Adsorptionsversuchen mit Anionenaustauschern wurden von den drei verschiedenen Amberlite-Produkten jeweils 20 g mit 30 ml 100 mmol·l⁻¹ Essigsäure konditioniert und anschließend mit 30 ml bidest. Wasser gewaschen. An den Anionenaustauschern können außer DHB auch andere negativ geladene Ionen des Fermentationsmediums adsorbieren. Um diesen störenden Matrixeffekt zu vermeiden, wurden DHB-Lösungen aus Fermentationen verwendet, bei denen der Salzgehalt geringer war (s. Kapitel 4.1.1). Aus einem Fermentationsmedium mit 31 mmol·l⁻¹ DHB in 1 mmol·l⁻¹ Phosphatpuffer wurde durch Verdünnen mit bidest. Wasser eine DHB-Lösung von ca. 30 mmol·l⁻¹ hergestellt. Diese DHB-Lösung wurde zu den konditionierten Anionenaustauschern gegeben und anschließend 15 Minuten im Becherglas gerührt. Nach diesem Adsorptionsschritt wurde der mit DHB beladene Anionenaustauscher mit 30 ml bidest. Wasser gespült. Anschließend wurde das gebundene DHB mit 30 ml 1 M NaOH eluiert. Zwischen den einzelnen Schritten wurde der Anionenaustauscher durch Filtration von der jeweiligen Lösung abgetrennt. Die DHB-Konzentration wurde in der Ausgangslösung, im Überstand der Adsorptionversuche, in der Spüllösung und im basischen Eluat mittels HPLC (s. Kapitel 3.11) gemessen (Abb. 4.16).

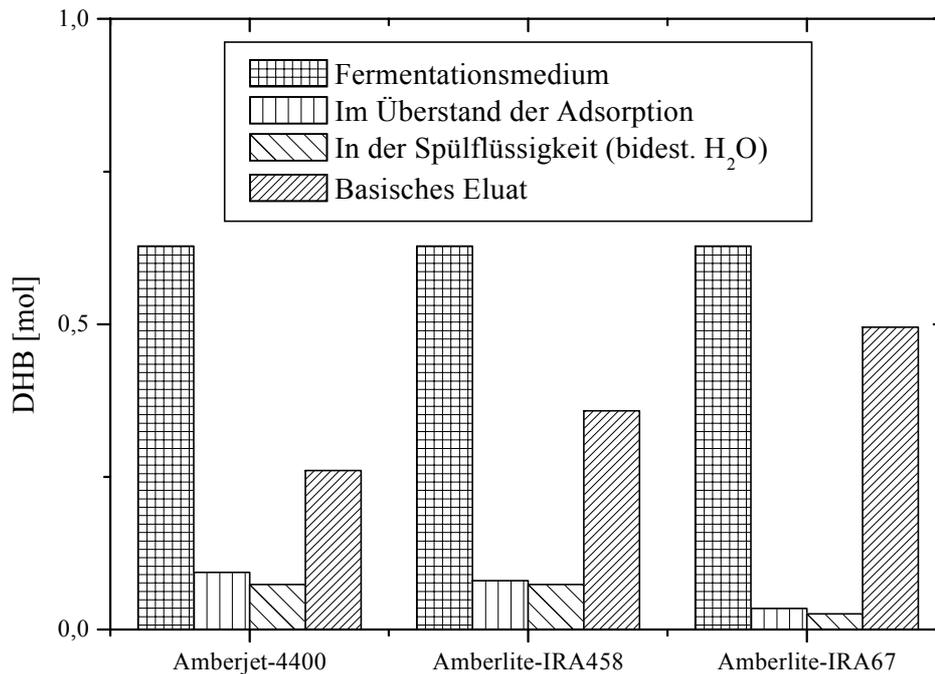


Abbildung 4.16 Adsorption von DHB an verschiedene Anionenaustauschern Elution mit 1 M NaOH-Lösung

Von den drei verschiedenen Amberlite-Produkten wurden jeweils 20 g mit 30 ml $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Essigsäure konditioniert. Nach Abfiltrieren wurde mit 30 ml bidest. Wasser gewaschen. 20 ml einer $30 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHB-Lösung (mit geringem Salzgehalt) wurden aus der Fermentationslösung durch Verdünnung mit bidest. Wasser hergestellt zum jeweiligen abfiltrierten, konditionierten Anionenaustauscher gegeben und anschließend 15 Min gerührt. Nach der Adsorption wurden die Anionenaustauscher abfiltriert und mit 30 ml bidest. Wasser gespült. Nach Abfiltrieren wurde das DHB mit 30 ml 1 M NaOH-Lösung eluiert.

Von den drei getesteten Anionenaustauschern haben alle DHB gut gebunden. Mit Wasser war nur ein geringer Teil des gebundenen DHB eluierbar. Nach dem Spülschritt wurde versucht, das DHB mit $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ und mit 1 M NaOH-Lösung zu eluieren. Bei den ersten zwei Eluenten war DHB nur teilweise eluierbar, was darauf hinweist, dass zwischen DHB und dem jeweiligen Anionenaustauscher starke Coulomb'sche Kräfte wirkten. Mit 1 M NaOH-Lösung war DHB am besten zu eluieren.

Von den drei Anionenaustauschern wurden zwei für weitere Versuche ausgewählt (IRA-458 und IRA-67), weil bei diesen die Elution am erfolgreichsten verlief. Um das Adsorptionsverhalten von DHB an diese beiden Anionenaustauscher näher zu

charakterisieren, wurden Adsorptionskinetiken und Adsorptionsisothermen sowie Desorptionsisothermen analysiert.

Bei der Anwendung von Anionenaustauschern für Produktaufreinigungen ist es wichtig, wie lange die Einstellung des Gleichgewichts dauert. Um die Adsorptionskinetik zu bestimmen, wurden jeweils 20 g der jeweiligen Anionenaustauscher mit 20 ml Essigsäure ($0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) konditioniert und danach mit 30 ml bidest. Wasser gewaschen. 20 ml DHB-Lösung aus einem Fermentationsmedium mit geringen Salzgehalt (s. Kapitel 4.1.1) wurden auf das Material gegeben, mit dem Magnetrührstab gerührt und alle 3-5 Minuten Proben genommen. Die DHB-Konzentration im Überstand wurde mittels HPLC (s. Kapitel 3.11) bestimmt und, basierend auf dem gemessenen Konzentrationsunterschied, die Beladung des Anionenaustauschers berechnet (Abb. 4.17). Zwischen den einzelnen Schritten wurde der Anionenaustauscher durch Filtration von der jeweiligen Lösung abgetrennt.

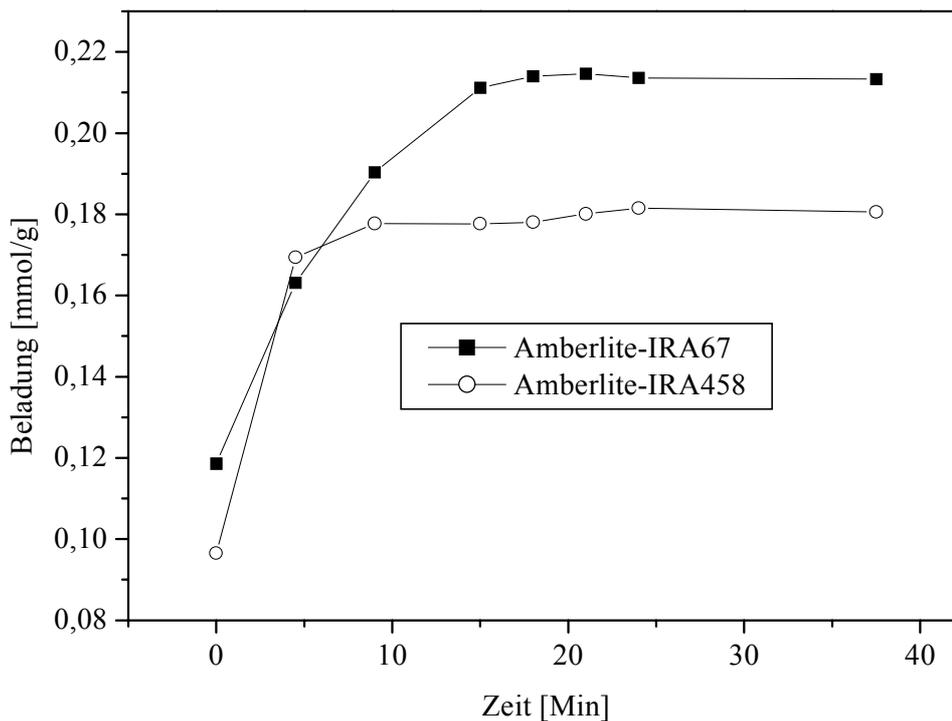


Abbildung 4.17 Kinetik der Beladung der Anionenaustauscher Amberlite-IRA67 und Amberlite -IRA458 mit DHB

Jeweils 20 g der jeweiligen Anionenaustauscher wurde im Becherglas mit 20 ml Essigsäure ($0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) konditioniert und danach mit 30 ml bidest. Wasser gewaschen. 20 ml DHB-Lösung aus einem Fermentationsmedium mit geringen Salzgehalt (s. Kapitel 4.1.1) wurden auf das Material gegeben, mit einem

Magnetrührstab gerührt und alle 3-5 Minuten Proben genommen. Die DHB-Konzentration im Überstand wurde mittels HPLC (s. Kapitel 3.11) bestimmt und, basierend auf dem gemessenen Konzentrationsunterschied, die Beladung des Anionenaustauschers berechnet. Zwischen den einzelnen Schritten wurde der Anionenaustauscher durch Filtration von der jeweiligen Lösung abgetrennt.

Die Bindung von DHB an den jeweiligen Anionenaustauscher erfolgte relativ schnell. Jeweils nach 15 Min hatte sich das Gleichgewicht eingestellt (Abb. 4.17). Zur weiteren Untersuchung des Adsorptionsverhalten wurden die Adsorptions- und Desorptionsisothermen der Anionenaustauscher Amberlite-IRA67 und Amberlite-IRA458 für DHB bestimmt. Nach den Erfahrungen der kinetische Untersuchungen waren 15 Minuten ausreichend, um eine vollständige Adsorption von DHB zu erreichen.

Um die Adsorption- und Desorptionsisothermen zu bestimmen wurden jeweils 20 g des jeweiligen Anionenaustauschers im Becherglas mit 20 ml Essigsäure ($0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) konditioniert und danach mit 30 ml bidest. Wasser gewaschen. Jeweils 20 ml DHB-haltiges Medium mit geringem Salzgehalt und verschiedenen Konzentrationen an DHB (10, 20, 50, 100, 150, 250, 300, 400 und $500 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) wurden auf das Material gegeben, mit dem Magnetrührstab gerührt und nach 15 Minuten Proben genommen. Die DHB-Konzentration im Überstand wurde mittels HPLC (s. Kapitel 3.11) bestimmt und, basierend auf dem gemessenen Konzentrationsunterschied, die Beladung des Anionenaustauschers berechnet. Nach der Adsorption wurde DHB mit 20 ml 1 M NaOH-Lösung desorbiert und im Eluat die DHB-Konzentration gemessen. Aus diesem Wert wurde ebenfalls wieder durch die gemessenen Konzentrationsunterschiede die restliche Beladung des Anionenaustauschers mit DHB berechnet (Abb. 4.18 und Abb. 4.19).

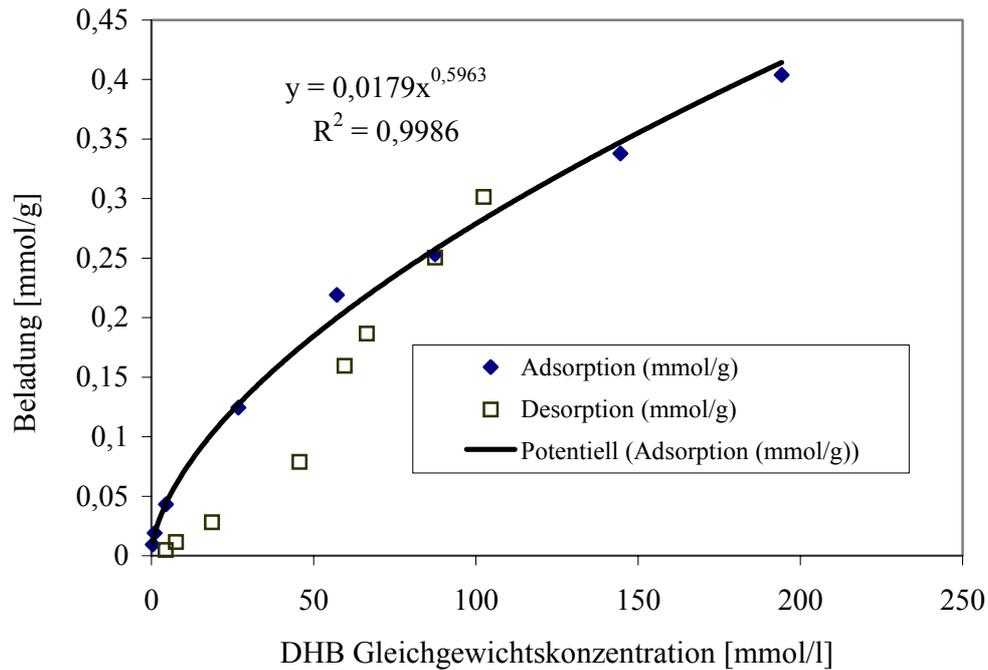


Abbildung 4.18 Adsorptions- und Desorptionsisothermen des Anionenaustauschers Amberlite-IRA458 für DHB aus Fermentationslösungen

Jeweils 20 g Anionenaustauscher wurden im Becherglas mit 20 ml Essigsäure ($0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) konditioniert und mit 30 ml bidest. Wasser gewaschen. Jeweils 20 ml DHB-Lösung (Konzentrationen: 10, 20, 50, 100, 150, 250, 300, 400 und $500 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) wurden zum jeweiligen Anionenaustauscher gegeben. Die Mischung wurde kräftig gerührt und nach 15 Minuten jeweils eine Probe entnommen. Die jeweilige DHB-Konzentration im Überstand wurde mittels HPLC (s. Kapitel 3.11) bestimmt. Basierend auf den gemessenen Konzentrationsunterschieden wurde die Beladung des Anionenaustauschers mit DHB berechnet.

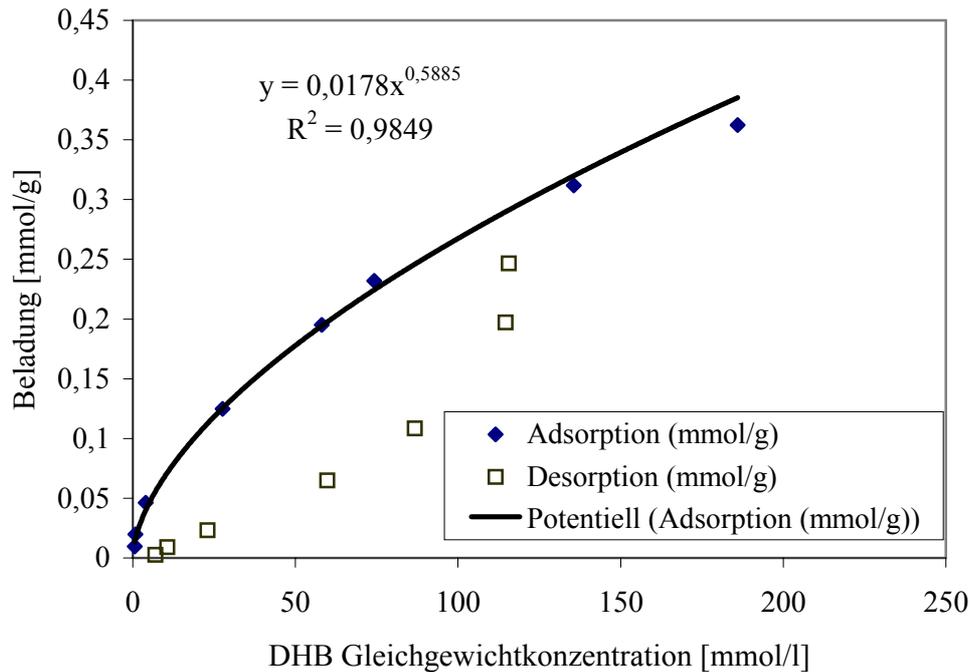


Abbildung 4.19 Adsorptions- und Desorptionsisothermen des Anionenaustauschers Amberlite-IRA67 für DHB aus Fermentationslösungen

Jeweils 20 g Anionenaustauscher wurden im Becherglas mit 20 ml Essigsäure ($0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) konditioniert und mit 30 ml bidest. Wasser gewaschen. Jeweils 20 ml DHB-Lösung (Konzentrationen: 10, 20, 50, 100, 150, 250, 300, 400 und $500 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) wurden zum jeweiligen Anionenaustauscher gegeben. Die Mischung wurde kräftig gerührt und nach 15 Minuten jeweils eine Probe entnommen. Die jeweilige DHB-Konzentration im Überstand wurde mittels HPLC (s. Kapitel 3.11) bestimmt. Basierend auf den gemessenen Konzentrationsunterschieden wurde die Beladung des Anionenaustauschers mit DHB berechnet.

In Abb. 4.18 und Abb. 4.19 sind die Adsorptionsisothermen für Amberlite-IRA458 und Amberlite-IRA67 dargestellt. Bei beiden Anionenaustauschern sind die Gleichgewichtskapazitäten von der Konzentration der jeweiligen Ausgangslösung abhängig. Das verursacht einen Verlauf der Kurve, der keinen Maximumwert erreicht. Es ist also keine Sättigung zu beobachten. Für den Fall, dass die adsorbierte Stoffmenge um so größer ist, je größer die Anfangskonzentration des Stoffes in der angrenzenden Phase ist, berechnet man die Adsorptionsisotherme nach Freundlich (Näser, 1976):

$$B = K * c_{\text{eq}}^n \quad (4.5)$$

- K Freundlich-Verteilungskoeffizient (Stoffkonstante)
 n Freundlich-Exponent (Stoffkonstante, liegt meist zwischen 0,1 und 0,6)
 B absorbierte Menge [mol/kg]
 C_{eq} Gleichgewichtskonzentration [mol/l].

Mit einer Trendlinie ist aus den experimentellen Ergebnissen der Verteilungskoeffizient (K) und der Freundlich-Exponent (n: liegt normalerweise zwischen 0,1 und 0,6) zu bestimmen (Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4 Experimentell ermittelte Freundlichparameter für DHB an verschiedenen Anionenaustauschern

Anionenaustauscher	K (mmol/g)	n
Amberlite-IRA458	0,0179	0,5963
Amberlite-IRA67	0,0178	0,5885

Die zwei getesteten Anionenaustauscher haben sehr ähnlichen Eigenschaften hinsichtlich der Bindung von DHB. Unterschiede sind dagegen bei den Desorptionsisothermen zu beobachten. So wurde beim Anionenaustauscher Amberlite-IRA67 eine bessere Desorption von DHB mit 1 M NaOH als beim Anionenaustauscher Amberlite-IRA458 erreicht. Die maximale Ausbeute bezogen auf die Ausgangslösung lag bei Amberlite-IRA458 bei 45 %, bei Amberlite-IRA67 bei 70%.

Obwohl die erhaltenen Adsorptionsisothermen in ersten Näherung mit den Freundlich-Isothermen zu beschreiben sind, handelt es sich bei der Bindung von DHB an die Anionenaustauscher nicht nur um einen reinen Adsorptionsprozess. Die Adsorption von DHB an die Anionenaustauscher besteht aus einer physikalischen Adsorption (Physisorption) des Moleküls und aus einer Ionenaustausch-Adsorption des DHB-Ions. Diese Prozesse sind voneinander abhängig. Die physikalische Adsorption beschreibt die Freundlich-Gleichung (s. Gleichung 4.5) und die Ionenaustausch-Adsorption der Selektivitätskoeffizient des Materials. Wie auch bei den chemischen Bindungen ist der Übergang von der Adsorption zum Ionenaustausch fließend. Wann ein Ionenaustausch und wann eine Adsorption für das Festhalten eines Stoffes verantwortlich ist, kann in vielen Fällen nicht eindeutig bestimmt werden. Fast immer sind beide Mechanismen (Adsorption und Ionenaustausch) gleichzeitig nebeneinander wirksam.

Um die Entscheidung zu treffen, welcher Anionenaustauscher für die Aufarbeitung von DHB geeignet ist, ist es erforderlich, den Selektivitätskoeffizienten ($S_{\text{CH}_3\text{COO}^-}^{\text{DHB}}$) beider Anionenaustauscher zu bestimmen. Der Selektivitätskoeffizient beschreibt die Selektivität des entsprechenden Austauschers für DHB gegenüber den Acetationen, mit denen der Anionenaustauscher nach der Konditionierung beladen ist (Kanazawa et. al, 2001).

$$X_{\text{DHB}} = \frac{Q_{\text{ion}}}{1 + C_{\text{Cl}^-} / (S_{\text{CH}_3\text{COO}^-}^{\text{DHB}} \cdot C_{\text{DHB}})} \quad (4.6)$$

$S_{\text{CH}_3\text{COO}^-}^{\text{DHB}}$	Selektivitätskoeffizient des Anionenaustauschers für DHB gegenüber CH_3COO^-
$C_{\text{CH}_3\text{COO}^-}$	CH_3COO^- -Konzentration im Gleichgewicht [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$]
Q_{ion}	Maximale Kapazität des Austauschers [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Material] ($\delta \approx 1 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
X_{DHB}	Beladung mit DHB [$\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$]
C_{DHB}	Gleichgewichtskonzentration des DHB [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$]

Bei den Berechnungen wurden störende Anionen nicht berücksichtigt, weil die Menge im Verhältnis zu DHB vernachlässigbar klein war.

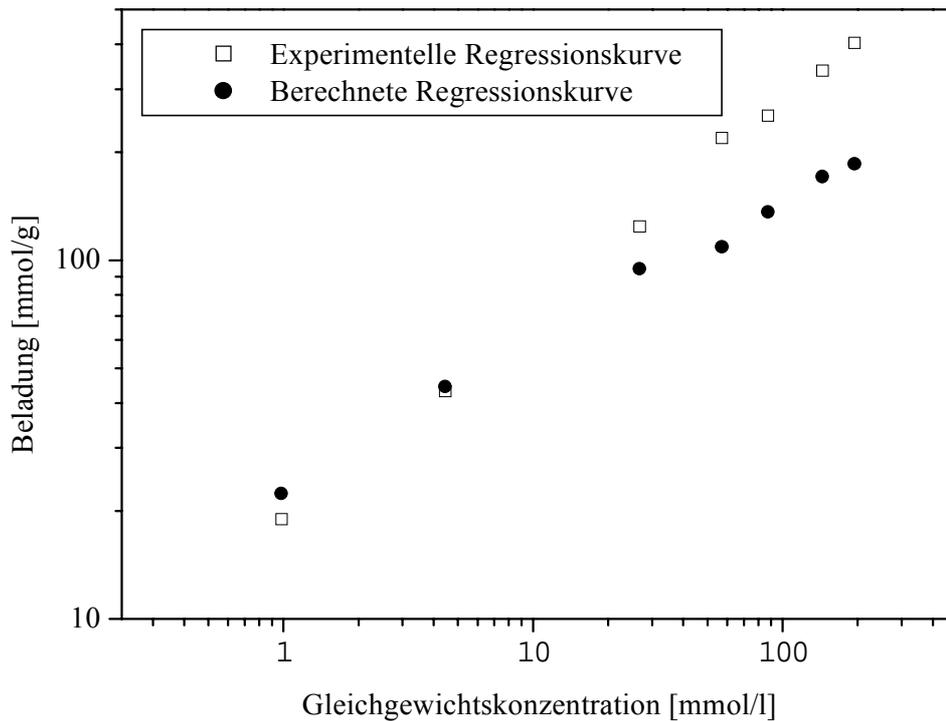


Abbildung 4.20 Bindung von DHB an Amberlite-IRA458: Vergleich zwischen den experimentellen und den berechneten Daten bei einem angenommenen Selektivitätskoeffizienten von 0,3

Aus den experimentellen Ergebnissen wurde die Beladung des Anionenaustauschers als Funktion der Gleichgewichtskonzentration logarithmisch dargestellt. Mit der Formel 4.6 wurde die theoretische Isotherme bestimmt, dabei wurde ein Selektivitätskoeffizient ($S_{\text{CH}_3\text{COO}^-}^{\text{DHB}}$) als Konstante frei ausgewählt. Der Selektivitätskoeffizient wurde solange geändert, bis eine maximale Anpassung der Isotherme erreicht wurde. Die experimentellen und berechneten Daten für die Adsorption von DHB an die beiden Anionenaustauscher Amberlite-IRA67 und Amberlite-IRA458 sind in den Abbildungen 4.20 und 4.21 dargestellt.

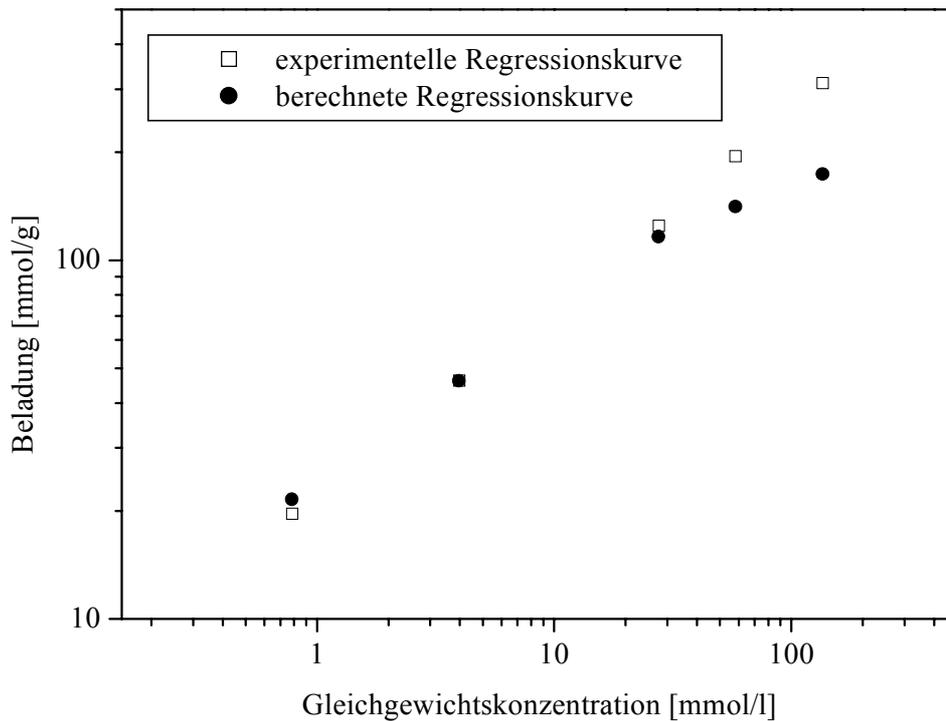


Abbildung 4.21 Bindung von DHB an Amberlite-IRA67: Vergleich zwischen den experimentellen und den berechneten Daten bei einem angenommenen Selektivitätskoeffizienten von 0,3

Obwohl beim Anionenaustauscher Amberlite-IRA458 die beiden Regressionskurven stärker voneinander abweichen als beim Anionenaustauscher Amberlite-IRA67, war die Anpassung der berechneten Daten an die experimentellen Daten bei einem Selektivitätskoeffizienten von $S_{\text{CH}_3\text{COO}^-}^{\text{DHB}} = 0,3$ in beiden Fällen am besten. Das heißt, im Bereich Selektivität gibt es zwischen den Anionenaustauschern Amberlite-IRA67 und Amberlite-IRA458 keinen signifikanten Unterschied.

4.1.3.6 Untersuchungen zur Aufarbeitung von DHB mit dem Cyclodextrin-Polymer TH 106 BA

Cyclodextrine bestehen aus 6, 7 oder 8 α -1,4-verknüpften Glucose-Einheiten (α -, β - bzw. γ -Cyclodextrine), die beim Abbau von Stärke durch *Bacillus macerans* oder *B. circulans* unter Einwirkung von Cyclodextrin-Glycosyltransferase entstehen. In ihrem Kristallgitter sind die

Einheiten so aufeinandergeschichtet, dass sie durchgehende innermolekulare Kanäle bilden, in denen sie hydrophobe Gastmoleküle in wechselnden Mengen bis zur Sättigung einschließen können. Cyclodextrine werden aufgrund dieser Eigenschaften zur Fertigung von Nahrungsmitteln, Kosmetika, Pharmazeutika und Pestiziden sowie zur Festphasenextraktion eingesetzt (Römpp Chemie Lexikon, 1995).

Auch für die Aufarbeitung von Produkten aus Fermentationsmedien stellt der Einsatz von Cyclodextrinen eine interessante Alternative dar. Höfler und Mitarbeiter (1996) zeigten, dass aromatische Verbindungen wie z. B. Benzoesäure in Cyclodextrine eingeschlossen werden können. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob auch DHB von solchen Cyclodextrinen eingeschlossen werden kann.

Die Versuche zum Einschluss von DHB in das Cyclodextrin-Polymer TH 106 BA wurden mit Fermentationslösungen durchgeführt, in denen die kontaminierende Salzkonzentration hoch war. Um zu untersuchen, welchen Einfluss Proteine, wie sie in Fermentationslösung mit lysierten Zellen normalerweise zu finden sind, auf den Einschluss des DHB haben, wurden die Untersuchungen mit einer zellfreien sowie einer ultrafiltrierten (s. 3. 17) Fermentationslösung durchgeführt.

Die so vorbereiteten DHB-haltigen Lösungen (DHB-Konzentration von $15 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) wurden mit 3, 6 und 15 g Cyclodextrin vermischt und über Nacht gerührt. Vor der Zugabe des Cyclodextrins und am Ende des Versuchs wurde die DHB-Konzentration mittels HPLC (s. Kapitel 3.11) bestimmt. In dem Ansatz, an dem die Proteine nicht entfernt worden waren, wurde keine Abnahme des DHB festgestellt. Im zweiten Ansatz, der vor dem Versuch ultrafiltriert wurde und keine Proteine über 1000 kDa enthielt, waren ca. 50 % des DHB im Cyclodextrin eingeschlossen. Die Untersuchungen zeigten also, dass die Verwendung von Cyclodextrinen prinzipiell eine Aufarbeitungsmethode für DHB darstellt. Allerdings ist es notwendig, die Proteine, die aus lysierten Zellen stammen, durch Ultrafiltration vor der Aufarbeitung zu entfernen. Aus diesem Grund ist diese Methode für eine technische Anwendung eher weniger geeignet. Es wurden deshalb keine weiteren Versuche durchgeführt.

4.1.3.7 Fällung mit Isopropanol

Wie schon im Kapitel 4.1.3.2 ausgeführt, kann DHB durch Ethylacetatextraktion und anschließender Fällung des Natriumsalzes mit Isopropanol aus einer konzentrierten wässrigen Lösung in kristalliner Form gefällt werden. Basierend auf dieser Methode, die schon von Reineke (1976) beschrieben worden war, wurde eine neue, einfachere Aufarbeitungsmethode

entwickelt. Die Idee, das DHB-haltige Fermentationsmedium ohne vorherige Extraktion mit Ethylacetat zur Fällung zu bringen, entstand aus der Tatsache, dass durch die neue Fermentationsmethode DHB-Lösungen bis zu einer Konzentration von ca. $300 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ mit geringem Salzgehalt herstellbar waren (s. 4.1.1). Durch Einengen des Fermentationsmediums (s. 3.10) war es auf einfache Weise möglich, eine DHB-Konzentration von $1\text{-}1,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ in Lösung zu erreichen. Bei dieser Konzentration war durch direkte Zugabe von Isopropanol die Fällung des DHB zu erreichen. Das Isopropanol wurde einfach mit der eingengten DHB-Lösung gemischt. In dieser Mischung war das DHB nicht mehr löslich und fiel als Natriumsalz aus. Nach der Fällung wurde das kristalline DHB einfach im Exsikkator getrocknet. Für eine weitere Aufreinigung wurde wieder in bidest. Wasser gelöst und mit frischem Isopropanol noch einmal ausgefällt.

Um die Fällungsmethode hinsichtlich der Menge an Isopropanol und der notwendigen DHB-Konzentration zu optimieren, wurden Versuche mit DHB-haltigem Fermentationsmedium mit geringem Salzgehalt durchgeführt. Durch Einengen (s. 3.10) wurden die folgenden DHB-Konzentrationen eingestellt: 200, 500, 600, 900 und $1400 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. In einem Erlenmeyerkolben wurde zu der DHB-Lösung so viel Isopropanol zugegeben, dass sich ein farblos Niederschlag bildete. Der Niederschlag wurde nach eine Stunde durch Vakuum-Filtration abgetrennt, im Exsikkator getrocknet und anschließend ausgewogen. Die Reinheit des kristallinen DHB wurde folgendermaßen bestimmt: $0,1 \text{ g}$ DHB wurde eingewogen und mit Phosphatpuffer auf einem Volumen von 1 ml aufgefüllt. Die erwartete Konzentration wurde berechnet. Anschließend wurde eine HPLC-Analyse (s. Kapitel 3.11) durchgeführt. Aus der gemessenen Konzentration wurde die genaue DHB-Menge bestimmt. Aus den zwei Werten wurde die Reinheit des Produktes berechnet (Abb. 4.22).

Die Analyse des Produktes mittels HPLC wies nach, dass die Reinheit des Produkts trotz der Komplexität des Fermentationsmediums befriedigend war (ca. 80-98 %). In der Abbildung 4.22 ist außerdem das Verhältnis der zugegebenen Isopropanolmenge zur Menge an wässriger DHB-Lösung sowie die Ausbeute in Bezug zur jeweiligen DHB-Konzentration in der wässrigen Phase dargestellt.

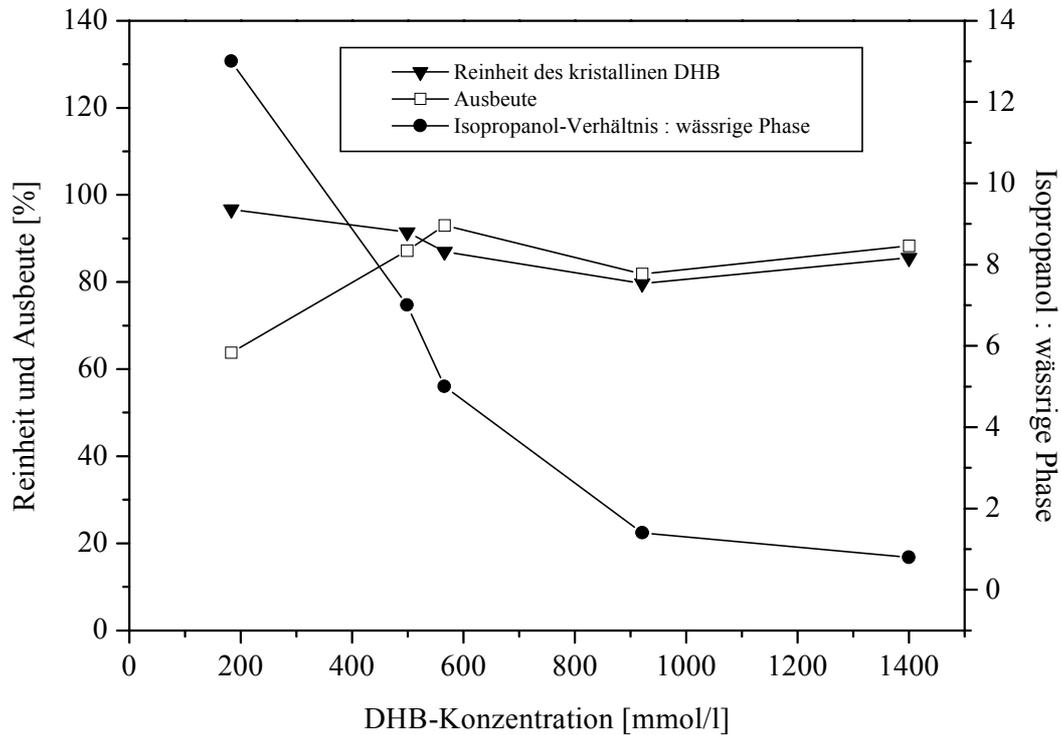


Abbildung 4.22 Fällung von DHB mit Isopropanol

Die DHB-Lösung aus einer Fermentation mit geringem Salzgehalt wurde auf unterschiedliche Konzentrationen (200, 500, 600, 900 und 1400 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) eingestellt. Für die meisten Ansätze musste die DHB-Lösung mit einem Rotationsverdampfer eingedunstet werden (s. Kapitel 3.12). In einem Erlenmeyerkolben wurde so viel Isopropanol zur DHB-Lösung gegeben, dass sich ein weißer Niederschlag bildete. Der Niederschlag wurde nach einer Stunde mit Vakuumfilter abgetrennt, im Exsikkator getrocknet und danach ausgewogen. Die Reinheit des kristallinen DHB wurde mittels HPLC bestimmt (s. Kapitel 3.11): Aus der eingewogenen Menge des DHB wurde die erwartete Konzentration berechnet und dann über die gemessene Konzentration die genaue DHB-Menge sowie die Ausbeute bestimmt.

Die Ergebnisse zeigen unterschiedliche Mengen an Isopropanol, die bei den verschiedenen Konzentrationen an DHB in Lösung benötigt werden, um akzeptable Ausbeuten zu erreichen. Je höher die DHB-Konzentration in der Lösung, desto weniger Isopropanol wird benötigt. Während bei einer Lösung von $1,4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ dieselbe Menge an Isopropanol für die Fällung ausreicht, wird bei einer Konzentration von $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ die 12-fache Menge an Isopropanol verbraucht.

Die Konzentration der DHB-Lösung spielt auch in Bezug auf die Reinheit des Produktes eine große Rolle. Je niedriger die Konzentration der Lösung war, desto sauberer wurde das

Produkt. Vermutlich können sich in verdünnten Lösungen Verunreinigungen (Proteine, Zellreste, Phosphate, Metabolite der Fructose, Fructosereste) besser lösen und verunreinigen nicht den Niederschlag.

Diese Verunreinigungen sind bereits an der Farbe des Produktpulvers zu erkennen. So ist das ausgefällte Produkt einer konzentrierten DHB-Lösung stärker gefärbt als das aus einer geringer konzentrierten DHB-Lösung gefällte Produkt (siehe Anhang, Bild 2). Wenn das Produkt nicht rein genug ist, besteht die Möglichkeit, durch ein weiteres Auflösen in bidest. Wasser und anschließende Fällung mit Isopropanol die Reinheit zu steigern. Allerdings steigt der Verlust an Produkt auch mit der Zahl der durchgeführten Fällungen.

Bei niedriger DHB-Konzentration ($100\text{-}200\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) lag die Ausbeute nur bei 64%, dafür wurde aber eine hohe Reinheit des Produktes (ca. 97%) erreicht. Im höheren DHB-Konzentrationsbereich war es möglich, DHB mit einer Ausbeute von 82-93% zu gewinnen. Allerdings lag die Reinheit des DHB dann nur bei 80-92%.

Die Fällung mit Isopropanol wurde immer bei Raumtemperatur ausgeführt. Bei einer konzentrierten DHB-Lösung (ca. 1 mol/l) wurde der Zeitfaktor bei der Fällung untersucht. Es wurde festgestellt, dass nach 1 Stunde mehr DHB ausgefallen war als nach 15 Minuten.

Wenn die Lösung über Nacht stand, konnte sich ein Teil des DHB offenbar wieder in der Wasser-Isopropanol-Mischung lösen. Die Ausbeute der Fällung war deutlich geringer. Deshalb ist es wichtig, die ausgefallenen Kristalle rechtzeitig von der Mutterlauge zu trennen. Wenn die DHB-Lösung nicht konzentriert genug war ($< 100\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), war es nicht möglich, DHB mit Isopropanol auszufällen. Um dennoch eine DHB-Fällung zu erreichen und die Ausbeute zu steigern, ist es möglich, die Mutterlauge mit einem Rotationsverdampfer einzuengen und dann Isopropanolfällungen durchzuführen. Die Reinheit der einzelnen Fraktionen kann dabei unterschiedlich sein, deshalb ist eine HPLC-Analyse der jeweiligen Fraktionen vor der Vereinigung erforderlich.

4.2 Herstellung verschiedener substituierter Dihydrodihydroxybenzoate

Nachdem ein Verfahren zur biotechnischen Herstellung von DHB im größeren Maßstab erfolgreich etabliert war, stellte sich die Frage, ob weitere substituierte DHB mit diesem zweistufigen Prozess, der aus einer Fedbatch-Fermentation und der Fällung mit Isopropanol besteht, hergestellt werden können.

Zunächst war es sinnvoll zu untersuchen, welche der zur Verfügung stehenden Bakterienstämme substituierte Benzoate zu den entsprechenden DHB umwandeln können. Es wurden Verbindungen ausgewählt, die Benzoesäure als Strukturelement enthalten und an denen eine vicinale 1,2-Dioxygenierung möglich erscheint. Die folgende Verbindungen wurden getestet:

Benzoat, 4-Methylbenzoat, 4-Methoxybenzoat, 4-Formylbenzoat, 3,5-Dimethylbenzoat, 4-Ethylbenzoat, Phenylacetat, Naphthalin-1-carboxylat, Naphthalin-2-carboxylat, Naphthalin-2-acetat, Biphenyl-2-carboxylat, Biphenyl-4-carboxylat, Biphenyl-4-acetat, 4-Aminobenzoat, 4-N-Methylaminobenzoat, 4-Hydroxybenzoat, 4-Brombenzoat, 4-Fluorbenzoat, 4-Chlorbenzoat, 4-Jodbenzoat, 4-Nitrobenzoat, 3,5-Dichlorbenzoat, 3-Aminobenzoat, 3-Brombenzoat, 3-Fluorbenzoat, 3-Chlorbenzoat, 3-Jodbenzoat, 3-Methylbenzoat, 3-Methoxybenzoat, 3-Nitrobenzoat, 3-Hydroxybenzoat, 3,4-Dimethylbenzoat, 4-Acetamidobenzoat, 3-Amino-4-chlorbenzoat, 4-(Aminomethyl)benzoat, Anthracen-4-carboxylat, 3-Carboxybenzaldehyd, 4-Hydrazinobenzoat, 4-(2-Chlorethyl)benzoat, 3-Amino-4-hydroxybenzoat, 4-Amino-3-hydroxybenzoat, 4-Fluor-1-naphthoat, 5-Brom-1-naphthoat, 4-Phenoxybenzoat, Benzophenon-3-carboxylat, Benzimidazol-5-carboxylat, α -Brom-4-tolylat, 4-Sulfamoylbenzoat, 4-Fluor-3-nitrobenzoat, 3-Brom-4-methylbenzoat, 4-(Methylmercapto)benzoat, 4-Ethoxybenzoat, 4-Cyanobenzoat, 3-Amino-4-methylbenzoat, 3-Fluor-4-methylbenzoat, 6-Hydroxynaphthalin-2-carboxylat, 3,5-Difluorbenzoat, 6-Bromnaphthalin-2-carboxylat.

Die substituierten DHB haben in ihrem UV-Vis-Spektrum ein Adsorptionsmaximum bei ca. 262 nm. Deshalb gibt es bei deren Bildung eine Zunahme der Adsorption des Mediums bei dieser Wellenlänge. Die oben genannten 56 substituierten Benzoesäurederivate wurden auf diesem Prinzip basierend mittels eines Mikrotiterplattenreaders untersucht, der im UV-Bereich messen kann. Die Umsatzversuche wurden wegen der schnelleren Analyse im Mikrotiterplatten-Maßstab statt im Schüttelkolbenmaßstab durchgeführt. Bei den Substraten, bei denen ein Umsatz festgestellt wurde, erfolgte im Anschluss an die UV-Messung im Plattenreader eine Analyse mit der HPLC (Benezan, persönliche Mitteilung).

Bei der Umsetzung kamen Stämme zum Einsatz, bei denen vorher schon beschrieben bzw. vermutet wurde, dass sie eine Dioxygenierung vicinal zur Carboxygruppe durchführen können. Drei Stämme hatten die benötigten Eigenschaften:

- *Ralstonia eutropha* B9 (Reiner & Hegeman, 1971)
- *Pseudomonas putida* BGXM1 (Whited *et. al.* 1986)
- *Pseudomonas putida* Idaho BDH2 (A. Germer, noch nicht publiziert)

Ralstonia eutropha B9 ist eine Stoffwechselmutante von *Ralstonia eutropha* 335, einem Benzoatverwerter, der nach dem initialen Oxidationsschritt im Benzoat-Katabolismus blockiert ist. Aus diesem Grund häuft er DHB im Medium an (s. Kapitel 4.1.1). Reiner und Hegeman (1971) beschrieben, dass der Stamm in der Lage ist, Benzoate, die in 3- oder 4-Position mit Fluor-, Chlor- oder einer Methylgruppe monosubstituiert sind, zu den entsprechenden DHBs umzusetzen.

Basierend auf diesen Kenntnissen und den Ergebnissen der Screeningsversuche wurden Schüttelkolbenversuche und anschließend Fedbatch-Fermentationen mit 4-Fluorbenzoat und 3,5-Difluorbenzoat als Cosubstrate durchgeführt.

Pseudomonas putida BGXM1 ist ein genetisch modifizierter Stamm von *Pseudomonas putida* BG1, einem 4-Methylbenzoatverwerter. Der Wildtyp kann 4-Methylbenzoat bzw. Benzoat vollständig zu CO₂ und H₂O oxidieren. *Pseudomonas putida* BGXM1 dagegen ist nach dem ersten Oxidationsschritt im 4-Methylbenzoat/Benzoat-Katabolismus blockiert und häuft das entsprechende DHB im Medium an (s. Kapitel 3.1). Whited (*et al.*, 1986) berichteten über die Fähigkeit des Stammes, 3- und 4-Methylbenzoat, 3-Ethylbenzoat, und 3,4-Dimethylbenzoat zu den entsprechenden DHBs umzusetzen. Basierend auf diesen Untersuchungen und den Ergebnissen der Screeningsversuche wurden Umsatzversuche und anschließend Fedbatch-Fermentationen mit 3-Methylbenzoat, 4-Methylbenzoat, 3,4-Dimethylbenzoat, 4-Brombenzoat und 4-Ethylbenzoat durchgeführt.

Pseudomonas putida Idaho BDH2 ist ein genetisch modifizierter Stamm von *Pseudomonas putida* Idaho, einem toluoltoleranten Toluolverwerter. Im Wildstamm wurden von A. Germer (Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart) beide DHB-Dehydrogenasen inaktiviert. Dadurch kann der Stamm aus Benzoat DHB herstellen (A. Germer, persönliche Mitteilung). Der Stamm wurde früher noch nicht auf substituierte Benzoate getestet. Deshalb sind die Ergebnisse der Screeningsversuche näher ausgeführt (Tabelle 4.5).

Tabelle 4.5 Umsetzung von substituierten Benzoaten als Cosubstrate mit *Pseudomonas putida* Idaho BDH2

Cosubstrat	Cosubstrat Umsetzung	DHB	Nebenprodukt(e)
Benzoat	++	d.	n.d.
4-Methylbenzoat	++	d.	n.d.
3,5-Dimethylbenzoat	+	d.	n.d.
4-Ethylbenzoat	+	d.	n.d.
Phenylacetat	++	n.d.	n.d.
4-Aminobenzoat	+	n.d.	d.
Naphthalin-2-carboxylat	+	d.	n.d.
4-Hydroxybenzoat	++	n.d.	n.d.
4-Brombenzoat	+	d.	n.d.
4-Fluorbenzoat	+	d.	n.d.
4-Chlorbenzoat	+	d.	n.d.
4-Jodbenzoat	+	n.d.	d.
3-Brombenzoat	+	d.*	d.
3-Fluorbenzoat	++	d.*	d.
3-Chlorbenzoat	+	d.*	d.
3-Jodbenzoat	+	d.*	d.
3-Methylbenzoat	++	d.	n.d.
3,4-Dimethylbenzoat	+	n.d.	d.
3-Methoxybenzoat	+	d.	d.
3-Carboxybenzaldehyd	+	n.d.	d.
4-Hydrazinbenzoat	+	n.d.	d.
3,4-Dimethylbenzoat	+	d.	n.d.

Cosubstrat	Cosubstrat Umsetzung	DHB	Nebenprodukt(e)
2-(Chlorethyl)benzoat	+	n.d.	d.
3-Brom-4-methylbenzoat	+	d.	n.d.
3-Amino-4-methylbenzoat	+	n.d.	d.
3-Fluor-4-methylbenzoat	+	d.	d.

+ Umsatzrate gering

++ Umsatzrate hoch

d. detektiert

n.d. nicht detektiert

d.* zwei DHBs wurden detektiert

Der Stamm *Pseudomonas putida* BDH2 setzte Benzoat, 4-Methylbenzoat, Phenylacetat, 4-Hydroxybenzoat, 3-Fluorbenzoat und 3-Methylbenzoat mit hohen Umsatzraten um, deshalb wären diese Cosubstrate für eine technische Anwendung interessant gewesen. Allerdings konnten Phenylacetat und 4-Hydroxybenzoat von *Pseudomonas putida* BDH2 vollständig abgebaut werden. Im Falle von 3-Fluorbenzoat und 3-Methylbenzoat wurde die Bildung von zwei DHBs und weiteren Nebenprodukten festgestellt. 4-Methylbenzoat war für die technische Anwendung nicht interessant, weil der Stamm *Pseudomonas putida* BGXM1 als Produktionsstamm mit diesem Cosubstrat schon früher beschrieben wurde (Whited *et al.* 1986). Der Stamm *Pseudomonas putida* Idaho BDH2 konnte die folgenden Verbindungen, wenn auch mit geringer Umsatzrate, umsetzen: 3,5-Dimethylbenzoat, 4-Ethylbenzoat, Naphtalin-2-carboxylat, 4-Brombenzoat, 4-Fluorbenzoat, 4-Chlorbenzoat, 3,4-Dimethylbenzoat. Bei diesen Cosubstraten waren in der HPLC-Analyse (s. Kapitel 3.11) keine Nebenprodukte nachweisbar. Nur das entsprechende DHB war entstanden. Nach den Ergebnissen der Screeningsversuche mit den anderen beiden Stämmen und den Umsatzversuchen mit *Pseudomonas putida* BDH2 wurde 4-Chlorbenzoat für die Herstellung des entsprechenden DHB mit diesem Stamm ausgewählt.

Im industriellen Auftrag sollten neue Synthone hergestellt werden, die als potentielle Zwischenprodukte für Pharmawirkstoffe oder Agrochemikalien getestet werden sollten. Das Ziel war es, jeweils 5 g verschieden substituierte DHBs als Synthone mittels Fedbatch-Fermentation herzustellen. Basierend auf den Ergebnissen der Vorversuche wurden Cosubstrate nicht verwendet, bei denen ein geringer Umsatz bzw. ein vollständiger Abbau

stattgefunden hatte. In manchen Fällen sind nicht die gewünschten Produkte entstanden, sondern andere Produkte, die nicht die zu erwartenden spektralen Eigenschaften aufwiesen. In einigen Fällen wurden zwei isomere DHB gebildet oder es traten Nebenprodukte als Verunreinigungen auf. Mit diesen Benzoaten wurden keine weitere Untersuchungen durchgeführt.

Bei manchen substituierten Benzoate entstand das gewünschte Produkt, jedoch war die Produktion in technischen Maßstab nicht lohnend da die Umsatzrate zu niedrig oder das Cosubstrat zu teuer war. Aus den genannten Gründen wurden die folgenden Benzoate als Cosubstrate für die biotechnische Herstellung von DHB ausgewählt:

- ◆ 4-Fluorbenzoat mit *Ralstonia eutropha* B9
- ◆ 3,5-Difluorbenzoat mit *Ralstonia eutropha* B9
- ◆ 3-Methylbenzoat mit *Pseudomonas putida* BGXM1
- ◆ 4-Methylbenzoat mit *Pseudomonas putida* BGXM1
- ◆ 3,4-Dimethylbenzoat mit *Pseudomonas putida* BGXM1
- ◆ 4-Brombenzoat mit *Pseudomonas putida* BGXM1
- ◆ 4-Ethylbenzoat mit *Pseudomonas putida* BGXM1
- ◆ 4-Chlorbenzoat mit *Pseudomonas putida* Idaho BDH2

4.2.1 Herstellung von 4-Fluor- und 3,5-Difluor-DHB mit *Ralstonia eutropha* B9

Der Stamm *Ralstonia eutropha* B9 hatte die besten Ergebnisse bei der Umsetzung von Benzoat zu DHB erzielt (s. Kapitel 4.1.1). Allerdings konnte der Stamm von 58 Benzoaten nur 4-Fluorbenzoat und 3,5-Difluorbenzoat im Hinblick auf eine technische Anwendung mit genügender Rate umsetzen.

Nach erfolgreichen Vorversuchen im Schüttelkolben wurden Fedbatch-Fermentationen mit beiden Substraten durchgeführt. Das Medium im Reaktor (s. Kapitel 3.5) war 1 mmol·l⁻¹ Phosphatpuffer mit Mineralsalzen (s. Kapitel 3.2.1), das Substrat und das Cosubstrat wurden unter strenger Kontrolle zugegeben. Die Versuchsdurchführung erfolgte analog der in 4.1.1 beschriebenen Fedbatch-Fermentation mit Benzoat als Cosubstrat und Fructose als Substrat. Antischaummittel wurde nicht benutzt, um eine Verunreinigung des Produktes zu vermeiden. Die Fedbatch-Fermentationen wurden möglichst nach 1-3 Tagen (bzw. bei einer DHB-Konzentration von 20-50 mmol/) gestoppt, um ein möglichst sauberes Medium am Ende der

Fermentation zu erhalten. Je länger eine Fedbatch-Fermentation dauert, desto mehr Verunreinigungen treten durch Bildung von Nebenprodukten, Metaboliten des Substrates oder durch lysierte Zellen auf.

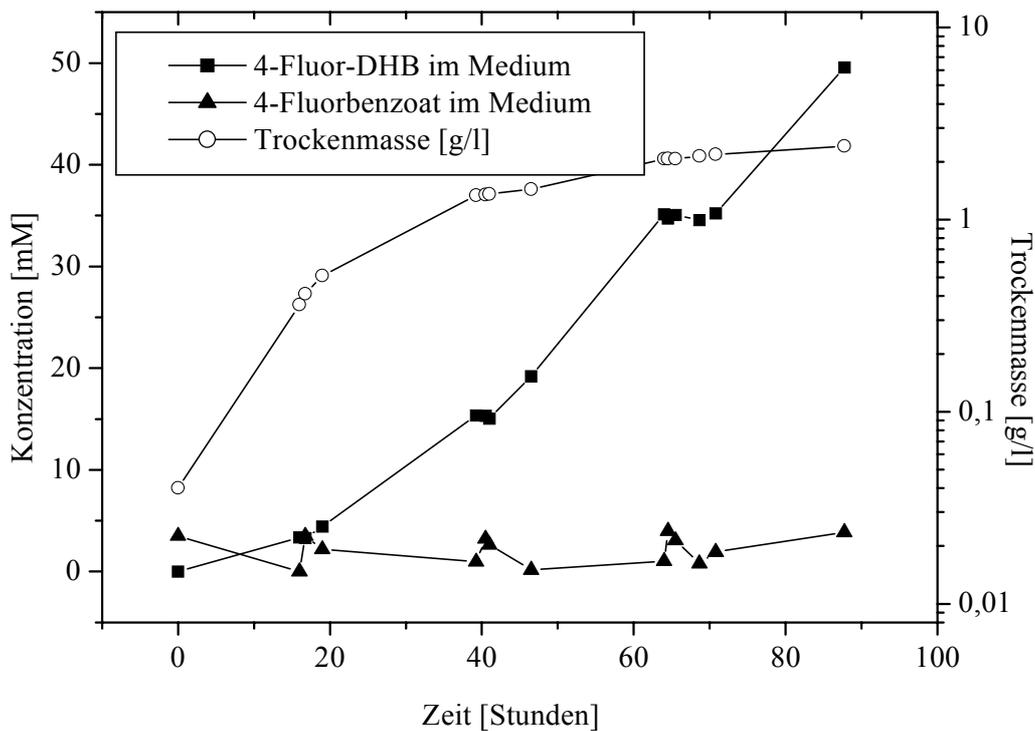


Abbildung 4.23 Fedbatch-Fermentation von 4-Fluorbenzoat mit *Ralstonia eutropha* B9 in $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer und mit Fructose als Auxiliarsubstrat

1700 ml $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer wurde in einem 2 l Reaktor mit 40 ml Vorkultur (Komplexmedium ohne Induktionssubstrat) beimpft. Die Ausgangskonzentrationen im Reaktor waren die folgenden: $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Fructose und $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 4-Fluorbenzoat in verdünntem Mineralsalzmedium (s. Kapitel 3.2.1). Während des gesamten Versuchs wurde die 4-Fluorbenzoatkonzentration mittels HPLC (s. Kapitel 3.11) gemessen und so nachdosiert, dass sie eine Konzentration von $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ nicht überschritt. Fructose wurde im Durchschnitt mit ca. $0,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ dosiert.

Die Zellen waren innerhalb von 24 Stunden auf eine $\text{OD}_{546\text{nm}}$ von 1,45 (\cong einer Trockenmasse von 0,51 g/l) gewachsen. In dieser Wachstumsphase erfolgte auch die Induktion der Benzoat-Dioxygenase durch 4-Fluorbenzoat. Trotz Zugabe von Fructose stagnierte das Wachstum von diesem Zeitpunkt an. Die Fructosezugabe führte lediglich zu einem Erhalt der Biomasse.

Allerdings ist zu berücksichtigen, dass keine weiteren Mineralsalze zugegeben wurden. Da 5 g 4-Fluor-DHB hergestellt werden sollten, wurde die Fermentation im Hinblick auf eine möglichst hohe Produktreinheit nach 90 Stunden abgebrochen (Abb. 4.23). Nach dieser Zeit war die Umsatzrate für 4-Fluorbenzoat aber noch so hoch, dass vermutlich deutlich höhere Mengen an 4-Fluor-DHB herstellbar gewesen wären. Bevor der Versuch abgebrochen wurde, wurde sicher gestellt, dass kein Fructose mehr in der Fermentationslösung nachweisbar war (s. Kapitel 3. 10). Die Cosubstratkonzentration wurde immer unter $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ gehalten, deshalb ist es nicht möglich, eine Aussage über die Toxizitätsgrenze des Cosubstrates zu treffen.

Bei diesem Versuch wurden aus $53 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 4-Fluorbenzoat $47 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 4-Fluor-DHB hergestellt. Mit einer Restcosubstratmenge von $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ergibt sich $Y_{P/C} = 0,93$ (Gleichung 4.1). Für die Herstellung von $47 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 4-Fluor-DHB wurde $76 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Fructose verbraucht, was ein $Y_{C/S} = 0,64$ ergibt (Gleichung 4.2).

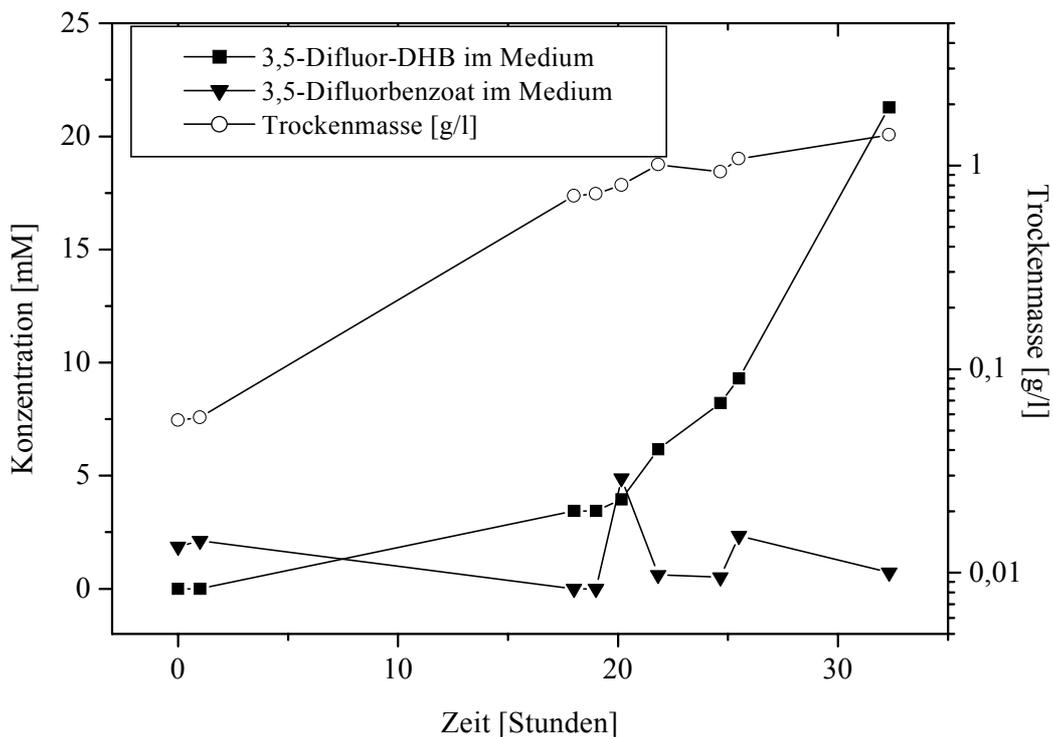


Abbildung 4.24 Fedbatch-Fermentation von 3,5-Difluorbenzoat mit *Ralstonia eutropha* B9 in $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer und mit Fructose als Auxiliarsubstrat

1600 ml $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer wurde in einem 2 l Reaktor mit 40 ml Vorkultur (Komplexmedium ohne Induktionssubstrat) beimpft. Die Ausgangskonzentrationen im Reaktor waren die folgenden: $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$

Fructose und $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 3,5-Difluorbenzoat in verdünntem Mineralsalzmedium (s. Kapitel 3.2.1). Während des gesamten Versuchs wurde die 3,5-Difluorbenzoatkonzentration mittels HPLC (s. Kapitel 3.11) gemessen und so nachdosiert, dass sie eine Konzentration von $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ nicht überschritt. Fructose wurde im Durchschnitt mit $0,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ dosiert.

Auch mit dem Cosubstrat 3,5-Difluorbenzoat wurde eine analoge Fedbatch-Fermentation durchgeführt. Die Zellen waren innerhalb von 24 Stunden auf ein $\text{OD}_{546 \text{ nm}}$ von 3,0 (\cong einer Trockenmasse von $1,0 \text{ g/l}$) gewachsen. Anschließend nahm die Biomasse nur noch geringfügig zu. Die Fructosezugabe führte also nur zu einem Biomasseerhalt. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass keine weiteren Mineralsalze zugegeben wurden. In dieser Wachstumsphase erfolgte auch die Induktion der Benzoat-Dioxygenase durch 3,5-Difluorbenzoat. Auch in diesem Fall wäre möglich gewesen, höhere Produktkonzentrationen zu erreichen. Aber im Hinblick auf eine möglichst hohe Produktreinheit wurde die Fermentation nach 33 Stunden abgebrochen. Zuvor wurde sichergestellt, dass keine Fructose mehr in der Fermentationslösung nachweisbar war (s. Kapitel 3.10). Die Cosubstratkonzentration wurde immer unter $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ gehalten, deshalb ist es nicht möglich, eine Aussage über die Toxizitätsgrenze des Cosubstrates zu treffen (Abb. 4.24).

Bei diesem Versuch wurden aus $29 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 3,5-Difluorbenzoat $21 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 3,5-Difluor-DHB hergestellt. Mit einer Restcosubstratmenge von $0,7 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ergibt sich $Y_{P/C} = 0,74$ (Gleichung 4.1). Für die Herstellung von $21 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 3,5-Difluor-DHB wurde $35 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Fructose verbraucht, was ein $Y_{C/S} = 0,61$ ergibt (Gleichung 4.2).

4.2.2 Herstellung von 3-Methyl-, 4-Methyl-, 3,4-Dimethyl-, 4-Brom-, und 4-Ethyl-DHB

Basierend auf Literaturangaben (Whited *et al.*, 1986) und den Ergebnissen der Screeningsversuche (s. Kapitel 4.2) sowie Umsatzversuchen zur Bestimmung der Umsatzraten wurden mit dem Stamm *Pseudomonas putida* BGXM1 Fedbatch-Fermentationen mit 3-Methyl-, 4-Methyl-, 3,4-Dimethyl-, 4-Brom-, und 4-Ethylbenzoat durchgeführt. Ziel war es, die korrespondierenden DHBs aus diesen substituierten Benzoaten herzustellen. Die Versuchsführung erfolgte analog der in Kapitel 4.1.1 beschriebenen Fedbatch-Fermentation mit Benzoat als Cosubstrat. Die Fermentation wurde in einem $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer mit Mineralsalzen (s. Kapitel 3.2.1) durchgeführt. Fructose diente als Auxiliarsubstrat.

Bei den Cosubstraten 3-Methylbenzoat und 3,4-Dimethylbenzoat besteht die Möglichkeit, dass der aromatische Ring in 1,2- oder 1,6- Position oxidiert wird (s. Abb. 5.6). Allerdings

war bei der Umsetzung dieser Cosubstrate mit dem Stamm *Pseudomonas putida* BGXM1 hauptsächlich nur ein Stellungsisomer des Dihydrodihydroxybenzoates zu beobachten, der Anteil des zweiten DHB lag nach der HPLC-Analyse unter 1%. Diese interessante Beobachtung wurde auch schon von Whited *et al.* beschrieben.

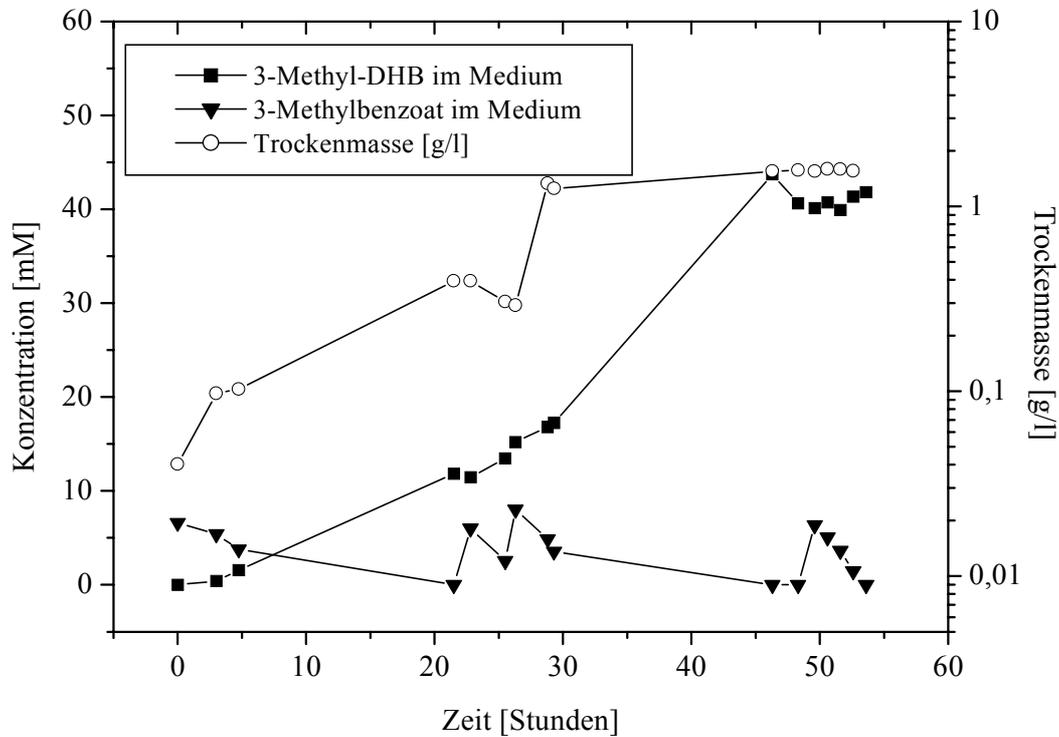


Abbildung 4.25 Fedbatch-Fermentation von 3-Methylbenzoat mit *Pseudomonas putida* BGXM1 in $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer und mit Fructose als Auxiliarsubstrat

1600 ml $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer wurde in einem 2 l Reaktor mit 40 ml Vorkultur (Minimalmedium ohne Induktionssubstrat) beimpft. Die Ausgangskonzentrationen im Reaktor waren die folgenden: $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Fructose und $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 3-Methylbenzoat, Mineralsalzmedium verdünnt (s. Kapitel 3.2.1). Während des gesamten Versuchs wurde die 3-Methylbenzoatkonzentration mittels HPLC (s. Kapitel 3.11) kontrolliert und so nachdosiert, dass sie eine Konzentration von $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ nicht überschritt. Fructose wurde im Durchschnitt mit $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ dosiert.

In Abbildung 4.25 ist die Fedbatch-Fermentation von 3-Methylbenzoat dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Zellen innerhalb von ca. 30 Stunden auf ein $\text{OD}_{546\text{nm}}$ von 3,1 (\cong einer Trockenmasse von 1,31 g/l) gewachsen waren. In dieser ersten Wachstumsphase wurde auch die Toluat-Dioxygenase (4-Methylbenzoat-Dioxygenase) induziert. Trotz Zugabe von Fructose stagnierte das Wachstum in der zweiten Wachstumsphase. Es wurde also soviel Fructose zugegeben, dass die Biomasse und deren Aktivität erhalten blieb. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass keine weiteren Mineralsalze zugegeben wurden.

Aus unbekanntenen Gründen wurde nach 45 Stunden kein 3-Methyl-DHB mehr gebildet, obwohl das Cosubstrat weiter umgesetzt wurde. Deshalb wurde die Fermentation abgebrochen. Zuvor wurde sichergestellt, dass keine Fructose mehr in der Fermentationslösung nachweisbar war (s. Kapitel 3.10). Da die Zellen eine Cosubstratkonzentration von $8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ noch tolerieren, kann die Toxizität des Cosubstrates als Ursache für die Abnahme der Bildungsrate an DHB ausgeschlossen werden.

Bei diesem Versuch wurden aus $58 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 3-Methylbenzoat $42 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 3-Methyl-DHB hergestellt. Am Ende der Fermentation war kein Cosubstrat mehr nachweisbar, deshalb ergibt sich $Y_{P/C} = 0,72$ (Gleichung 4.1). Für die Herstellung von $42 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 3-Methyl-DHB wurden $34 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Fructose verbraucht, was ein $Y_{C/S} = 1,23$ ergibt (Gleichung 4.2) ergibt.

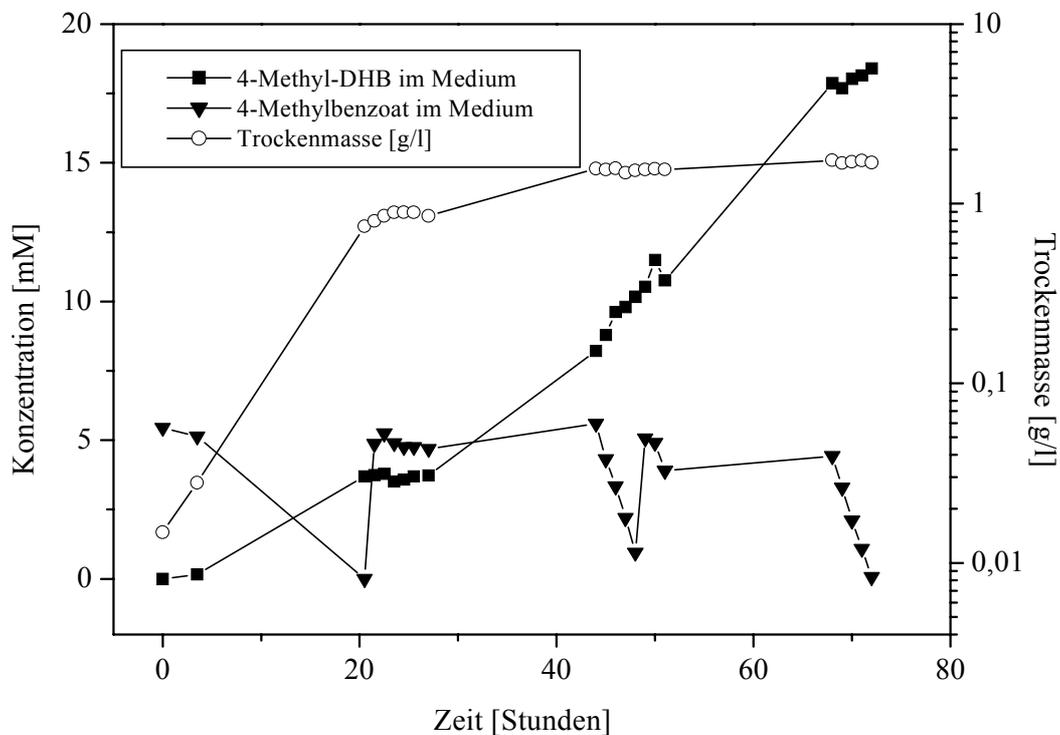


Abbildung 4.26 Fedbatch-Fermentation von 4-Methylbenzoat mit *Pseudomonas putida* BGXM1 in $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer und mit Fructose als Auxiliarsubstrat

1700 ml $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer wurde in einem 2 l Reaktor mit 40 ml Vorkultur (Minimalmedium ohne Induktionssubstrat) beimpft. Die Ausgangskonzentrationen im Reaktor waren die folgenden: $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Fructose und $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 4-Methylbenzoat in verdünntem Mineralsalzmedium (s. Kapitel 3.2.1). Während des gesamten Versuchs wurde die 4-Methylbenzoatkonzentration mittels HPLC (s. Kapitel 3.11) gemessen und so nachdosiert, dass sie eine Konzentration von $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ nicht überschritt. Fructose wurde im Durchschnitt mit $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ dosiert.

In Abbildung 4.26 ist die Fedbatch-Fermentation von 4-Methylbenzoat dargestellt. Auch bei diesem Versuch wurde die Biomasse innerhalb von 24 Stunden gezüchtet ($OD = 2,1$; \cong Trockenmasse $0,89 \text{ g/l}$), anschließend nahm diese bis zum Ende des Versuchs nur noch auf einen $OD_{546 \text{ nm}}$ -Wert von $3,6$ zu (\cong einer Trockenmasse von $1,52 \text{ g/l}$). Allerdings konnte die Kultur N-limitiert sein, da keine weiteren Mineralsalze zugegeben wurden. Die Induktion der Toluat-Dioxygenase erfolgte ebenfalls in der ersten Wachstumsphase. Die hohe Umsatzrate von 4-Methylbenzoat gegen Ende der Fermentation lässt erkennen, dass es möglich gewesen wäre, eine höhere Produktkonzentration zu erreichen. Allerdings wurde die Fermentation im Hinblick auf ein möglichst hohe Produktreinheit nach 72 Stunden abgebrochen. Zu diesem Zeitpunkt war keine Fructose mehr nachweisbar (s. Kapitel 3.10). Die Cosubstratkonzentration wurde unter $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ gehalten, deshalb kann über die Toxizitätsgrenze keine Aussage getroffen werden.

Bei diesem Versuch wurde aus $38 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 4-Methylbenzoat $18 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 4-Methyl-DHB hergestellt. Am Ende der Fermentation war kein Cosubstrat mehr nachweisbar, deshalb ergibt sich $Y_{P/C} = 0,47$ (Gleichung 4.1). Für die Herstellung von $18 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 4-Methyl-DHB wurde $32 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Glucose verbraucht, was ein $Y_{C/S} = 0,56$ ergibt (Gleichung 4.2).

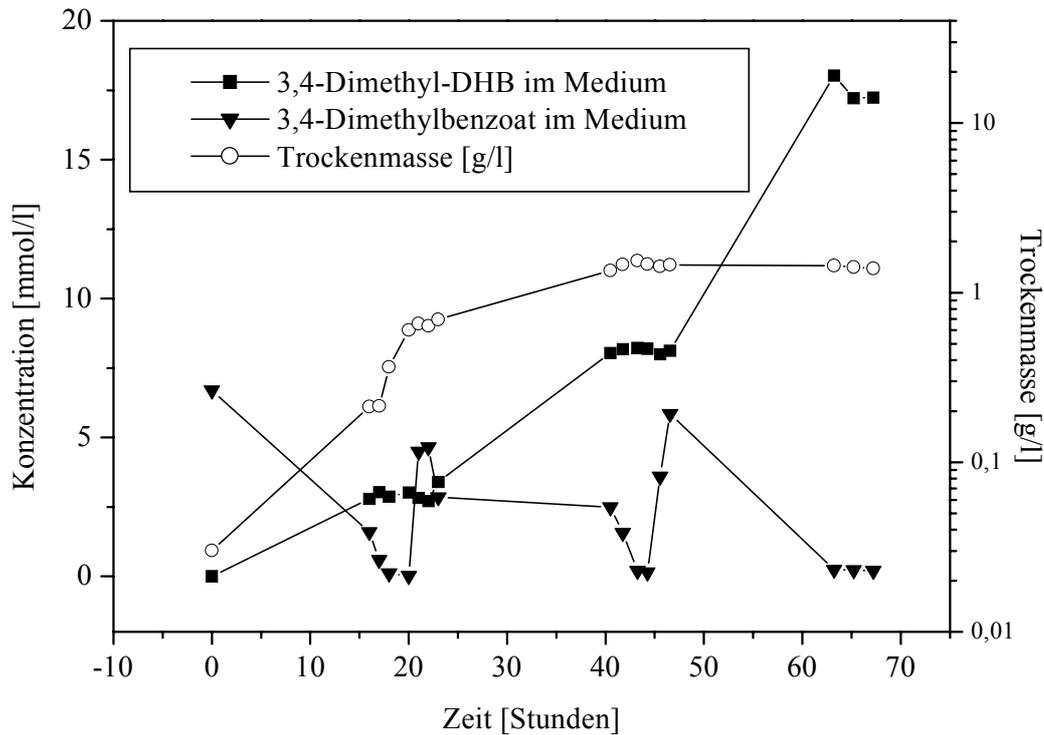


Abbildung 4.27 Fedbatch-Fermentation von 3,4-Dimethylbenzoat mit *Pseudomonas putida* BGXM1 in $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer und mit Fructose als Auxiliarsubstrat

1600 ml $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer wurde in einem 2 l Reaktor mit 40 ml Vorkultur (Minimalmedium ohne Induktionssubstrat) beimpft. Die Ausgangskonzentrationen im Reaktor waren die folgenden: $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Fructose und $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 3,4-Dimethylbenzoat in verdünntem Mineralsalzmedium (s. Kapitel 3.2.1). Während des gesamten Versuchs wurde die 3,4-Dimethylbenzoatkonzentration mittels HPLC (s. Kapitel 3.11) gemessen und so nachdosiert, dass sie eine Konzentration von $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ nicht überschritt. Fructose wurde im Durchschnitt mit $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ dosiert.

Auch mit 3,4-Dimethylbenzoat konnte eine Fedbatch-Fermentation mit den üblichen Bedingungen erfolgreich durchgeführt werden. Die Hauptmenge an Biomasse wurde innerhalb von 24 Stunden gebildet ($\text{OD}_{546 \text{ nm}} = 1,6$; \cong einer Trockenmasse von $0,68 \text{ g/l}$). Bis zum Ende der Fermentation nahm die Biomasse noch auf eine optische Dichte $\text{OD}_{546 \text{ nm}} = 3,6$ zu (\cong einer Trockenmasse von $1,52 \text{ g/l}$). Allerdings konnte die Kultur N-limitiert sein, da keine weiteren Mineralsalze zugegeben wurden.

Nach ca. 60 Stunden war eine Abnahme der Produktkonzentration zu beobachten. Deshalb wurde die Fermentation abgebrochen. Zuvor wurde sichergestellt, dass kein Fructose in der Fermentationslösung mehr nachweisbar war (s. Kapitel 3.10). Die Zellen konnten bis zu 7

$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 3,4-Dimethylbenzoat tolerieren. Es wurde die Cosubstratzugabe so kontrolliert, dass sie eine Konzentration von $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ im Reaktor nicht überstieg.

Bei diesem Versuch wurde aus $32 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 3,4-Dimethylbenzoat $17 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 3,4-Dimethyl-DHB hergestellt. Mit einer Restcosubstratmenge von $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ergibt sich $Y_{P/C} = 0,53$ (Gleichung 4.1). Für die Herstellung von $17 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 3,4-Dimethyl-DHB wurde $33 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Glucose verbraucht, was ein $Y_{C/S} = 0,52$ ergibt (Gleichung 4.2).

Mit den Verbindungen 4-Brombenzoat und 4-Ethylbenzoat ist es nicht gelungen, eine befriedigende Fedbatch-Fermentation durchzuführen. Unter den Bedingungen bei denen Benzoat mit hoher Rate umgesetzt wurde (pH-Kontrolle, ausreichende Sauerstoffzufuhr im Fermenter) hatten die Zellen so niedrige Umsatzraten ($\text{max. } 0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), dass bei einer 3-4-tägigen Fermentation nur eine Endkonzentration des Produkts von $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ erreicht wurde. Wie später erklärt wird, war für eine Aufarbeitung aber mindestens eine Produktkonzentration von $10\text{-}15 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ nötig.

4.2.3 Herstellung von 4-Chlor-DHB mit *Pseudomonas putida* Idaho BDH2

Wie schon im Kapitel 4.2 ausgeführt, kann das neu konstruierte Derivat BDH2 von *Pseudomonas putida* Idaho eine Vielzahl von substituierten Benzoaten umsetzen. Basierend auf Umsatzversuchen zur Bestimmung der Umsatzrate von 4-Chlorbenzoat wurden mehrere erfolgreiche Fedbatch-Fermentationen mit diesem Cosubstrat durchgeführt, von denen eine exemplarisch in Abbildung 4.28 dargestellt ist.

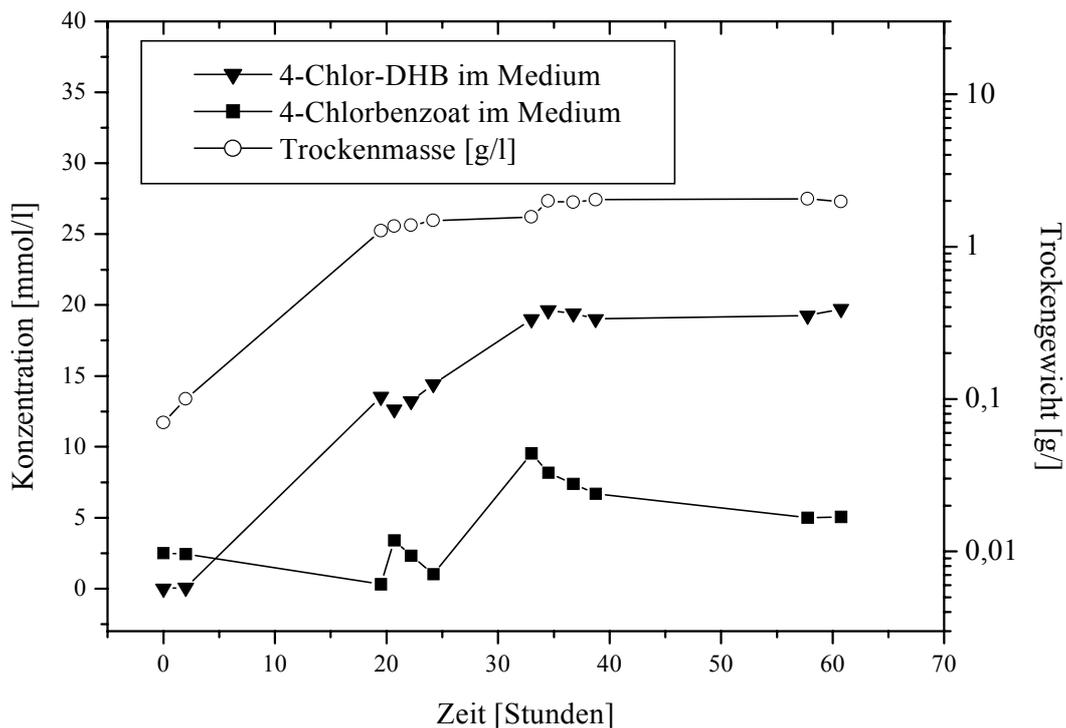


Abbildung 4.28 Fedbatch-Fermentation von 4-Chlorbenzoat mit *Pseudomonas putida* Idaho BDH2 in $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer und mit Glucose als Auxiliarsubstrat

1400 ml $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer wurde in einem 2 l Reaktor mit 40 ml Vorkultur (Minimalmedium ohne Induktionssubstrat) beimpft. Die Ausgangskonzentrationen im Reaktor waren die folgenden: $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Glucose und $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 4-Chlorbenzoat in verdünntem Mineralsalzmedium (s. Kapitel 3.2.1). Während des gesamten Versuchs wurde die 4-Chlorbenzoatkonzentration mittels HPLC (s. Kapitel 3.11) kontrolliert und so nachdosiert, dass sie eine Konzentration von $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ nicht überschritt. Glucose wurde im Durchschnitt mit $2,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ dosiert.

Es ist zu erkennen, dass die Zellen innerhalb von 20 Stunden auf eine optische Dichte $\text{OD}_{546 \text{ nm}} = 3,2$ (\cong einer Trockenmasse von $1,48 \text{ g/l}$) gewachsen waren. In dieser Wachstumsphase wurde auch die Benzoat-Dioxygenase induziert. Trotz weiterer Zugabe von Fructose wuchsen die Zellen in der zweiten Phase der Fermentation nur noch geringfügig. Allerdings konnte die Kultur N-limitiert sein, da keine weiteren Mineralsalze zugegeben wurden. Am Ende der Fermentation lag die optische Dichte bei $\text{OD}_{546 \text{ nm}} = 4,2$ (\cong einer Trockenmasse von $1,94 \text{ g/l}$) (Abb. 4.29). Interessanterweise wurde beobachtet, dass ab dem Zeitpunkt, zu dem die Zellen nur geringfügig wuchsen, keine Zunahme der 4-Chlor-DHB-Konzentration mehr zu beobachten war. Dieser Aktivitätsausfall führte zu einer Überdosierung und Anhäufung des Cosubstrates. Da sich aber die Konzentration des Cosubstrates nach 60 Stunden praktisch nicht mehr änderte, wurde die Fermentation abgebrochen. Zuvor wurde sichergestellt, dass

die Glucose vollständig abgebaut worden war. Möglicherweise verursachte die relativ hohe Konzentration an 4-Chlorbenzoat (ca. $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) den plötzlichen Aktivitätsverlust.

Bei diesem Versuch wurden aus $24 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 4-Chlorbenzoat $19 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 4-Chlor-DHB hergestellt. Mit einer Restcosubstratmenge von $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ergibt sich $Y_{P/C} = 1$ (Gleichung 4.1). Für die Herstellung von $19 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 4-Chlor-DHB wurde $139,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Glucose verbraucht, was ein $Y_{C/S} = 0,17$ ergibt (Gleichung 4.2). Während der Fermentation wurde die Glucosekonzentration regelmäßig kontrolliert, es war in keinem Fall mehr als $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ nachweisbar.

In Abbildung 4.29 sind die maximalen Produktkonzentrationen dargestellt, die bei den Fedbatch-Fermentationen erreicht wurden. Es ist zu erkennen, dass die maximal erreichte DHB-Konzentration bei der Fedbatch-Fermentation von Benzoat deutlich höher war. Dies liegt größtenteils daran, dass die Fermentationen mit den substituierten Benzoaten zu einem frühen Zeitpunkt abgebrochen wurden, um möglichst reine Produkte zu erhalten.

Die Ausbeuten der DHB bezogen auf die umgesetzte Cosubstratmenge waren relativ gut und lagen bei fast allen Cosubstraten über 70 %. Zwei Cosubstrate, 4-Methylbenzoat und 3,4-Dimethylbenzoat, wurden offensichtlich von dem entsprechenden Stamm teilweise vollständig abgebaut. Deshalb lag bei den Cosubstraten im Falle von 3,4-Dimethylbenzoat die Produktausbeute bei 55% und bei 3-Methylbenzoat sogar nur bei 47 % (Abb. 4.30).

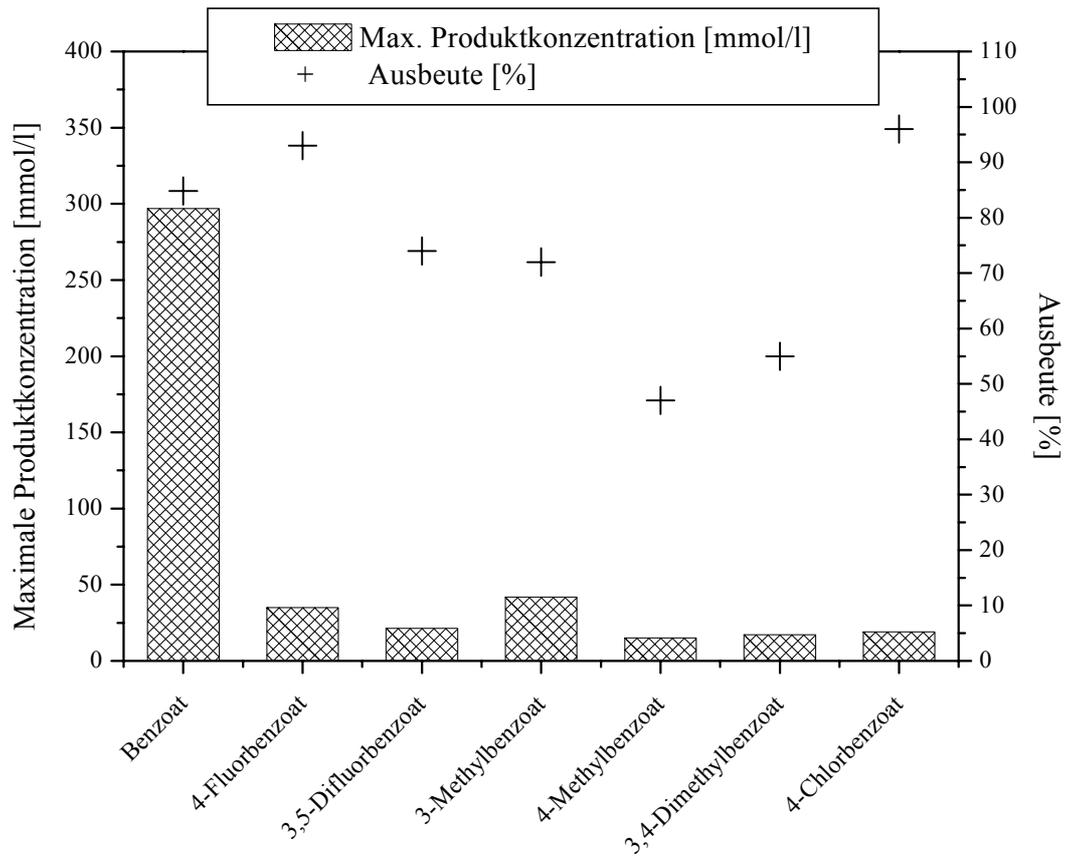


Abbildung 4.29 Maximale Produktkonzentrationen und Ausbeuten bei den verschiedenen Fedbatch-Fermentationen von substituierten Benzoaten mit *Ralstonia eutropha* B9, *Pseudomonas putida* Idaho BDH2 bzw. *Pseudomonas putida* BGXM1

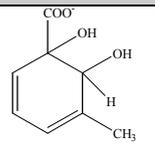
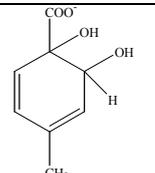
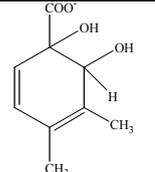
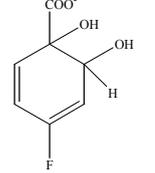
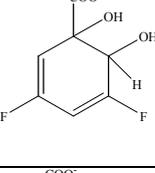
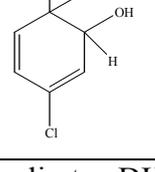
4.2.4 Fällung der Na-Salze der substituierten DHBs mit Isopropanol

Ziel der zuvor beschriebenen Fedbatch-Fermentationen war es, jeweils 5 g des Na-Salzes der substituierten DHB als kristallines Produkt zu erhalten. Um die Produkte zu isolieren, wurde nach der für Na-DHB entwickelten Methode vorgegangen (s. Kapitel 4.1.3.7). Aus Tabelle 4.6 ist zu entnehmen, dass im Fall von 4-Chlor-DHB und 4-Methyl-DHB die Produktkonzentrationen (s. Kapitel 4.2.2 und 4.2.3) so niedrig waren, dass für die Isolierung der Produkte durch Fällung weitere Fermentationen durchgeführt werden mussten.

Für die Fällung mit Isopropanol wurde das jeweilige DHB-haltige Fermentationsmedium eingengt (s. Kapitel 3.10), so dass die Konzentration des jeweiligen substituierten DHB bei 200-500 mmol·l⁻¹ lag. In Vorversuchen (jeweils 1 ml) wurde die für die Fällung benötigte Isopropanolmenge bestimmt. Zu der eingengten Lösung wurde dann die entsprechende Menge Isopropanol zugegeben und geschüttelt. Nach eine Stunde wurde der Niederschlag mit Vakuumfilter abgetrennt. Falls die HPLC-Analyse (s. Kapitel 3.11) des isolierten Produktes noch Verunreinigungen erkennen ließ, wurde das Produkt noch einmal in bidest. Wasser aufgenommen und mit frischem Isopropanol (Menge je nach DHB-Konzentration, s. Abb. 4.23) erneut ausgefällt. Das Produkt wurde anschließend im Exsikkator getrocknet.

In Tabelle 4.6 sind Daten zusammengefasst, die für die Herstellung der DHB von Bedeutung waren. Die Ausbeute an kristallinem DHB bezogen auf die umgesetzte Cosubstratmenge war bei allen Verbindungen relativ niedrig (zwischen 13 und 68%), aber die Reinheit der Produkte lag in der Regel über 90 %. Nur im Falle von 4-Methyl-DHB und 3,4-Dimethyl-DHB lag die Reinheit nur bei 86 bzw. 81 %.

Tabelle 4.6 Daten der hergestellten *cis*-Dihydrodihydroxybenzoate aus Fermentationen mit verschiedenen substituierten Benzoaten als Cosubstrat

Cosubstrat	Formel des Produktes (<i>cis</i> -Dirole)	Anzahl und (Dauer) der Fermentation	Zugegebene Cosubstratmenge [mmol]	Ausbeuten der ausgefällten Na-Salze der Dihydrodihydroxybenzoate [%]**	Reinheit [%]***
3-Methylbenzoat		1 (3 Tage)	75,7	68 (9,9 g)*	95
4-Methylbenzoat		4 (3-7 Tage)	198,3	13 (5,1 g)	86
3,4-Dimethylbenzoat		1 (4 Tage)	52,0	26 (2,8 g)	81
4-Fluorbenzoat		1 (5 Tage)	80,1	41 (6,5 g)	94
3,5-Difluorbenzoat		1 (3 Tage)	45,4	63 (6,1 g)	94
4-Chlorbenzoat		2 (3 Tage)	33,6	35 (1,1 g)	92

* Menge an isolierten DHB

** Nach HPLC-Analyse

*** Bestimmung siehe Kapitel 4.1.3.7

4.3. Versuche mit Toluol

4.3.1. Löslichkeit vom Toluol

Wie schon in der Einleitung ausgeführt, wirkt Toluol auf die meisten Bakterien toxisch. Toluol ist in Wasser relativ schlecht löslich (0,52 g/l bei 20 °C). Es bildet in einem wässrigen Puffersystem eine zweite Phase, falls die Konzentration über der Löslichkeitsgrenze liegt. Es wurden überwiegend *Pseudomonas putida* Stämme beschrieben, die gegenüber Toluol tolerant sind (Weber *et al.*, 1994; Heipieper *et al.*, 1995; Pinkart *et al.*, 1996; Ramos *et al.*, 1997). Auf die genauen Mechanismen der Toluoltoleranz wurde in der Einleitung eingegangen. Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit kamen *Pseudomonas putida* Stämme zum Einsatz. Diese Bakterienstämme können DHB aus Toluol bilden (s. Kapitel 3.1). Um mögliche toxische Effekte des Toluols von vorneherein auszuschließen, wurde Toluol bei den Untersuchungen zur Bildung von DHB schonend über die Gasphase zugeführt. Toluol lagert sich hauptsächlich in die Membranen ein, wodurch deren Funktion beeinträchtigt wird. Das kann unter Umständen sogar zum Zelltod führen. In der Literatur wurden sogenannte lösungsmitteltolerante Bakterien beschrieben, die z.B. Toluol in hohen Konzentrationen und sogar in einem Zweiphasensystem tolerieren können.

Um das Phosphatpuffer-Toluol-System näher zu charakterisieren, wurden zunächst Versuche im Puffersystem ohne Zellen durchgeführt. Das Ziel dieser Versuche war, ein System zu etablieren, in dem die Toluolzugabe nicht von der Diffusion des Toluols über die Gasphase abhängig ist. Gleichzeitig sollte sich das Toluol relativ schnell in dem Puffer lösen, ohne dass die Konzentration zu hoch wird.

Für die Experimente wurden zunächst gasdicht verschließbare Glasgefäße eines BSB-Bestimmungsgerätes verwendet. Die Glasgefäße waren an der Seite mit einer Probennahmestelle ausgestattet. Es war möglich, einen kleinen Seitenansatz anzuschließen, der mit Toluol gefüllt wurde (s. Abb. 4.30). Um die Lösegeschwindigkeit zu analysieren, wurden parallel folgende Versuche durchgeführt: In einem Ansatz wurde Toluol (1 ml) in das Seitengefäß (s. Abb. 4.31) gegeben und im zweiten wurde 110 µl Toluol direkt in die wässrige Phase zugegeben. Die Toluolkonzentration wurde mittels HPLC-Analyse (s. Kapitel 3.11) bestimmt. Um den Übergang von Toluol in die wässrige Phase zu erhöhen, wurde bei einem weiteren Ansatz das Toluol in dem Seitenansatz mit Hilfe eines mit 80 °C heißem Wasser gefüllten Becherglases aufgewärmt.

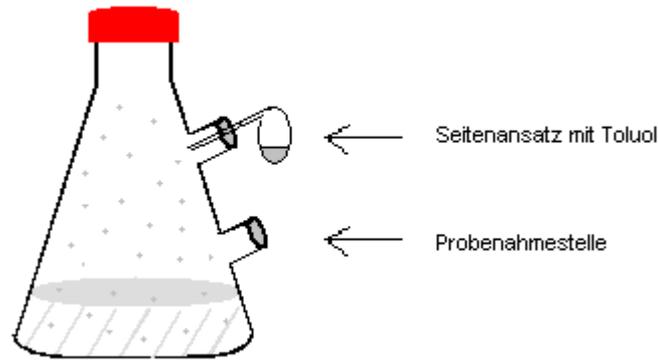


Abbildung 4.30 Glasgefäß mit Seitenansatz, das Kapillarrohr (5 mm Innendurchmesser) zur Gasphase hat

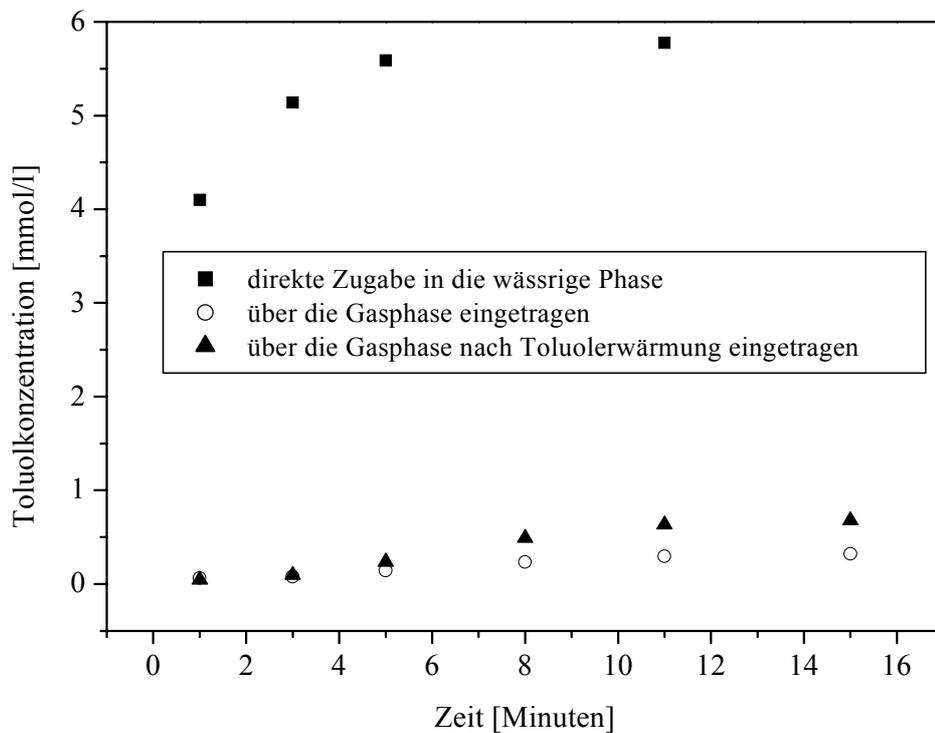


Abbildung 4.31 Lösungsgeschwindigkeit vom Toluol bei kleiner Toluoloberfläche

In Glasgefäße mit Seitenansatz (s. Abb. 4.30) wurde jeweils 50 ml Phosphatpuffer ($50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) gefüllt und auf zwei verschiedenen Arten Toluol zugegeben: direkte Zugabe von $110 \mu\text{l}$ Toluol in die wässrige Phase bzw. 1 ml Toluol in den Seitenansatz. Um den Übergang von Toluol in die wässrige Phase zu erhöhen, wurde bei einem weiteren Ansatz Toluol in dem Seitenansatz mit Hilfe eines mit $80 \text{ }^\circ\text{C}$ heißem Wasser gefüllten Becherglases aufgewärmt. In relativ kurzen Zeitabständen wurden Proben gezogen und mittels HPLC (s. Kapitel 3.11) die Toluolkonzentration gemessen.

Wie in Abbildung 4.20 zu erkennen, war der Übergang von Toluol von der Gasphase in die wässrige Phase sehr langsam. Wurde das Toluol direkt in die Flüssigphase gegeben, war die Pufferlösung schon nach ein paar Minuten gesättigt (ca. $7 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Bei Erwärmen des Toluolbehälters (Seitenansatz) erhöhte sich die maximale Toluolkonzentration in der wässrigen Phase etwas, jedoch war die Geschwindigkeit des Stoffübergangs für Umsatzversuche unbefriedigend.

Um die Oberfläche der Toluolphase im Vorratsgefäß zu erhöhen, wurde das Glasgefäß mit einem andersartigen Vorratsgefäß für Toluol ausgestattet (s. Abb. 4.32).

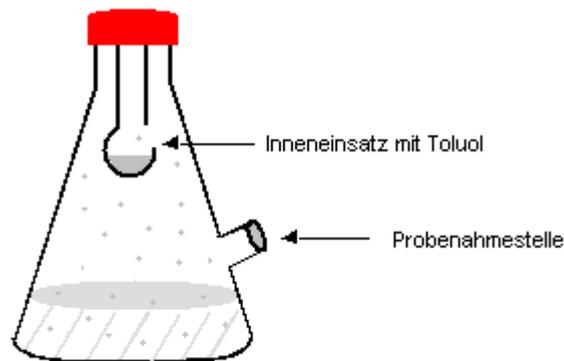


Abbildung 4.32 Glasgefäß mit Inneneinsatz, das eine relativ große Öffnung zur Gasphase hat

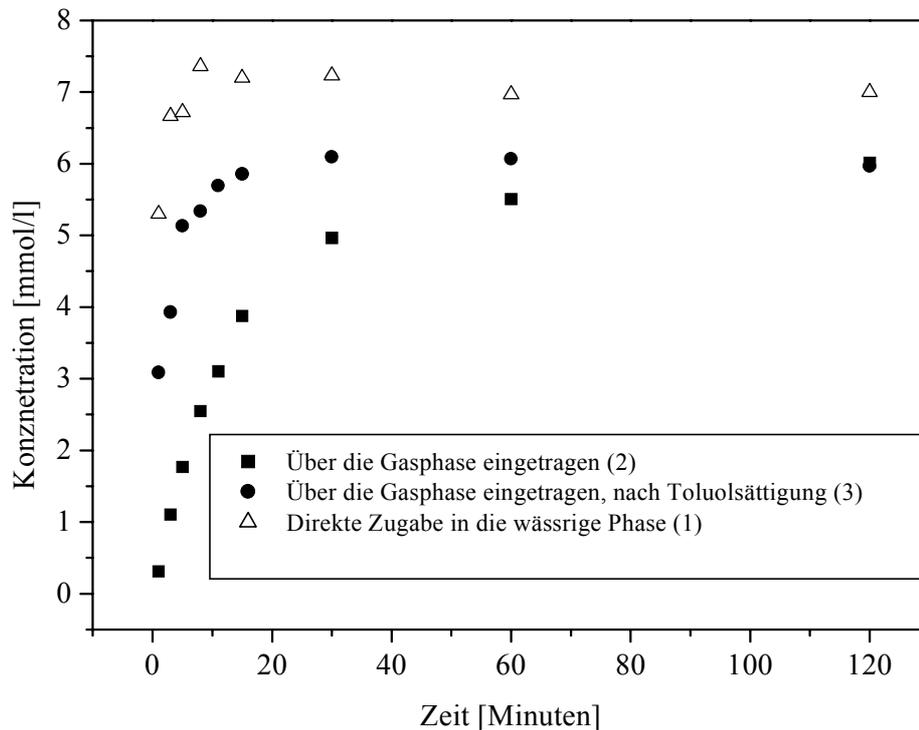


Abbildung 4.33 Lösungsgeschwindigkeit vom Toluol bei großer Toluoloberfläche

In zwei Glasgefäße mit Inneneinsatz (s. Abb. 4.32) wurde jeweils 50 ml Phosphatpuffer ($50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) gefüllt. Es wurden drei verschiedene Versuche durchgeführt: (1) 110 μl Toluol wurde direkt in die wässrige Phase gegeben. (2) 1 ml Toluol wurde in den Inneneinsatz gegeben. (3) Im dritten Ansatz wurde zuerst 1 ml Toluol in den Inneneinsatz gefüllt. Dieser Ansatz wurde eine Stunde auf einen Rotationsschüttler inkubiert und so der Gasraum mit Toluol gesättigt. Der Phosphatpuffer wurde erst danach mit einer Spritze in das geschlossenen System gegeben. Alle drei Flaschen wurden bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ auf einem Rotationsschüttler inkubiert. In relativen kurzen Zeitabständen wurde Probe gezogen und mittels HPLC (s. Kapitel 3.11) gemessen.

In diesem System löste sich das Toluol deutlich schneller im Puffer und die Sättigung wurde bereits nach ca. 1 Stunde erreicht. Der Prozess war noch schneller, wenn die Gasphase des gesamten Systems vorher mit Toluol gesättigt wurde (Abb. 4.33).

Die Umsatzversuche mit ganzen Zellen wurden in 300 ml Schüttelkolben mit 50 ml Phosphatpuffer und einer Gasphase von 270 ml durchgeführt. Um die Bildung eines Zweiphasensystems zu vermeiden, wurde die maximale Sättigungskonzentration für Toluol bestimmt. Toluol wurde bei diesem Versuch direkt in die wässrige Phase gegeben und die Toluolkonzentration mittels HPLC-Analyse (s. Kapitel 3.11) in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt (Abb. 4.34).

Es wurde eine Sättigungskonzentration von ca. $7 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ermittelt. Dieser Wert deckt sich mit Literaturdaten (Römpp, 1995). Auch bei einer höheren Zugabe von Toluol (Daten nicht dargestellt) wurde keine höhere Sättigungskonzentration festgestellt.

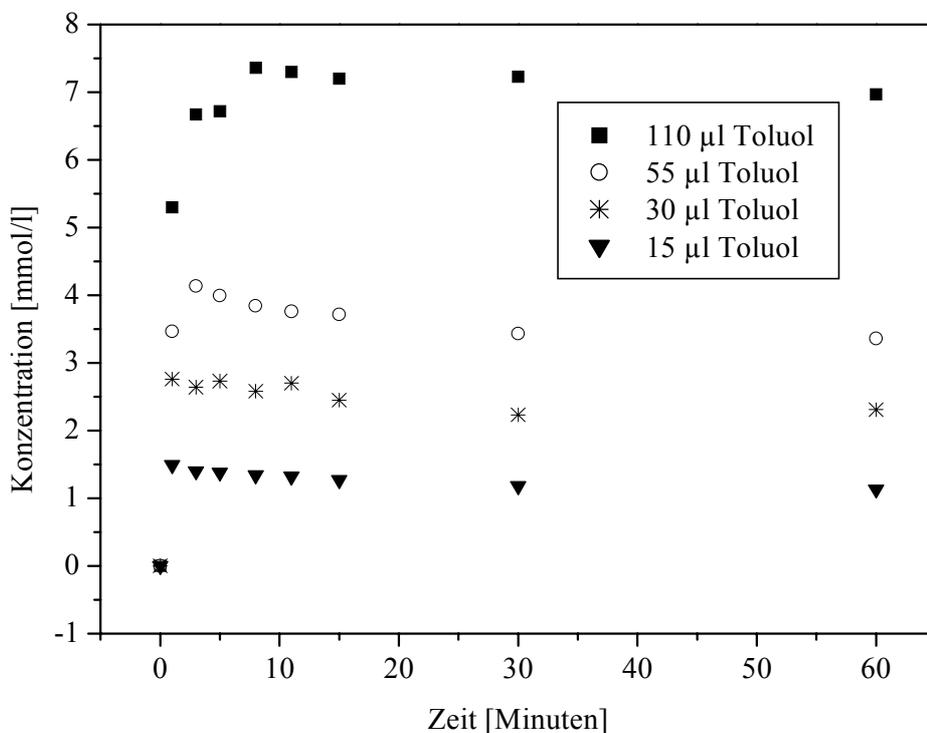


Abbildung 4.34 Bestimmung der Sättigungskonzentration von Toluol in $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer

Jeweils 50 ml Phosphatpuffer ($50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) wurden in 4 Glasgefäße je 300 ml (s. Abb. 4.33) gefüllt und Toluol in 4 verschiedenen Mengen zugegeben: 15 µl, 30 µl, 55 µl und 110 µl. Die Gefäße wurden bei 30°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. In relativ kurzen Zeitabständen wurden Proben gezogen und mittels HPLC (s. Kapitel 3.11) die Toluolkonzentration gemessen.

Um die Sättigungskonzentration von Toluol in Wasser zu erreichen, war es notwendig, dem System, das aus 50 ml wässriger Phase und 270 ml Gasphase bestand, 110 µl Toluol zuzugeben. Auch in den späteren Umsatzversuchen wurde dieses System benutzt. Deshalb wurde der Henry-Koeffizient von Toluol für diesen Gleichgewichtszustand des Systems berechnet:

$$K_H = \frac{C_G}{C_F} \quad (4.7)$$

wo

K_H : dimensionsloser Henry-Koeffizient, $K_H^{\text{Toluol}} = 0,36$

C_G : Toluolkonzentration in der Gasphase

C_F : Toluolkonzentration in der Flüssigphase (mittels HPLC gemessen)

Ausgehend vom K_H^{Toluol} -Wert von 0,36 kann abgeleitet werden, dass sich 2/3 des Toluols in der Gasphase befinden und nur 1/3 in der wässrigen Phase vorliegt. Bei den Umsatzversuchen ist also zu berücksichtigen, dass höchstens ein Drittel des zugegebenen Toluols mittels HPLC in der Flüssigphase nachweisbar ist.

Aufgrund der leichten Flüchtigkeit von Toluol sind bei den HPLC-Konzentrationsbestimmungen (s. Kapitel 3.11) in wässrigen Proben von Umsatzversuchen einige Ungenauigkeiten zu berücksichtigen, die durch die Gasphase der HPLC-Vials sowie durch die Aufarbeitung der Zellsuspensionen auftreten. Beim Ansetzen von Standardlösungen wurden gasdichte Gefäße (GC-Vials) benutzt, in denen es möglich war, Toluolstandards in Methanol ohne Gasphase herzustellen. Die Messungen dieser Toluolstandards mittels HPLC mit einem Autosampler und manueller Injektion (s. Kapitel 3.11) wiesen nach, dass bei einer relativ schnellen Messung der Toluolstandards (Standzeit der Standards auf wenige Minuten minimiert) kein Verlust in der zu messenden Konzentration an Toluol in der Flüssigphase der HPLC-Vials nachweisbar war. Bei den realen Proben war aber wegen der Zellen eine Probenvorbereitung für die HPLC-Messung nötig, wodurch sich die Standzeiten der Proben verlängerten und insbesondere bei der Zentrifugation (3 Minuten) ein geringer Teil des Toluols verdampfte. Darüber hinaus war wegen der Verteilung von Toluol im HPLC-Vial zwischen Flüssig- und Gasphase und wegen der Einlagerung von Toluol in die Zellen nur ein Teil der theoretischen (mit dem Henry-Koeffizienten aus der gesamten Toluolmenge berechneten) Toluolkonzentration zu messen. Die Toluolmessungen in der wässrigen Phase sind also mit einem gewissen Fehler behaftet. Um Bilanzen von gebildetem DHB aus Toluol zu berechnen, wurde als Bezugsgröße die Menge an zugegebenem Toluol in mmol verwendet.

4.3.2 Umsetzung von Toluol zu DHB durch *Pseudomonas putida* BDH2

Der Stamm *Pseudomonas putida* Idaho BDH2 kann Toluol zu DHB umzusetzen (A. Germer, persönliche Mitteilung). In dem oben beschriebenen System (50 ml Phosphatpuffer, 270 ml Gasphase) wurde der Stamm näher untersucht.

Um die optimale Toluolkonzentration zu bestimmen, wurden sogenannte Ruhezellversuche durchgeführt. Die Anzucht der Zellen erfolgte im Gegenwart von Toluol, Glucose diente als Kohlenstoff- und Energiequelle (s. Kapitel 3.2.2). Die Zellen wurden in der exponentiellen Phase des Wachstums geerntet. Toluol wurde über die Gasphase in folgenden Mengen zugesetzt: 0,115 mmol; 0,23 mmol; 0,46 mmol. Um eine ausreichende Versorgung an Reduktionsäquivalenten für die Toluoloxidation sicherzustellen, wurde zusätzlich eine Versuchsreihe mit Glucose durchgeführt.

Unter diesen Bedingungen zeigte der Stamm nur bei 0,025% (0,115 mmol) und 0,05% (0,23 mmol) Toluolkonzentration einen geringen Umsatz von Toluol. In dem Ansatz mit der höheren Toluolmenge (0,46 mmol) war innerhalb von 24 Stunden kein DHB entstanden. Falls der Ansatz keine Glucose enthielt, war der Umsatz von Toluol bei 0,05% (0,23 mmol) und 0,025 % (0,115 mmol) Toluol noch geringer.

Um bessere Toluolumsatzraten zu erzielen, wurden Versuche mit wachsenden Zellen durchgeführt. Die Anzucht der Zellen erfolgte im Gegenwart von Toluol. Glucose diente als Kohlenstoff- und Energiequelle. Die Zellen wurden in der exponentiellen Phase des Wachstums geerntet. In den Ansätzen wurden außer Glucose und Toluol noch Mineralsalze zugegeben, so dass ein weiteres Wachstum der Zellen möglich war.

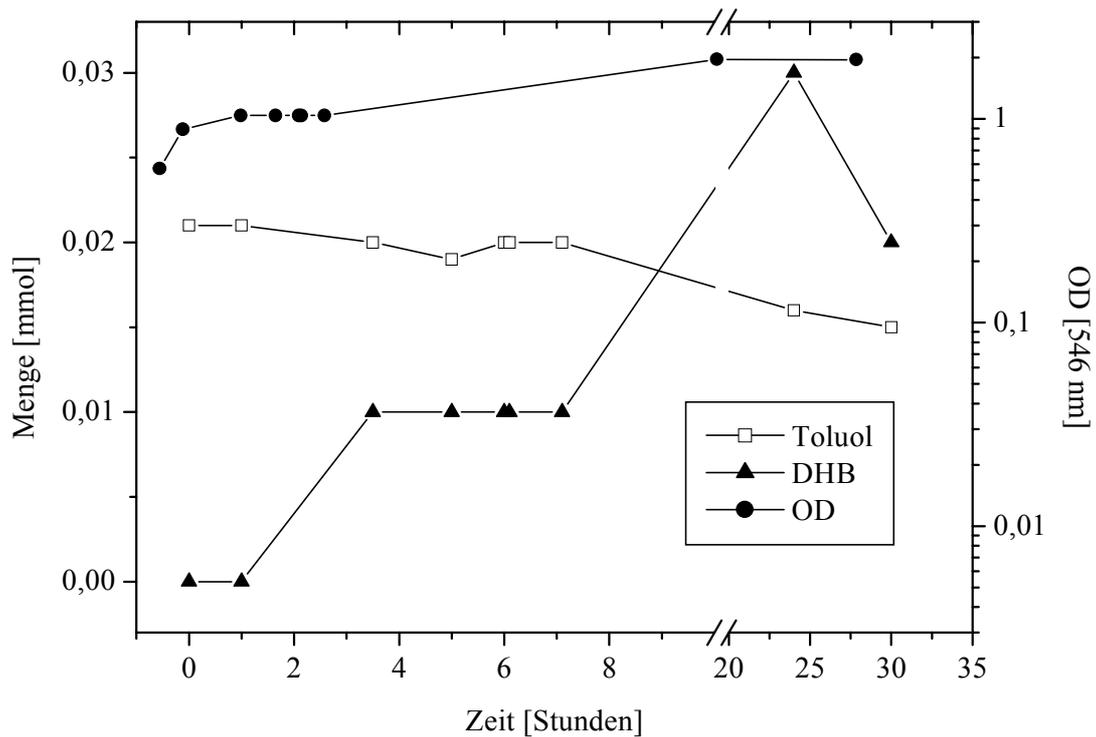


Abbildung 4.35 Umsetzung von Toluol zu DHB durch *Pseudomonas putida* Idaho BDH2 unter Wachstumsbedingungen

Ein Vorkultur von *Pseudomonas putida* Idaho BDH2 in Mineralmedium (s. Kapitel 3.2.1) mit $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Glucose wurde im Verhältnis 1:40 in einen Hauptansatz mit 400 ml Mineralmedium in einem 3 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen transferiert, der $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Glucose und $200 \mu\text{l}$ ($1,88 \text{ mmol}$) Toluol in einem Verdampfereinsatz enthielt. Nach 16 Stunden wurde weitere $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Glucose, Mineralsalze im Verhältnis 1:200 sowie $100 \mu\text{l}$ ($0,94 \text{ mmol}$) Toluol über die Gasphase zugegeben. In der exponentielle Wachstumsphase wurden die Zellen geerntet, und in einem Ansatz mit 600 ml Mineralmedium (s. Kapitel 3.2.1) transferiert, der $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Glucose enthielt. Zu diesen Ansatz wurde über die Gasphase (in einem Verdampfereinsatz) $30 \mu\text{l}$ ($5,6 \text{ mmol}$) Toluol zugegeben.

In den Versuchen mit wachsenden Zellen lag noch nach 24 Stunden ein großer Teil des Toluols vor. Zu diesem Zeitpunkt waren $0,03 \text{ mmol}$ DHB gebildet, was einer Ausbeute von 4 % entspricht (Abb. 4.35). Die Abnahme der DHB-Konzentration in der Endphase wies darauf hin, dass der Stamm trotz Blockierung zweier DHB-Dehydrogenasen einen Teil des Toluols vollständig abbauen konnte. Im Abbauweg von Toluol treten Benzylalkohol und Benzoat als Metabolite auf. Deshalb wurde getestet, ob der Stamm diese Substrate mit höherer Ausbeute zu DHB umsetzen kann (Abb. 4.36 und 4.37).

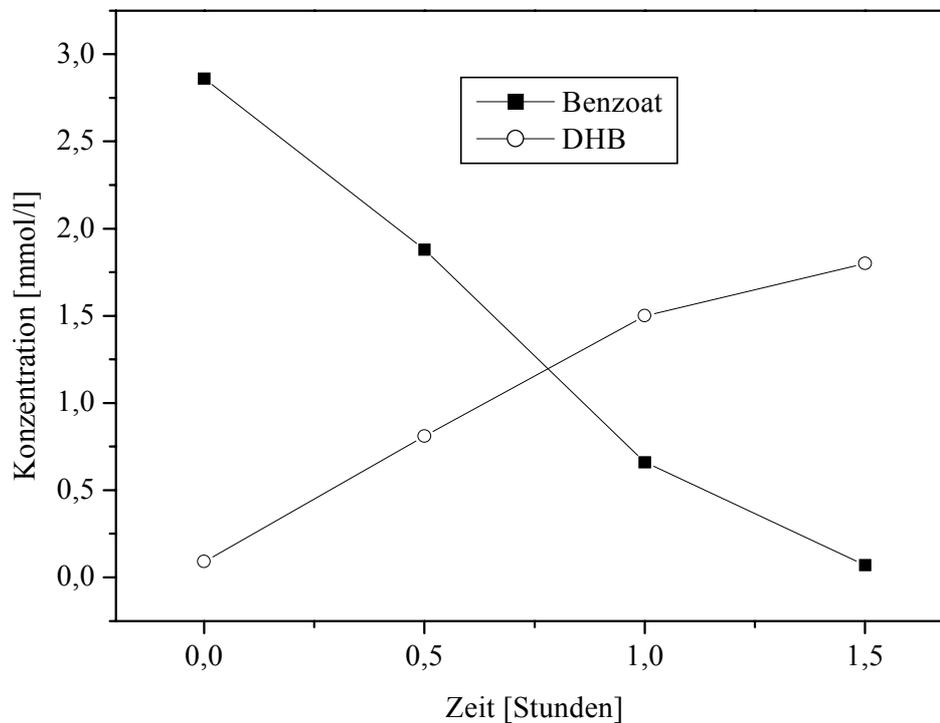


Abbildung 4.36 Umsetzung von Benzoat zu DHB durch *Pseudomonas putida* Idaho BDH2

Ein Vorkultur von *Pseudomonas putida* Idaho BDH2 in Mineralmedium (s. Kapitel 3.2.1) mit $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Glucose wurde im Verhältnis 1:40 in einen Hauptansatz mit 400 ml Mineralmedium in einem 3 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen transferiert, der $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Glucose und $200 \mu\text{l}$ ($1,88 \text{ mmol}$) Toluol in einem Verdampfereinsatz enthielt. Nach 16 Stunden wurde weitere $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Glucose, Mineralsalze im Verhältnis 1:200 sowie ($0,94 \text{ mmol}$) Toluol über die Gasphase zugegeben. In der exponentielle Wachstumsphase wurden die Zellen geerntet, und in einen Ansatz mit 600 ml Phosphatpuffer ($50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) transferiert, der $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Glucose und $3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Benzoat enthielt. Die Zelldichte entsprach einem $\text{OD}_{546 \text{ nm}}$ -Wert von 2 (\approx einer Trockenmasse von $0,92 \text{ g/l}$).

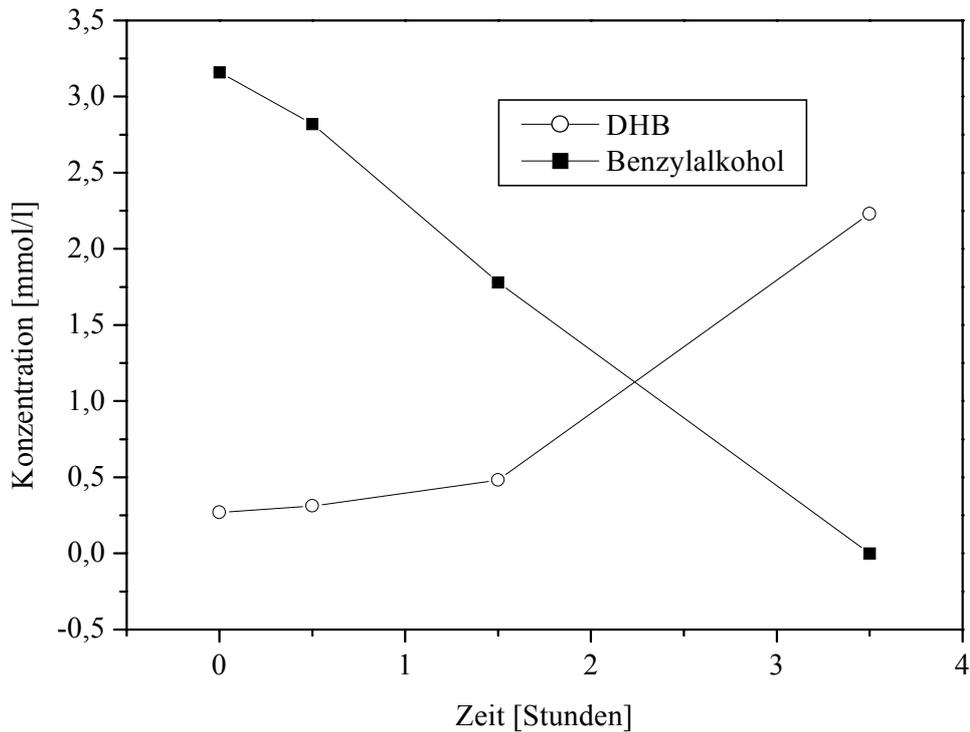


Abbildung 4.37 Umsetzung von Benzylalkohol zu DHB durch *Pseudomonas putida* Idaho BDH2

Ein Vorkultur von *Pseudomonas putida* Idaho BDH2 in Mineralmedium mit $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Glucose wurde im Verhältnis 1:40 in einen Hauptansatz mit 400 ml Mineralmedium (s. Kapitel 3.2.1) in einem 3 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen transferiert, der $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Glucose und $200 \mu\text{l}$ ($1,88 \text{ mmol}$) Toluol in einem Verdampfereinsatz enthielt. Nach 16 Stunden wurde weitere $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Glucose, Mineralsalze im Verhältnis 1:200 sowie $100 \mu\text{l}$ ($0,94 \text{ mmol}$) Toluol über die Gasphase zugegeben. In der exponentielle Wachstumsphase wurden die Zellen geerntet, und in einem Ansatz mit 600 ml Phosphatpuffer ($50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) transferiert, der $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Glucose und $3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Benzylalkohol enthielt. Die Zelldichte entsprach einem $\text{OD}_{546 \text{ nm}}$ -Wert von 4 (\approx einer Trockenmasse von $1,85 \text{ g/l}$).

Im Vergleich zu Toluol (s. Abb. 4.35) wurde sowohl Benzoat (s. Abb. 4.36) als auch Benzylalkohol (s. Abb. 4.37) mit guten Umsatzraten zu DHB umgesetzt. Auch die Ausbeuten an DHB (70% beim Benzoatumsatz und 60% beim Benzylalkoholumsatz) waren deutlich höher als bei Toluol (4 %). Dennoch weist die nicht ausgeglichene Bilanz darauf hin, dass ein Teil des DHB verstoffwechselt wird. Durch Enzymtests mit DHB in Rohextrakten hat A. Germer bewiesen, dass noch immer eine Umsatzaktivität für DHB in den Zellen vorhanden ist (pers. Mitteilung).

Der Stamm *Pseudomonas putida* BDH2 kann trotz Inaktivierung von zwei DHB-Dehydrogenasen immer noch Toluol als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten. Nur mit Toluol wachsende Zellen bildeten mehr DHB aus Toluol. Allerdings war erst nach 3 Tagen die Bildung von 40% DHB nachzuweisen. Das entstandene DHB wurde nach 6 Tagen bei gleichzeitiger Biomassezunahme vollständig abgebaut (A. Germer, persönliche Mitteilung).

4.3.3 Umsetzung von Toluol zu DHB durch *Pseudomonas putida* BGXM1

Whited *et al.* (1986) reicherten den Stamm *Pseudomonas putida* BG1 aus einer Bodenprobe mit 4-Methylbenzoat (p-Toluat) als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle an. Nach Behandlung mit N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin wurde eine Mutante isoliert, die nicht mehr allein mit 4-Methylbenzoat, aber mit Glucose im Gegenwart von 4-Methylbenzoat wachsen konnte. Diese Mutante akkumulierte 4-Methyl-DHB beim Umsatz von 4-Methylbenzoat, und erhielt die Bezeichnung *Pseudomonas putida* BGXM1.

Während der vorliegenden Arbeit wurde der Stamm ursprünglich für die Umsetzung von verschiedenen substituierten Benzoaten verwendet (s. Kapitel 4.2). Nach eingehendem Literaturstudium wurde vermutet, dass der Stamm Toluol zu DHB umsetzen kann.

Die Umsatzversuche vom Toluol mit diesem Stamm wurden in dem zuvor beschriebenen System (50 ml wässrige Phase + 270 ml Gasphase, s. Abb. 4.32) durchgeführt. Um die Untersuchungen bei optimalen Bedingungen durchzuführen, wurden induzierte, wachsende Zellen für die Ruhezellversuche geerntet (s. Kapitel 3.5). Es wurde getestet, ob Fructose oder Glucose als Auxiliarsubstrat am besten geeignet ist. Außerdem wurde der Einfluss von Sauerstoff auf die Geschwindigkeit und auf die Ausbeute der Umsetzung untersucht.

Bei diesem Stamm wurde auch untersucht, bei welcher Toluolkonzentration die Umsetzung von Toluol zu DHB stattfindet. *Pseudomonas putida* BGXM1 zeigte nur bei 0,025% (0,115 mmol) und 0,05% (0,23 mmol) Toluolkonzentration einen Umsatz von Toluol (DHB Bildung ca. 40 %). Bei höheren Toluolkonzentrationen wurde keine DHB-Bildung beobachtet.

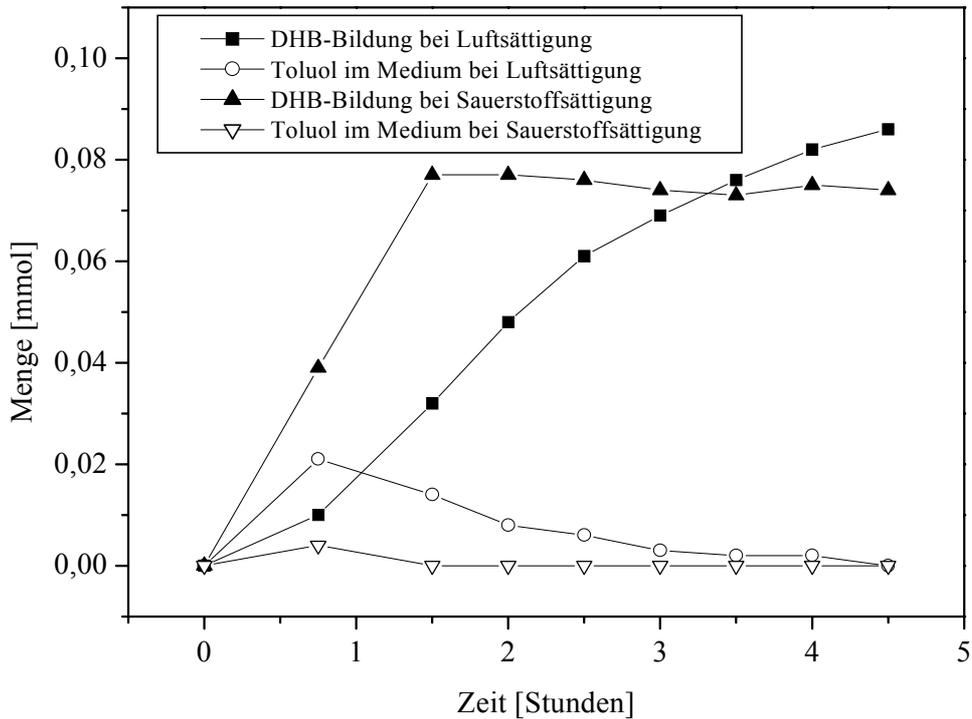


Abbildung 4.38 Umsetzung von Toluol zu DHB durch *Pseudomonas putida* BGXM1 mit Fructose als Auxiliarsubstrat

Die Vorkultur wurde in Mineralmedium (s. Kapitel 3.2.1) mit $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Fructose gezüchtet und im Verhältnis 1:40 in die Hauptkultur (400 ml Mineralmedium mit $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Fructose und $200 \mu\text{l}$ ($1,88 \text{ mmol}$) Toluol im Verdampferansatz (s. Abb. 4.33) transferiert. Nach 18 Stunden wurde zusätzlich $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Fructose und $100 \mu\text{l}$ ($0,94 \text{ mmol}$) Toluol zugegeben und die optische Dichte ($\text{OD}_{546\text{nm}}$) photometrisch verfolgt (s. Kapitel 3.7). Nach 2-3 Stunden wurden die Zellen geerntet und nach Resuspendieren in den jeweiligen Versuchskolben transferiert. Die Versuchskolben enthielten $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Fructose und $25 \mu\text{l}$ ($0,23 \text{ mmol}$) Toluol im Verdampferansatz (s. Abb. 4.33). Vor der Zugabe der Zellen wurde die wässrige Phase 3 Minuten lang mit Luft bzw. reinem Sauerstoff (10 l/min) gesättigt. Die optische Dichte der Zellsuspension betrug $\text{OD}_{546\text{nm}} = 4,5$ (\approx einem Trockengewicht von $1,9 \text{ g/l}$). Die Toluol- und DHB-Konzentration in der wässrigen Phase wurde mittels HPLC (s. Kapitel 3.11) gemessen.

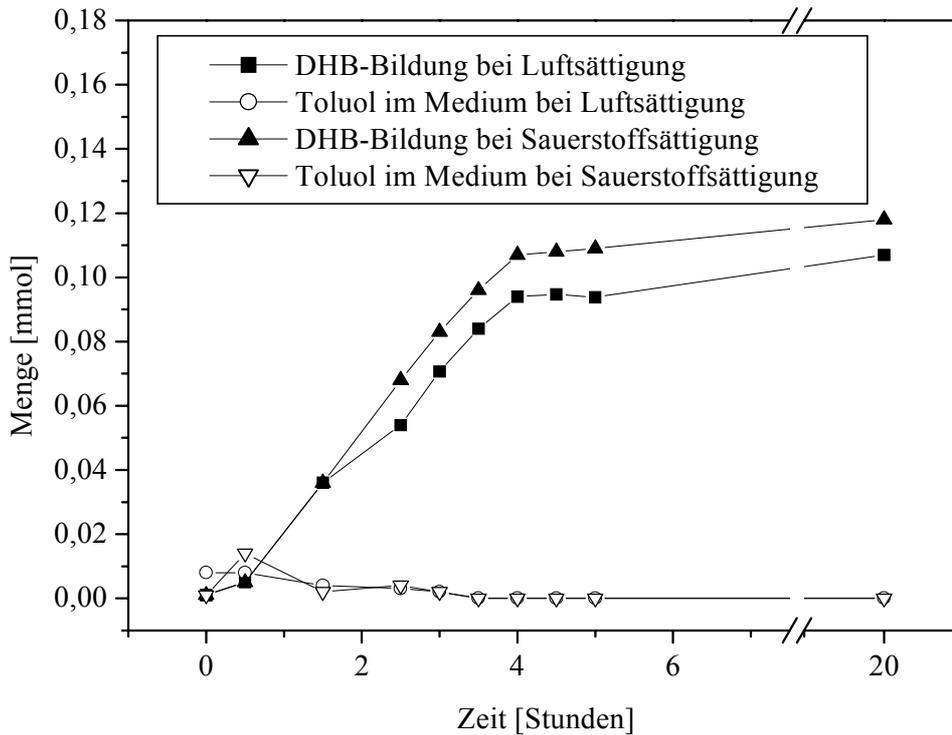


Abbildung 4.39 Umsetzung von Toluol zu DHB durch *Pseudomonas putida* BGXM1 mit Glucose als Auxiliarsubstrat

Die Vorkultur wurde in Mineralmedium (s. Kapitel 3.2.1) mit $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Glucose gezüchtet und im Verhältnis 1:40 in die Hauptkultur (400 ml Mineralmedium mit $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Glucose und $200 \mu\text{l}$ ($1,88 \text{ mmol}$) Toluol im Verdampferansatz (s. Abb. 4.33) transferiert. Nach 18 Stunden wurde zusätzlich $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Glucose und $100 \mu\text{l}$ ($0,94 \text{ mmol}$) Toluol zugegeben und die optische Dichte ($\text{OD}_{546\text{nm}}$) photometrisch verfolgt (s. Kapitel 3.7). Nach 2-3 Stunden wurden die Zellen geerntet und nach Resuspendieren in den jeweiligen Versuchskolben transferiert. Die Versuchskolben enthielten $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Glucose und $25 \mu\text{l}$ ($0,23 \text{ mmol}$) Toluol im Verdampferansatz (s. Abb. 4.33). Vor der Zugabe der Zellen wurde die wässrige Phase 3 Minuten lang mit Luft bzw. reinem Sauerstoff (10 l/min) gesättigt. Die optische Dichte der Zellsuspension betrug $\text{OD}_{546\text{nm}} = 4,5$ (\approx einem Trockengewicht von $1,9 \text{ g/l}$). Die Toluol- und DHB-Konzentration in der wässrigen Phase wurde mittels HPLC (s. Kapitel 3.11) gemessen.

In Abb. 4.38 und 4.39 sind die Umsatzversuche von Toluol durch *Pseudomonas putida* BGXM1 mit den beiden Auxiliarsubstraten Glucose oder Fructose dargestellt. Die Versuche wurden einmal mit Luft und einmal mit O_2 -gesättigtem Phosphatpuffer durchgeführt. Zwischen den beiden Auxiliarsubstraten gibt es kaum Unterschiede. Die Ausbeute des Umsatzversuchs mit Fructose lag bei ca. 37%, mit Glukose bei 47%. Die weiteren Versuche

wurden mit Glukose durchgeführt. Ohne Zugabe von Auxiliarsubstrat erfolgte zwar eine Umsetzung, allerdings wurden dann 33 % weniger DHB gebildet als in dem Ansatz mit 5 mmol·l⁻¹ Glucose.

Bei der Luft- bzw. Sauerstoffsättigung des Mediums ist ein Unterschied zu beobachten. Wenn der Versuchsansatz mit Sauerstoff gesättigt war, wurde im Fructose-Versuch DHB mit einer anfänglich höheren Umsatzrate gebildet (s. Abb. 4.39). Allerdings wurden bei allen Versuchsansätzen gleiche Mengen an DHB gebildet. Die höhere Sauerstoffkonzentration in den Ansätzen mit reinem Sauerstoff hatte also offenbar keinen Einfluss auf die Ausbeute an DHB. Um zu untersuchen, ob durch höhere Sauerstoffmengen die Ausbeute erhöht werden kann, wurden Experimente durchgeführt, in denen das Medium zunächst mit Luft gesättigt wurde und erst nach 4 Stunden zusätzlich reiner Sauerstoff (20 ml) zugegeben wurde.

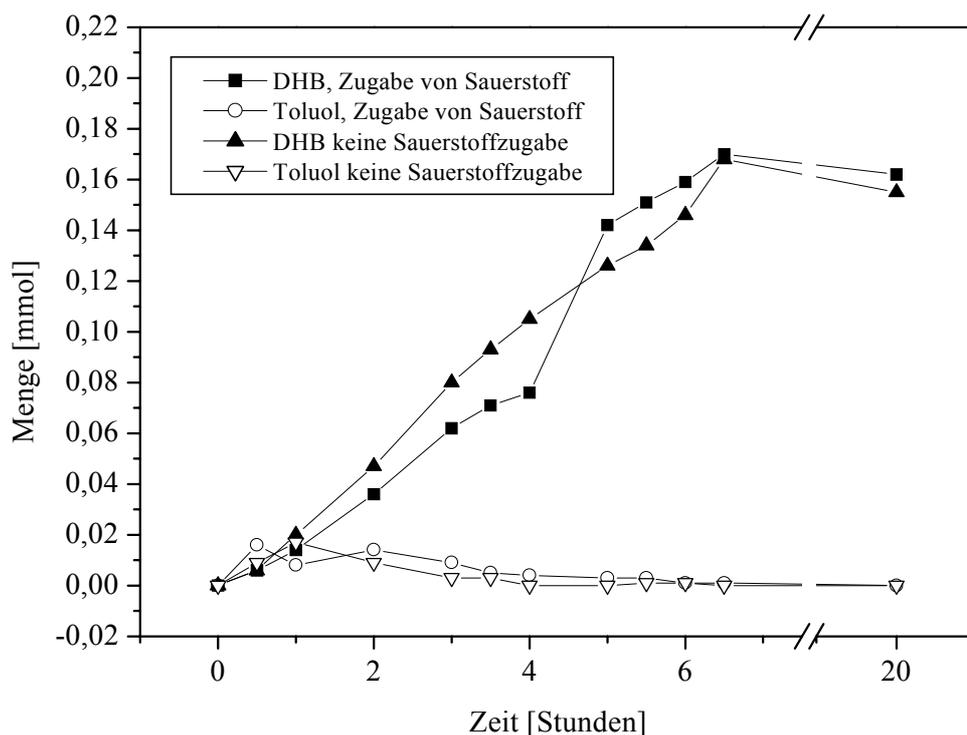


Abbildung 4.40 Umsetzung von Toluol zu DHB durch *Pseudomonas putida* BGXM1 in Gegenwart von Glucose und bei Zugabe von reinem Sauerstoff

Die Vorkultur wurde in Mineralmedium (s. Kapitel 3.2.1) mit 5 mmol·l⁻¹ Glucose gezüchtet und im Verhältnis 1:40 in die Hauptkultur (400 ml Mineralmedium mit 5 mmol·l⁻¹ Glucose und 200 µl (1,88 mmol) Toluol im Verdampferansatz (s. Abb. 4.33) transferiert. Nach 20 Stunden wurde zusätzlich 5 mmol·l⁻¹ Glucose und 100 µl

(0,94 mmol) Toluol zugegeben und die optische Dichte (OD_{546nm}) photometrisch verfolgt (s. Kapitel 3.7). Nach 2-3 Stunden wurden die Zellen geerntet und nach Resuspendieren in den jeweiligen Versuchskolben transferiert. Die Versuchskolben enthielten $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Glucose und $25 \mu\text{l}$ (0,23 mmol) Toluol im Verdampferansatz (s. Abb. 4.33). Vor Zugabe der Zellen wurde die wässrige Phase 3 Minuten lang mit Luft (10 l/min) gesättigt. Die optische Dichte der Zellsuspension betrug $OD_{546nm} = 5,0$ (\approx einem Trockengewicht von 2,1 g/l). Die Toluol- und DHB-Konzentration in der wässrigen Phase wurde mittels HPLC (s. Kapitel 3.11) gemessen. Nach 4 Stunden wurde zu einem Ansatz 20 ml reiner Sauerstoff mit einer Spritze in die wässrige Phase gegeben. Während der Zugabe blieb das Glasgefäß geschlossen.

Wie schon vorher beobachtet, konnte die Sauerstoffzugabe die Umsetzung beschleunigen, hatte aber keinen Effekt auf die Ausbeute. Interessanterweise wurde bei diesem Experiment trotz identischer Anzucht- und Reaktionsbedingungen deutlich mehr DHB aus Toluol gebildet. In dem in Abb. 4.38 und 4.39 dargestellten Versuchen wurde aus 0,23 mmol Toluol ca. 0,08 bzw. 0,12 mmol DHB gebildet, was einer Ausbeute von 37% bzw. 51% entspricht. Bei den in Abb. 4.40 dargestellten Versuch wurde 0,16 mmol DHB aus 0,23 mmol Toluol gebildet, was einer Ausbeute von 70% entspricht. Die Ausbeute ist also offenbar stark vom Zustand der Zellen abhängig.

Pseudomonas putida BGXM1 besitzt ein komplexes Enzymsystem, in dem die einzelnen Enzyme unterschiedliche Aktivitäten haben, wodurch die optimale Aktivierung der gesamten Enzymkette schwierig ist.

5 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein bioverfahrenstechnischer Prozess für die Herstellung von Phenol aus Toluol entwickelt werden. Dieses Verfahren sollte aus zwei Schritten bestehen: im ersten Schritt sollte DHB (Dihydrodihydroxybenzoat, *cis*-cyclohexa-3,5-diene-1,2-diol-carboxylat) biotechnisch produziert werden, im zweiten Schritt sollte dieses nach Zugabe von Säure zu Phenol umgewandelt werden. Zur Umsetzung des Verfahrens musste ein Bakterienstamm konstruiert werden, der Toluol zu DHB umzusetzen kann. Darüber hinaus sollte dieser Bakterienstamm die Eigenschaft besitzen gegenüber Toluol tolerant zu sein (s. Kapitel 2.1). Die genetischen Modifikationen wurden in dem Wildtypstamm *Pseudomonas putida* Idaho durchgeführt. Dieser Stamm zeichnet sich dadurch aus, dass er in einem Zweiphasensystem, mit bis 50 % Toluol wachsen kann (Cruden *et al.* 1992).

Da das genetische Stammkonstrukt für die Untersuchung zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch nicht zur Verfügung stand, wurden ausgehend von Benzoat zunächst Untersuchungen zur biotechnischen Herstellung von DHB durchgeführt.

Ein weiteres Ziel der Untersuchung war, eine Aufreinigungsmethode für DHB aus Fermentationslösungen zu erarbeiten. Bei erfolgreicher Etablierung der biotechnischen Herstellung von DHB sowie einer Aufarbeitungsmethode sollte das Produktionsverfahren auf weitere substituierte DHB übertragen werden.

Am Ende der Untersuchungen sollte außerdem die Herstellung von DHB aus Toluol mit einem neu konstruierten Bakterienstamm des Wildtyps *Pseudomonas putida* Idaho, der von A. Germer (Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart) zur Verfügung gestellt wurde, näher untersucht werden.

5.1 Biotechnische Herstellung von Phenol aus Toluol

Die biotechnische Herstellung von Phenol ist theoretisch aus Benzol oder aus Toluol möglich (s. Kapitel 2.3). In Voruntersuchungen wurde festgestellt, dass Toluol als Ausgangsverbindung geeignet ist, da Bakterien gegenüber dieser Verbindung deutlich toleranter sind als gegenüber Benzol. Außerdem stand ein Toluol toleranter Bakterienstamm *Pseudomonas putida* zur Verfügung, der nach genetischer Manipulation das Toluol zu DHB umwandelt und gleichzeitig gegenüber der Ausgangsverbindung tolerant ist. Dadurch, dass

bei der Umsetzung von Toluol genauso viele Reduktionsäquivalente entstehen, wie für den gesamten Prozess benötigt werden sollte (s. Abb. 2.4), wird bei der technischen Umsetzung des Verfahrens theoretisch kein Auxiliarsubstrat nötig sein.

Phenol besitzt für Mikroorganismen eine hohe Toxizität. Eine Akkumulation von Phenol während des Prozesses würde zur Inaktivierung der transformierenden Bakterien führen. Aus diesem Grund sollte erst DHB durch die Bakterien aus Toluol hergestellt werden, und anschließend in einem chemischen Verfahren durch Zugabe von Säure DHB zu Phenol umgesetzt werden (s. Abb. 5.1).

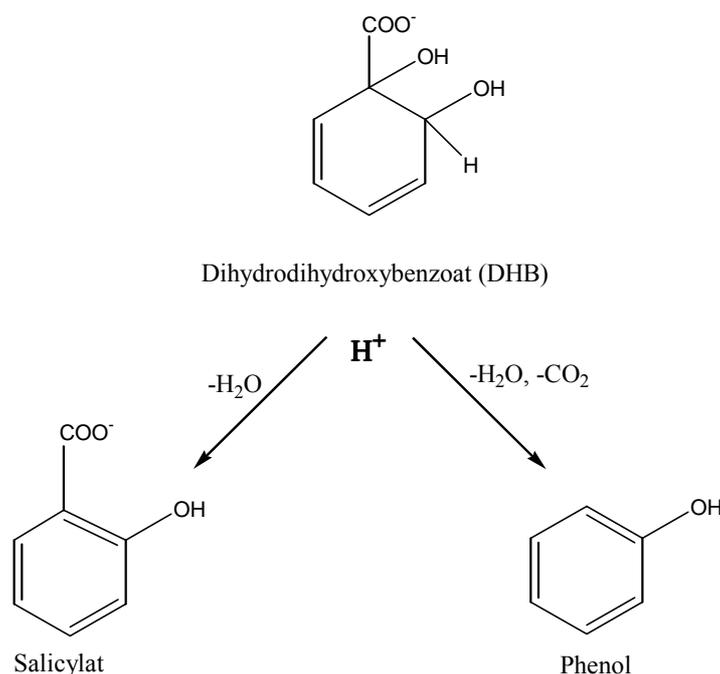


Abbildung 5.1 Umwandlung von DHB in Phenol und Salicylat unter sauren Bedingungen

DHB wirkt gegenüber Phenol auf die Zellen nicht toxisch und lässt sich biologisch bei optimalen Bedingungen in hohen Konzentrationen (ca. 300 mmol/l) produzieren (s. Abb. 4.3). Außerdem wurde festgestellt, dass der Bakterienstamm *Ralstonia eutropha* B9 auch in Gegenwart hoher DHB-Konzentration (bis zu 150 mmol/l) wachsen kann. Für Phenole dagegen ist beschrieben, dass sie auf Bakterien schon bei einer Konzentration von $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (= $5,3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) wachstumshemmend wirken (Heipieper *et al.*, 1991). DHB wird unter sauren Bedingungen zu ca. 50 % Salicylat und 50 % Phenol umgewandelt (s. Abb. 4.9). Der Salicylatanteil der Produktmischung ist in einem weiteren chemischen Prozess durch Erhitzen weiter zu Phenol umsetzbar (Tanger, pers. Mitteilung, Fa. Phenolchemie, Gladbeck, s. Abb. 5.2).

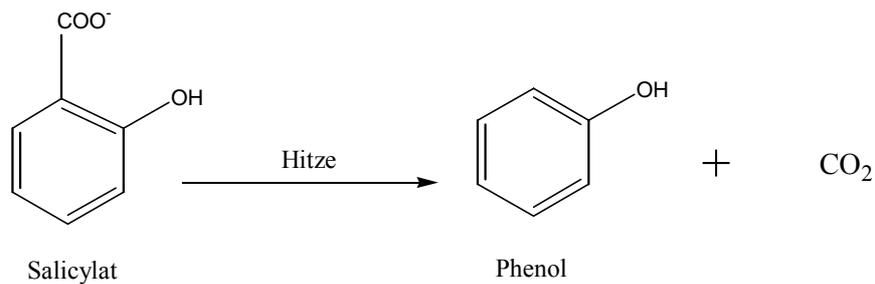


Abbildung 5.2 Umwandlung von Salicylat zu Phenol durch Erhitzen

Um die biotechnische Herstellung von Phenol aus Toluol durchzuführen, wurde ein Stamm benötigt, der Toluol zu DHB umzusetzen kann. Für die genetische Konstruktion standen zwei Methoden zur Verfügung (s. Kapitel 2.3). Einerseits bestand die Möglichkeit, die für die Toluoloxidation fehlenden Gene (Toluol-Monooxygenase, Benzylalkohol-Dehydrogenase und Benzaldehyd-Dehydrogenase) in einen Bakterienstamm, der Benzoat zu DHB umsetzen kann, zu transferieren. Bei dieser Methode wurde das Benzoat verwertende Bakterium *Ralstonia eutropha* B9 verwendet (S. Gittinger, pers. Mitteilung, s. Kapitel 3.1). Andererseits war es theoretisch möglich, in einem Toluol verwertenden Bakterienstamm das Enzym Dihydrodihydroxybenzoat-Dehydrogenase, das für die Metabolisierung von DHB zuständig ist, zu blockieren. Dadurch konnte die Akkumulation von DHB erreicht werden (s. Kapitel 3.1). Für diese genetische Konstruktion wurde der Wildstamm *Pseudomonas putida* Idaho eingesetzt.

In den Stämmen *Ralstonia eutropha* B9 und *Ralstonia eutropha* 335 (Wildstamm, s. Kapitel 3.1) wurden die Gene, die für die Umsetzung von Toluol zu DHB zuständig sind, mittels Transposition in das Chromosom integriert (S. Gittinger, pers. Mitteilung, Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart). Die erhaltenen Transkonjuganten konnten Toluol jedoch nicht oxidieren, obwohl das B9 Konstrukt Benzylalkohol zu DHB umsetzen und der Wildstamm Benzylalkohol verwerten kann. Wegen der geringen Toleranz des Stammes gegenüber Toluol wurde die eingesetzte Toluolkonzentration reduziert (0,02 % Toluol; Vol. Toluol/Vol. Flüssigphase). Dabei wurde festgestellt, dass schon der Ausgangsstamm *Ralstonia eutropha* B9 Toluol auf einem noch nicht beschriebenen Weg abbauen kann. Dies wurde durch die Beobachtung bestätigt, dass Kresol und ein unbekanntes Produkt entstanden waren. Dadurch, dass die Transkonjuganten auch Benzylalkohol abbauen konnten, wurde

vermutet, dass die Toluol-Monooxygenase die Umsetzung von Toluol limitiert. Diese Annahme konnte bisher noch nicht bestätigt werden (S. Gittinger, pers. Mitteilung).

Als alternative Möglichkeit wurde vermutet, dass das Problem in der Genexpression liegt. Das Modul wurde deshalb in den Stamm *Pseudomonas putida* KT2442 übertragen. Bei diesen Transkonjuganten wurde festgestellt, dass sie mit Toluol wachsen konnten (S. Gittinger, pers. Mitteilung).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Transkonjuganten von *Ralstonia eutropha* B9 für die technische Umsetzung von Toluol zu DHB nicht geeignet sind. Dieser Stamm war jedoch bei der Umsetzung von Benzoat zu DHB sehr wirksam. Dies zeigte sich sowohl bei Versuchen im kleinen Maßstab (20 ml) als auch unter optimalen Bedingungen (pH-Kontrolle, ausreichende Sauerstoffzufuhr) im Reaktormaßstab (2 l) (s. Kapitel 4.1.1).

In dem Wildstamm *Pseudomonas putida* Idaho wurde eine Toluat- und eine DHB-Dehydrogenase inaktiviert. Dadurch wurde die Akkumulation von DHB mit dieser Doppelmutante *Pseudomonas putida* Idaho BDH2 möglich (A. Germer, pers. Mitteilung, s. auch Kapitel 4.3.2). Während der genetischen Arbeiten musste jedoch festgestellt werden, dass in dem Wildstamm neben dem schon bekannten Abbauweg für Toluol über die Methylgruppenoxidation, noch ein weiterer, bisher unbekannter Weg existieren muss. Für Pseudomonaden sind mehrere z.T. isofunktionelle Abbauwege für Aromaten beschrieben (<http://umbbd.ahc.umn.edu/> s. Abb. 2.3). Aus diesem Grund sind sie für diese Anwendung weniger geeignet. In *Pseudomonas putida* Idaho BDH2 wurde daneben festgestellt, dass das entstandene DHB nach längerer Zeit unter Bildung von Biomasse abgebaut wurde. Des Weiteren wurde eine zusätzliche Aktivität einer DHB-Dehydrogenase nachgewiesen, von der weder die Funktion noch dessen Regulatoren bekannt ist (A. Germer, pers. Mitteilung). Von Germer wurde beschrieben, dass die Doppelmutante Toluol innerhalb von vier Tagen zu DHB in Ausbeuten von 25-40 % umsetzen kann, wenn Toluol als alleiniges Substrat eingesetzt wurde. In der vorliegenden Arbeit dagegen lag die Ausbeute an DHB bei maximal 4 %. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von A. Germer wurden die Versuche hier mit sogenannten "ruhenden Zellen" durchgeführt. Dem Medium wurde bei diesen Versuchen zusätzlich Glucose und Mineralsalze zugesetzt. In Versuchsansätzen bei denen Glucose zugegeben wurde, wurde eine höhere Toluol-Umsatzaktivität festgestellt. Eine Katabolitrepression scheint also für die geringe DHB-Bildung nicht verantwortlich zu sein. Es wird vermutet, dass ein großer Anteil des Toluols vollständig abgebaut wurde. Die geringe Ausbeute an DHB und die niedrige Bildungsrate von DHB (s. Kapitel 4.3.2, A. Germer pers. Mitteilung) ließen

erkennen, dass die Doppelmutante *Pseudomonas putida* Idaho BDH2 für einen technischen Einsatz nicht geeignet ist.

Bei den Fedbatch-Fermentationen mit Benzoat zeigte sich, dass *Ralstonia eutropha* B9 im Hinblick auf die Produktion von DHB die besten Eigenschaften unter den untersuchten Stämmen besitzt. Dieser Stamm konnte jedoch nicht eingesetzt werden, da er für diesen Zweck nicht genetisch modifiziert werden konnte (S. Gittinger, pers. Mitteilung).

Neben den oben genannten Stämmen wurde ein weiterer Stamm untersucht, dessen Verwendung ursprünglich nicht vorgesehen war. Dieser Stamm (*Pseudomonas putida* BGXM1) wurde von Whited *et al.* (1986) beschrieben (s. Kapitel 3.1). Diese Mutante weist im Stoffwechsel von 4-Methylbenzoat einen Defekt auf und akkumuliert 4-Methyl-DHB. In der vorliegenden Arbeit wurde der Stamm zunächst für die Umsetzung verschieden substituierter Benzoate verwendet. Ob der Stamm Toluol zu DHB umsetzt, wurde in der Literatur nicht beschrieben.

Bei Umsatzversuchen wurde jedoch festgestellt, dass *Pseudomonas putida* BGXM1 tatsächlich Toluol zu DHB umsetzen kann (s. Kapitel 4.3.3). Allerdings wurde auch hier DHB nicht in stöchiometrischen Mengen aus Toluol, sondern nur bis maximal 70 %, gebildet. Trotz gleicher Anzucht- und Reaktionsbedingungen war die Ausbeute stark vom Zustand der Zellen abhängig. *Pseudomonas putida* BGXM1 besitzt vermutlich ein komplexes Enzymsystem, bei dem die einzelnen Enzyme unterschiedliche Aktivitäten und Umsatzgeschwindigkeiten haben. Hierdurch ist die Aktivierung der gesamten Enzymkette wahrscheinlich nicht optimal. Durch diese unvorhersehbare Aktivität der Enzyme sowie durch die mangelnde Toleranz gegenüber Toluol (s. Kapitel 4.3.3) ist auch dieser Stamm für eine technische Anwendung nicht geeignet.

Als Fazit der Umsatzversuche ist festzuhalten, dass eine biotechnische Herstellung von Phenol aus Toluol prinzipiell möglich ist. Eine technische Anwendung ist allerdings wegen der zu geringen Umsatzraten und der unbefriedigenden Ausbeuten noch nicht möglich. Es wurde festgestellt, dass entgegen der Annahme, dass die Reduktionsäquivalente für die Umsetzung von Toluol zu DHB ausreichen müssten, ein Auxiliarsubstrat verwendet werden sollten (s. Kapitel 2.3). Die Beobachtung, dass die Verwendung eines Auxiliarsubstrats während der Umsetzung von Toluol durch *Pseudomonas putida* BGXM1 zu einer höheren Produktausbeute führte, erfordert weitere Untersuchungen der internen Cofaktorregenerierung und des Verlustes von Reduktionsäquivalenten für den Erhaltungsstoffwechsel der Zellen.

Generell gibt es verschiedene Strategien, um Bakterienstämme mit interessanten Stoffwechselwegen für die Biotransformationen einzusetzen. Es können Mutanten verwendet werden, bei denen der weitere Metabolismus eines gewünschten Produktes durch Inaktivierung von Genen für Folgeenzyme blockiert ist. Manche Bakterienstämme können einige Strukturanaloga eines Substrats nicht vollständig abbauen und akkumulieren dadurch ein gewünschtes Produkt. Es besteht neben diesen Techniken noch die Möglichkeit die Gene, die das jeweilige Enzym codieren, zu klonieren und für die Biotransformation in *E. coli* zu exprimieren. Vorteile dieser Methode sind, dass die Regulation der Gene in *E. coli* leichter kontrollierbar sind und in der Regel höhere Enzymkonzentrationen erreicht werden können.

Es wurde z. B. ein rekombinanter *E. coli* Stamm Nah1/3F beschrieben, der die Naphthalin-Dioxygenase aus dem Stamm *Pseudomonas putida* NCIB 9816 (Ensley and Gibson, 1983) exprimiert. Als Nachteil von *E. coli* sollte man aber erwähnen, dass dieser Stamm gegenüber Toluol weniger tolerant ist als die hier verwendeten Pseudomonaden. Jedoch berichteten Inoue und Horikoshi (1989) über eine *E. coli*-Mutante (*E. coli* IFO3806), deren Toleranz gegenüber verschiedenen Lösungsmitteln mit Pseudomonaden vergleichbar war.

Für die im Rahmen der Arbeit verwendeten Pseudomonaden Stämme ist folgendes festzustellen: Obwohl Pseudomonaden eine hohe Lösungsmitteltoleranz besitzen, sind sie vermutlich wegen ihrer vielfältigen Abbauaktivitäten für die Biotransformation von Aromaten im großtechnischem Maßstab nicht geeignet.

5.2 Technische Herstellung von DHB und substituierten DHB

Da zum Beginn dieser Arbeit weder ein konstruierter Bakterienstamm von *Ralstonia eutropha* B9 noch von *Pseudomonas putida* Idaho für die Herstellung von DHB aus Toluol zur Verfügung stand, wurde der biotechnische Prozess für die Herstellung von DHB zunächst aus Benzoat entwickelt. Mit dem Stamm *Ralstonia eutropha* B9 (s. Kapitel 3.1) wurden zunächst Vorversuche durchgeführt. Da dieser Stamm stöchiometrische Menge an DHB (nahezu 100 %) aus Benzoat DHB produziert, wurde er für die Optimierung des technischen Verfahrens verwendet (s. Kapitel 4.1.1).

Wegen der relativ hohen Toxizitäts des Cosubstrats (ca. 10 mmol/l, s. Kapitel 4.1.1) empfahl es sich, die Reaktorversuche (s. Kapitel 3.6) im sogenannten Fedbatch-Prozess durchzuführen. Gegenüber dem klassischen Batch-Prozess, bei dem die entsprechenden Substrate und Cosubstrate von Anfang an vorgelegt werden, sollten bei diesem Verfahren die Substanzen während des Prozesses so zudosiert werden, dass die bestimmte Konzentrationen

nicht überschritten werden. Nach Beendigung der Zugabe wird das Edukt, wie im Batch-Prozess, annähernd vollständig abgebaut (Storhas, 1994).

5.2.1 Fedbatch-Fermentation zur Herstellung von DHB aus Benzoat

Den Literaturangaben entsprechend (Reiner und Hegeman, 1971) wurde bei den ersten Versuchen Succinat als Auxiliarsubstrat eingesetzt. Bei diesem Verfahren wurde festgestellt, dass die maximal erreichbare Konzentration an DHB die Grenze von 120 mmol/l nicht überschritt. Nach ca. 80 h stellten die Zellen die Umsetzung praktisch ein (s. Abb. 4.2). Neben der relativ niedrigen Produktkonzentration wurde ein weiterer Nachteil des Prozesses festgestellt: Durch den Abbau von Na₂-Succinat stieg der pH-Wert der Fermentationslösung ständig an. Durch die pH-Kontrolle wurde ständig HCl zugeführt, was zu einem enormen hohen Anstieg der Salzkonzentration führte.

Die hohe Salzkonzentration, die bereits auf der hohen Phosphationen-Konzentration (50 mmol l⁻¹) des Mediums beruhte, verursachte Schwierigkeiten bei der Langzeitstabilität der Zellen und später bei der Aufarbeitung des Produktes. Aus diesem Grund wurde die Phosphatpuffer-Konzentration von 50 mmol·l⁻¹ auf 1 mmol·l⁻¹ herabgesetzt. Außerdem wurde als Auxiliarsubstrat anstelle von Succinat Fructose verwendet. Die beide Maßnahmen führten zu einer niedrigeren Salzkonzentration am Ende der Fermentation, wodurch längere Fermentationszeiten und höhere DHB-Konzentrationen (ca. 300 mmol·l⁻¹) erzielt werden konnten (s. Kapitel 4.1.1).

Zwischen den beiden Fermentationen (50 mmol·l⁻¹ Phosphatpuffer, Succinat als Auxiliarsubstrat und 1 mmol·l⁻¹ Phosphatpuffer, Fructose als Auxiliarsubstrat, s. Kapitel 4.1.1) waren außer den höheren Produktkonzentrationen noch weitere Unterschiede zu beobachten.

Bei allen durchgeführten Fermentationen wurde ein ähnlicher Wachstumsverlauf beobachtet. Sowohl beim Einsatz von 50 mmol·l⁻¹-Phosphatpuffer und Succinat als Auxiliarsubstrat als auch bei 1 mmol·l⁻¹ Phosphatpuffer und Fructose als Auxiliarsubstrat wuchsen die Zellen in der ersten Phase schnell auf eine bestimmte optische Dichte. Die Wachstumsrate in dieser Phase betrug 0,46 h⁻¹, die Verdopplungszeit (t_d) lag bei 1,5 h. In dieser Phase wurde die Benzoat-Dioxygenase induziert. In der zweiten Phase nahm die OD_{546nm}-Wert nur noch leicht zu. Dies kann dadurch erklärt werden, dass in dieser Phase keine Mineralsalze mehr vorhanden waren, wodurch eine N-Limitierung auftrat. Die Zellen haben das Auxiliarsubstrat

nur als Quelle für Reduktionsäquivalente für die Umsetzung von Benzoat zu DHB und als Energiequelle zum Erhalt der Biomasse verwendet.

Obwohl bei beiden Fermentationen die gleiche Mengen an Mineralsalzen zugegeben wurden, hat der Stamm *Ralstonia eutropha* B9 im Falle von der niedrigen Phosphatpufferkonzentration ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) einen höheren OD_{546} -Wert erreicht ($\text{OD}_{546} = 7,0$ statt $\text{OD}_{546} = 3,6$; entspricht $2,5 \text{ g/l}$ bzw. $1,2 \text{ g/l}$ Trockenmasse).

Auch in den Raten zur Umsetzung von Benzoat zu DHB wurden Unterschiede beobachtet. *Ralstonia eutropha* B9 setzte in der Fermentation, in der $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer und Succinat als Auxiliarsubstrat eingesetzt wurde, über 72 h Benzoat mit einer Rate von durchschnittlich $0,3 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ um (max. Umsatzrate : $0,5 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Die Umsatzrate erhöhte sich, als die Phosphatpuffer-Konzentration im Reaktor auf $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ herabgesetzt und das Auxiliarsubstrat Fructose verwendet wurde (durchschnittlich: $0,48 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$, maximal: $0,92 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

In Intervallen von 2-3 Stunden wurden Benzoat bzw. Auxiliarsubstrat (Succinat oder Fructose) mit ca. $1,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (Benzoat) bzw. $1,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (Succinat) oder $0,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (Fructose) zugegeben. Die zugegebenen Mengen an Cosubstrat und Substrat wurden durch Messung der Zufuhr bestimmt (s. Kapitel 3.6). Hierdurch konnten die Ertragskoeffizienten ($Y_{P/C}$) und die cometabolischen Ausbeutekoeffizienten ($Y_{C/S}$) berechnet werden (s. Gleichung 4.1). Bei der Fermentation, bei der Succinat als Auxiliarsubstrat diente, wurde mehr Auxiliarsubstrat für die Umsetzung von 1 mol Benzoat als Cosubstrat verbraucht. Aus diesem Grund war hier der $Y_{C/S}$ -Wert höher als bei der Fermentation mit Fructose ($2,44$ statt $2,08$). Der $Y_{P/C}$ -Wert war dagegen bei der Fermentation mit Succinat höher ($0,97$), d. h., hier wurde aus Benzoat 97% DHB gebildet. Bei der Fermentation mit Fructose wurde Benzoat nur mit 85% zu DHB umgesetzt ($Y_{P/C} = 0,85$). Allerdings mussten die Proben für die HPLC-Analytik (s. Kapitel 3.11) wegen der hohen DHB-Konzentration (ca. $300 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) stark verdünnt werden, was die genaue Bestimmung der Cosubstrat- und Produktkonzentration fehlerhaft gestaltete.

Obwohl die Toxizitätsgrenze von Benzoat für den Stamm *Ralstonia eutropha* B9 in Vorversuchen bestimmt wurde ($10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, s. Kapitel 4.1.1), wurde beobachtet, dass er unter Fermentationsbedingungen (pH-Kontrolle, optimale Sauerstoffzugabe) eine höhere Konzentration an Benzoat ($16 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) tolerierte.

Nachdem die Doppelmutante von *Pseudomonas putida* Idaho von A. Germer (Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart) zur Verfügung stand, wurde die Umsetzung von Benzoat

durch diesen Stamm mit der neuen Fermentationsmethode (1 mmol·l⁻¹ Phosphatpuffer) getestet (s. Kapitel 4.1.2). *Pseudomonas putida* Idaho BDH2 wuchs bei derselben Mineralsalzzugabe auf eine niedrigere OD als *Ralstonia eutropha* B9. Auf die Trockenmasse bezogen, wies der Stamm auch niedrigere Umsatzraten während der Fermentation auf. Während die durchschnittliche Bildungsrate bei einer Trockenmasse von 1 g·l⁻¹ beim Stamm B9 bei 0,25 g·l⁻¹·h⁻¹ lag, wurde beim Stamm BDH2 bei der selbe Trockenmasse eine durchschnittliche Umsatzrate von 0,15 g/l/h gemessen. Außerdem war die Ausbeute der Fermentation deutlich kleiner. *Pseudomonas putida* Idaho BDH2 hat bei der Fedbatch-Fermentation nur ca. die Hälfte der zugegebene Benzoatmenge zu DHB umgesetzt. Hierauf weist der niedrige Ertragskoeffizient ($Y_{P/C} = 0,56$). Dieser Wert war sogar niedriger als die gemessene Ausbeute bei Versuchen im Schüttelkolbenmaßstab. In diesen Versuchen wurden 62 % des Benzoats umgesetzt (s. Kapitel 4.1.2). Der cometabolische Ausbeutekoeffizient des Stammes lag während der Fermentation bei nur ca. 1/5 desjenigen des Stammes *Ralstonia eutropha* B9 (Tabelle 5.1).

Als negative Eigenschaft des Stammes *Pseudomonas putida* Idaho BDH2 sollte man hier bemerken, dass die Umsetzung nur solange problemlos gelaufen ist, als sich der Stamm noch in der Wachstumsphase befand. Eine Umsetzung durch ruhende Zellen fand nicht statt (s. Abb. 4.5).

Tabelle 5.1 Vergleichende Fermentationsdaten von *Ralstonia eutropha* B9 und *Pseudomonas putida* Idaho BDH2

Stamm	Durchschnittliche* Bildungsrate von DHB [g/l/h]	Maximale* Bildungsrate von DHB [g/l/h]	Ertragskoeffizient [$Y_{P/C}$]	Cometabolischer Ausbeutekoeffizien t [$Y_{C/S}$]
<i>Ralstonia eutropha</i> B9	0,25	0,48	0,85	2,08
<i>Pseudomonas putida</i> Idaho BDH2	0,15	0,30	0,56	0,45

* Bezogen auf 1 g·l⁻¹ Trockenmasse

Durch die unbefriedigenden Ergebnisse mit dem Stamm *Pseudomonas putida* Idaho BDH2 sowie *Pseudomonas putida* BGXM1 (s. Kapitel 5.1) ist klar geworden, dass die Herstellung von DHB aus Toluol für die Phenolproduktion im großtechnischen Maßstab aus

Kostengründen nicht interessant ist. Die bei den Fermentationen von Benzoat erzielten Umsatzraten und Ausbeuten lassen allerdings erkennen, dass die Herstellung von DHB aus Benzoat für einen technischen Maßstab zur Herstellung als Feinchemikalie durchaus lohnend sein kann. *cis*-Dihydrodiol von aromatischen Verbindungen, die durch Dioxygenasen gebildet werden, sind seit den siebziger Jahren wichtige Schlüsselverbindungen (Jenkins *et al.*, 1995).

Die verantwortlichen Enzyme sind nicht substratspezifisch. Sie tolerieren für die Doppelhydroxylierung als Substrat auch Aromaten mit Halogen-, Alkyl- oder Arylgruppe (Taylor *et al.*, 1987). Gerade diese Eigenschaften der Enzyme kann die chemische Industrie für die Produktion sogenannter Synthone nutzen, die als Ausgangssubstrate oder Zwischenprodukte bei der Synthese verschiedener Feinchemikalien dienen können. Mit einem Enzym oder einer Enzymkette ist es grundsätzlich möglich, eine Gruppe von strukturanalogen Verbindungen der gleichen chemischen Stoffumwandlung zuzuführen, womit neue, früher nicht oder schwer herstellbare Chemikalien erzeugt werden können (Jenkins *et al.*, 1995).

Das Interesse für biotechnische Verfahren stieg in den letzten Jahren in der chemischen Industrie zunehmend. Die Firma Genencor (USA) entwickelte einen Prozess, mit dem Indigo aus Glucose mit einem rekombinanten *E. coli* Stamm herstellbar ist. Als umweltfreundliches Verfahren kann man diese biotechnische Methode für die Farbstoffproduktion in der Textilindustrie verwenden. Die Firma Merck & Co. Inc. möchte die biotechnische Oxidation von Inden zu *cis*-(1S,2R)-Indandiol für die Synthese von Indivar (CrixivanTM, HIV-Protease-Inhibitor) nutzen.

Hudlicky *et al.* (1999) berichteten über ein Verfahren der Imperial Chemical Industries (ICI, Großbritannien), bei dem biokatalytisch aus Benzol *cis*-1,2-Dihydroxycyclohexa-3,5-dien (*cis*-Dihydro-benzoldiol) für die Synthese von Polyphenylen hergestellt wird.

Einige Verfahren zur Produktion von *cis*-Dihydrodiolen wurden also schon bis zu der industriellen Verwendung entwickelt. Daneben existieren Herstellungsmethoden im Labormaß, die derzeit nur wissenschaftlich, später eventuell industriell interessant sein können. Reineke und seine Kollegen (1978) haben bei den Stämmen *Ralstonia eutropha* B9 und *Pseudomonas sp.* B13 nachgewiesen, dass sie halogenierte und methyl-substituierte Benzoate zu den entsprechenden substituierten *cis*-3,5-Cyclohexadiene-1,2-diol-1-carbonsäuren (DHB) oxidieren können. Im Gegensatz zu dieser "ipso" Oxidation können andere Stämme der Gattung substituierte Benzoate in 2,3-Position oxidieren, wie Ribbons (1977) bei der Umsetzung von Cuminsäure zu 2,3-Dihydroxy-4-isopropylcyclohexa-4,6-

diensäure beschrieben hat. Hudlicky (1999) entwickelte einen Prozess im Labormaßstab, bei dem Chlorbenzol mit dem Stamm *Pseudomonas putida* F39/D zu 1-Chlor-(2*S*,3*S*)-dihydroxycyclohexa-4,6-dien oxidiert wird. Nach seinen Angaben ist dieses Verfahren auch für die Oxidation anderer flüchtiger Aromaten geeignet. Auch feste Substrate, wie z.B. Naphthalin oder Biphenyl können direkt zum Kulturmedium gegeben werden. Unter diesen Bedingungen induzieren die aromatischen Verbindungen die jeweilige Dioxygenase. Nach der Zellernte können die unterschiedlichen Cosubstrate auf Umsatzaktivität hin getestet sein. Bei dieser Methode wird Pyruvat ins Umsatzmedium gegeben um den NADH-Bedarf abzudecken. Manche konstitutive Stämme, wie *Pseudomonas putida* UV4 brauchen sogar keine Induktion, da ihre Dioxygenase unter allen Wachstumsbedingungen zur Verfügung steht (Hudlicky *et al.*, 1999).

Interessanterweise handelt es sich bei dem Induktor nicht immer um dasselbe Substrat, das für die Isolierung des Wildstammes benutzt wurde. Zum Beispiel wird die Naphthalin-Dioxygenase im Stamm *Pseudomonas sp.* NCIB 9816 mit Salicylat oder Anthranilat induziert (Barnsley, 1975), die Biphenyl-Dioxygenase in *Sphingomonas yanoikuyae* B8/36 mit *p*-Xylol (Mahaffey, 1988).

5.2.2 Fedbatch-Fermentation zur Herstellung von substituierten DHB

Im Rahmen dieser Arbeit wurden substituierte Benzoate teilweise nach Literaturangaben hergestellt oder aufgrund von Screeningversuchen auf Möglichkeiten zur DHB-Herstellung im 5 g Maßstab untersucht (s. Kapitel 4.2). Diese substituierten DHBs sollten als Synthone für die chemische Synthese von Wirkstoffen verwendet werden. Bei den Screeningversuchen wurden 58 Benzoate mit den Stämmen *Ralstonia eutropha* B9, *Pseudomonas putida* Idaho BDH2 und *Pseudomonas putida* BGXM1 (s. Kapitel 3.1) umgesetzt. Bei Umsetzen mit Ergebnis wurden die entstandenen Metabolite mittels HPLC analysiert (s. Tabelle 4.5). Falls die Umsetzung nur ein einziges Produkt, das entsprechende substituierte Dihydrodihydroxybenzoat lieferte und die Umsatzraten relativ hoch waren, wurde die gewünschte Verbindung in 1 bis 5 g Mengen produziert. Mit dem Stamm *Ralstonia eutropha* B9 konnte 4-Fluorbenzoat und 3,5-Difluorbenzoat (Abb. 5.3) erfolgreich umgesetzt werden (s. Kapitel 4.2.1). Mit dem Stamm *Pseudomonas putida* BGXM1 wurde 3-Methylbenzoat, 4-Methylbenzoat, 3,4-Dimethylbenzoat, 4-Brombenzoat und 4-Ethylbenzoat (Abb. 5.4 und 5.5) umgesetzt. Allerdings waren die Umsatzrate bei den beiden letzt genannten Verbindungen und dadurch die Konzentration des Produktes am Ende der Fermentation so niedrig, dass die

Isolierung des Produktes aus dem Medium nicht möglich war (s. Kapitel 4.2.2). Der neu konstruierte Stamm (von A. Germer, Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart, zur Verfügung gestellt) *Pseudomonas putida* Idaho BDH2 wurde vorher noch nicht auf die Umsetzung von substituierten Benzoate getestet. Bei den Screeningversuchen hatte die Doppelmutante ein positives Ergebnis für die Umsetzung von 4-Chlorbenzoat gezeigt (Abb. 5.6), welches weder durch *Ralstonia eutropha* B9 noch *Pseudomonas putida* BGXM1 mit befriedigenden Raten umgesetzt werden konnte. Dies konnte durch die erfolgreiche Fermentation von 4-Chlorbenzoat zu 4-Chlor-DHB später bestätigt werden (Ausbeute lag bei 97 %, s. Kapitel 4.2.3). Über die Substratspezifität der Benzoat-Dioxygenase im einzelnen ist bisher noch nichts bekannt.

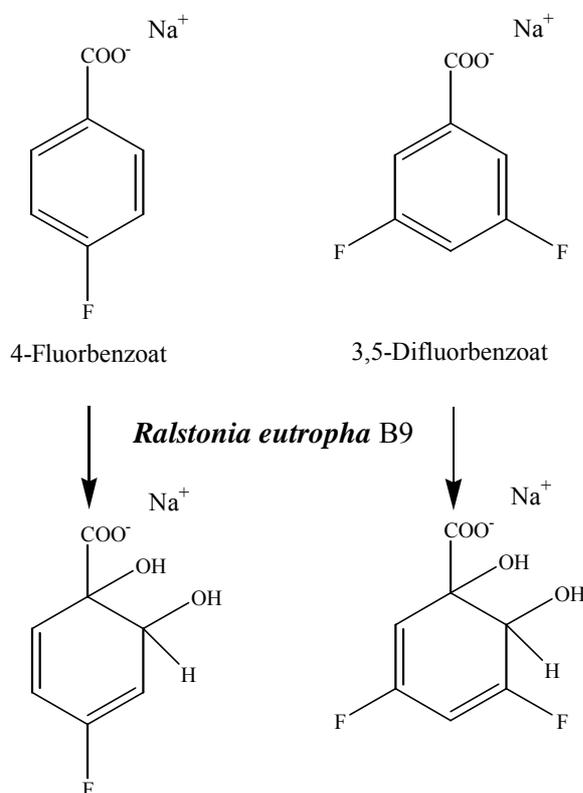


Abbildung 5.3 Umsetzung von 4-Fluorbenzoat und 3,5-Difluorbenzoat zu 4-Fluor-DHB bzw. 3,5-Difluor-DHB mit dem Stamm *Ralstonia eutropha* B9

Bei allen substituierten Benzoaten lag die Endkonzentration des jeweiligen Produktes (17 bis 47 mmol·l⁻¹) unter der DHB-Konzentration, die in der Fedbatch-Fermentationen mit Benzoat erreicht wurden. Dies war unabhängig davon mit welchem Bakterienstamm gearbeitet wurde (s. Abb. 4.29). Allerdings konnte bei den Fermentationen mit Benzoat festgestellt werden,

dass lediglich mit dem Stamm *Ralstonia eutropha* B9 besonders hohe Mengen an DHB gebildet wurden. Es muss betont werden, dass die Fedbatch-Fermentationen der substituierten Benzoate darauf abzielten, substituierte DHB im 5 g Maßstab im industriellen Auftrag herzustellen. Bei den Untersuchungen stand also zunächst nicht die Optimierung jeder einzelner Fedbatch-Fermentation im Vordergrund.

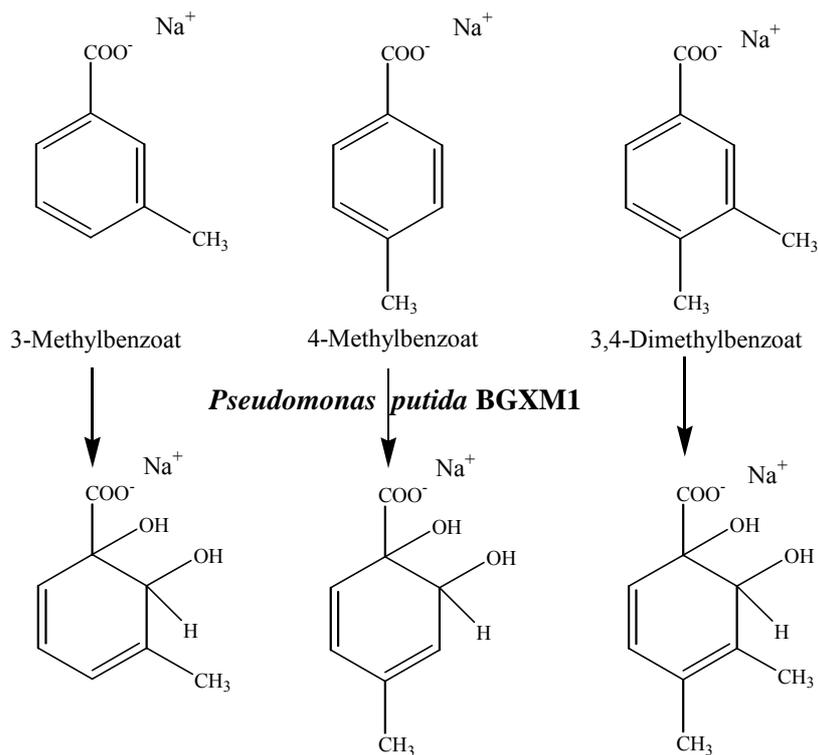


Abbildung 5.4 Umsetzung von 3-Methyl-, 4-Methyl- und 3,4-Dimethylbenzoat zu den entsprechenden DHB mit dem Stamm *Pseudomonas putida* BGXM1

Auf den Erfahrungen der Fermentationen mit *Ralstonia eutropha* B9 basierend, wurden die Cosubstrate, Auxiliarsubstrate und Mineralsalze zudosiert, die eventuell für den entsprechenden Stamm nicht immer die optimalen Bedingungen darstellten. Aus diesem Grund wären für eine technische Anwendung weitere Versuche zur Optimierung der Fedbatch-Fermentationen für die einzelnen Benzoate nötig.

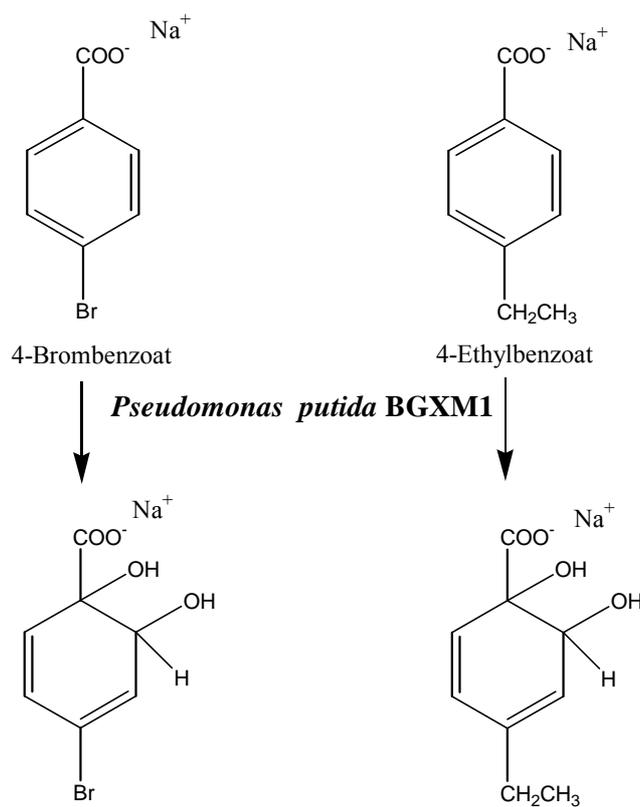


Abbildung 5.5 Umsetzung von 4-Brombenzoat und 4-Ethylbenzoat zu den entsprechenden DHB mit dem Stamm *Pseudomonas putida* BGXM1



Abbildung 5.6 Umsetzung von 4-Chlorbenzoat zu 4-Chlor-DHB mit *Pseudomonas putida* IdahoBDH2

Im Falle von *Ralstonia eutropha* B9 waren bei den Fedbatch-Fermentationen die folgende Unterschiede bei der Umsetzung von Benzoat und 4-Fluorbenzoat bzw. 3,5-Difluorbenzoat zu beobachten (Tabelle 5.2):

Tabelle 5.2 Umsatzraten verschiedener Cosubstrate bei Fermentationen mit *Ralstonia eutropha* B9

Substrat	Durchschnittliche* Umsatzrate [mmol·l⁻¹·h⁻¹]	Ertragskoeffizient Y_{P/C}	Cometabolischer Ausbeutekoeffizient Y_{C/S}
Benzoat	1,42	0,85	2,08
4-Fluorbenzoat	1,66	0,93	0,64
3,5-Difluorbenzoat	1,75	0,74	0,62

* Bezogen auf 1 g/l Trockenmasse

Wie Tabelle 5.2 zeigt, waren die durchschnittlichen Umsatzraten von 4-Fluorbenzoat und 3,5-Difluorbenzoat mit *Ralstonia eutropha* B9 vergleichbar mit der Umsatzrate von Benzoat. Die Ertragskoeffizienten (Y_{P/C}), die aus den Fermentationen ermittelt wurden, weichen nur geringfügig voneinander ab. Am niedrigsten war der Ertragskoeffizient bei 3,5-Difluorbenzoat. Das lag vermutlich daran, dass der Stamm ein Teil dieses Cosubstrates vollständig abgebaut hat. Auffällig war, dass bei den Umsetzungen der fluorierten Benzoate der Auxiliarsubstratverbrauch deutlich höher war, als bei Benzoat (Y_{C/S}). Am Ende der Fermentationen waren die Umsatzraten bei 4-Fluorbenzoat (0,85 mmol·l⁻¹·h⁻¹) und bei 3,5-Difluorbenzoat (1,75 mmol·l⁻¹·h⁻¹) immer noch relativ hoch. Dies weist darauf hin, dass bei beiden fluorierten Benzoaten die Fermentation noch fortgeführt werden könnte (s. Kapitel 4.2.1).

Der Stamm *Pseudomonas putida* BGXM1 setzte die substituierte Benzoate nicht stöchiometrisch um (Tabelle 5.3).

Tabelle 5.3 Umsatzraten verschiedener Cosubstrate bei Fermentationen mit *Pseudomonas putida* BGXM1

Substrat	Durchschnittliche* Umsatzrate [mmol·l⁻¹·h⁻¹]	Ertragskoeffizient Y_{P/C}	Cometabolischer Ausbeutekoeffizient Y_{C/S}
Benzoat	1,10	0,56	1,05
3-Methylbenzoat	0,76	0,72	1,22
4-Methylbenzoat	0,23	0,47	0,56
3,4-Dimethylbenzoat	0,42	0,55	0,52

* Bezogen auf 1 g/l Trockenmasse

Der Stamm erreichte beim Einsatz von Benzoat die beste Umsatzrate, beim Einsatz von den substituierten Benzoaten lagen sie deutlich niedriger. Die besten Ergebnisse wies der Stamm in der Produktion von 3-Methyl-DHB auf: mit einer Ausbeute von 72% (bezogen auf die zugegebene Cosubstratmenge) wurden nur 0,8 mol Fructose je mol 3-Methyl-DHB verbraucht. Bei 4-Methyl- und 3,4-Dimethylbenzoat waren die Werte weniger günstig: die Ausbeuten lagen bei ca. 50 % (Y_{P/C}). Die verbrauchte Auxiliarsubstratmenge lag bei 2 mol Fructose/mol substituierten DHB. Um die benötigten 5 g des jeweiligen DHB herzustellen, waren im Falle des 4-Methylbenzoats und des 3,4-Dimethylbenzoats mehrere Fermentationen notwendig. Es ist anzunehmen, dass ein großer Teil der beiden Methylbenzoate vollständig abgebaut wurde. Da dies im Besonderen bei den Benzoaten zu beobachten war, die in 4-Stellung eine Methylgruppe haben stellte sich die Frage, ob der Stamm über mehr als eine DHB-Dehydrogenase verfügt, die bevorzugt 4-Methyl-substituierte DHB umsetzen kann und in der Mutante BGXM1 aktiv ist (s. Kapitel 4.2.2).

Bei der Fermentation mit 3-Methylbenzoat als Cosubstrat war die Produktkonzentration für den Stamm bereits toxisch, d. h., eine weitere Umsetzung über eine Produktkonzentration von 40 mmol·l⁻¹ hinaus war nicht durchführbar. Beim Einsatz von 4-Methyl- und 3,4-Dimethylbenzoat konnten die Zellen bis zum Abbrechen der Fermentation 0,15 bzw. 0,2 mmol·l⁻¹·h⁻¹ des entsprechenden DHB bilden. Eine weitere Produktion wäre also bei diesen Cosubstraten möglich gewesen. Allerdings ist zu erwähnen, dass die Fermentationen in Hinblick auf die hohe Reinheit des Produktes bei einer Konzentration von ca. 20 mmol·l⁻¹ des jeweiligen DHB beendet wurde. In weiterführenden Untersuchungen sollte im Hinblick auf eine technische Anwendung genauere Untersuchungen zum toxischen Einfluss der substituierten DHB durchgeführt werden.

Die starke Schaumbildung während der Fedbatch-Fermentationen ist als Nachteil des Stammes zu nennen. In manche Fällen war die Schaumbildung so groß, dass eine sterile Rückfuhr der Zellen mit einer zwischen der Abluft und einer Pumpe des Reaktors geschalteten Schaumsammelflasche nötig war. Während der Fermentationen wurde kein Antischaummittel zugegeben, da hierdurch das Produkt verunreinigt worden wäre.

Während *Pseudomonas putida* BGXM1 die Methyl-substituierten Benzoate in einer Konzentration von ca. $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ohne weiteres tolerierte, war die Toxizität bei 4-Brombenzoat und 4-Ethylbenzoat offenbar so hoch, dass bei einer Cosubstratkonzentration von 1 bis $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ die Zellen schon inhibiert wurden. Aus diesem Grund war es nicht möglich, befriedigende Fedbatch-Fermentationen für die Herstellung der DHB durch *Pseudomonas putida* BGXM1 durchzuführen (s. Kapitel 4.2.2).

Bis dato wurde über den Stamm *Pseudomonas putida* Idaho BDH2 nicht beschrieben, dass er substituierte Benzoate umzusetzen kann. Der Stamm hatte gegenüber allen hier untersuchten Stämmen in Vorversuchen 4-Chlorbenzoat am besten umgesetzt, was auch in den Fedbatch-Fermentationen bestätigt wurde.

Tabelle 5.4 Umsatzraten verschiedener Cosubstrate bei Fermentationen mit *Pseudomonas putida* Idaho BDH2

Substrat	Durchschnittliche* Umsatzrate [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$]	Ertragskoeffizient $Y_{P/C}$	Cometabolischer Ausbeutekoeffizient $Y_{C/S}$
Benzoat	0,60	0,56	0,45
4-Chlorbenzoat	0,26	0,96	0,17

* Bezogen auf 1 g/l Trockenmasse

Tab. 5.4 zeigt, dass Umsatzraten von *Pseudomonas putida* Idaho BDH2 mit 4-Chlorbenzoat niedriger waren als mit Benzoat. Die Ausbeute der Fermentation mit 4-Chlorbenzoat ($Y_{P/C} = 0,96$) war nahezu stöchiometrisch, allerdings war der Auxiliarsubstratverbrauch hoch. Es wurde die etwa 6-fache Menge des gebildeten 4-Chlor-DHB im Form von Glucose als Auxiliarsubstrat zugegeben.

Zu Beginn der Fermentation (bis 33. Stunde) transformierte der Stamm 4-Chlorbenzoat mit hoher Umsatzrate ($0,6 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$). Die Beobachtung, dass 4-Chlor-DHB im Gegensatz zu Benzoat in stöchiometrischen Mengen gebildet wurde, lässt die Frage aufkommen, ob die dritte, bisher nicht eindeutig nachgewiesene DHB-Dehydrogenase, möglicherweise eine relativ hohe Aktivität für DHB aber nicht für 4-Chlor-DHB hat.

In der stationäre Phase war zu beobachten, dass die Benzoat-1,2-Dioxygenase nicht mehr aktiv war. Diese zwar interessante, aber für die Produktion ungünstige Eigenschaft des Stammes, war bei der Fedbatch-Fermentation mit Benzoat früher schon zu beobachten. Prinzipiell wäre es möglich, die Zellen im Wachstumszustand zu halten, hierdurch würde sich jedoch der Substrat- und Mineralsalzverbrauch und der damit einhergehende hohe Salz- und Proteingehalt des Mediums die Aufarbeitung des Produktes nachteilig auswirken (s. Kapitel 4.1.3.4).

Während der Fermentationen mit *Pseudomonas putida* Idaho BDH2 wurden große Mengen an Glucose verbraucht (s. Kapitel 4.1.2 und 4. 2 3). Bei der Fedbatch-Fermentation mit Benzoat benötigte der Stamm $56 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Glucose für das Wachstum auf eine $\text{OD}_{546 \text{ nm}} = 3,2$ (\cong einer Trockenmasse von $1,48 \text{ g/l}$) und weitere $158 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ für die Umsetzung von Benzoat bzw. den Erhalt der Biomasse ($\text{OD}_{546 \text{ nm}} = 4,3$ am Ende der Fermentation). Bei der Fedbatch-Fermentation mit 4-Chlorbenzoat verbrauchte der Stamm für das Wachstum nur $32 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Für den Erhalt der Biomasse bzw. für die Bildung von 4-Chlor-DHB waren weitere $107 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Glucose nötig. Es stellte sich die Frage, ob durch den hohen Glucoseverbrauch ein Katabolit-Repression aufgetreten ist. Die Glucosezufuhr wurde in Abhängigkeit vom gemessenen Verbrauch zudosiert. In weiteren Versuchen wäre zu klären, ob die DHB-Bildungsraten deutlich zu erhöhen wären, wenn die Glucosezufuhr gesenkt werden würde.

Bei allen drei Stämme war die Benzoat-Dioxygenase mit den entsprechenden substituierten Benzoaten zu induzieren. Es war keine Zugabe von unsubstituierten Benzoaten für die Induktion nötig, was eine höhere Reinheit des Produktes ermöglichte.

Bei allen Fermentationen war zu beobachten, dass die Zellen nur eine bestimmte Konzentration des Cosubstrates tolerieren: bei Einsatz von substituierten Benzoaten lag sie teilweise unter $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, bei Benzoat war sie höher, ca. $15 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. In einzelnen Fällen und zwar besonders bei Einsatz von Benzoat war festzustellen, dass die Zellen eine Überdosierung von ca. $30\text{-}40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ noch akzeptieren konnten. Allerdings ist diese Fähigkeit stark von Zustand der Zellen abhängig. Eine kontinuierliche Regelung der Zugabe des Cosubstrats war mit der vorhandenen Ausstattung nicht zu realisieren, dafür wäre eine "online-HPLC" Messung verbunden mit einer Steuerung der Benzoatzugabe nötig gewesen. Ebenso sinnvoll wäre ein kontinuierliche Kontrolle der Substratzufuhr gewesen.

Beim Einsatz der Cosubstrate 3-Methylbenzoat und 3,4-Dimethylbenzoat bestand die Möglichkeit, dass der aromatische Ring in 1,2- oder 1,6-Position oxidiert wird (s. Abb. 5.6). Allerdings war bei der Umsetzung dieser Cosubstrate mit dem Stamm *Pseudomonas putida*

BGXM1 hauptsächlich nur ein Stellungs-Isomer des Dihydrodihydroxybenzoates zu beobachten, der Anteil des zweites DHB lag nach der HPLC-Analyse unter 1 %. Diese interessante Beobachtung wurde auch schon von Whited et al. (1994) beschrieben (s. Abb. 5.7).

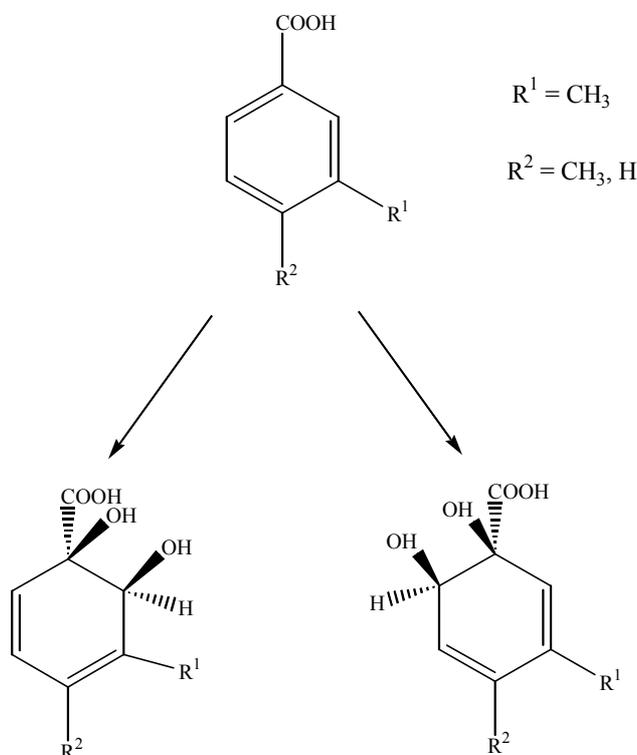


Abbildung 5.7 Möglichkeiten zur initiale Dioxygenierung von 3- bzw. 3,4-substituierten Benzoaten

5.3 Aufarbeitung von DHB aus Fermentationslösungen

Nach Ende der Fermentationen lag das Produkt DHB in einer Lösung, die mit Salzen, Cosubstrat- und Substratresten, lysierten Zellen und Proteinen verunreinigt war, vor. Um die Zielverbindung aus einer so komplexen Matrix zu isolieren, standen (wie in Kapitel 4.1.3 ausgeführt) verschiedene Aufarbeitungsmethoden zur Verfügung. Diese verschiedenen Verfahren wurden für die Isolierung von DHB getestet. Das am besten geeignete Verfahren wurde später beim Einsatz substituierten DHBs verwendet.

5.3.1 Extraktionen

Reineke (1976) hat über eine Methode berichtet, womit DHBs aus einem Fermentationsmedium isolierbar sind. Nach dieser Methode, die aus einer sauren Extraktion mit Ethylacetat und anschließender Fällung des Na-Salzes mit Isopropanol bestand, wurde die Aufreinigung von DHB aus den im Rahmen dieser Arbeit genommenen Kulturbrühen vorgenommen. Da es sich bei DHB um eine polare Verbindung handelt, lässt es sich nicht ohne weiteres mit organischen Lösungsmitteln extrahieren (s. Kapitel 4.1.3.2). Für die Extraktion wurde deshalb die DHB-haltige Fermentationslösung angesäuert. Da jedoch DHB bei niedrigem pH-Bereich instabil ist (s. Kapitel 4.1.3.1), führte diese Aufarbeitungsmethode zu einer Verunreinigung mit Salicylat (20%) des kristallinen DHB. Die maximale Ausbeute bei der Extraktion lag bei 70%. Außerdem waren die Ausbeuten an kristallinen Na-DHB bezogen auf die umgesetzten Benzoesäuremenge sehr gering. So wurde aus 7,2 g umgesetzten Benzoesäure 1 g kristallines Na-Salz des DHBs erhalten.

Als alternative Extraktionsmethode wurde darüber hinaus die Ionenpaarextraktion untersucht. Um die unpolare Eigenschaften des DHB und damit eine bessere Extrahierbarkeit in organischen Lösungsmitteln zu erreichen, wurde Alamin 336 bzw. Tetrabutylammoniumhydroxid der Fermentationslösung zugesetzt (s. Kapitel 4.1.3.3). Bei der Ionenpaarbildung bilden die negativ geladenen Ionen des Mediums einen kompetitiven Partner zu DHB. Um den Matrixeffekt des Mediums zu untersuchen wurden Versuche mit Lösungen, die viel bzw. wenig Salze enthielten ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ bzw. $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer, s. Kapitel 4.1.1) durchgeführt. Da auch eine Extraktion von DHB nicht aus dem gering salzhaltigen Medien möglich war, ist anzunehmen, dass diese Beobachtung eher an den unzureichenden Ionenpaarbildung als an dem Matrixeffekt der Lösung lag.

5.3.2 Adsorption

Mit der Adsorption kann man in geringer Konzentration vorkommende Bestandteile aus einem nicht oder wenig absorbierbaren Stoffgemisch selektiv abtrennen. Der Feststoff, an dem die Zielkomponente binden kann, wird Adsorbens genannt (Näser, 1976).

Garcia und Kim (1993) konnten aus einem zellhaltigen Fermentationsmedium das Diol (+)-*cis*-(1S,2S)-Dihydroxy-3-chlorcyclohexa-3,5-dien an einem pyrolysierten Polymer (Amborsorb XEN-575) adsorbieren und anschließend mit einer Ethanol-Ethylacetat-Mischung desorbieren. Basierend auf diesen Angaben wurden Versuche mit verschiedenen analogen

Adsorbentien durchgeführt von denen bekannt war, dass sie polare Verbindungen adsorbieren können (s. Kapitel 4.1.3.4). Die Versuche wurden mit unterschiedlichen Fermentationslösungen durchgeführt: mit Lösungen die relativ viel und mit Lösungen die relativ wenig Salz enthielten (s. Kapitel 4.1.1). Die Adsorbentien konnten das DHB nicht spezifisch binden, unabhängig vom Salzgehalt der Lösung. Die sehr schwache van der Waals Bindungen waren mit bidest. Wasser zu trennen. Dadurch war die Isolierung des DHB von den anderen Matrixkomponenten nicht möglich. Das Problem lag hier nicht an der Zusammensetzung der aufzureinigenden Lösung, sondern an den physikalisch-chemischen Eigenschaften des DHB.

Neben diesen Adsorbentien wurden außerdem Anionenaustauschern für die Aufarbeitung von DHB getestet. Bookser und Zhu (2001) konnten an verschiedenen Anionenaustauschern (DOWEX- und Amberlite-Kunsthharzen) Benzoat, 4-Nitrobenzoat, Diphenylacetat und 4-Aminobenzoat erfolgreich aus Fermentationsmedien aufreinigen. Kanazawa *et al.* (2001) konnten aus einer Fermentationslösung Benzoat und Propionat an Anionenaustauschern (Amberlite-XAD4 und XAD8) voneinander trennen.

Um den Matrixeffekt möglichst niedrig zu halten, wurden nur Fermentationslösungen für die Untersuchungen verwendet, die geringe Salzkonzentrationen ($1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer) enthielten (s. Kapitel 4.1.1). Aus mehreren Anionenaustauschern wurden nach Vorversuchen Amberlite-IRA67 und Amberlite-IRA548 ausgewählt. Bei Amberlite-IRA67 handelt es sich um einen schwachen und bei Amberlite-IRA458 um einen starken Anionenaustauscher (s. Kapitel 4.1.3.5).

Das Verhalten von DHB an der Austauscheroberfläche wurde mit der Adsorptionskinetik und -kapazität beschrieben (s. Kapitel 4.1.3). Die Kinetik hängt von der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen der Oberfläche des Austauschers und dem DHB ab, die Kapazität bestimmt der Zahl der Bindungsplätze. Die absorbierte Menge ist abhängig von der Konzentration und der Temperatur (c , T). Zur Vereinfachung beschreibt man das Gleichgewicht bei konstanter Temperatur. Der Zustand des Gleichgewichts ist mit den Adsorptionsisothermen zu kennzeichnen.

Die Beladung der jeweiligen Anionenaustauscher wurde als Funktion der DHB-Gleichgewichtskonzentration dargestellt (s. Abb. 4.18 und 4.19). In dem Verlauf der Kurve war keine Sättigung zu beobachten, d.h., bei beiden Anionenaustauschern waren die Gleichgewichtskapazitäten von der Konzentration der jeweiligen Ausgangslösung abhängig. In diesem Fall, wenn die adsorbierte Stoffmenge um so größer ist je größer die

Anfangskonzentration des Stoffes in der angrenzenden Phase ist, berechnet man die Adsorptionsisotherme nach Freundlich (Gleichung 4.5, Näser, 1976).

Obwohl die erhaltenen Adsorptionsisothermen in erster Näherung mit einer Freundlich-Isotherme zu beschreiben waren, handelte es sich bei der Bindung von DHB nicht nur um eine rein physikalische Adsorption des Moleküls, sondern auch um eine Ionenaustausch-Adsorption des DHB-Ions, die mit dem Selektivitätskoeffizienten des Materials zu kennzeichnen ist. Ob ein Ionenaustausch oder eine Adsorption für das Festhalten eines Stoffes verantwortlich ist, kann in vielen Fällen nicht eindeutig erkannt werden. Fast immer sind beide Mechanismen (Adsorption und Ionenaustausch) gleichzeitig nebeneinander wirksam.

Während des Austausches verläuft eine Konkurrenz zwischen den verschiedenen Anionen in der Lösung. Wegen der Komplexität der Lösung ist es schwer abzuschätzen, ob die Bindungsplätze der Anionenaustauscher hauptsächlich durch DHB oder durch andere Ionen besetzt sind.

Um die Entscheidung zu treffen, welche Anionenaustauscher für die Aufarbeitung von DHB geeignet sind, ist es erforderlich den Selektivitätskoeffizient ($S_{CH_3COO^-}^{DHB}$) beider Anionenaustauscher zu bestimmen. Dieser beschreibt die Selektivität des Austauschers für DHB gegenüber dem Anion (im vorliegenden Fall Acetat, s. Kapitel 4.1.3.5), mit dem der Anionenaustauscher konditioniert wurde (Kanazawa et. al, 2001).

Aus den experimentellen Ergebnissen wurden die Selektivitätskoeffizienten ($S_{CH_3COO^-}^{DHB}$) für die beiden Anionenaustauschern bestimmt (s. Kapitel 4.1.3.5). Da der Selektivitätskoeffizient bei beiden getesteten Anionenaustauschern unter 1 lag, war die Selektivität des Austauschers gegenüber dem zubindenden Ion weniger selektiv als gegenüber dem Acetation, womit der Austauscher konditioniert wurde. Somit waren beide Anionenaustauschern für DHB nicht selektiv. Amberlite-IRA 458 handelt es sich um einen starken, bei Amberlite-IRA67 um einen schwachen Anionenaustauscher. Dies weist darauf hin, dass die Methode für die Aufreinigung von DHB grundsätzlich nicht geeignet ist (Kanazawa, 2001).

5.3.3 Fällung mit Isopropanol

Wie schon im Kapitel 4.1.3.2 ausgeführt, kann DHB durch eine saure Ethylacetatextraktion und anschließender Fällung des Natriumsalzes mit Isopropanol aus einer konzentrierten wässrigen Lösung in kristalliner Form erhalten werden. Basierend auf dieser Methode, die schon von Reineke (1976) beschrieben worden war, wurde eine neue, einfachere Aufarbeitungsmethode entwickelt.

Die Tatsache, dass durch die neue Fermentationsmethode DHB-Lösungen in einer Konzentration von ca. $300 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ mit geringem Salzgehalt herstellbar waren (s. 4.1.1), führte zu der Idee Na-DHB durch direkte Zugabe von Isopropanol zur Fällung zu bringen. Durch Einengen war eine DHB-Konzentration von 1 bis $1,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zu erreichen. Bei dieser Konzentration war eine Isopropanolmenge im Verhältnis 1:1 zu der wässrigen Lösung für die Fällung ausreichend.

Um den Matrixeffekt zu reduzieren, wurden Fermentationslösungen, die wenig Salze (Medium mit $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Phosphatpuffer) enthielten verwendet (s. Kapitel 4.1.1). Trotz der Abtrennung der Zellen und Minimierung der Menge der verunreinigenden Stoffe sind andere Komponenten der Lösung mit Isopropanol fällbar. Im Vergleich mit den anderen Methoden wurde jedoch mit der Fällungsmethode die beste Ausbeute und Reinheit des DHB erreicht (s. Kapitel 4.1.3.7). Bei niedriger DHB-Konzentration ($100\text{-}200 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) lag die Ausbeute zwar nur bei 64%, die isolierten Kristalle an DHB wiesen jedoch eine hohe Reinheit auf (ca. 97%). Im höheren DHB-Konzentrationsbereich ($800\text{-}1000 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) war es möglich 82-93% des gelösten DHB aufzuarbeiten. Die Reinheit des DHB war dabei geringer (80-92 %). Um diese Aufarbeitungsmethode für technische Zwecke zu nutzen, sollten Fermentationslösungen mit $800\text{-}1000 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHB verwendet werden. Hierdurch wurde gewährleistet, dass die höchste Ausbeute und Produktreinheit zu erreichen war. Ferner wurden nur geringste Mengen an Isopropanol benötigt. Bei einem Fermentationsmedium mit ca. $300 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DHB-Gehalt (s. Kapitel 4.1.1) wurde ca. die 11-fache Menge an Isopropanol verwendet.

Durch die Optimierung des Aufarbeitungsverfahrens von DHB ist es möglich geworden, Fermentationslösungen mit verschiedenen DHB aufzureinigen. Wie im Kapitel 4.2 erwähnt wurde, lag die Konzentration dieser DHB-Lösungen am Ende der Fermentation unter der Konzentration von unsubstituierten DHB, mit denen die Ausfällungsmethode optimiert wurde. Trotzdem war nach Einengen der Lösungen (s. Kapitel 3.10) die Aufarbeitung durch Fällung mit Isopropanol möglich. Aufgrund der niedrigen Konzentrationen (ca. $200\text{-}500 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ nach Aufkonzentrierung) war der Isopropanolverbrauch höher, in manchen Fällen

musste die 10-fache Menge an Isopropanol zugesetzt werden. Als Vorteil des hohen Isopropanolverbrauchs war aber die Tatsache, dass offenbar die Verunreinigungen in der Lösung zurückblieben. Dies wurde durch die hohe Reinheit der Produkte gezeigt (80-98%). Die Konzentrationen der substituierten DHBs könnten durch längere Fermentationszeiten und durch weitere Optimierungen der Fermentation erhöht werden (s. Kapitel 4.2), was bei der Aufarbeitung zu einem reduzierten Isopropanolverbrauch führen würde. Ein entsprechend ausgereiftes Verfahren könnte für die Feinchemikalien-Industrie, wie zur Herstellung enantiomeren reinen DHBs als Synthese, interessant sein.

5.4 Ziele und Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, ein biotechnisches Verfahren für die Herstellung von Phenol aus Toluol zu entwickeln. Das Verfahren sollte aus einem biologischen und aus einem chemischen Schritt bestehen. In dem biologischen Schritt sollte aus Toluol Dihydrodihydroxybenzoat (*cis*-cyclohexa-3,5-diene-1,2-diol-1-carboxylat) produziert werden, welches in einem Folgeschritt durch Ansäuern zu Phenol umgewandelt werden kann.

Für den biologischen Prozess stand am Anfang dieser Arbeit noch kein Bakterienstamm zur Verfügung, der Toluol zu DHB umzusetzen konnte. Deshalb wurde zunächst ein Verfahren entwickelt, bei dem in Fedbatch-Fermentationen mit *Ralstonia eutropha* B9 aus Benzoat als Ausgangssubstrat DHB in hohen Produktkonzentrationen hergestellt werden konnte ($300 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Dieser Benzoat-Verwerter ist im Benzoat-Katabolismus an der Stelle der Benzoat-Dehydrogenase blockiert. Wichtig hierfür war, dass die Phosphatpufferkonzentration des Mediums von $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ auf $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ reduziert wurde. Außerdem war die Verwendung eines Auxiliarsubstrats wichtig, dessen Abbau keine pH-Änderung während des Prozesses verursachte. Bei dieser relativ hohen Produktkonzentration ist es möglich geworden, durch eine einfache Aufarbeitungsmethode (Fällung mit Isopropanol) Na-DHB am Ende der Fedbatch-Fermentation in reiner kristalliner Form zu isolieren.

Dieser zweistufige Prozess konnte auch erfolgreich zur Herstellung substituierter DHBs angewendet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden auf industrieller Nachfrage 4-Fluor-DHB, 3,5-Difluor-DHB, 3-Methyl-DHB, 4-Methyl-DHB, 3,4-Dimethyl-DHB und 4-Chlor-DHB im 1 bis 5 g Maßstab und DHB im 60 g Maßstab produziert. Mit dem Stamm *Ralstonia eutropha* B9 wurden die fluorierten DHB hergestellt. Die methyl-substituierten DHB wurden mit einem von Whited *et al.* (1986) beschriebenen Stamm, *Pseudomonas putida* BGXM1, produziert. Für die Produktion von 4-Chlor-DHB kam der von A. Germer (Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart) konstruierte Stamm *Pseudomonas putida* Idaho BDH2 zum Einsatz. Dieser Stamm zeichnet sich vor allem dadurch aus, dass er Toluol zu DHB umsetzen kann. Die genetische Veränderung bestand in der Blockierung zweier DHB-Dehydrogenasen.

Dieses Konstrukt wurde im Hinblick auf einen technischen Prozess näher untersucht. Nach Angaben von A. Germer konnte DHB mit einer Ausbeute von 25-40 % aus Toluol gewonnen werden, wenn Toluol als alleiniges Substrat bzw. Cosubstrat verwendet wurde. Bei einer weiteren Kultivierung (etwa 4 Tagen) wurde das entstandene DHB unter Bildung von Biomasse wieder abgebaut.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es lediglich gelungen 4 % DHB aus Toluol zu bilden und zwar mit sogenannten "Ruhezellen" von *Pseudomonas putida* Idaho BDH2. Diesen "Ruhezellen" wurde allerdings sowohl Glucose als auch Mineralsalze zugesetzt wurden. Wurde bei diesen Experimenten nur Toluol verwendet, war eine noch geringere Umsatzrate und eine noch niedrigere Ausbeute an DHB festzustellen.

Deutlich höhere Ausbeuten an DHB (70%) wurden mit dem 4-Methylbenzoatverwertenden Stamm *Pseudomonas putida* BGXM1 erhalten. Dieser ist in der 4-Methylbenzoat-Katabolismus an der Stelle der 4-Methylbenzoat-Dehydrogenase blockiert. Für diesen Stamm, der ursprünglich für die Herstellung von Methyl-substituierten DHB eingesetzt wurde, konnte nachgewiesen werden, dass er DHB aus Toluol bildet. Allerdings war trotz identischer Anzucht- und Reaktionsbedingungen die Ausbeute von DHB stark vom Zustand der Zellen abhängig.

Als Fazit der Untersuchungen ist festzustellen, dass die Herstellung von Phenol aus Toluol prinzipiell möglich ist. Die im Rahmen der Arbeit untersuchten Bakterienstämme, die Toluol zu DHB oxidieren, sind für einen technischen Prozess jedoch wenig geeignet. Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Methode zur Herstellung von DHB kann durchaus für einen technische Einsatz z.B. für die Herstellung von Synthonen und Feinchemikalien verwendet werden.

6 Literaturverzeichnis

Arlt, W. 1999. Thermische Grundoperationen der Verfahrenstechnik. TU Berlin Institut für Verfahrenstechnik.

Barnsley, E.A. 1975. The induction of the enzymes of naphthalene metabolism in pseudomonads by salicylate and 2-aminobenzoate. J. Gen. Microbiol. 88, 193.

Blume, R., B. Schwarz. 2000. Ionenaustauscher. Universität Bielefeld, Fakultät für Chemie.

Blahous, J. 2001. Übungen zur physikalischen Chemie. Springer-Verlag Wien New York.

Bookser, B.C., S. Zhu. 2001. Solid phase extraction purification of carboxylic acid products from 96-well format solution phase synthesis with DOWEX 1x8-400 formate anion exchange resin. J. Comb. Chem. 3, 205-215.

Brändström, A., P. Berntsson, S. Carlsson, A. Djurhuss, K. Gustavii, U. Junggre, B. Lamm, B. Samuelsson. 1969. Ion pair extraktion in preparative organic chemistry. II. Preparation of tetrabutylammonium salts. Acta Chem. Scand. **23**, 2206.

Bühler, B., A. Schmid, B. Hauer, B. Witholt. 2000. Xylene monooxygenase catalyzes the multistep oxygenation of toluene and pseudocumene to corresponding alcohols, aldehyds, and acids in *Escherichia coli* JM101. J. Biol. Chem. Vol. 275, No. 14, p:10085-10092.

CD Römpp Chemie Lexikon. 1995 Version 1.0, Stuttgart/New York: Georg Thieme Verlag.

Cruden, D., L. J. H. Wolfram, R. D. Rogers, D. T. Gibson. 1992, Physiological properties of a *Pseudomonas* strain which grows with p-xylene in a two-phase (organic aqueous) medium. Appl. Environ. Microbiol. **58**:2723-2729.

Deckwer, W.D., R. Luttmann, H-G. Reng, S. Yonsel. 1987. Bioreaktoren: Ein Leitfaden für Anwender. Gesellschaft für Biotechnische Forschung mbH.

DeFrank, J.J., D.W. Ribbons. 1977. p-Cymene pathway in *Pseudomonas putida*: ring cleavage of 2,3-dihydroxy-p-cumate and subsequent reactions. J. Bacteriol. 129(3), :1356-64, 1365-74.

Dorn, E., M. Hellwig, W. Reineke, H-J. Knackmuss. 1974. Isolation and characterisation of a 3-chlorobenzoate degrading pseudomonad. Arch. Microbiol. 99:61-70.

Ensley, B.D., D.T., Gibson. 1983. Naphthalene dioxygenase: purification and properties of a terminal oxygenase component. J Bacteriol, 155(2):505-11.

Fernandez-Barrero, A. 1997. Mechanisms for solvent tolerance in bacteria J. Biol. Chem. 272:3887-3890.

- Fukumori, F., H. Hirayama, H. Takahami, A. Inou, K. Horikoshi.** 1998. Isolation and transposon mutagenesis of a *Pseudomonas putida* KT2442 toluene-resistant variant: involvement of an efflux system in solvent resistance. *Extremophiles* 2:395-400.
- Garcia, A. A., D.H. Kim.** 1994 Recovery of a cyclic diol produced via biocatalysis. *Isolation & Purification* Vol.2, p: 19-25.
- Gibson, D.T., M. Hensley, H. Yoshioka, T.J. Mabry.** 1970. Formation of (+)-*cis*-2,3-dihydroxy-1-methylcyclohexa-4,6-diene from toluene by *Pseudomonas putida* F1. *Biochemistry*, 9, 1626-1630.
- Gottschalk, G., H-J. Knackmuss.** 1993. Bakterien und der Abbau von Chemikalien: Natürliches und durch Kombination oder Kongsruktion Erreichbares. *Angew. Chem.* 105:1437-1448.
- Heipieper, H.J., R. Diefenbach, H. Keweloh.** 1992. Conversion of *cis* unsaturated fatty acids to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrat toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1213-1217.
- Heipieper, H.J., J.A.M. DeBont.** 1994. Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to ethanol and toluene at the level of fatty acid composition of membranes *Appl. and Environ. Microbiology* p. 4440-4444.
- Heipieper, H.J., B. Loffeld, H. Keweloh, J.A.M. De Bont.** 1995. The *cis/trans* isomerisation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* S12: an indivator for environmental stress due to organic compounds. *Chemosphere* Vol. 30, No. 6, 1041-1051.
- Heipieper, H.J., H. Keweloh, H.J. Rehm.** 1991. Influence of phenols on growth and membrane permeability of free and immobilized *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(4): 1213-7.
- Helferich, F.** 1959. Ionenaustauscher. Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr.
- Höfler, T., G. Wenz.** 1996. Determination of binding energies between cyclodextrins and aromatic guest molecules by microcalorimetry. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.*, 25, Nr. 1-3, 81-84
- Hudlicky, T., D. Gonzalez, D.T. Gibson.** 1999. Enzymatic dihydroxylation of aromatics in enantioselective synthesis: expanding asymmetric methodology. *Aldrichimica Acta* Vol.32, No.2.
- Inoue, A., K. Horikoshi.** 1989. A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene *Nature* 338:264-266.
- Isken, S., J.A.M. De Bont.** 1996. Active efflux of toluene in a solvent-resistant bacterium *J. Bacteriol.* 90: 6056-6058.

- Isken, S., A. Derks, P.F.G. Wolffs, J.A.M. De Bont.** 1999. Effect of organic solvents on the yield of solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12. Appl. and Environ. Microbiol. p. 2631-2635.
- Jenkins, R.O. G.M. Stephens, H. Dalton.** 1987. Production of toluene *cis*-glycol by *Pseudomonas putida* in glucose fed-batch culture. Biotech. and Bioeng. Vol. 29, p. 873-883.
- Jenkins, G.N., D.W. Ribbons, D.A. Widdowson, A.M.Z. Slawin, D.J. Williams.** 1995. Synthetic application of biotransformations: absolute stereochemistry and Diels-Alder reactions of the (*1S,2R*)-1,2-dihydroxycyclohexa-3,5-diene-1-carboxylic-acid from *Pseudomonas putida* J. Chem. Soc. Perkin Trans.
- Johnson, B.F., R.Y. Stanier.** 1971. Dissimilation of aromatic compounds by *Alcaligenes eutrophus*. Journal of Bacteriology, 468-475.
- Kanazawa, N., Urano, K., Kokado, N., Urushigawa, Y.** 2001. Adsorption Equilibrium Equation of Carboxylic Acids on Anion-Exchange Resins in Water. Journal of Colloid and Interface Science **238**, 196-202.
- Karau, A.** 1998. Verfahrenstechnische Grundlagen und Anwendungen der Fließbettadsorption in der Proteinaufarbeitung. Fakultät für Maschinenwesen der Rheinisch-Westfälischen Technische Hochschule, Aachen.
- Kieboom, J., J.J. Dennis, J.A.M De Bont, G.J. Zylstra.** 1998. Identification and molecular characterization of an efflux pump involved in *Pseudomonas putida* S12 solvent tolerance J. Biol. Chem. 273:85-91.
- Kobayashi, H., K. Uematsu, H. Hirayama, K. Horikoshi.** 2000. Novel toluene elimination system in a toluene-tolerant microorganism. J. of Bacteriology, Vol. 182, No. 22, p. 6451-6455.
- Kim, G.J., I-Y. Lee Choi, D.K. Yoon, S.C. Park.** 1996. High cell density cultivation of *Pseudomonas putida* BM01 using glucose. J. Microbiol. And Biotech. Vol. 6. No. 3, 221-224.
- Lenke, K., K. Jähnisch, B. Lücke.** 2001. Hydroxilierung von Benzol an heterogenen Katalysatoren in der Flüssigphase. 4th World Congress on Oxydation Catalysis, Berlin/Potsdam.
- Lenke, H., M. Schlömann, H-J. Knackmuss.** 2001. Selektive Hydroxylierung von Kohlenwasserstoffen mit Hilfe biologischer Verfahren am Beispiel der Herstellung von Phenol aus Benzol. Abschlussbericht, Fraunhofer Inst. Für Grenzfl. u. Bioverfahrenstech. und Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart

- Mahaffey, W.R., D.T. Gibson, C.E. Cerniglia.** 1988. Related Articles Bacterial oxidation of chemical carcinogens: formation of polycyclic aromatic acids from benz[*a*]anthracene. *Appl Environ Microbiol.* 1988 Oct;54(10):2415-23.
- Marinsky, J.A.** 1966. Ion exchange Marcel Dekker, Inc., New York.
- Näser, K-H.** 1976. Physikalische Chemie für Techniker und Ingenieure. VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig.
- Olsen, R.H., J.J. Kukor, B. Kaphammer.** 1994. A novel toluene-3-monooxygenase pathway cloned from *Pseudomonas pickettii* PKO1 *Journal of Bacteriology.* 176(12) 3749-56.
- Pinkart, H.C., D.C. White.** 1997. Phospholipid biosynthesis and solvent tolerance in *Pseudomonas putida* strains. *J. of Bacteriology* 179: 4219-4226.
- Pinkart, H.C., J.W. Wolfram, R. Rogers, D.C. White.** 1996. Cell envelope changes in solvent-tolerant and solvent-sensitive *Pseudomonas putida* strains following exposure to *o*-xylene *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1129-1132.
- Präve, P.** 1994. Handbuch der Biotechnologie, Anreicherung und Konzentrierung. Oldenbourg Verlag, München.
- Ramos, J.L., E. Duque, M.J. Huertas, A. Haidour.** 1995. Isolation and expansion of the catabolic potential of a *Pseudomonas putida* strain able to grow in the presence of high concentration of aromatic hydrocarbons. *J. Bacteriol.* 177:3911-3916.
- Ramos, J.L., E. Duque, J.J. Rodriguez-Herva, P. Godoy, A. Fernandez Barrero.** 1997. Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. *J. Biol. Chem.* 272: 3887-3890.
- Reineke, W.** 1976. Ursachen des verlangsamten biologischen Abbaus halogener aromatischer Kohlenwasserstoffe: Modelluntersuchungen an substituierten Benzoaten und 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren. Dissertation an dem Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen.
- Reineke, W., H-J. Knackmuss.** 1978. Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Substituent effects on dehydrogenation of 3,5-cyclohexadiene-1,2-diol-1-carboxylic acid. *Biochim et Biophys Acta;* 542(3):424-9.
- Reiner, A. M.; G. D. Hegeman.** 1971. Metabolism of benzoic acid by bacteria. Accumulation of (-)-3,5-Cyclohexadiene-1,2-diol-1-carboxylic acid by a mutant strain of *Alcaligenes eutrophus*. *Biochemistry*, Vol. 10, No. 13, 2530-2536.
- Rippen,** 1996. Handbuch Umweltchemikalien, Stoffdaten, Prüfverfahren, Vorschriften, ecomed Verlag

- Rojas, A., E. Duque, G. Mosqueda, G. Golden, A. Hurtado, J.L. Ramos, A. Segura.** 2001. Three efflux pumps are required to provide efficient tolerance to toluene in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Journal of Bacteriology*, 183(13), 3967-73.
- Rossiter, J.T., S.R. Williams, A.E.G. Cass, D.W. Ribbons.** 1987. Aromatic biotransformations 2: production of novel chiral fluorinated 3,5-cyclohexadiene-*cis*-1,2-diol-1-carboxylates. *FEBS Lett.* 220(2):353-7.
- Shields, M.S., S.O. Montgomery, P.J. Chapman, S.M. Cuskey, P.H. Pritchard.** 1989. Novel pathway of toluene catabolism in the trichlorethylene-degrading bacterium G4. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1624-1629.
- Schlegel, H.G.** 1985. *Allgemeine Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Schügerl, K., M.R. Kula, U. Onken.** Aufarbeitung biologischer Medien, Physikalisch-chemische Grundlagen. Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig.
- Smith, M.R.** 1990. The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. *Biodegradation* 1:191-206.
- Storhas, W.** 1994 *Bioreaktoren und periphere Einrichtungen*. Lehrbuch, Vieweg Verlag Braunschweig
- Streitwieser, A. Jr., C.H. Heathcock.** 1980. *Organische Chemie*. Verlag Chemie, Weinheim.
- Syldatk, C.** 2000. Aktuelle Trends in Forschung und Entwicklung in der Biokatalyse in der chemischen Industrie, Tagungsband von "Biotechnologie: Umwelttechnik der Zukunft", Ministerium für Umwelt und Verkehr Baden-Württemberg.
- Taylor, S.J.C., D.W. Ribbons, A.M.Z. Slawin, D.A. Widdowson, D.J. Williams.** 1987. Biochemically generated chiral intermediates for organic synthesis: The absolute stereochemistry of 4-bromo-*cis*-2,3-dihydroxycyclohexa-4,6-diene-1-carboxylic acid formed from 4-bromobenzoic acid by a mutant of *Pseudomonas putida*. *Tetrahedron Letters*, Vol. 28, No.50, pp 6391-6392.
- Weber, F.J., S. Isken, J.A.M. De Bont.** 1994. *Cis/Trans* isomerization of fatty acids as a defense mechanism of *Pseudomonas putida* strains to toxic concentrations of toluene *Microbiology* 140: 2013-2017.
- Weissermel, Arpe.** 1994 *Industrielle organische Chemie*, VCH-Verlag.
- Whited, GM., W.R. McCombie, L.D. Kwart, D.T. Gibson.** 1986. Identification of *cis*-Diols as Intermediates in the oxidation of aromatic acids by a strain of *Pseudomonas putida* that contains a TOL plasmid. *Journal of Bacteriology*, p. 1028-1039.

Whited, G.M., D.T. Gibson. 1991. Toluene-4-monooxygenase a three-component enzyme system that catalyses the oxidation of toluene to *p*-cresol in *Pseudomonas mendocina* KR1. J. Bacteriol., 173, 3010-3016.

Whited, G., L. Kwart, W. Anthony, C. Downie, 1994. Recovery of a cyclic diol produced via biocatalysis. Isolation and Purification, Vol.2, 19-25.

Worsey, M.J., P.A. Williams. 1975. Metabolism of toluene and xylenes by *Pseudomonas putida* (*arvilla*) mt-2: evidence for a new function of the TOL plasmid. J. Bacteriol., 124, 7-13.

Zhang, J. R. Greasham. 1999. Chemically defined media for commercial fermentations. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51:407-421.

Yarmoff, J.J., Y. Kawakami, T. Yago, H. Maruo, H. Nishimura. 1988. *cis*-benzeneglycol production using a mutante *Pseudomonas* strain. J. Ferment. Technol., 66, 305-312.

Internet Adressen:

<http://www.rohmhaas.com/ionexchange> (Homepage der Fa. Rohm&Haas)

http://umbbd.ahc.umn.edu/tol/tol_map.html (The University of Minnesota Biocatalysis / Biodegradation Database)

7 Anhang



Bild 7.1 DHB Kristallin, durch Extraktion mit Ethylacetat aus Fermentationsmedium aufgereinigt



Bild 7.2 DHB Kristallin, durch Fällung mit Isopropanol aus verdünnter (ca. $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, Schale 1) und aus konzentrierter (ca. $1,4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, Schale 2) DHB-Lösung aufgereinigt

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Erstens gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. H.-J. Knackmuss für die Vergabe dieser Arbeit und die Diskussionsbereitschaft.

Frau PD Dr. Hiltrud Lenke gilt mein besonderer Dank für die zahlreiche Diskussionen und Anregungen, für die ständige Hilfsbereitschaft und für die Übernahme des Korreferates. Für das anstrengende erste Korrekturlesen der Dissertation und der englischen Fassung möchte ich mich auch bei ihr herzlich bedanken.

Prof. Dr. H. Brunner danke ich für die Möglichkeit, die Untersuchungen bei dem Fraunhofer-IGB durchführen zu können.

Bei den praktischen Arbeiten hat mich Frau Ute Sieglen mit Rat und Tat unterstützt, wofür ich mich hier bedanken möchte. Sie und Frau Dipl.-Biol. Susanne Benezan möchte ich die Durchführung der Screeningsversuche danken. Besondere Erwähnung gebühren meinen PraktikantInnen: Herr Alexander Brückner, Herr Ingo Grodde und Frau Martina Dautel. Sie waren eine große Hilfe in der praktischen Umsetzung meiner Ideen.

Bei den GC-Messungen geleistete Hilfsbereitschaft möchte ich mich bei Frau Dipl.-Ing. (FH) Ulrike Götz bedanken.

Herrn Gerhard Gottschling und Mark Hessel sei für die Bereitschaft die Aufbau und Service der Reaktoren gedankt. Für die Tips und Tricks im Bereich der EDV und für die Ratschläge, immer die passende deutsche Ausdrücke finden zu können möchte ich mich bei Frau Dipl.-Ing. (FH) Silke Dieckmann bedanken.

Ich möchte mein Dank Frau Dr. Petra Koziollek und Frau Dr. Christiane Buta ausdrücken, dass sie meine Arbeit sprachlich auf eine gut lesbare Stufe gebracht haben. Für die Korrektur meiner englische Fassung bedanke ich mich bei Dr. Duni Chand.

Hiermit möchte ich mich auch für die gute Arbeitsklima und für die Vorschritte, die ich in der deutschen Sprache gemacht habe bei allen Mitarbeitern der ehemaligen Arbeitsgruppe Chemische Mikrobiologie ganz herzlich bedanken.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie und besonders bei meinem Mann Bernard für die seelische Unterstützung bedanken.

Lebenslauf

Edina Payer (geb. Barsi)

Geboren am 12.06.1973 in Budapest (Ungarn)

Schulbildung

1979 - 1987 Dózsa György Schule, Tatabánya, Ungarn

1987 - 1991 Bárdos László Gymnasium, Tatabánya, Ungarn

Juni 1991 Abitur

Studium

1992 - 1997 Studium der Chemieingenieur Fakultät an der TU Budapest (Ungarn)

Juli 1995 Vordiplom als Chemieingenieur (B. Sc.)

Juli 1997 Diplom als Bioingenieur (M. Sc.), Diplomarbeit beim Ungarischen Pflanzenschutzinstitut, Thema: Entwicklung einer immunoanalytischen Methode zur Bestimmung des Pestizids Myclobutanil

1997 – 1998 Praktikum beim GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München. Arbeitsgebiete: Herstellung und Test von Monoklonaren Antikörper für die Immunanalytik, Validierung von PAK-Analytik-Testkits

Dissertation

Dez. 1998 Beginn der experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertation am Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, Fraunhofer Gesellschaft, Stuttgart, unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.-J. Knackmuss