

Autor: Lukas Müller



Ich absolvierte meine Lehre zum Laborant EFZ Chemie mit Schwerpunkt Analytik in der Nitrochemie Wimmis AG. Dabei wurde mir klar, dass ich mein Wissen in Chemie vertiefen möchte. Nach meinem Abschluss an der Berufsmittelschule, dem Absolvieren der Rekrutenschule und dem Sammeln von Berufserfahrung begann ich mein Bachelorstudium in Chemie mit Schwerpunkt Chemie an der ZHAW in Wädenswil. Meine Bachelorarbeit über die Synthese von 2-Fluoroxiran in enantiomerenreiner Form schrieb ich in der Fachgruppe Physikalische Chemie bei Prof. Dr. Jürgen Stohner. Im Jahr 2021 habe ich den SVC-Preis für den besten Bachelorgesamtabschluss an der ZHAW in Chemie erhalten. Auch deswegen war es für mich naheliegend, den Master of Science in Life Sciences mit Vertiefung Chemistry for the Life Sciences, ebenfalls an der ZHAW in Wädenswil, anzuhängen.

Meine Masterarbeit mit dem Titel «Etablierung eines kontinuierlichen Verfahrens zur biokatalytischen Herstellung von 2,6-Dimethyl-5-heptenol» habe ich bei Prof. Dr. Achim Ecker im Labor für Industrielle Chemie

des Instituts für Chemie und Biotechnologie geschrieben. Meine Zweitkorrektorin war Dr. Christin Peters aus der Fachgruppe Biosystemtechnologie an der ZHAW. Ich freue mich ausserordentlich über die Verleihung des Preises für den besten Abschluss im Master in der Vertiefung Chemistry for the Life Sciences. In diesem kurzen Beitrag möchte ich meine Masterarbeit vorstellen.

Etablierung eines kontinuierlichen Verfahrens zur biokatalytischen Herstellung von 2,6-Dimethyl-5-heptenol

Die Suche nach nachhaltigen Herstellungsverfahren in der chemischen Industrie hat aufgrund der steigenden Umweltbedenken und der Ressourcenausbeutung in den letzten Jahren viel Aufmerksamkeit erhalten. Um die negativen Auswirkungen bei der Produktion chemischer Produkte zu verringern, sollten die 12 Prinzipien der Grünen Chemie und das Konzept der Prozessintensivierung berücksichtigt werden^[1-2]. Insbesondere hat sich die Biokatalyse als essentielles Mittel zur Entwicklung nachhaltigerer und prozessintensivierter Verfahren bewährt^[2]. Dabei werden natürliche oder modifizierte Enzyme oder Zellen eingesetzt, um chemische Reaktionen zu katalysieren^[3].

Ein neueres Forschungsgebiet ist die Verwendung von Ganzzellen mit Enzymkaskaden, die komplexe chemische Reaktionen katalysieren können^[4-5]. Dabei werden Enzyme häufig mit sog. *Enzyme Engineering* modifiziert, um ihre Leistungsfähigkeit zu verbessern^[4]. Ganzzellen können sowohl frei als auch immobilisiert eingesetzt werden, wobei die Immobilisierung Vorteile wie höhere Stabilität, einfacheres Abtrennen der Biokatalysatoren und reduzierten Aufwand bei der Produktgewinnung bietet^[6]. Die Verwendung von Ganzzellen in Kombination mit kontinuierlichen Herstellungsprozessen bieten zusätzliche

Vorteile, welche in dieser Arbeit untersucht wurden.

In dieser Arbeit wurde ein kontinuierliches Verfahren zur biokatalytischen Herstellung von 2,6-Dimethyl-5-heptenol, auch Melonol genannt, mittels einer in *Escherichia coli* enthaltenen Enzymkaskade untersucht. Das kontinuierliche Verfahren wurde zunächst in einem Kreislaufsystem implementiert. Die Enzymkaskade bestand aus einer Ene-Reduktase (ERED) und einer Bayer-Villiger-Monooxygenase (BVMO) zur schrittweisen Biosynthese von Melonol aus Citral sowie einer Glucose-Dehydrogenase (GDH) zum Regenerieren des benötigten Cofaktors Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH).

Die Biokatalysatoren wurden mittels Alginat, einem natürlich vorkommenden Polysaccharid, in sog. Beads immobilisiert. In Abbildung 1 sind die verschiedenen Diffusionsschritte schematisch dargestellt, die ein essentieller Teil der Biosynthese sind. Für die kontinuierliche Herstellung von Melonol wurde ein gepackter Bettreaktor (PBR) eingesetzt. Der PBR wurde mit den selbst hergestellten Alginat-Beads gleichmässig befüllt. Ausserdem kamen eine automatisierte Probenahme und die Regelung des pH-Werts der Reaktionslösung als Prozessanalysetechnologien (PAT) zum Einsatz. Zum Vergleich wurden ausserdem Experimente in zwei verschiedenen Batch-Verfahren mit in Alginat immobilisierten sowie freien Biokatalysatoren durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Produktbildung durch die Enzymkaskade stark von der Anwesenheit von Sauerstoff abhängig war. Daher wurde ein zweiphasischer Fluss aus Luft und Pufferlösung im kontinuierlichen Verfahren implementiert, wodurch die Melonolkonzentration nach dem PBR signifikant um den Faktor 19 (im Vergleich zu keinem Lufteintrag im kontinuierlichen Verfahren) gesteigert

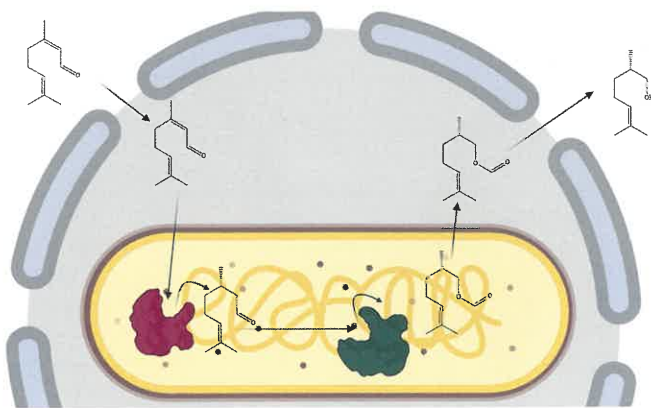


Abbildung 1: Schematische Veranschaulichung der nötigen Diffusionschritte in Alginate und *E. coli* für die involvierten Moleküle der Enzymkaskade. Citral (oben links) gelangt durch die Alginate-Schicht (grau) zum Bakterium (gelb). Darin befinden sich die Enzyme ERED und BVMO, wodurch (mit weiteren Schritten), Melonol hergestellt wird. Dieses gelangt wiederum aus dem Bakterium und der Alginate-Schicht hinaus. Darstellung nicht massstabsgetreu.

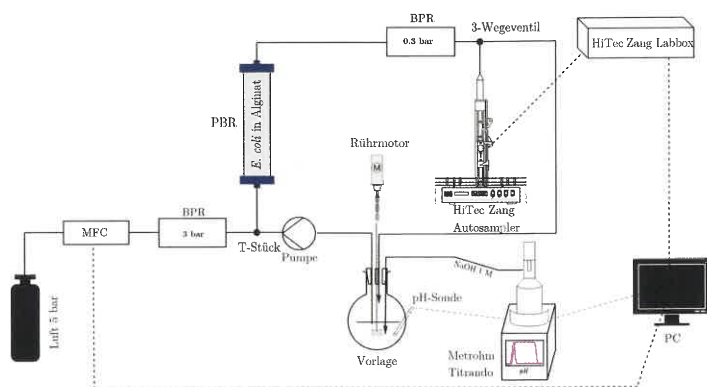


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus für die kontinuierliche Prozessführung



Abbildung 3: Fotografie des Aufbaus für die kontinuierliche Prozessführung im Labor

werden konnte. Es war danach ein stetiger Anstieg der Melonolkonzentration sowie auch der Konzentrationen der Neben- und Zwischenprodukte in der Vorlage des kontinuierlichen Kreislaufverfahrens zu erkennen. Die Endkonzentration konnte möglicherweise aufgrund eines potentiell eingestellten Gleichgewichts oder aufgrund der zurückgegangenen Aktivität der BVMO nach einigen Stunden nicht weiter gesteigert werden.

Ein Fokus der Arbeit war die Implementierung verschiedener Automationsysteme. Es wurde sowohl ein Autosammler zur automatisierten Probenahme über lange Reaktionszeiten und die Regelung des pH-Werts mit einer pH-Sonde und einer Dosiereinheit erfolgreich im kontinuierlichen Kreislauf- sowie im Batch-Verfahren integriert. Beide Methoden ermöglichen es, Biokatalysen über längere Zeiträume reproduzierbar zu untersu-

chen. Die Reproduzierbarkeit des dosierten Volumens des Autosamplers konnte durch entsprechende apparative Anpassungen erhöht werden. Diese apparativen Anpassungen beinhalteten den Einbau von Dreiwegeventilen, einer optimierten Schlauchführung sowie den Austausch der Autosammler-Nadel. In Abbildungen 2 und 3 ist der Aufbau des kontinuierlichen Systems schematisch und als Fotografie ersichtlich.

Literaturverzeichnis

- [1] R. A. Sheldon, J. M. Woodley, «Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry», *Chemical Reviews* **2018**, 118, 801–838, DOI 10.1021/acs.chemrev.7b00203.
- [2] R. A. Sheldon, D. Brady, «Broadening the Scope of Biocatalysis in Sustainable Organic Synthesis», *ChemSusChem* **2019**, 12, 2859–2881, DOI 10.1002/cssc.201900351.
- [3] E. L. Bell, W. Finnigan, S. P. France,

A. P. Green, M. A. Hayes, L. J. Hepworth, S. L. Lovelock, H. Niikura, S. Osuna, E. Romero, K. S. Ryan, N. J. Turner, S. L. Flitsch, «Biocatalysis», *Nature Reviews Methods Primers* **2021**, 1, 46, DOI 10.1038/s43586-021-00044-z.

- [4] R. A. Rocha, R. E. Speight, C. Scott, «Engineering Enzyme Properties for Improved Biocatalytic Processes in Batch and Continuous Flow», *Organic Process Research & Development* **2022**, 26, 1914–1924, DOI 10.1021/acs.oprd.1c00424.
- [5] C. Peters, R. Buller, «Linear enzyme cascade for the production of (–)-iso-isopulegol», *Zeitschrift für Naturforschung C* **2019**, 74, 63–70, DOI 10.1515/znc-2018-0146.
- [6] A. Basso, S. Serban, «Industrial applications of immobilized enzymes—A review», *Molecular Catalysis* **2019**, 479, 110607, DOI 10.1016/j.mcat.2019.110607.