

Anwendung poröser Adsorbentien in der Biokatalyse

Vom Promotionsausschuss der Technischen Universität Hamburg-Harburg zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Dissertation

von
Paul Bubenheim

aus
Hamburg

2012

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2008 bis Oktober 2011 am Institut für Technische Biokatalyse der Technischen Universität Hamburg-Harburg angefertigt.

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr.-Ing. S. Heinrich
1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. A. Liese
2. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. I. Smirnova
Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2012

Veröffentlichungen

Rene Heils^a, Paul Bubenheim^b, Andreas Liese^b, Irina Smirnova^a,

^aHamburg University of Technology, Thermal Separation Processes, Eißendorfer Str. 38, D-21073 Hamburg, Germany, ^bHamburg University of Technology, Technical Biocatalysis, Denickestr. 15, D-21073 Hamburg, Germany

Integration of enzymatic catalysts in a reactive distillation column with structured packings, Journal: Biotech & Bioengineering 2012

Patente

Verfahren zur Auftrennung von Alkohol-Keton-Gemischen,
K. Suck, U. Sohling, F. Ruf, A. Liese, K. Goldberg, P. Bubenheim
DE102009032080A1 13.01.2011

Ein in der Reaktivrektifikation einsetzbarer, einen Biokatalysator aufweisende Kolonneneinbau und dessen Verwendung in der Reaktivrektifikation
I. Smirnova, A. Liese, G. Fieg, L. Hilterhaus, P. Bubenheim, A. Sont
DE102010028788A1 2010

Danksagung

Mein Dank gebührt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Andreas Liese für das interessante Thema und die Möglichkeit diese Arbeit in seinem Arbeitskreis anfertigen zu können. Frau Prof. Dr. Irina Smirnova danke ich für die Einwilligung das Zweitgutachten zu übernehmen.

Des Weiteren gilt mein Dank Dr. Ulrich Sohling und Dr. Kirstin Suck von der Süd-Chemie AG für die gute Zusammenarbeit ihre Ratschläge und die Bereitstellung sämtlicher in dieser Arbeit verwendeten Adsorbentien. Herrn Dr. Lars Dähne, Frau Dr. Claudia Aldenhoven und Frau Dr. Gabriele Egri von der Surflay Nanotech GmbH danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung der LbL-modifizierten Träger. Herrn Dr. Christian Leggewie von der Evocatal GmbH danke ich für die Bereitstellung von Alkoholdehydrogenasen. Meiner Kooperationspartnerin Dipl.-Ing. Heike Temme aus dem AK Prof. Dr. Bernd Niemeyer der Helmut-Schmidt Universität der Bundeswehr danke ich für die angenehme und gute Zusammenarbeit. Mein Dank gilt auch dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die Förderung meiner Arbeiten im Rahmen des Biokatalyse 2021 Projektclusters.

Prof. Dr. Seidel-Morgenstern und Frau Dr. M. Johannsen gebührt mein Dank für die wertvollen Tipps zur Chromatographie und den Durchbruchkurven und Dr. Boris Galunsky für die anregende Diskussion der Adsorptionsisothermen.

Für die Durchführung der Kernspinresonanzspektroskopie-Messungen, Beratung und Hilfestellung bei der Auswertung danke ich Herrn Dr. Erhardt Haupt vom Institut für Anorganische und Angewandte Chemie der Universität Hamburg.

Den Mitarbeitern der Abteilung Elektronenmikroskopie der Technischen Universität Hamburg-Harburg danke ich für die zuverlässige Untersuchung meiner Proben.

Meinen Kolleginnen und Kollegen des AK Liese, insbesondere Benjamin Bürgel, danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die anregenden Gespräche und die tollen Freizeitunternehmungen.

Meinen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern und den Studentinnen und Studenten die bei mir im Rahmen ihrer Ausbildung/Studiums gearbeitet haben und ihre Abschlussarbeiten angefertigt haben danke ich für die begeisterte Aufnahme der Themen und das entgegengebrachte Vertrauen, auch wenn wir manchmal nicht genau wussten wohin die Reise geht.

Ein großer Dank gebührt meinen Eltern und Christina Pinck für die zuverlässige Unterstützung und den steten Rückhalt sowie das Ertragen von Forscherdrang und Forscherfrust.

Der Sinn des Reisens besteht darin, die Vorstellungen mit der Wirklichkeit auszugleichen, und anstatt zu denken, wie die Dinge sein könnten, sie so zu sehen, wie sie sind.

Samuel Johnson

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	10
1.1.	Immobilisierung von Biokatalysatoren	12
1.2.	Isolation der Reaktionsprodukte	15
1.3.	Produktion chiraler Alkohole	19
1.4.	Wahl des Produktionssystems	21
2.	Zielsetzung.....	23
3.	Enzymimmobilisierung auf modifizierten Trägern	25
3.1.	Kovalente Immobilisierung	26
3.1.1.	Immobilisierung auf modifizierten Glaspartikeln	26
3.1.2.	Kovalente LbL-Immobilisierung auf Glaträgern	28
3.1.3.	Charakterisierung der PEI-Beschichtung.....	32
3.1.4.	Stabilität in organischen Lösungsmitteln	33
3.1.5.	Effektivitätsfaktor	34
3.1.6.	Immobilisierungsdauer	35
3.1.7.	Beladungsmenge für ADH	36
3.1.8.	Charakterisierung des Immobilisates.....	38
3.1.9.	Einfluss des pH-Wertes	38
3.1.10.	Einfluss der Temperatur.....	39
3.2.	Immobilisierung auf Fällungskieselsäuren.....	40
3.3.	Stabilität des Immobilisates	44
3.3.1.	Repetitive-Batch Versuche.....	44
3.3.2.	Einsatz im Festbettreaktor	45
3.3.3.	Lagerfähigkeit des Immobilisates	47
3.3.3.1.	Lagerung des Enzyms bei - 20 °C.....	47
3.3.3.2.	Lagerung des Immobilisates bei 4 °C	48
3.3.3.3.	Lagerung in lyophilisiertem Zustand.....	49
3.4.	Fazit	52
4.	Selektive Adsorption von Wertstoffen	53
4.1.	Systemuntersuchung mit porösen Adsorbentien	54
4.1.1.	Screening zur Adsorption	54
4.1.2.	Adsorbentien aus Alumosilikat	56

4.1.3.	Adsorbentien aus γ -Aluminiumoxid.....	58
4.1.4.	Screening mit Kieselgel und Aluminiumoxid	61
4.1.5.	Adsorberharze.....	63
4.1.6.	Adsorption aromatischer Verbindungen	64
4.2.	Dünnschichtchromatographie	65
4.3.	Kinetik der Adsorption	67
4.4.	Adsorptionsisothermen	70
4.4.1.	Adsorptionsisothermen Alumosilikat	71
4.4.2.	Adsorptionsisothermen γ -Aluminiumoxid	74
4.4.3.	Adsorptionsisothermen Kieselgel	77
4.4.4.	Adsorptionsisothermen granulierter Adsorber	79
4.4.5.	Untersuchung weiterer Verbindungen und Adsorber	81
4.4.6.	Fazit zu den Adsorptionsisothermen	88
4.5.	Untersuchungen zur <i>in-situ</i> Adsorption.....	90
4.5.1.	Adsorption des Cofaktors.....	90
4.5.2.	Vorbehandlung der Adsorber	92
4.5.3.	Einfluss der Cofaktorregenerierung.....	93
4.5.4.	<i>In-situ</i> Einsatz der Adsorber	95
4.6.	Charakterisierung der Adsorber im Festbett	98
4.6.1.	Berechnung der Durchbruchzeit T_R	105
4.7.	Fazit	106
5.	Prozessentwicklung zur Feinchemikalienproduktion	107
5.1.	Automatisierte Produktion mit Adsorption	107
5.1.1.	Aufbau der Anlage	108
5.2.	Kontinuierliche Produktion im Festbettreaktor.....	109
5.3.	Charakterisierung des Festbettreaktors	110
5.3.1.	Verweilzeitverteilung	110
5.3.2.	Substratkonzentration und Verweilzeit	111
5.3.3.	Lösungsmittelverwendung und Cofaktoreintrag.....	113
5.3.4.	Trocknung des Produktstroms	116
5.3.5.	Stabilität des Immobilisates	116
5.4.	Kontinuierliche Produktadsorption	118
5.4.1.	Inbetriebnahme der Anlage	119

5.4.2.	Automatisierung der Anlage	123
5.5.	Kosten und Wirtschaftlichkeit.....	125
5.6.	Übertragbarkeit.....	126
5.7.	Fazit	127
6.	Diskussion.....	128
7.	Zusammenfassung	134
8.	Ausblick	136
9.	Material und Methoden.....	138
9.1.	Biokatalysatoren, Chemikalien und Partikel.....	138
9.2.	Geräte	139
9.3.	Synthese von 5-Hydroxyhexan-2-on.....	140
9.4.	Zellaufschluss und Isolierung der ADH-´A`	140
9.4.1.	Zellaufschluss und Hitzefällung.....	140
9.4.2.	Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford	140
9.4.3.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	141
9.4.4.	Standardaktivitätsassay	141
9.4.5.	Batch-Assay	141
9.4.6.	Reaktionstechnische Charakterisierung	142
9.5.	Immobilisierung von Alkohol-Dehydrogenasen	142
9.5.1.	Adsorptive Immobilisierung.....	142
9.5.2.	Kovalente Immobilisierung	143
9.5.3.	Charakterisierung immobilisierter ADH.....	143
9.5.3.1.	Immobilisierungsausbeute.....	143
9.5.3.2.	Theoretische Aktivität der Immobilisate	143
9.5.3.3.	Aktivitätsausbeute	143
9.5.3.4.	Charakterisierung des Festbettreaktors	144
9.5.3.5.	Verweilzeitverteilung des Festbettreaktors.....	144
9.6.	Adsorptive Produktabtrennung	145
9.6.1.	Adsorption in wässrigem Medium.....	145
9.6.2.	Adsorption in organisch-wässrigem Medium.....	145
9.6.3.	Adsorption in organischem Medium	145
9.7.	Adsorptionsisothermen	146
9.8.	Dünnschichtchromatographie	146

9.9.	<i>In-situ</i> Produktabtrennung.....	147
9.9.1.	Reduktion im Zweiphasensystem	147
9.9.2.	Reduktion im organischen System.....	148
9.9.3.	Adsorptionsverhalten gegenüber NADH	148
9.9.4.	Einfluss des Cosubstrats auf die Adsorption.....	148
9.10.	Charakterisierung der Adsorber-Festbettpackung	149
9.10.1.	Hohlraumvolumen und Porosität des Festbetts.....	149
9.10.2.	Durchbruchs- und Elutionskurven	149
9.10.3.	Kristallisation des Reinstoffes (2 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-Hexandiol.....	149
9.11.	Analytik.....	150
9.12.	Matlab-Skript	151
	Abkürzungsverzeichnis	156
	Abbildungsverzeichnis	158
	Tabellenverzeichnis	169
	Literaturverzeichnis.....	172

1. Einleitung

Die Biotechnologie wird mittlerweile als Innovationstreiber angesehen und wurde in unterschiedlichen Ländern zur Schlüsseltechnologie erklärt. Auch die wirtschaftlichen Schwierigkeiten in Europa oder Amerika haben das Wachstum der Biotechnologie nicht gestoppt. Als Querschnittstechnologie kommt der Biotechnologie in unterschiedlichen Wirtschaftszweigen eine große Bedeutung zu, insbesondere die medizinische „rote Biotechnologie“, besitzt eine wirtschaftlich sehr bedeutende Rolle. Aber auch die Bedeutung der Biotechnologie in der Nahrungsmittelindustrie, in der Landwirtschaft oder aber auch im Energiesektor gewinnen an Bedeutung und die industrielle „weiße Biotechnologie“ wächst schon seit Jahren überproportional. Viele biotechnologische Prozesse finden ihre Anwendung in der Pharmazie-, Chemie-, oder Saatgutbranche, da die Unternehmen auf nachhaltiges und energiesparendes Wirtschaften angewiesen sind oder aber aufgrund des auslaufenden Patentschutzes für Blockbuster-Medikamente nach Alternativen suchen, so das Ergebnis einer von der Informationsplattform Biotechnologie.de durchgeführten Umfrage im Auftrag des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) Anfang 2011 [Biotechnologie.de 2011]. Das Wachstum der Biotechnologiebranche wird in dem Bericht zahlenmäßig belegt, so wurden zwischen 2006 – 2010 durchgängig steigende Unternehmenszahlen, Mitarbeiterzahlen und Umsätze ermittelt. Die aktuellsten Zahlen belegen für die Biotechnologie ein Umsatzplus von 9 % und eine Rekordfinanzierung von 700 Millionen Euro (+ 122 %), welche auch die Hoffnungen und Erwartungen widerspiegeln, die in die Biotechnologie gesetzt werden. Neben den guten Wachstumswerten, kommt der Biotechnologie mit ihrem Innovationspotential eine weitere Verantwortung zu. So stehen wir im 21. Jahrhundert vor großen Herausforderungen. Die Versorgung von sieben Milliarden Menschen mit Nahrung und Energie, die Herabsetzung von Emissionsgrenzen als Reaktion auf eine zunehmende Verknappung der Ressourcen durch Klimawandel und Umweltverschmutzung und der steigende Bedarf der Schwellenländer nach Nahrungsmitteln und Rohstoffen, stellen die Weltgemeinschaft vor große Herausforderungen. Lösungen zu diesen Problemen bestehen unter anderem in der effizienteren und vor allem nachhaltigen Nutzung vorhandener Ressourcen und der Entwicklung neuer und unkonventioneller Prozesse und Lösungsstrategien, zu denen die biotechnologische Forschung ihren Beitrag leisten sollte. Aufgrund des abstrakten Begriffes „Biotechnologie“ soll an dieser Stelle eine Definition der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (oecd.org) angeführt werden [Beuzekom, Arundel 2009], auf welche auch in der Umfrage 2011 von Biotechnologie.de verwiesen wird [Biotechnologie.de 2011]. So ist die Biotechnologie definiert als die An-

wendung von Wissenschaft und Technik auf lebende Organismen, Teile von ihnen, ihrer Produkte oder Modelle von ihnen zwecks Veränderung von lebender oder nichtlebender Materie zur Erweiterung des Wissenstandes, zur Herstellung von Gütern und zur Bereitstellung von Dienstleistungen.

“Application of science and technology to living organisms, as well as parts, products and models thereof, to alter living or non-living materials for the production of knowledge, goods and services.”

[Beuzekom, Arundel 2009]

In dieser Arbeit geht es um die Verwendung der Produkte von Organismen (Enzyme, gewonnen aus Bakterienzellen) für biotechnologische Prozesse. In der chemischen Industrie werden Katalysatoren verwendet, um chemische Reaktionen zu beschleunigen und damit kostengünstiger ablaufen zu lassen. Die Natur verwendet Enzyme, sogenannte Biokatalysatoren, um chemische Reaktionen unter physiologischen Bedingungen zu ermöglichen. Enzyme grenzen sich durch einige wichtige Funktionen von den meisten chemischen Katalysatoren ab. So weisen sie eine hohe Anpassung an die katalysierte Reaktion und an die Substrate auf und produzieren Produkte von hoher Reinheit, in der Regel werden keine oder kaum Nebenprodukte gebildet. Da die Gewinnung von Enzymen mit hohen Kosten verbunden ist, werden sie bevorzugt in immobilisierter Form eingesetzt, was ihre Wiederverwendung ermöglicht. Diese Arbeit beschäftigt sich in einem Kapitel mit der Immobilisierung der Enzyme auf modifizierten Trägerstoffen zur Produktion kurzkettiger Alkohole sowie dem Einsatz der Immobilisate im Technischen Prozess. Praktisch stellt sich die Frage, wie die Alkohole aus dem komplexen Stoffgemisch isoliert werden sollen. Die Abtrennung der hochreinen Produkte aus dem komplexen Produktionsgemisch stellt häufig eine Herausforderung und einen hohen Kostenfaktor in der Produktion dar. In dieser Arbeit werden für die Isolierung unterschiedliche anorganische Feststoffe als alternative Materialien für die Abtrennung untersucht, dieser Aufgabe ist ein weiteres Kapitel gewidmet. Das Schlusskapitel widmet sich der technischen Umsetzung der Einzelergebnisse in einen kontinuierlich betriebenen Prozess.

1.1. Immobilisierung von Biokatalysatoren

Die Immobilisierung von Enzymen dient in erster Linie deren Rückhaltung und Wiedergewinnung und beschreibt die örtliche Fixierung eines Biokatalysators auf einem Untergrund oder in einer Matrix. Bereits 1916 wurde die Immobilisierung eines Enzyms auf Aluminiumhydroxid von Nelson und Griffin das erste Mal beschrieben [Nelson *et al.* 1916] und seitdem ausgiebig auf dem Gebiet geforscht, vor allem in den 70er Jahren wurde eine Vielzahl an Materialien und Enzymen untersucht [Cao 2005]. Durch eine Immobilisierung des Biokatalysators ergeben sich einige Vorteile:

- Prozesskosten sinken durch Mehrfachverwendung
- Kontinuierlicher Prozess ist realisierbar
- Die Stabilität des Enzyms kann erhöht werden [Liao *et al.* 2001]

Gleichzeitig ergeben sich unter Umständen aber auch Nachteile:

- Verlust an Aktivität durch Konformationseinschränkung
- Kosten für Trägermaterial und Anbindung
- Transportlimitierungen durch Diffusionsbarrieren
- Quellung oder Unbeständigkeit des Trägermaterials

Dabei spielt die Wahl des Trägers eine wichtige Rolle für den späteren Prozess. Grundlegende Anforderungen an die Träger sind eine große Porenweite zur Minimierung der Diffusionslimitierung, eine hohe spezifische Oberfläche, um möglichst viel Enzym anbinden zu können und geringe Kosten, um den Einsatz auch im industriellen Maßstab zu ermöglichen.

Für die eigentliche Immobilisierung kommen eine Reihe unterschiedlicher Verfahren in Frage. Die Enzyme können adsorptiv über Physisorption oder kovalent mithilfe von Linkermolekülen gebunden werden. Weitere Verfahren sind z. B. Einschlussverfahren in Silika-Gelmatrices [Smirnova 2002] oder die Anbindung an Membranoberflächen [Cao 2005], wobei jedes Verfahren seine Vor- und Nachteile hat.

Besonders inert sind Trägermaterialien auf Siliciumbasis, die wegen ihrer hohen Beständigkeit gegenüber wechselnden Prozessbedingungen eine breite Anwendung nicht nur zur Enzymimmobilisierung finden. Durch langjährige Forschung sind die Prozessbedingungen bekannt, unter denen die reproduzierbare Herstellung unterschiedlicher Modifikationen möglich ist. Dadurch wurden die Träger immer besser an die jeweiligen Anforderungen angepasst. So wird Kieselgel (amorphes Siliciumdioxid) mit definierter, mikroporöser Oberfläche seit langem zur Stofftrennung in der Chromatographie eingesetzt. Fällungskieselsäuren, wie z. B. Sipernate® der Firma Evonik, sind makroporöse Stoffträger und werden in Spezialanwendungen zur Bindung von Flüssigkeiten oder als Trägerstoffe unter anderem im Lebens-

mittelbereich eingesetzt [Evonik-Industries 2009]. Diese Trägerstoffe sind über spezielle Methoden oberflächenmodifizierbar, so dass die maximale Anbindungskapazität der Enzyme an die Trägerstoffe erreicht wird. Eine dieser Methoden ist z. B. die Silanisierung. Es handelt sich um die Kondensation von Silanen aus Organosiliciumverbindungen auf Silicaoberflächen, ein bekanntes und etabliertes Verfahren zur gezielten Funktionalisierung von Silica-Oberflächen (Abbildung 1–1). Allerdings ist das Verfahren aufwendig und teuer.

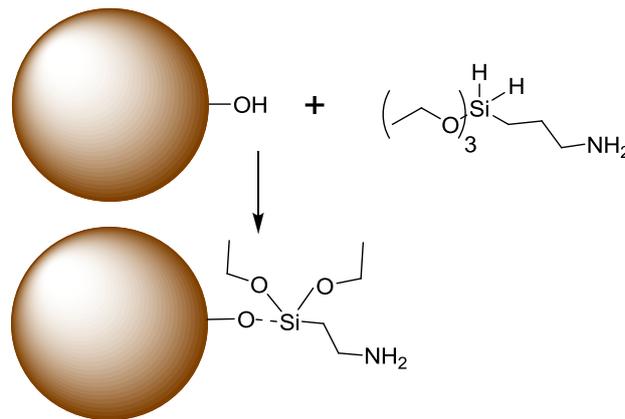


Abbildung 1–1: Prinzip der Silanisierung, Einführung funktioneller Aminofunktionen.

Eine weitere Methode zur Modifizierung der Oberfläche stellt die Layer-by-Layer (LbL) Technik dar (Abbildung 1–2). Diese findet bei der Immobilisierung von Enzymen bisher allerdings keine Anwendung. Dabei werden Polyelektrolyte mit anionischen oder kationischen dissoziierbaren Gruppen durch elektrostatische Anziehung auf Feststoffoberflächen der gegenteiligen Ladung adsorbiert (Abbildung 1–3). Die Methode hat ihre Ursprünge in den 1960er Jahren, in denen Kuhn und Möbius [1971] monomolekulare Schichten von einer Wasseroberfläche auf einem Feststoff nach der Langmuir-Blodgett (LB) Technik adsorbierten und untersuchten. Aus dieser Technik entwickelte sich nach einigen Modifizierungen die LbL-Methode, welche 1991 von Decher eingeführt und weiterentwickelt wurde [Decher *et al.* 1991]. Das Prinzip der Technik besteht in der lösungsmittelfreien Funktionalisierung von geladenen Oberflächen mit Polyelektrolyten. Dabei können alternierende Schichten aus Polyanionen und Polykationen aufgetragen werden, so dass bis zu wenige Nanometer dicke Polymerschichten entstehen, die bei porösen Trägern auch die Poren von innen auskleiden [Dähne *et al.* 2005].

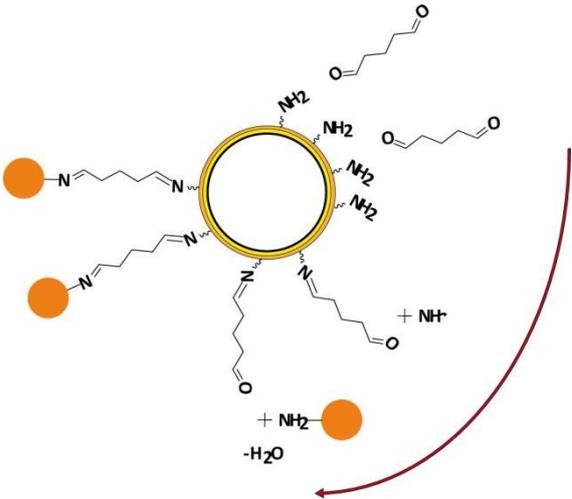


Abbildung 1–2: Immobilisierung auf LbL-modifizierten Trägern mithilfe von Glutardialdehyd (GDA) als Linker, zuerst Aktivierung mit GDA dann Enzymimmobilisierung.

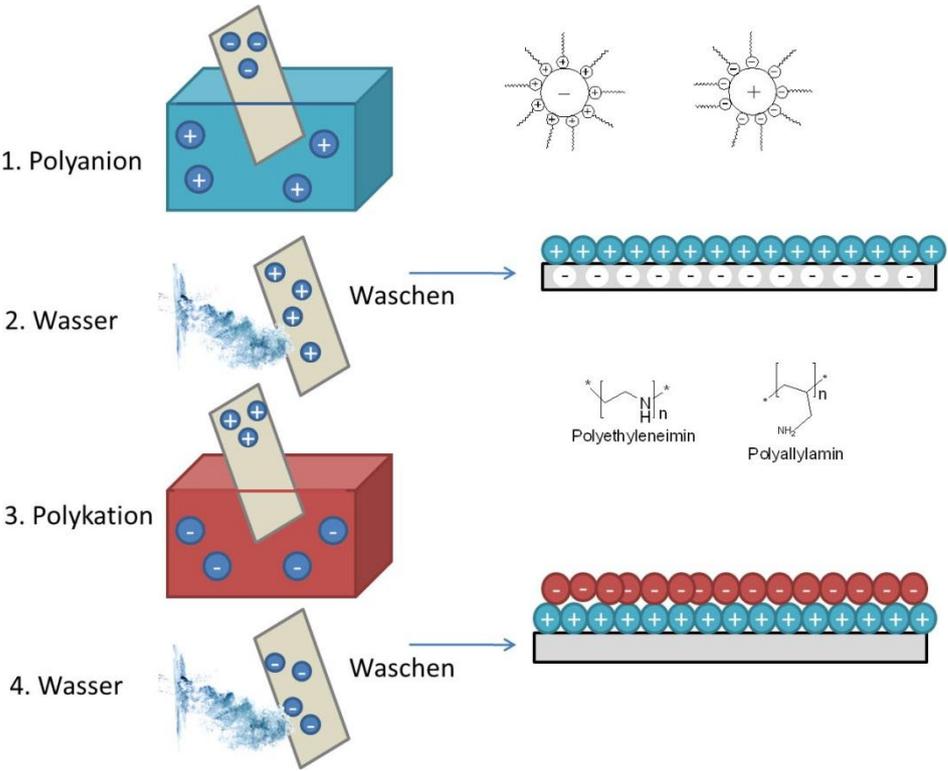


Abbildung 1–3: Layer-by-Layer Technik, Überziehen einer geladenen Oberfläche mit Polyelektrolyten gegensätzlicher Ladung führt zu Schichtbildung, beispielhaft aufgeführt sind die Polyelektrolyte Polyethylenimin und Polyallylamin.

Die eigentliche Dicke einer Schicht hängt vom jeweiligen Polyelektrolyt ab und davon, ob die Polyelektrolytmoleküle als dünne Schicht oder geknäult adsorbiert werden. Das Aufbringen erfolgt durch Aufsprühen der Elektrolyte oder durch Eintauchen der Träger in die Polyelektrolytlösung. Durch Verwendung unterschiedlicher Polyelektrolyte können Oberflächen mit

bestimmten funktionellen Gruppen für die Immobilisierung von Proteinen angepasst werden. Eine Anbindung kann direkt oder über sogenannte Linkermoleküle erfolgen. In dieser Arbeit werden sowohl silanisierte Trägerstoffe, als auch LbL-modifizierte Trägerstoffe für die Enzymimmobilisierung untersucht. Der Fokus liegt dabei auf der Untersuchung verschiedener Polyelektrolytbeschichtungen und Schichtkombinationen durch die LbL-Technik.

1.2. Isolation der Reaktionsprodukte

Am Ende der Produktion eines Stoffes mit Enzymen oder Bakterien muss das Produkt aus dem Stoffgemisch isoliert werden. Die Isolation des Reaktionsproduktes eines biokatalytischen Prozesses kann allerdings zwischen 60 - 80 % der Gesamtprozesskosten verursachen [Antranikian 2006]. Häufig gliedert sich die Aufarbeitung in mehrere Prozessschritte und das Produkt wird stufenweise eingeeengt. Die Schwierigkeit besteht in der Abtrennung eines Einzelstoffes aus einem komplexen Gemisch von Verbindungen, welche in unterschiedlichen Konzentrationen gelöst sind. Um die richtige Strategie zur Isolierung zu wählen, stehen verschiedene Verfahren hauptsächlich aus dem Gebiet der thermischen Verfahrenstechnik zur Verfügung. Es handelt sich um Verdampfung, Kristallisation, Destillation, Adsorption, Adsorption, Trocknung, Flüssig-Flüssig-Extraktion (Solventextraktion), Membranverfahren und einige weitere. Vorhersagen über die Trennung durch thermodynamische Theorien werden ausgehend von Einzelmessungen der Reinstoffe getroffen, allerdings ist es mit dem Stand des aktuellen Wissens nicht möglich, genaue Vorhersagen der komplexen Wechselwirkungen zu treffen [Grünewald *et al.* 2011]. Aus diesem Grund trägt die experimentelle Bearbeitung eines Trennungsproblems entscheidend zum Verständnis der Vorgänge bei.

Gegenstand dieser Arbeit ist unter anderem die selektive Adsorption polarer Alkohole aus Stoffgemischen auf festen Trägerstoffen, eingesetzt als Adsorber. Das Problem bei der Beschreibung der Vorgänge an festen Trägerstoffen ist die starke Heterogenität der Oberflächen. Die Chemie und Physik der Phänomene auf molekularer Ebene sind bis heute nur zum Teil verstanden [Köhler *et al.* 1993]. Der Prozess der Adsorption beschreibt die Anreicherung einer oder mehrerer Komponenten an der Phasengrenzfläche zwischen einem Feststoff und der Flüssigkeit oder Gasphase. Trennverfahren durch Adsorption auf porösen Adsorbentien finden dabei eine breite Anwendung. Eingesetzt werden sie z. B. bei der Reinigung von Gasgemischen oder zur Entfernung von farblichen Verunreinigungen oder Bitterstoffen aus Flüssigkeiten. Die Adsorption von Stoffen kann dabei in die grundlegenden Phänomene der Physisorption und der Chemisorption un-

terteilt werden (durch die IUPAC 1972 festgelegt). Bei der Physisorption erfolgt die Bindung über elektrostatische Anziehung und Van-der-Waals-Kräfte, es handelt sich um eine schwache Bindung, die leicht wieder zu lösen ist. Die Chemisorption hingegen ist eine kovalente Bindung und erfordert einen höheren Aufwand an Energie. Die Adsorptionswärme beträgt bei physikalischer Bindung $< 40 \text{ kJ mol}^{-1}$ Adsorpt und bei der chemischen Bindung zu Beginn $> 80 \text{ kJ mol}^{-1}$ Adsorpt und nimmt mit steigender Beladung ab [Sattler 2001]. Dabei ist die Adsorption ein exothermer Vorgang, ihre Umkehrung, die Desorption, folglich endotherm (siehe auch Abbildung 1–4). Die Wahl geeigneter Adsorbentien richtet sich nach folgenden grundlegenden Punkten [Bart *et al.* 2005]:

- Kapazität des Sorbens
- Produkt-Reinheit oder Selektivität des Adsorbers
- Methode zur Regeneration
- Preis der Adsorbentien

Von großer Wichtigkeit bei der Wahl eines Adsorbens ist die verfügbare spezifische Oberfläche, die mittels BET-Verfahren (benannt nach den Wissenschaftlern Brunauer, Emmett und Teller [Brunauer *et al.* 1938]) über Stickstoffadsorption bestimmt werden kann. Pulverförmige poröse Adsorbentien weisen häufig die größten Oberflächen auf, je nach Makro- bzw. Mikroporensystem der Adsorber. Unterschieden wird in der Regel zwischen Makroporen ($d_{pr} > 50 \text{ nm}$), Mesoporen ($50 > d_{pr} > 2 \text{ nm}$) und Mikroporen ($2 > d_{pr} > 0,4 \text{ nm}$).

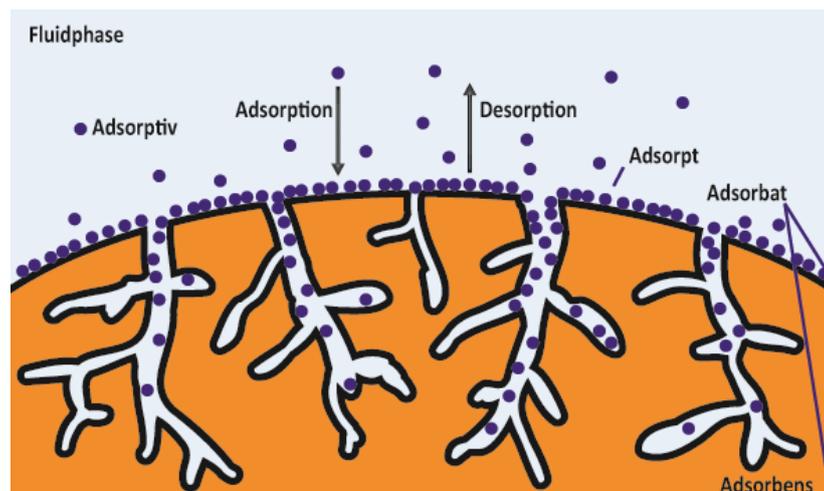


Abbildung 1–4: Schema zur Erläuterung der Vorgänge bei der Stoffadsorption.

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Adsorption ist die Überwindung des langsamsten Transportvorganges, der durch Diffusion aus der Fluidphase (auch Abgeberphase) durch den Grenzfilm in das Porensystem und

Anlagerung an der inneren Porenoberfläche besteht (siehe Abbildung 1–4). Die Schichtdicke des Grenzfilms hängt unter anderem von der Flussrate ab. Während in Flüssigkeiten der externe Stofftransport und die Kinetik der Adsorption recht schnell ablaufen, stellen die Filmdiffusion und der Transport innerhalb der Poren die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte dar [Schmidt-Traub 2005].

Die Stofftrennung durch Adsorption findet ihre größte Anwendung in der analytischen und präparativen Chromatographie, deren Ziel die Gewinnung reiner Stoffe ist. Bei der präparativen Chromatographie geht es um die Isolation von Einzelstoffen aus Stoffgemischen im präparativen Maßstab. Durch Überladen der Trennsäulen kommt es zu einer Verschlechterung der Trennleistung, allerdings können größere Mengen des Zielproduktes gewonnen werden [Seidel-Morgenstern 1995]. Eine große Bedeutung für verschiedene Anwendungen besitzen spezielle Adsorbentien in Form von Polymeren und Adsorberharzen. Diese finden ihre Anwendung in unterschiedlichen Bereichen, z. B. in der Wasserenthärtung oder der Proteinauftrennung. Durch Oberflächenmodifikationen können diese an den Trennprozess angepasst werden und erreichen dadurch eine sehr hohe Trennleistung. In der Literatur werden einige Verfahren zur *in-situ* oder nachgeschalteten Produktabtrennung mithilfe von Adsorberharzen beschrieben [Vicenzi *et al.* 1997, Haberland 2003], aufgrund der teilweise recht hohen Preise ist ein Einsatz unter Umständen aber nicht wirtschaftlich, entscheidend dafür ist unter anderem die Dauer der Verwendbarkeit. Eine Alternative stellt die Verwendung kostengünstiger anorganischer Adsorbentien wie Kieselgel oder Aluminiumoxid dar, die aufgrund ihrer hervorragenden Eigenschaften die am meisten verwendeten Adsorbentien darstellen. Für die Herstellung der anorganischen Adsorber werden etablierte Verfahren zur Fällung von Aluminiumhydroxiden oder Hydraten aus basischen Aluminatlösungen oder die Herstellung über den Sol-Gel Prozess (Hydrolyse von Aluminiumalkoxiden) eingesetzt [Hart *et al.* 1990, Smirnova 2002]. Als selektive Adsorber werden Aluminiumoxide bisher für die Trocknung von organischen Lösungsmitteln eingesetzt, indem polare Wassermoleküle durch selektive Adsorption aus der organischen Phase adsorbiert werden (siehe Abbildung 1–5). Auf dieser Anwendung beruht auch die Einteilung der Aluminiumoxide in Trocknungsstufen, je nach Wassergehalt nach Brockmann [1947].

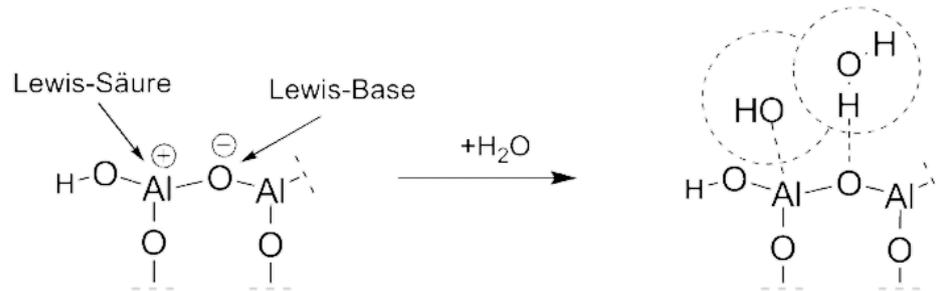


Abbildung 1–5: Schema zur Erläuterung der Bindung von Wasser durch Aluminiumoxid.

Aluminiumoxid findet eine breite Anwendung und kann durch Variation des Aktivierungsprozesses oder durch Dotierung an ein Trennproblem angepasst werden, einige bekannte Anwendungsfelder sind [Yang 2003]:

- Entfernung von HCl und HF aus Gasen und Flüssigkeiten
- Entfernung saurer Gase aus Kohlenwasserstoffen (CO_2 , H_2S)
- Entfernung polarer organischer Komponenten

Auf der Aluminiumoxid-Oberfläche stehen eine Vielzahl von Sorptionsstellen zur Verfügung: Al^+ , AlO^- [Gritter *et al.* 1985]. Aufgrund der mechanischen Stabilität, der großen Oberfläche und der Beständigkeit gegenüber dem Sintern ist das γ -Aluminiumoxid als kommerzieller Katalysator oder Trägerstoff für Katalysatoren in der industriellen Chemie die am weitesten verbreitete Form von Aluminium [Zaki *et al.* 1986, Yang 2003]. Eine große Rolle spielen die Al-OH und koordinativ ungesättigten kationischen Al^{3+} Bindungsstellen [Knözinger 1988]. Die stark polare Oberfläche der Aluminiumoxide grenzt diese vom Kieselgel ab und zeigt sich auch im amphoteren Verhalten von sowohl sauren, als auch basische Eigenschaften (Abbildung 1–5) [Crittenden 1998].

Auch Kieselgel findet breite Anwendung als Trocknungsmittel aufgrund seiner hohen Kapazität für Wasser von etwa 40 Gew.-% [Yang 2003]. Es ist außerdem zur Stofftrennung in der Chromatographie weit verbreitet und kann mithilfe von Oberflächenmodifikationen durch organische Liganden modifiziert werden. Kieselgel hat sich als universelles Trennmittel in der Chromatographie etabliert und wird für die Bindung von Wasser, Alkoholen, Phenolen, Aminen uvm. über Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen eingesetzt. Der Einsatz von Aluminiumoxiden oder Kieselgel zur selektiven Bindung polarer Alkohole aus Keton-Alkoholgemischen als Trennmethode, wird in der Literatur von K. Goldberg [Goldberg 2010] das erste Mal beschrieben. Gegenstand dieser Arbeit ist unter anderem der Einsatz eben dieser Adsorber in einem bestehenden Trennproblem zur Alkoholabtrennung.

1.3. Produktion chiraler Alkohole

Die Produktion optisch reiner, chiraler Alkohole, ist mit klassischen chemischen Methoden oder biokatalytischen Verfahren möglich. Der große Vorteil biotechnologischer Verfahren sind die hohe Stereo- und Regioselektivität von Enzym- oder Ganzzellkatalysatoren (Bakterien, Pilze) und die milden Reaktionsbedingungen. Dabei wird die Verwendung isolierter Enzyme bevorzugt, da in der Regel keine Nebenprodukte auftreten und eine höhere volumetrische Produktivität und eine bessere Selektivität erreicht werden [Goldberg *et al.* 2007]. Für die Produktion chiraler Alkohole eignen sich unterschiedliche Enzyme wie Oxidoreduktasen, Hydrolasen und Lyasen [Goldberg 2010]. Gegenstand dieser Arbeit sind die Oxidoreduktasen, welche Oxidations- und Reduktionsreaktionen katalysieren. Zu ihnen zählen auch die Alkohol-Dehydrogenasen (ADH) EC 1.1.1.1., welche als Redoxmediator des Cofaktors β -Nicotinamid-Adenindinukleotid (NAD(P)H) bedürfen. Aufgrund der hohen Kosten der Cofaktoren ist ein stöchiometrischer Einsatz zu teuer, weshalb eine effiziente, parallel zur Hauptreaktion verlaufende Cofaktorregenerierung unumgänglich ist. Eine 10^2 - 10^6 -fache Regeneration des Cofaktors sollte dabei für einen ökonomischen Einsatz erreicht werden [Liese *et al.* 2006]. Für die Cofaktorregenerierung ist ein kostengünstiges und stabiles System notwendig. Verfahren wie die elektrochemische Regeneration, chemische Regeneration, photochemische Regeneration und enzymatische Regeneration kommen in Frage [Goldberg *et al.* 2007]. Eine gute Lösung stellen der Umsatz und die Cofaktorregenerierung mit ein und demselben Enzym dar. Dabei wird nicht enzym-, sondern substratgekoppelt gearbeitet [Hummel *et al.* 1989]. Das bedeutet, dass ein und dasselbe Enzym zwei Reaktionen katalysiert, einmal die eigentliche Produktbildung (Hauptreaktion) unter Verbrauch von Substrat, zum anderen die Regenerierung des Cofaktors unter Verbrauch eines zweiten Substrats, das sogenannte Cosubstrat (Nebenreaktion). Der Vorteil besteht darin, dass das Gesamtsystem nicht an ein zweites Enzym angepasst und dieses bereitgestellt werden muss. Der Nachteil besteht in der thermodynamischen Limitierung, da alle Reaktionsteilnehmer im Gleichgewicht stehen und der maximale Umsatz unter Umständen nicht erreicht wird. Einen Ansatz um diese Limitierung zu überwinden, bieten ISPR-Techniken (*in-situ* product removal-Techniken), welche eine kontinuierliche Entfernung eines der Reaktionsprodukte durch Begasung (Stripping) [Goldberg *et al.* 2008]), Vakuum, Kristallisation, Membranabtrennung [Schroer, Lütz 2009] oder adsorptive Produktabtrennung [Temme *et al.* 2011, Bechthold, Panke 2009] ermöglichen. Denkbar ist auch eine Kopplung mit Folgereaktionen. Ein grundsätzliches Problem bei der Verwendung von Enzymen für die Ketonreduktion zur Produktion von Alkoholen ist die häufig geringe Löslich-

keit vieler Ketone in wässrigen Lösungen sowie deren Instabilität [Keinan *et al.* 1986]. Als Alternative ist die Katalyse in organischen Lösungsmitteln möglich, obwohl viele isolierte Enzyme eine hohe Instabilität in organischen Substraten oder Lösungsmitteln aufweisen [Liese *et al.* 1998]. Als alternative Reaktionssysteme kommen Zweiphasensysteme in Frage [Van den Wittenboer *et al.* 2009]. Das organische Lösungsmittel wird dabei als Substratspeicher und zur kontinuierlichen Extraktion der Produkte/Co-Produkte genutzt. Allerdings kann es zur Grenzflächeninaktivierung der Enzyme sowie der Konzentrierung des Lösungsmittels in der Wasserphase kommen [Müller 2010]. In der Literatur wird von einer guten Stabilität einiger Alkohol-Dehydrogenasen im Zweiphasensystem mit MTBE berichtet [Villela *et al.* 2003]. Durch Immobilisierung der Enzyme oder zielgerichtetes Protein-Engineering kann die Stabilität der Enzyme weiter erhöht werden [Lutz *et al.* 2009] und zu besseren Umsätzen sowohl in wässrigen als auch in organisch-wässrigen Medien führen.

Für die stereoselektive Reduktion der Ketone wird in dieser Arbeit die Alkohol-Dehydrogenase- α (ADH- α) aus *Rhodococcus ruber* DSM 44541 als Modellsystem gewählt. Das Enzym wurde überexprimiert in *Escherichia coli* (*E. coli*) [Edegger *et al.* 2006] und steht in Form gefriergetrockneter Zellen zu Verfügung. Bei der ADH- α handelt es sich um eine sehr lösungsmitteltolerante Alkohol-Dehydrogenase [Stampfer 2002, Stampfer 2003], die in organischen Lösungsmitteln von 99 % V V⁻¹ noch Aktivität zeigt, solange eine mikro-wässrige Phase vorhanden ist [Gonzalo *et al.* 2007 b] und die auch in ionischen Flüssigkeiten noch Aktivität zeigt [Gonzalo *et al.* 2007 a]. Das Enzym besteht aus einem Homodimer mit etwa 72 kDa je Untereinheit, welche jeweils ein Zink-Atom gebunden durch vier Cystein-Cluster enthalten. Ein weiteres Zink-Atom findet sich im aktiven Zentrum [Karabec *et al.* 2010]. Für die ADH- α ergibt sich eine Größe von etwa 6 nm [Goldberg 2010]. Das Enzym ist auf den Cofaktor NADH angewiesen, der über die substratgekoppelte Cofaktorregenerierung vom Enzym unter Isopropanolverbrauch wieder regeneriert werden kann [Stillger *et al.* 2002].

Der optimale Temperaturbereich der Alkohol-Dehydrogenase- α liegt zwischen 30-50 °C mit einer Halbwertszeit von 35 h bei 50 °C, die höchste Anfangsaktivität wurde zwischen 50-60 °C gemessen. Für die Oxidationsreaktion beträgt der optimale pH 9,0, für die Reduktionsreaktion pH 6,5. [Kosjek *et al.* 2004] und der isoelektrische Punkt liegt bei 5,1 [Edegger *et al.* 2006]. Das Substratspektrum des Enzyms ist vielfältig, als typische Substrate gelten allerdings mittelkettige *sek*-Alkohole oder Ketone, für die das Enzym eine hohe Regio- und Stereoselektivität von > 99 % *S*-Enantiomer besitzt [Stampfer *et al.* 2002]. Als Modellsupstrat wird in dieser Arbeit das Ke-

ton *rac/meso*-2,5-Hexandion eingesetzt. Unter Verbrauch von NADH wird das Substrat über das Zwischenprodukt 5-Hydroxyhexan-2-on zu (2*S*,5*S*)-Hexandiol umgesetzt (siehe Abbildung 1–6).

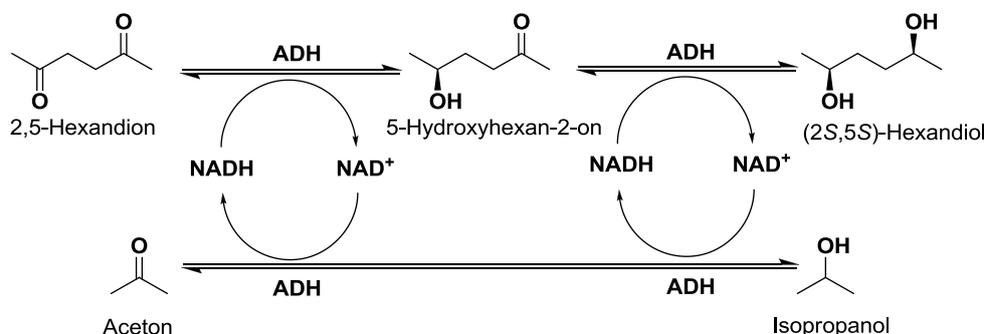


Abbildung 1–6: Schema zur enzymatischen Reduktion von prochiralen Ketonen mit ADH-A' und substratgekoppelter Cofaktorregenerierung.

Über die bereits beschriebene substratgekoppelte Cofaktorregenerierung kann das Enzym unter Umsetzung des Cosubstrats Isopropanol, das oxidierte NAD⁺ wieder zum NADH reduzieren und auf diese Weise den Cofaktor regenerieren.

1.4. Wahl des Produktionssystems

Zur Produktion größerer Mengen einer Substanz eignet sich die kontinuierliche Produktionsweise mit immobilisiertem Biokatalysator. Für diesen Zweck stehen mehrere Reaktortypen zur Auswahl. Als Grundtypen stehen das Strömungsrohr (auch als Plug-Flow Reaktor „PFR“ bezeichnet) und der Rührkessel (als Stirred-Tank Reaktor „STR“ bezeichnet) zur Verfügung. Für immobilisierte Enzyme ergeben sich im Rührkessel aufgrund der hohen Scherkräfte einige Nachteile, so kann es zu Enzymverlust, Enzyminaktivierung oder zum Bruch des Trägers kommen [Hanefeld *et al.* 2009]. Als mögliche Lösung wurde das Immobilisat z. B. mit einem Überzug aus Silikon versehen [Flaschel *et al.* 2010]. Im idealen Rührkesselreaktor wird davon ausgegangen, dass eine vollständige Durchmischung vorliegt und die Konzentration aller Reaktionsteilnehmer in jedem Teil des Reaktors gleich ist. Es ergibt sich ein zeitabhängiger aber ortsunabhängiger Umsatz (siehe Abbildung 1–7).

In einem idealen kontinuierlich betriebenen Strömungsrohrreaktor ist die Situation umgekehrt. Bei konstantem Fluss der Reaktionsmischung durch den Reaktor wird ein Gleichgewichtszustand erreicht und die höchste Konzentration an Produkt findet sich am Ausgang des Reaktors. Die Produktkonzentration steigt über die Länge des Reaktors an und die durchschnittliche Reaktionsgeschwindigkeit ist schneller als in einem kontinuierlich betriebenen Rührkessel [Liese *et al.* 2006]. Das Strömungsrohr ist damit zeit-

unabhängig aber ortsabhängig (siehe Abbildung 1–7). Die Vorteile für immobilisierte Biokatalysatoren im Strömungsrohrreaktor bestehen in dem Fehlen von Scherkräften und Abrieb und der hohen Biokatalysatordichte bei niedrigem Reaktionsvolumen. Es ergibt sich eine gute radiale Diffusion des Substrats bei niedriger Flussrate, so dass der Strömungsrohrreaktor durch die kompakte Abmessung und das geringe Gesamtvolumen gut zur Produktion von Feinchemikalien geeignet ist und bei Bedarf erweitert oder vergrößert werden kann.

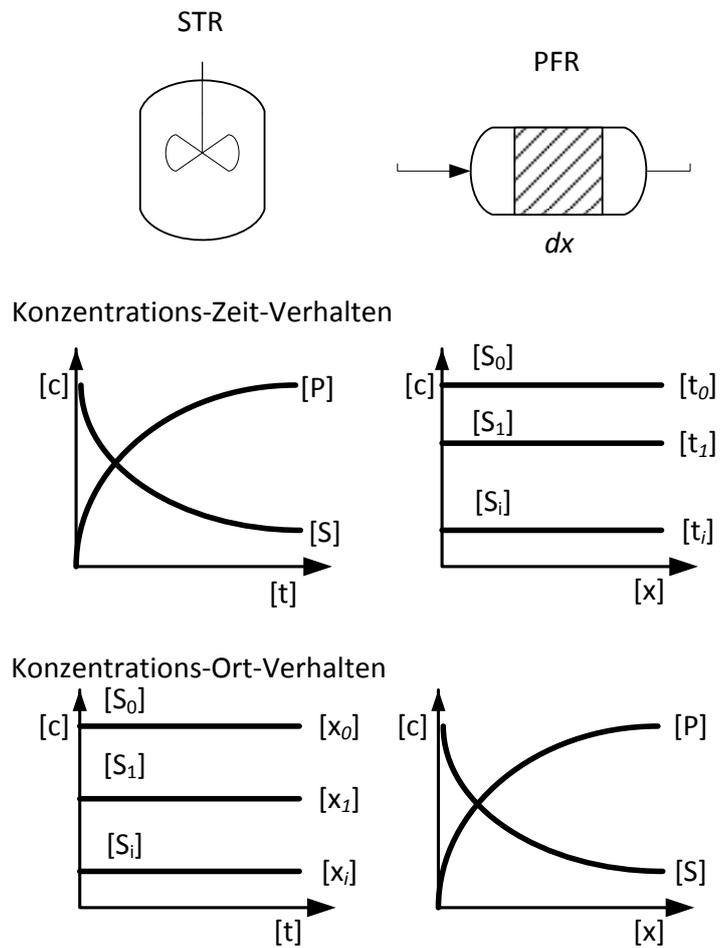


Abbildung 1–7: Zeit-Ort-Diagramm für den kontinuierlichen Rührkesselreaktor (STR) und den Strömungsrohrreaktor (PFR).

2. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines Prozesses zur Produktion chiraler Alkohole mit immobilisierter Alkohol-Dehydrogenase auf oberflächenmodifizierten Trägern. Zusätzlich sollte das chirale Reaktionsprodukt über selektive Adsorption auf einem kostengünstigen Feststoff abgetrennt werden. Aufgrund der großen Bedeutung chiraler Alkohole als „Building Blocks“ in der pharmazeutischen Industrie und dem ständig steigenden Bedarf chiraler Moleküle als Intermediate, besteht ein großes wirtschaftliches Potential für Redoxreaktionen. Dabei stellt sich neben dem Problem der Enzymstabilität und der Versorgung mit Cofaktor häufig die schlechte Löslichkeit der Substrate in Wasser oder aber die Instabilität der Substrate in wässriger Lösung als problematisch dar [Keinan *et al.* 1986]. Zusätzlich ist die Isolierung des Reaktionsprodukts aus Wasser in der Regel aufwendig und teuer (siehe auch Kapitel 1.2.).

Aus diesem Grund wurde ein integratives Reaktionskonzept untersucht und entwickelt. Die Wahl fiel auf eine hoch selektive Alkohol-Dehydrogenase, die einen Enantiomerenüberschuss von > 99 % S-Alkohol produziert. Damit war eine spätere Enantiomerentrennung nicht mehr notwendig. Als Feststoff für die Adsorption wurden kostengünstige, synthetische anorganische Adsorbentien in die engere Wahl genommen, so wurden Kieselgel, Aluminiumoxid und Mischphasen, sogenannte Alumosilikate, als Adsorber untersucht und deren Adsorptionsfähigkeit für unterschiedliche Alkohol-Ketongemische aus unterschiedlichen Lösungsmitteln getestet. Das Ziel bestand in dem Einsatz als Adsorber in einem diskontinuierlichen Festbett, da dieser Ansatz eine hohe Flexibilität gewährleistet.

Um die Alkohol-Dehydrogenase über einen langen Zeitraum einsetzen zu können, wurden Konzepte für deren Immobilisierung, der Erhöhung der Langzeitstabilität und der Lagerfähigkeit untersucht. Für den Einsatz im Reaktor wurde die Immobilisierung auf porösem Glas und auf neuartigen, mit Polyelektrolyten nach der LbL-Technik beschichteten Trägermaterialien durchgeführt und näher untersucht.

In einem Gesamtkonzept wurden die vielversprechendsten Adsorber und Immobilisate in der kontinuierlichen Produktion chiraler Alkohole eingesetzt, um deren Anwendbarkeit im kontinuierlichen Prozess zu belegen.

In der folgenden Abbildung 2–1 sind die Schwerpunkte und das Gesamtkonzept der Arbeit noch einmal schematisch dargelegt.

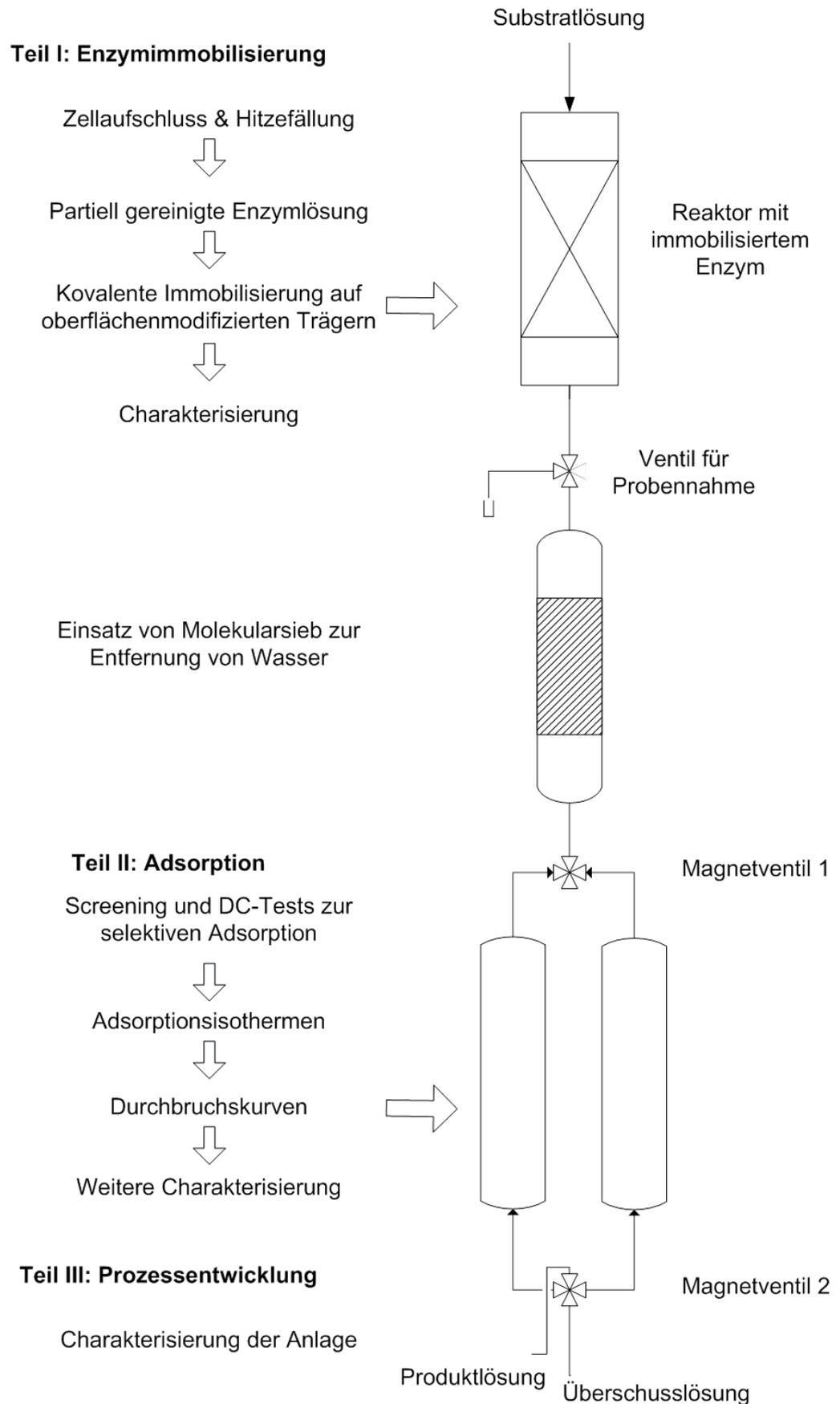


Abbildung 2-1: Schema Prozessentwicklung und Aufbau der Dissertation (Teil I-III).

3. Enzymimmobilisierung auf modifizierten Trägern

Für eine erfolgreiche Immobilisierung von Enzymen auf einer Oberfläche sollte diese eine große Anzahl spezifischer Anbindungsstellen aufweisen. Sind diese nicht vorhanden, können sie mithilfe einer Methode zur Funktionalisierung aufgebracht werden, z. B. durch Silanisierung oder die Layer-by-Layer-Technik (LbL-Technik [Decher, Schlenoff 2003]), wie in der Einleitung beschrieben (Kapitel 1.1). Die Wahl des Trägermaterials erfolgt im Idealfall nach den Anforderungen des späteren Prozesses. Die grundlegenden Anforderungen an das Trägermaterial sind neben der großen Oberfläche, ein Porendurchmesser von 50-100 nm (ab etwa 100 nm kann die Diffusionslimitierung vernachlässigt werden [Cao 2005]), ein geringes Quellvermögen und mechanische Stabilität. Prozesstechnisch relevant ist dabei auch das eingesetzte Rührsystem im Reaktor, da es bei Verwendung anorganischer Träger zu Abrieb durch Scherung z. B. am Rührblatt, kommen kann. Auch die Art der Immobilisierung kann einige Einschränkungen mit sich bringen. So führt die kovalente Immobilisierung des Enzyms mithilfe von Linkermolekülen häufig zu einem Verlust an Aktivität aufgrund von Konformationseinschränkungen des Enzyms [Cao 2005]. Methoden zur Erhöhung der Aktivität und die geometrisch gezielte Anbindung spielen deshalb eine immer größere Rolle. Bei der Immobilisierung von Lipasen kann es zu einer Erhöhung der Aktivität des immobilisierten Enzyms aufgrund einer Grenzflächenaktivierung kommen [Hanefeld *et al.* 2009] und von Alkohol-Dehydrogenasen ist bekannt, dass die Wasseraktivität bzw. die im System vorhandene Restwassermenge die Aktivität stark beeinflussen kann [Gonzalo *et al.* 2007, Deetz *et al.* 1988].

Im Idealfall sind inerte Trägerstoffe mit unterschiedlicher spezifischer Oberfläche und unterschiedlichen Porenradien kommerziell verfügbar, welche dann nach Bedarf gezielt oberflächenfunktionalisiert werden können. Neben porösen Glaspartikeln wie Trisoperl[®] und Trisopor[®] (Firma Vit-räbio), welche bereits Verwendung in der Enzymimmobilisierung finden [Goldberg 2010], stellen Fällungskieselsäuren (Sipernate[®]) einen inerten Trägerstoff mit hohem Bindungsvermögen für Wasser dar (etwa 50-60 Gew.-%) [Evonik-Industries 2009]. Sipernate sind makroporöse Trägerstoffe und in unterschiedlicher Spezifikation kommerziell in großen Mengen verfügbar. Sowohl poröse Glaspartikel als auch Fällungskieselsäuren wurden in LbL-modifizierter Form auf ihre Eignung für die Enzymimmobilisierung untersucht.

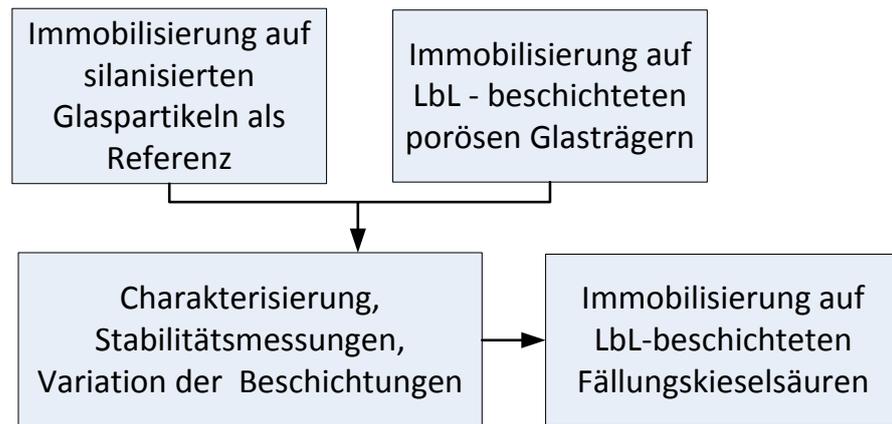


Abbildung 3–1: Schema zum Vorgehen bei der Enzymimmobilisierung.

3.1. Kovalente Immobilisierung

Eine Bedingung für den Einsatz immobilisierter Enzyme in einem kontinuierlichen Prozess ist die stabile Bindung des Enzyms an den Träger. Trotz der literaturbekannten Nachteile einer kovalenten Immobilisierung wie z. B. Aktivitätsverluste, Diffusionslimitierung oder zusätzliche Kosten für das Trägermaterial [Cao 2005, Hanefeld *et al.* 2009], stellt die kovalente Kopplung eine zuverlässige und weit verbreitete Methode zur Immobilisierung von Enzymen dar. Zunächst ist die Immobilisierung auf silanisierten, porösen Glas-Partikeln als Referenzmethode dargestellt. Das Ziel der Versuche bestand in der Untersuchung und Bewertung Polyelektrolyt-beschichteter Träger für die Enzymimmobilisierung und Übertragbarkeit der Enzymanbindung auf weitere LbL-modifizierte Trägerstoffe.

3.1.1. Immobilisierung auf modifizierten Glaspartikeln

Poröse Glaspartikel wie Trisopor[®] und Trisoperl[®] stellen als inerte Partikel mit definierter großer Oberfläche und gleichmässigem Porensystem eine ideale Anbindungsgrundlage für die Enzymimmobilisierung dar [Goldberg *et al.* 2008]. Im Folgenden werden die silanisierten Träger Trisoperl PMGK L 17/05 Amino 222 mit einer spezifischen Oberfläche von $165,6 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ und einem Porendurchmesser von 40 nm untersucht (Herstellerangaben).

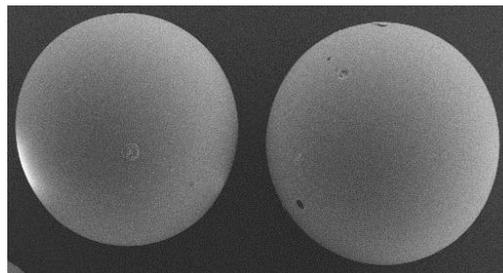


Abbildung 3–2: Rasterelektronenaufnahme von Trisoperl-Partikeln.

Die Immobilisierung der Alkoholdehydrogenase-´A` wurde als kovalente Immobilisierung mit Glutardialdehyd als Linkermolekül durchgeführt (siehe Material und Methoden 9.5.2). Die Partikel wurden zunächst in einem separaten Schritt mit Glutardialdehyd aktiviert und in einem zweiten Schritt wurde das Enzym immobilisiert. Sämtliche Überstände und Waschfraktionen wurden auf Aktivität und Proteingehalt untersucht.

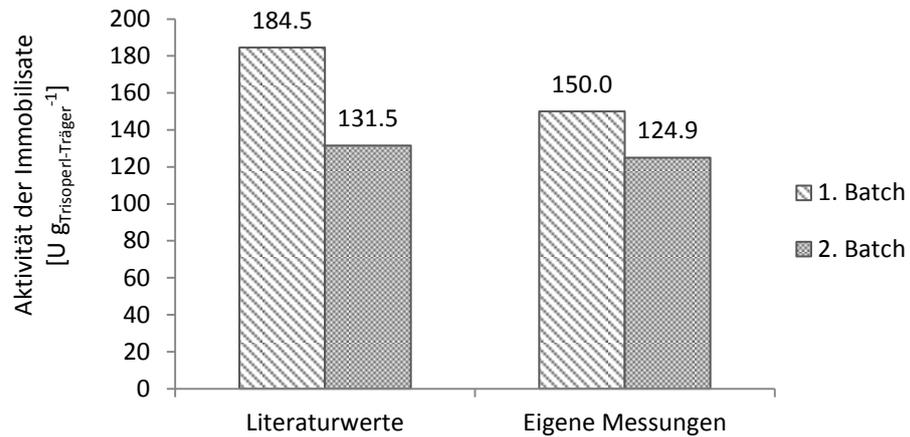


Abbildung 3–3: Vergleich der Literaturwerte der Aktivitäten und Wiederverwendbarkeit von Trisoperl PMGK L 17/05 Amino 222 [Goldberg 2010], 0,2 g Träger, Reaktionsbedingungen: 80 mM Acetophenon, 18 % V V⁻¹ Isopropanol, 1 mM NADH in KP_i-Puffer (0,1 M, pH 7), Reaktionsvolumen 10 mL, 30 °C, kovalente Immobilisierung des Enzyms ADH-´A`.

Die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung in Abbildung 3–3 zeigen, dass die Immobilisierung auf den aminomodifizierten porösen Glasträgern funktioniert hat. Die literaturbeschriebene Aktivität von 185 U g_{Trisoperl-Träger}⁻¹ wurde nicht erreicht, im zweiten Batch (wiederholter Einsatz) liegen die literaturbeschriebene und die im Versuch ermittelte Aktivität mit 132 U g_{Trisoperl-Träger}⁻¹ und 125 U g_{Trisoperl-Träger}⁻¹ in einem vergleichbaren Bereich, so dass aus dem Ergebnis geschlossen werden kann, dass die Methode funktioniert. Die Immobilisierungsausbeute (η_i) wurde nach der Formel 9-4 berechnet (siehe Kapitel 9.5.3.1):

$$\eta_I = \frac{(A_0 \cdot V_0) - (A_1 \cdot V_1) - (A_2 \cdot V_2)}{A_0 \cdot V_0} \cdot 100 \%$$

Von der Aktivität die für das freie Enzym gemessen wurde, wird die Aktivität welche nach der Immobilisierung im Überstand und den Waschfraktionen gemessen wurde, subtrahiert. Für die kovalente Immobilisierung auf den Trisoperl PMGK-Trägern betrug die Immobilisierungsausbeute $\eta_i = 81 \%$. Die Aktivitätsausbeute (η_A) wurde nach der Formel 9-6 berechnet (siehe Kapitel 9.5.3.3):

$$\eta_A = \frac{A_0 - A_1 - A_2}{A_{i_{theoretisch}}} \cdot 100 \%$$

Die Aktivität aus Überstand (A_1) und Waschfraktionen (A_2) wird subtrahiert und durch die theoretische Aktivität (siehe Kapitel 9.5.3.2) dividiert. Die theoretische Aktivität gibt die maximal mögliche immobilisierte Aktivität an, davon ausgehend, dass sich durch die Immobilisierung kein Aktivitätsverlust ergibt. Für die Trisoperl PMGK-Träger betrug diese $\eta_A = 41 \%$, es hat sich demnach ein Aktivitätsverlust von etwa 60 % ergeben.

Bei der Berechnung muss beachtet werden, dass sich bei Verwendung hoher Enzymkonzentrationen für die Immobilisierung ein Fehler ergibt. Da nicht genügend Bindungsstellen auf dem Träger zur Verfügung stehen, liegt die Immobilisierungsausbeute in dem Fall immer $< 100 \%$. Die niedrige Aktivitätsausbeute resultiert allerdings in der kovalenten Immobilisierungsmethode. Durch die kovalente Anbindung verliert ein Teil des Enzyms seine katalytische Aktivität, so dass nach einer kovalenten Immobilisierung nicht die gesamte Aktivität des freien Enzyms in immobilisierter Form wiedergefunden wird. Durch eine kovalente Immobilisierung können hohe Aktivitätsverluste bis zu einem kompletten Verlust an Aktivität auftreten [Cao 2005]. Die in der Literatur für die Immobilisate belegte Wiederverwendbarkeit konnte im Experiment bestätigt werden. Der zusätzliche, hohe Verlust an Aktivität vom ersten auf den zweiten Batch könnte seine Ursache in unzureichend gebundenem Enzym haben, welches durch Waschschrte nach der Immobilisierung nicht hinreichend entfernt wurde und sich während des Versuchs vom Träger ablöst. In der Folge wird aus diesem Grund auch die adsorptive Immobilisierung auf den polyelektrolytbeschichteten Trägern untersucht, um zu ermitteln wie gut die Bindung an den Träger ohne Linkermolekül funktioniert.

3.1.2. Kovalente LbL-Immobilisierung auf Glaträgern

Von dem Projektpartner Surflay-Nanotec wurden poröse Glaspartikel Trisoperl PMGL L 05/11-Träger (Durchmesser 50 - 100 μm , Porendurchmesser 102,6 nm) mit LbL-Beschichtung unterschiedlicher Polyelektrolyte hergestellt und für die Enzymimmobilisierung zur Verfügung gestellt. Mithilfe der im vorangegangenen Kapitel dargestellten Methode wurden Enzyme immobilisiert und die Immobilisate auf Aktivität untersucht. Das Ziel bestand darin eine passende Polyelektrolyt-Beschichtung zu finden, welche eine hohe Aktivität und Stabilität der Immobilisate gewährleistet. Die LbL-Methode findet bei der Immobilisierung von Enzymen bisher keine Anwendung, so dass keine Literaturbeschreibungen zur Verfügung standen. In weiteren Untersuchungen wurden in der Folge die genauen Enzym-

Anbindungsmengen, die Lagerfähigkeit, Temperatur- und pH-Stabilität der Immobilisate ermittelt. In Tabelle 3-1 sind die unterschiedlichen Polyelektrolyt-Beschichtungen aufgeführt, es handelt sich um die Polyanionen: Polystyrolsulfonat (PSS) und Polymethacrylamid (PMAA) und die Polykationen: Polyethylenimin (PEI) und Polyallylamin-Hydrochlorid (PAH).

Tabelle 3-1: Von Projektpartner Surflay Nanotec nach der LbL-Methode beschichtete poröse Trisoperl Glas-Träger (Bezeichnung: PMGK L 05/01) für die kovalente Immobilisierung mittels GDA.

Bezeichnung	Beschichtung	Aminogruppen/ Träger [mmol/g]
SHU 100	Amino-Silanisierte Referenzpartikel	1.1
SHU 201	PAH 15 000	0.32
SHU 301	PAH 15 000	0.32
SHU 402	PAH 15 000, PMAA 100 000	k.A.
SHU 503	PAH 15 000/PSS 70 000/PAH 15 000	k.A.
SHU 136	PAH 15 000	0.32
SHU 138	PAH 15 000/PSS 30 000/PAH 15 000	k.A.
SHU 139	PEI 25 000	k.A.

Die Immobilisierung und die Aktivitätstests wurden alle nach der gleichen Methodik durchgeführt, so dass eine Vergleichbarkeit der Versuche untereinander möglich ist (siehe auch 9.5.1 und 9.5.2). Zu allen beschichteten Trägern wurde nach der Aktivierung ein Überschuss an Enzym gegeben, so dass von einer maximalen Enzymanbindung ausgegangen werden kann. Das Enzymaktivitätsscreening nach kovalenter Immobilisierung auf den unterschiedlichen Polymerbeschichtungen ist im Folgenden dargestellt:

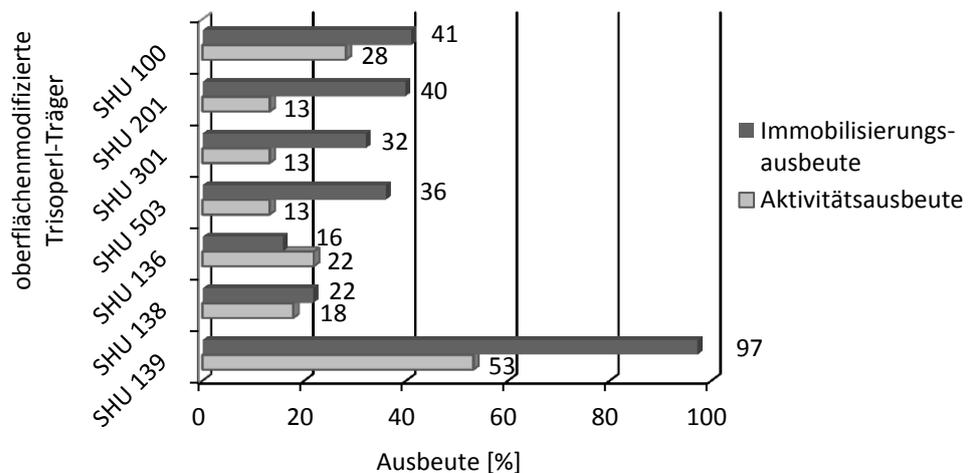


Abbildung 3-4: Immobilisierungs- und Aktivitätsausbeute ADH-A', mit modifizierten Trisoperl-Trägern von Surflay Nanotec, Bedingungen: 80 mM Acetophenon, 18 % V V⁻¹ Isopropanol, 1,0 mM NADH in KP_i-Puffer (0,1 M,

pH 7,0), Reaktionsvolumen 10 mL, 30 °C, Immobilisierung von etwa 0,3 U mg⁻¹ Enzymträger.

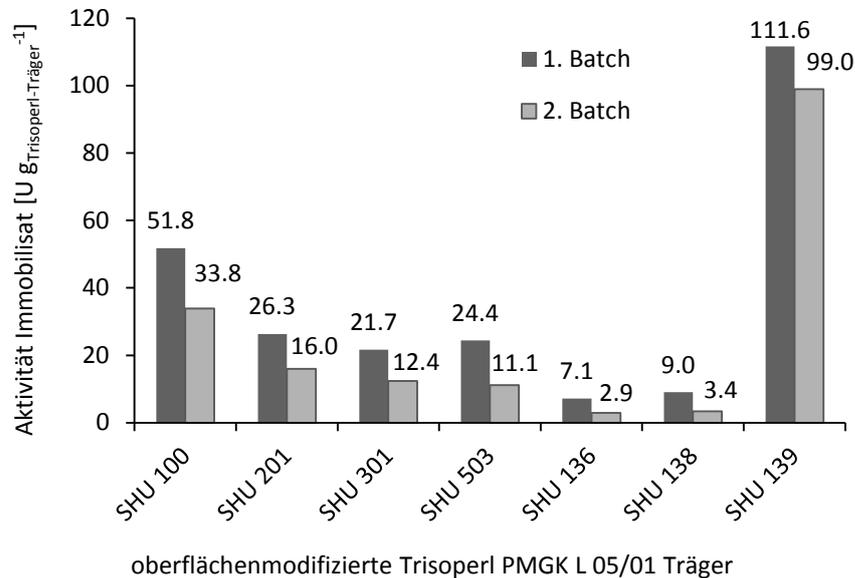


Abbildung 3–5: Repetitive-Batch-Versuche mit Immobilisaten, Verwendung der oberflächenmodifizierten Trisoperl Träger von Surflay Nanotec, 2 mL einer 10 % V V⁻¹ Suspension der Träger in Wasser, Reaktionsbedingungen: 80 mM Acetophenon, 18 % V V⁻¹ Isopropanol, 1,0 mM NADH in KP_i-Puffer (0,1 M, pH 7,0), Reaktionsvolumen 10 mL, 30 °C.

Die Enzymimmobilisierung war auf allen modifizierten Trägern möglich (siehe Abbildung 3–4), die Ergebnisse sind jedoch sehr inhomogen. Die niedrigen Aktivitätsausbeuten weisen auf einen Aktivitätsverlust durch die Art der Immobilisierung hin. Die Immobilisierungsausbeute liegt für die meisten Träger sehr niedrig, dies hängt unter anderem mit der anfänglich eingesetzten, sehr hohen Menge an Enzymlösung zusammen, wodurch ein hoher Überschuss an Aktivität im Überstand resultierte.

Eine sehr hohe Immobilisierungsausbeute mit 97 % und einer Aktivitätsausbeute von 53 % weisen die SHU139 Partikel auf (Polyethyleniminbeschichtung 25 000 Da). Diese Partikel zeigen im Batchversuch die höchste Aktivität in Units pro Gramm Träger. Die zweithöchste Aktivität und Immobilisierungsausbeute weisen die Referenzpartikel SHU100 (silanierte Glaspartikel, Trisoperl) auf. Die Aminogruppendichte dieser Partikel ist dreimal so hoch wie die der Partikel SHU201, 301 und 136, deren gemessene Aktivität den Erwartungen entsprechend niedriger liegt, wobei die Aktivität auf den SHU136 Partikeln mit 7,1 U gTräger⁻¹ sehr gering ausfällt. Insgesamt ist die nach der Immobilisierung auf den Trägern gemessene Aktivität sehr niedrig und die Enzymaktivität im Überstand sehr hoch. Damit wird deutlich, dass sich nicht alle Beschichtungen für eine gute Anbindung

der Enzyme eignen. Da die Aktivierung und Immobilisierung mit Glutardialdehyd eine etablierte Standardmethode für Träger mit Aminogruppen darstellt, kann davon ausgegangen werden, dass das Linkermolekül grundsätzlich geeignet ist. Auffällig sind die Aktivitätsverluste im Repetitive-Batch Versuch (Abbildung 3–5), die zwischen 35 % und 63 % liegen und auf einen Verlust an Enzym hinweisen. Der Aktivitätsverlust wurde auch bei der Immobilisierung mit kommerziellen Trägern beobachtet (siehe Versuch 3.1.1) und ist mit einem Verlust an nicht hinreichend gebundenem Enzym zu erklären. Eine weitere Erklärung könnte eine neben der kovalenten Anbindung zusätzlich auftretende adsorptive Anbindung von Enzymen sein. Vor und zwischen den einzelnen Versuchen wurde das Immobilisat mit Puffer gespült um lose oder schwach gebundene Enzyme zu entfernen und die Waschlösung auf Enzymaktivität untersucht, ohne dabei eine Ablösung von Enzymen zu messen. In weiteren Versuchen wurde deshalb untersucht, ob eine adsorptive Immobilisierung auf den Trägern überhaupt möglich ist. Aufgrund des guten Ergebnisses mit den SHU139 Trägern (PEI-Beschichtung), wurden weitere Versuche zur Bestätigung der Ergebnisse mit PEI-beschichteten Trägern durchgeführt und es wurden Variationen der PEI-Beschichtung näher untersucht.

3.1.3. Charakterisierung der PEI-Beschichtung

Polyethylenimin (PEI) ist das Polymerisationsprodukt des Ethylenimins und stellt ein verzweigtes basisches und wasserlösliches Molekül dar. Aufgrund der guten Enzymanbindung auf der PEI-Beschichtung wurden weitere Immobilisierungen auf Variationen der PEI-Beschichtung mit unterschiedlichem Molekulargewicht und unterschiedlicher Schichtenfolge untersucht (siehe Tabelle 3-2). Dafür wurden neben der ADH-‘A` auch eine weitere Alkohol-Dehydrogenase ADH 1.1.200 des Projektpartners evocatal GmbH immobilisiert, um die Eignung für weitere Enzymsysteme zu belegen. Für die Versuche wurde 60 mg mL^{-1} Lyophilisat in Triethanolamin-Puffer (TEA-Puffer) gelöst und auf die mit Glutardialdehyd aktivierten Partikel gegeben. Für die Enzymstammlösung wurde eine Aktivität von 235 U mL^{-1} mit Acetophenon als Substrat gemessen. Für die Versuche wurde mit einer hohen Enzymkonzentration gearbeitet um eine maximale Immobilisierung zu erzielen.

Tabelle 3-2: Kovalente Immobilisierung von ADH auf vom Projektpartner Surflay Nanotec nach der LbL-Methode mit Polyethylenimin (PEI) beschichteten Trisoperl-Trägern, Typ: PMGK L 05/01, Substrat 60 mM Acetophenon, Standardaktivitätstest bei 30 °C.

Partikel	Beschichtung und Molekulargewicht des Polymers [Kg/mol]	Aktivität [U]
SHM513	PEI 800 / PSS / PEI 800	13,7
SHM521	PEI 800	13,5
SHM533	PEI 2000 / PSS / PEI 2000	39,2
SHM541	PEI 2000	38,6
SHM553	PEI 25000 / PSS / PEI 25000	37,03
SHM561	PEI 25000	31,1
SHM573	PEI 75000 / PSS / PEI 75000	24,1
SHM581	PEI 75000	34,2

Das Ergebnis in Tabelle 3-2 zeigt Enzymaktivität auf allen Trägern und belegt die Verwendbarkeit von PEI zur Enzymanbindung. Für die Mischbeschichtung SHM533 mit PEI 2000 / PSS / PEI 2000, wurde eine Aktivität von 39,2 U und für die reine PEI-Beschichtung PEI 2000 (SHM541) eine Aktivität von 38,6 U gemessen (siehe Abbildung 3–6). Beide Beschichtungstypen zeigten im Versuch die höchste Aktivität. Für die in Kapitel 3.1.2 getestete PEI 25000 Beschichtung (SHM561), wurde eine Aktivität von 31,1 U gemessen.

sen. Die PEI 75000 Beschichtung (SHM581) zeigte mit 34,2 U eine Aktivität die in einem vergleichbaren Bereich liegt.

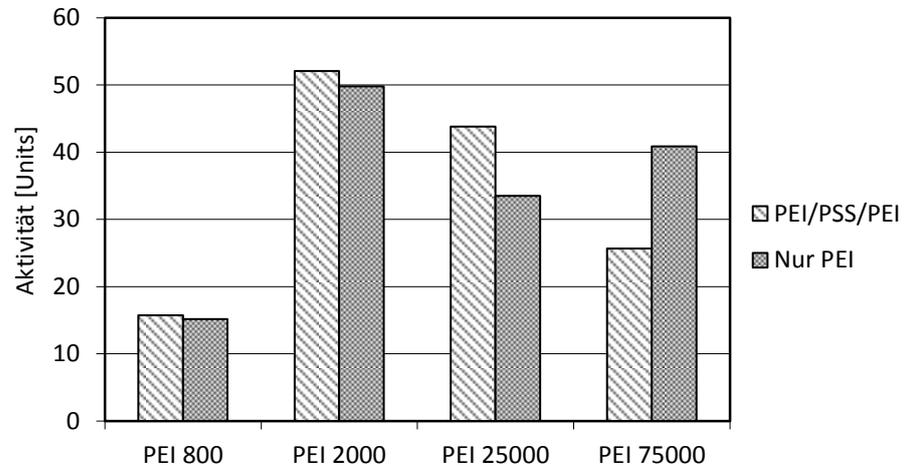


Abbildung 3–6: Enzymimmobilisierung mit ADH 1.1.200 auf unterschiedlichen PEI-Polymeren (Variation des Molekulargewichts), Träger: Trisoperl, Reaktionsbedingungen: Standardaktivitätstest TEA-Puffer 20 mM mit Acetophenon 60 mM, 10 % V V⁻¹ Isopropanol, V = 10mL, 30 °C. Immobilisierungsausbeuten > 91 %.

3.1.4. Stabilität in organischen Lösungsmitteln

Die Verwendung von Enzymträgern in organischen Lösungsmitteln kann z. B. zum Quellen der Träger führen. Da die Polyelektrolytbeschichtung in der Enzymimmobilisierung noch nicht verwendet wird, kann nicht auf Literaturdaten zurückgegriffen werden. Bei porösen Glasparkeln kann hingegen davon ausgegangen werden, dass sich diese inert verhalten und keine Reaktionen eingehen. Versuche mit Enzymsubstratlösung bestätigten diese Annahme, es wurde keine Produktbildung durch Trägerkatalyse gemessen. Die LbL-oberflächenmodifizierten Träger wurden über mehrere Tage in organischen Lösungsmitteln gelagert (untersucht wurden *tert*-Butylmethylether, Essigsäureethylester, Toluol und ein Substratmix aus 1 mL Toluol und 30 µL Acetophenon, um Substratumsatz durch Trägerkatalyse auszuschließen). Die Überstände wurden anschließend gaschromatographisch vermessen und mit dem Spektrum des jeweiligen reinen Lösungsmittels verglichen, es wurde keine Konzentrationsänderung der Stoffe oder die Bildung neuer Peaks detektiert. Sowohl die gemessenen Spektren, als auch die Träger zeigten keine Auffälligkeiten. Es wurde auch kein Ablöseverhalten der Beschichtung beobachtet. In der Folge wurde mit dem Immobilisat auch im organischen Medium gearbeitet.

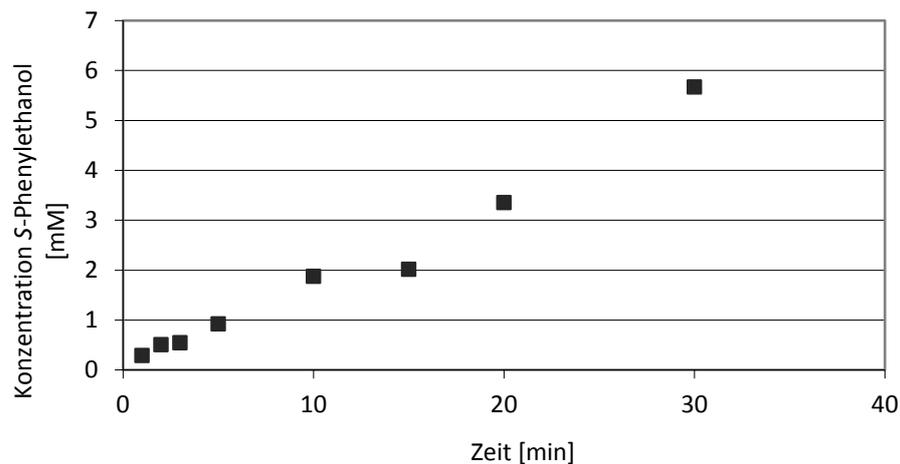


Abbildung 3–7: Produktzunahme in *tert*-Butylmethylether mit adsorptiv immobilisierter ADH 1.1.200 auf PEI 100 μm Partikeln (Lyophilisatkonzentration für Immobilisierung 60 mg mL^{-1}), 100 μL 1 mM NADH, 8830 μL puffergesättigtem *t*-Butylmethylether, Substrat: Acetophenon 60 mM, 10 % V V^{-1} Isopropanol, $t = 30$ $^{\circ}\text{C}$, $V = 10$ mL, 250 rpm, $n = 2$ (+/- 0,11), Aktivität Immobilisat: 9,2 U g^{-1} .

Im Versuch wurde der Einsatz immobilisierter ADH 1.1.200 auf oberflächenmodifizierten PEI-Trägern in organischem Lösungsmittel untersucht (Abbildung 3–7). Es zeigte sich ein niedrigerer Umsatz als im wässrigen System, da das Enzym in organischem Lösungsmittel grundsätzlich eine niedrigere Aktivität aufweist (bei gleichen Testbedingungen). Diffusionslimitierung und Grenzflächenphänomene wurden außer Acht gelassen. Sobald Substrate umgesetzt werden sollen, die eine schlechte Wasserlöslichkeit aufweisen, ist der Einsatz organischer Lösungsmittel als Reaktionsmedium eine gute Alternative [Gonzalo *et al.* 2007 a]. Dafür muss die Katalysatordichte allerdings hoch genug gewählt werden, um ökonomische Umsätze realisieren zu können.

3.1.5. Effektivitätsfaktor

Um das Verhältnis von trägergebundenem zu freiem Biokatalysator im Experiment zu vergleichen, kann anstelle der Aktivitätsausbeute der Wirkungsgrad (die Effektivität η) bestimmt werden. Dieser beruht auf der Beobachtung, dass gleiche Konzentrationen an freiem gegenüber gebundenem Biokatalysator in Lösungen mit der gleichen Substratkonzentration eine abweichende Umsatzgeschwindigkeit erreichen [Buchholz *et al.* 1995]. Im Experiment wurde eine Aktivitätsmessung mit freiem Enzym durchgeführt und dieselbe Menge Enzym auf Trisopor-Trägern (200 mg, optimale Trägermenge für die Anbindung) kovalent immobilisiert (nach der Standardmethode siehe 9.5.2) und nach derselben Methode vermessen.

Der stationäre Effektivitätsfaktor berechnet sich nach:

$$\eta = \frac{\text{Anfangsgeschwindigkeit immobilisierter Biokatalysator}}{\text{Anfangsgeschwindigkeit freier Biokatalysator}} = \frac{v_{Ai}}{v_f} \quad \text{Formel 3-1}$$

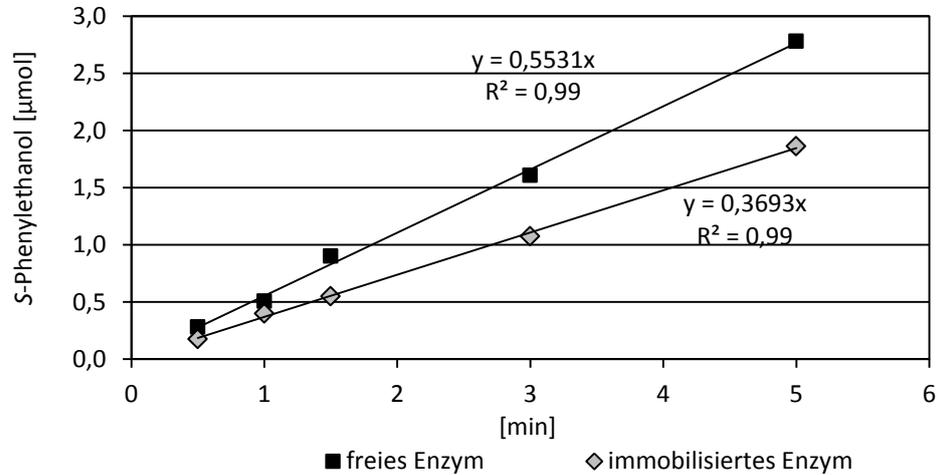


Abbildung 3–8: Vergleich der Aktivität von freiem gegenüber kovalent mittels Glutar-dialdehyd immobilisiertem Enzym ADH-´A` in KP_i-Puffer 0,1 M, pH 7, 200 mg, Substrat 60 mM Hexandion, T = 30°C, V = 1 mL, Träger: Trisopor (Partikelgröße 100-200 µm, Porengröße 49 nm) mit PEI 25000 Beschichtung.

Demnach ergibt sich ein stationärer Effektivitätsfaktor von $\eta = 0,67$.

Dieser beschreibt den beobachteten Aktivitätsverlust durch die kovalente Immobilisierung des Enzyms ADH-´A`. Der Verlust an Aktivität ist bereits aus der Abbildung 3–8 ablesbar. Für die Methode der kovalenten Immobilisierung ergibt sich für das Enzym ADH-´A` ein Aktivitätsverlust von 33 %, ein Hinweis darauf, warum die Aktivitätsausbeute in den vorhergehenden Versuchen nicht an das Maximum von 100 % heranreichte. Der Aktivitätsverlust durch kovalente Immobilisierung wird in der Literatur immer wieder beschrieben [Cao 2005]. Durch die Verschiedenartigkeit der Enzymoberfläche (bzw. der Aminosäurezusammensetzung) und der unterschiedlichen Trägermaterialien, lässt sich dieser nicht genau beziffern und muss für jedes Enzym mit dem jeweiligen Trägermaterial experimentell ermittelt werden.

3.1.6. Immobilisierungsdauer

Zur Bewertung der Immobilisierungsdauer nach Aktivierung der Träger mit Glutar-dialdehyd wurden kovalente Immobilisierungen der ADH-´A` auf PEI 25000 beschichteten Trisopor-Trägern (Partikelgröße 100-200 µm, Porengröße 49 nm) über unterschiedliche Zeitdauer durchgeführt. Sämtliche Arbeitsschritte und Konzentrationen waren für alle Ansätze identisch. Die ei-

gentliche Anbindung der Enzyme wurde bei 4 °C auf einem Rotationschüttler mit 100 rpm durchgeführt.

Tabelle 3-3: Variation der Immobilisierungsdauer (1-3 Stunden) und erzielte Aktivität des Immobilisates bei anschließender Messung, sowie theoretische Aktivität und Proteingehalt von Überstand und Waschfraktion, Träger je Ansatz 0,2 g Trisopor mit PEI 25000 Beschichtung, 5 mL partiell gereinigte Enzymlösung ADH-A` 8 U mL⁻¹, Aktivitätsmessung mit Acetophenon 60 mM bei 30 °C (Standardbedingungen). Immobilisierungsausbeute wurde errechnet über Proteingehalt im Überstand und Waschfraktion.

Immobilisierungsdauer [Std]	Units [U g ⁻¹ Träger]	Immobilisierungsausbeute η_i
1	157,3	100
2	161,4	98
3	151,7	92

Aus den Daten in Tabelle 3-3 ist ersichtlich, dass die Immobilisierung bei einer Immobilisierungsdauer von 1 Stunde abgeschlossen ist. Die höchste gebundene Aktivität wurde für eine Immobilisierungsdauer von 2 Stunden gemessen. Das Experiment zeigt, dass nach einer Immobilisierungsdauer von 1 - 2 Stunden eine hohe Beladung der aktivierten Träger mit Enzym resultiert. Die Abweichung nach 3 Stunden kann ihre Ursache in einem Proteinverlust durch Scherkräfte haben.

3.1.7. Beladungsmenge für ADH

Zur Ermittlung der geeigneten Enzymmenge für die kovalente Immobilisierung wurde lyophilisierte ADH 1.1.200 (evocatal GmbH, Proteingehalt: 0,23 mg mL⁻¹) in definierter Konzentration in Puffer gelöst und auf PEI 25000 oberflächenmodifizierten Trisoperl-Trägern immobilisiert. Anschließend wurde im Standardaktivitätstest die Aktivität bestimmt. Als Ergebnis ergibt sich die Aktivität in Abhängigkeit der jeweiligen eingesetzten Lyophilisatmenge (siehe Abbildung 3–9). Zusätzlich wurden die Immobilisierungs- und die Aktivitätsausbeuten bestimmt.

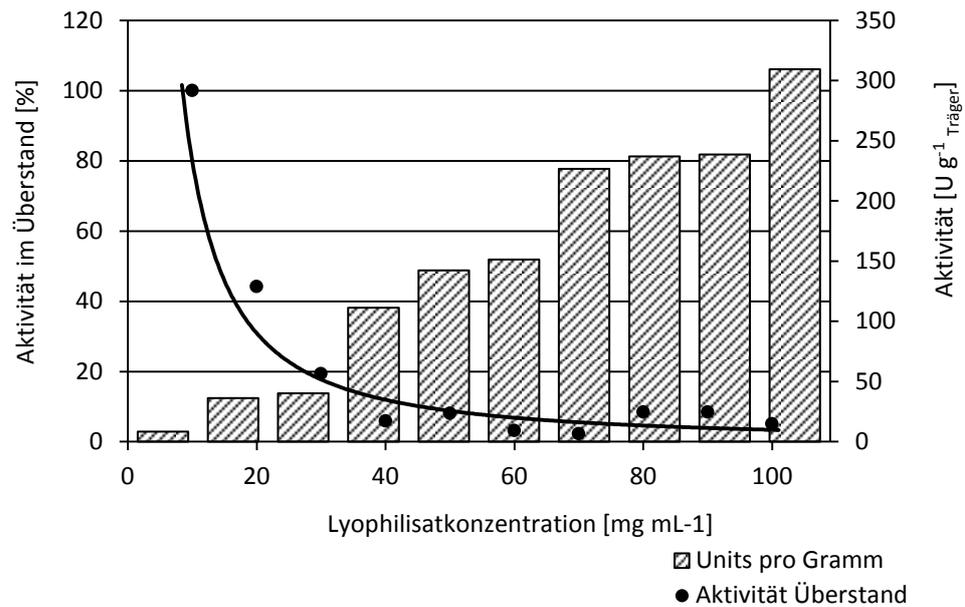


Abbildung 3-9: Enzym ADH 1.1.200 kovalent immobilisiert auf Surflay Partikeln Trisoperl mit PEI 25 000 Beschichtung. Abhängigkeit der Aktivität von der eingesetzten Enzymkonzentration. Reaktionsbedingungen: 80 mM Acetophenon, 10 % V V⁻¹ Isopropanol, 1 mM NAD⁺ in TEA-Puffer (20 mM, 1,15 mM MgCl₂, pH 7). Reaktionsvolumen: 10 mL, 30 °C.

Der Versuch zur Anbindungsmenge zeigte eine steigende Enzymaktivität bei steigender Lyophilisatmenge (Abbildung 3-9) und bestätigte damit die Erwartung, dass eine Erhöhung der Enzymkonzentration zu einer höheren Beladung der Träger mit Enzym führt. Wie aus der Abbildung auch ersichtlich ist, findet sich bei allen Ansätzen eine messbare Menge Protein im Überstand und wird nicht gebunden. Dies kann verschiedene Ursachen haben. So könnten alle Bindungsstellen belegt sein oder aber es kommt zu einem Wiederablösen von Enzym während der Immobilisierung.

Tabelle 3-4: Immobilisierungs- und Aktivitätsausbeute zur Bestimmung der Anbindungsmenge bei Variation der Lyophilisatkonzentration.

Aktivität Lyophilisat [mg mL ⁻¹]	Immobilisierungs-Ausbeute [%]	Aktivitätsausbeute [%]
10	-	-
20	55,8	32,5
30	80,6	16,7
40	94,1	29,5
50	91,9	31,0
60	96,8	26,0
70	97,8	33,1
80	91,5	32,4
90	91,5	28,9
100	94,9	32,6

Aus den Daten der Immobilisierungs- und Aktivitätsausbeuten (Tabelle 3-4) ist erkennbar, dass sich bereits bei einer Lyophilisatkonzentration von

70 mg mL⁻¹ eine hohe Immobilisierungsausbeute und eine hohe Aktivitätsausbeute ergeben, die in der Folge unter Verwendung höherer Lyophilisatkonzentrationen kaum noch gesteigert werden konnte. In weiteren nicht dargestellten Versuchen wurde bestätigt, dass eine Lyophilisatkonzentration > 100 mg mL⁻¹ eine weitere geringfügige Steigerung der Aktivität auf den Trägern ergibt. Bei den Versuchen war jedoch keine eindeutige Sättigung feststellbar.

3.1.8. Charakterisierung des Immobilisates

Neben der Wiederverwendbarkeit und einer hohen Aktivität und Stabilität der Immobilisate, kann durch die Immobilisierung die pH- und die Temperaturstabilität beeinflusst werden [Cao 2005]. Diese Versuche sind im Folgenden dargestellt.

3.1.9. Einfluss des pH-Wertes

In der Literatur finden sich Angaben zur Aktivität und Stabilität in Abhängigkeit des pH-Wertes für das freie Enzym ADH-A'. Der pH-Bereich in welchem die höchste Aktivität für die Reduktionsreaktion erzielt wurde, liegt bei pH 6,5 und bei pH 9,0 für die Oxidationsreaktion [Kosjek *et al.* 2004]. Es wurden Versuche zur Reduktionsreaktion mit immobilisierter ADH-A' und dem Substrat *rac*-2,5-Hexandion bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt.

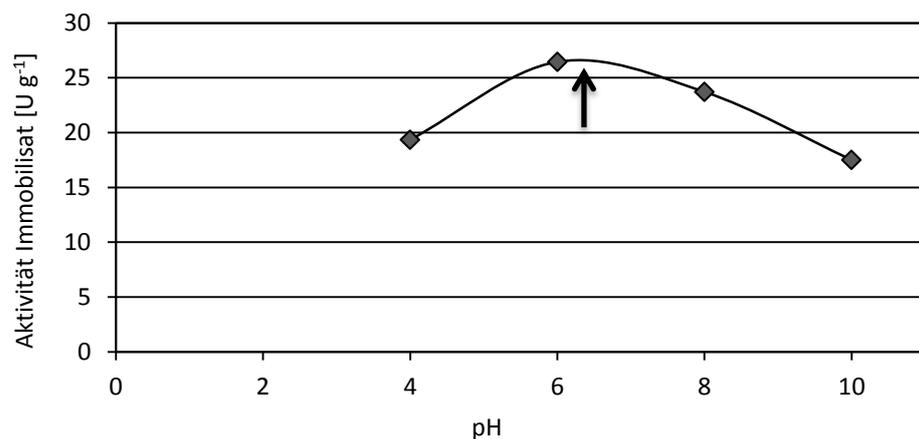


Abbildung 3–10: Einfluss des pH-Werts auf die Aktivität immobilisierter ADH-A' (Trisopor Partikel mit PEI 25 000 Beschichtung), Substrat 60 mM 2,5-Hexandion, 30 °C, V = 1 mL, (n = 2), 15 mg Immobilisat je Experiment.

Für die untersuchte Reduktionsreaktion zeigt sich keine Verschiebung des pH Maximums von 6,5 (Abbildung 3–10), eingezeichneter Pfeil (Kosjek *et al.* 2004]. Für die kovalente Immobilisierung der ADH-A' auf polyethyl-

enimin-beschichteten Trägern wurde keine Veränderung des pH-Maximums für die Reduktionsreaktion gemessen.

3.1.10. Einfluss der Temperatur

Ein Nachteil von Biokatalysatoren ist häufig deren Instabilität bei Temperaturen $> 50\text{ °C}$. Eine Erhöhung des Temperaturtoleranzbereiches durch eine Immobilisierung kann das Enzym für einen industriellen Einsatz attraktiver machen [Cao 2005]. In der Literatur wird für die freie ADH-A von einem „optimalen Temperaturbereich“ zwischen $30 - 50\text{ °C}$, mit einer Halbwertszeit von 35 h bei 50 °C berichtet [Kosjek *et al.* 2004].

Im Versuch wurde die Aktivität von freiem Enzym und von Immobilisat bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht. Sämtliche Reaktionsbedingungen wurden konstant gehalten und nur die Temperatur wurde variiert.

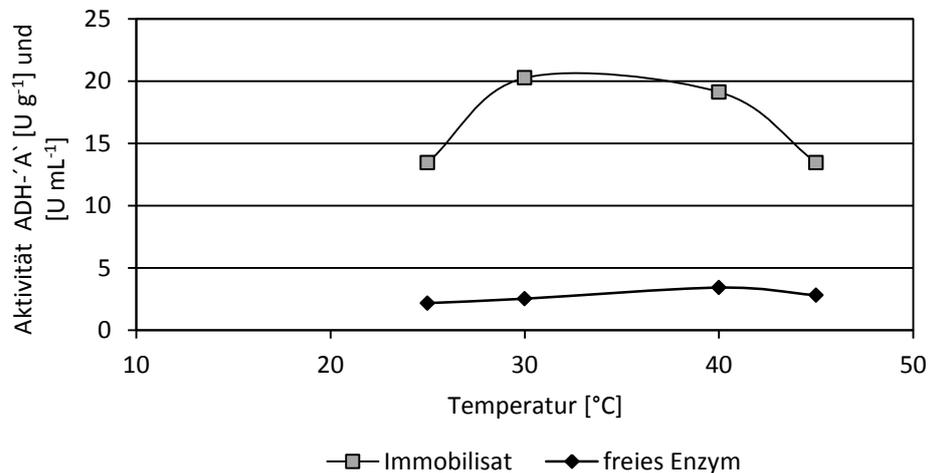


Abbildung 3–11: Bestimmung des Einflusses der Temperatur auf die Aktivität immobilisierter ADH-A (Trisopor Partikel mit PEI 25 000 Beschichtung), Substrat 60 mM Hexandion in KP_i-Puffer 0,1 M, pH 7, 1 mM NADH, V = 1 mL, untersucht wurde die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit (t = 10 Min). Je 20 mg Immobilisat bzw. 400 μ L Enzymlösung je Experiment, (n = 2).

Die Ergebnisse zur Bestimmung des Temperaturbereichs mit der höchsten Aktivität (Abbildung 3–11) zeigen, dass sich die höchste Aktivität für das Immobilisat für etwa 30 °C ergibt, für das freie Enzym lag diese bei 40 °C . Die Abweichung ist allerdings minimal und liegt im Bereich des Fehlers. Die Aktivitäten liegen in dem für die ADH-A literaturbeschriebenen Bereich von $30 - 50\text{ °C}$ [Kosjek *et al.* 2004]. Inwieweit Diffusionslimitierungsphänomene am Träger das Ergebnis beeinflussen, sollte Gegenstand weiterer Versuche sein.

3.2. Immobilisierung auf Fällungskieselsäuren

Poröse Glaspartikel stellen aufgrund der porösen Oberfläche mit definiert einstellbaren Poren und des inerten Materials eine geeignete Immobilisierungsgrundlage dar. Der Herstellungsprozess ist allerdings verhältnismäßig teuer und aufwendig. Als Alternative, und um die Übertragbarkeit der Polyelektrolyt-Beschichtung auf kostengünstige Träger zu belegen, wurde diese auf Fällungskieselsäuren (Sipernate[®]) unterschiedlicher Durchmesser aufgetragen und die Fähigkeit zur Bindung von Enzymen untersucht. Fällungskieselsäuren zeichnen sich durch ihre große makroporöse Oberfläche und die Fähigkeit zur Bindung großer Flüssigkeitsmengen aus [Evonik-industries 2009]. Sipernate sind in unterschiedlicher Beschaffenheit und Porosität kommerziell erwerbbar und finden unter anderem Anwendung im Lebensmittelbereich z.B. zur Trägerung von Vitaminen, dem Eindicken von Lösungen und vielem mehr. Untersucht wurden sowohl die adsorptive als auch die kovalente Immobilisierung.

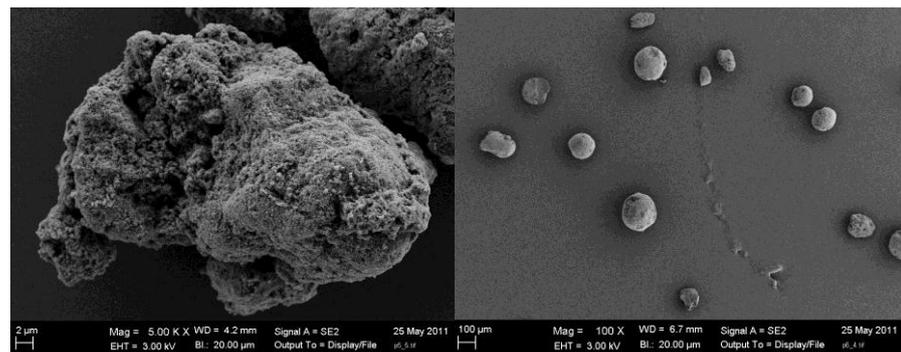


Abbildung 3–12: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen, LbL-beschichtete Fällungskieselsäuren, links oberflächenmodifizierte 50 µm Partikel mit immobilisierter ADH 1.1.200 bei 5.000-facher Vergrößerung, rechts 100 µm Partikel bei 100-facher Vergrößerung (eigene Aufnahmen).

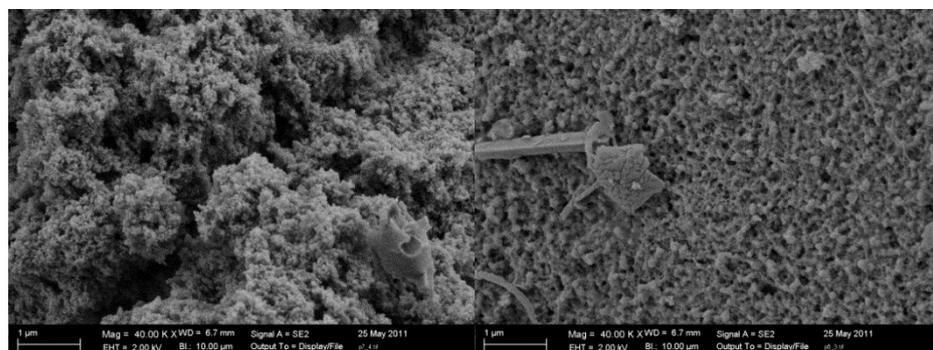


Abbildung 3–13: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen, LbL-beschichtete Oberflächen der Fällungskieselsäuren, links 300 µm Partikel mit immobilisierter ADH 1.1.200 bei 40.000-facher Vergrößerung, rechts 700 µm Partikel mit immobilisierter ADH 1.1.200 bei 40.000-facher Vergrößerung (eigene Aufnahmen).

Auf den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 3–12 und Abbildung 3–13) ist die makroporöse Oberfläche der Sipernate gut erkennbar. Es handelt sich um eine makroporöse, inhomogene Oberfläche, welche eine gute Anbindung der Enzyme ermöglicht. Da ein einzelnes Enzym der Alkohol-Dehydrogenase einen Durchmesser von etwa 6 Nanometern besitzt [Goldberg 2010], ist dieses auf den Aufnahmen nicht identifizierbar.

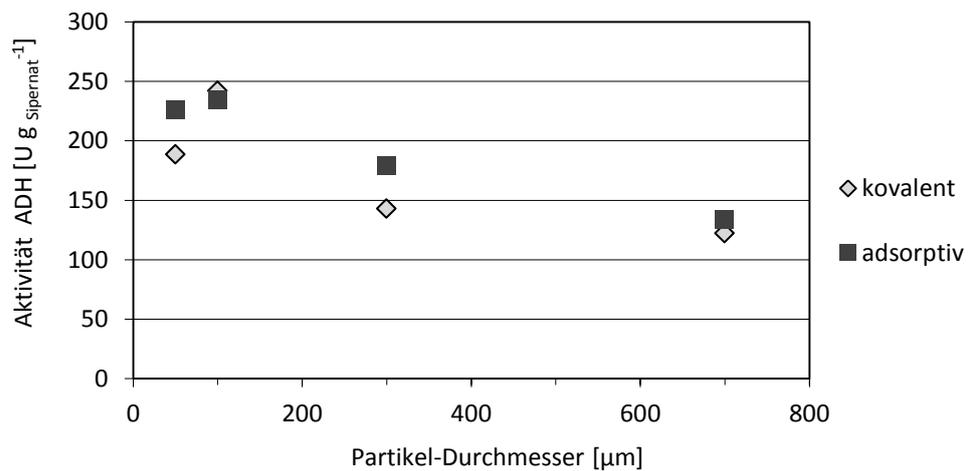


Abbildung 3–14: Enzymimmobilisierung ADH 1.1.200 adsorptiv und kovalent auf LbL-beschichteten Fällungskieselsäuren unterschiedlicher Durchmesser mit PEI 25 000-Polymerbeschichtung. Immobilisierung mit 5 % V V⁻¹ Glutardialdehyd (GDA), 1 Stunde aktiviert. Immobilisierung für 3 Stunden, 150 rpm, 4 °C. Lyophilisatkonzentration 60 mg mL⁻¹, Substrat Acetophenon 60 mM, 10 % V V⁻¹ Isopropanol, TEA-Puffer 20 mM, pH 7, V = 10 mL.

Aus der graphischen Auftragung (Abbildung 3–14) ist ersichtlich, dass die höchste Aktivität der Immobilisate von 242 U g⁻¹ für die modifizierten Sipernate mit 100 μm Durchmesser erzielt wurde. Ein gutes Ergebnis weisen auch die 50 μm Sipernatpartikel mit 189 U g⁻¹ auf. Im Vergleich zu den in Kapitel 3.1.1 oder Kapitel 3.1.2 erzielten Enzymaktivitäten, die alle < 200 U g⁻¹ betragen, zeigten die Immobilisierungsergebnisse auf den Sipernaten insgesamt eine relativ hohe Aktivität. Dabei weisen die kovalente Anbindung mittels Glutardialdehyd und die adsorptive Anbindung ohne Verwendung von Linkermolekülen Enzymaktivitäten im vergleichbaren Bereich auf. Weitere Versuche zeigten allerdings, dass die kovalente Anbindung aufgrund ihrer Stabilität die prozessrelevante Methode darstellt. Bei der adsorptiven Immobilisierung wurden höhere Enzymverluste bei Einsatz unter Repetitive-Batch Bedingungen (Kapitel 3.3.1) oder bei Einsatz im Reaktor beobachtet (Kapitel 3.3.2).

Tabelle 3-5: Ergebnisse zur Messung der Immobilisate auf beschichteten Fällungskieselsäuren, Reaktionsbedingungen siehe Abbildung 3–14.

Fällungskiesel-säure	Bezeichnung	kovalent		adsorptiv	
Durchmesser [μm]	Sipernat	Aktivität [U]	Aktivität [U g^{-1}]	Aktivität [U]	Aktivität [U g^{-1}]
50	50	24	189	45	226
100	22	49	242	47	235
300	2200	29	143	36	179
700	700	25	122	27	134

Eine detaillierte Übersicht gibt Tabelle 3-5, aus der ersichtlich wird, dass für die 700 μm Sipernate für beide Immobilisierungsarten die geringste Aktivität erzielt wurde. Da es sich um die Partikel mit dem größten Durchmesser handelt, weisen diese eine geringere verfügbare Oberfläche auf und binden deshalb erwartungsgemäß weniger Enzym. Für den Einsatz im Prozess kommen den Ergebnissen nach die Sipernate mit den Durchmessern 50 μm und 100 μm in Frage, diese zeigten die höchsten Aktivitäten. Aufgrund der insgesamt sehr hohen Aktivitäten nach der Immobilisierung, kann davon ausgegangen werden, dass die grundsätzliche Übertragbarkeit der LbL-Beschichtung auf günstigere Trägerstoffe funktioniert. Die LbL-beschichteten Sipernate eignen sich offenbar trotz Fehlen von mikroporösen Porensystemen sehr gut zur Immobilisierung von Enzymen. Dabei muss in Frage gestellt werden, in wieweit die Mikroporen nach der Beschichtung noch zur Enzymanbindung zur Verfügung stehen. Durch die Beschichtung mit Polyelektrolyten ist eine Veränderung der Oberfläche der Träger zu erwarten. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Beschichtung auch einen Einfluss auf die Poren der Träger hat, indem zum Beispiel besonders kleine Poren verschlossen werden. Dies wurde mittels BET-Messungen [Brunauer *et al.* 1938] über die Adsorption von Stickstoff bestimmt und die Daten mit den unbeschichteten kommerziellen Sipernaten verglichen.

Tabelle 3-6: Ergebnisse zur Untersuchung der Oberfläche nach BET (gemessen vom Projektpartner Süd-Chemie AG), Gegenüberstellung von unbeschichteten (kommerziellen) Sipernaten und LbL-beschichteten Sipernaten.

Probe	kommerziell	beschichtet	Abweichung durch Beschichtung [%]
	BET [$\text{m}^2 \text{g}^{-1}$]	BET [$\text{m}^2 \text{g}^{-1}$]	
Sipernat 50	391	253	35
Sipernat 22	171	151	12
Sipernat 2200	183	155	15
Sipernat 700 - experimentell	176	153	13

Die Ergebnisse zur BET-Messung in Tabelle 3-6 zeigen, dass durch die Beschichtung mit Polyelektrolyten die spezifische Oberfläche abnimmt. Die prozentuale Abnahme ist in der letzten Tabellenspalte dargestellt. In der folgenden Graphik sind die Werte zum direkten Vergleich noch einmal dargestellt:

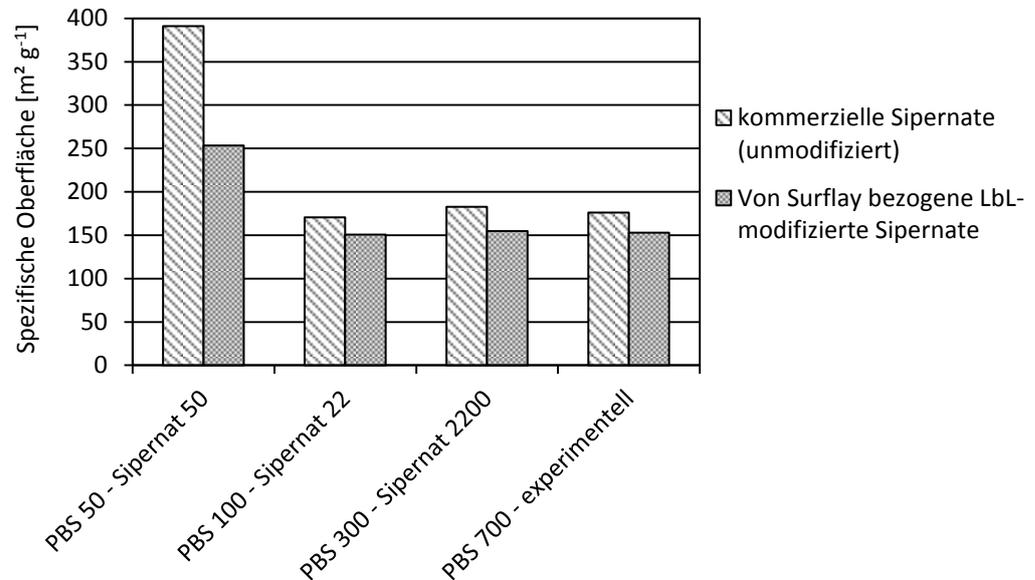


Abbildung 3–15: Bestimmung der spezifischen Oberfläche mithilfe der BET-Methode, Trägermaterial: kommerzielles Sipernat und Sipernat mit PEI 25 000 Beschichtung im Vergleich.

Wie aus Abbildung 3–15 ersichtlich, beeinflusst die Beschichtung mit Polyelektrolyten die spezifische Oberfläche der Träger, diese nimmt für drei der Sipernate geringfügig ab. Die Abweichung für die Sipernat 50 Partikel ist mit 35,2 % relativ hoch, während die Abweichung für alle weiteren Partikel zwischen 11,7 % und 15,4 % (siehe Tabelle 3-6) liegt. Aufgrund der externen Messung und der geringen Trägermenge, wurde die Messung nur einmal durchgeführt, weshalb die Abweichung der Sipernat 50 μm Partikel nicht abschließend geklärt werden konnte. Aufgrund der Datenlage kann davon ausgegangen werden, dass sich durch eine Beschichtung der Träger mittels Polyelektrolyten eine geringfügige Einbuße an verfügbarer Oberfläche ergibt. Um diese Auswirkung weitgehend gering zu halten, ist die Beschichtung mit wenigen Polyelektrolytschichten durchzuführen. Dieser Sachverhalt sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein, auch um endgültig zu klären, inwieweit eine Mehrfach-Polyelektrolytbeschichtung die Mikroporen von Partikeln verschließt.

3.3. Stabilität des Immobilisates

Ein wichtiges Kriterium für die Verwendung des immobilisierten Biokatalysators und dessen Wirtschaftlichkeit im Prozess stellen die Anwendung unter Prozessbedingungen und die Langzeitstabilität dar. Diese sind Gegenstand der folgenden Versuche. Bei den untersuchten Trägern handelt es sich um Träger mit Polyethylenimin-Beschichtungen, da sich diese in den vorhergehend dargestellten Versuchen als geeignet erwiesen haben.

3.3.1. Repetitive-Batch Versuche

Zur Untersuchung der Wiederverwendbarkeit und Stabilität der Immobilisate auf PEI-beschichteten porösen Glasträgern, wurden diese mehrfach eingesetzt. Nach jedem Versuch wurde das Reaktionsmedium ausgetauscht und die Träger mit Puffer gespült, um gelöste Enzyme und überschüssige Substratlösung zu entfernen.

Zum Einsatz kamen LbL-PEI 25000 modifizierte poröse Glasträger, die in ersten Versuchen schon eine hohe Anbindungsfähigkeit zeigten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3–16 dargestellt.

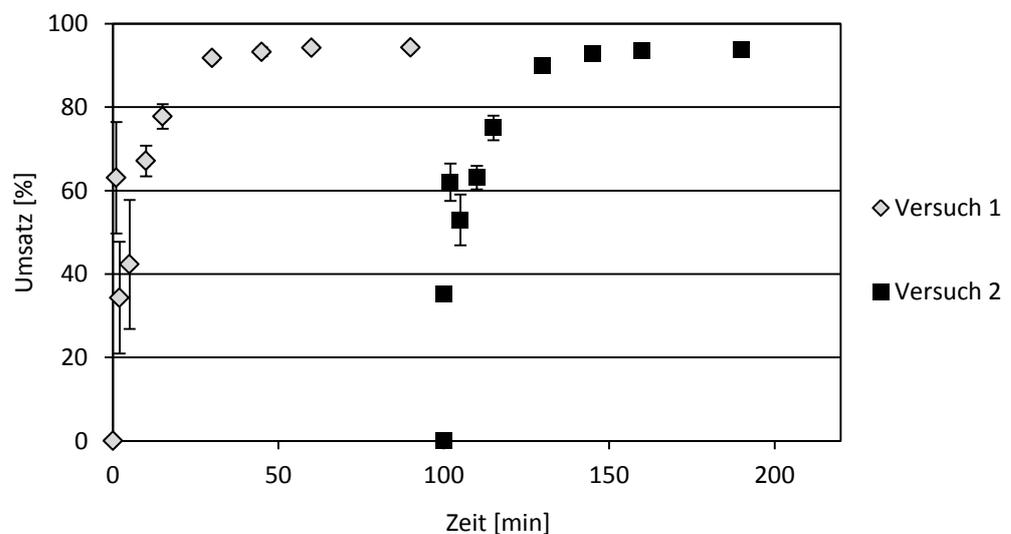


Abbildung 3–16: Repetitive-Batch mit ADH-A über GDA auf Trisopor mit PEI 25 000 Beschichtung immobilisiert. Je Versuch wurden 2 Ansätze durchgeführt, um die Wiederverwendbarkeit der Immobilisate durch Mehrfacheinsatz zu untersuchen. Reaktionsbedingungen für alle Ansätze: 80 mM Acetophenon, 18 % V V⁻¹ Isopropanol, 1 mM NADH in KP_i-Puffer (0,1 M, pH 7), Reaktionsvolumen 10 mL, T = 30 °C, n = 2.

Der Einsatz der Träger im Repetitive-Batch zeigte eine gute Reproduzierbarkeit und hohe Umsätze. Die Enzymaktivität der Immobilisate lag bei 120 - 140 U g⁻¹ Träger. Die Umsatzkurven erreichten jeweils nach 60 Minuten einen Umsatz > 90 % und zeigten im hohen Umsatzbereich kaum Abweichungen. Auch bei dem wiederholten Einsatz der Immobilisate

(Abbildung 3–16, rechte Umsatzkurve, Versuch 2), wird der hohe Umsatz erreicht. Aus dem Ergebnis kann geschlossen werden, dass die Immobilisate im Repetitive-Batch Versuch eine stabile Enzymbindung, eine hohe Aktivität und eine hohe Reproduzierbarkeit aufweisen. Im mittleren Umsatzbereich liegen die Schwankungen etwas höher, dies kann unter anderem durch Probleme in der Durchmischung des Reaktionsansatzes liegen oder an der schlechten Löslichkeit des als Substrat verwendeten Acetophenons im wässrigen Medium mit einer maximalen Löslichkeit von $5,5 \text{ g L}^{-1}$ (46 mM), die durch das als Cosubstrat zugesetzte Isopropanol (18 % V V⁻¹) noch einmal verbessert wurde. Aus den Versuchen kann geschlossen werden, dass sich das Immobilisat für den mehrfachen Einsatz eignet.

3.3.2. Einsatz im Festbettreaktor

Der erfolgreiche Einsatz der Immobilisate im Repetitive-Batch Verfahren belegt deren Eignung für ein kontinuierliches Verfahren. Um eine bessere Aussage zur Eignung in der kontinuierlichen Produktion treffen zu können, wurde als Modellsystem die kontinuierliche Reduktion von Acetophenon zu (S)-Phenylethanol in Kaliumphosphatpuffer in einem temperierbaren Festbettreaktor (*Superperformance*-Säule, Typ 150-10, Merck) untersucht. Zunächst wurden die physikalischen Rahmenparameter der Katalysatorschüttung bestimmt (Tabelle 3-7). Die Verweilzeit (τ) wurde experimentell ermittelt als die Zeit, welche zum Durchströmen des trockenen Festbettes benötigt wird. Rechnerisch lässt sich darüber das Hohlraumvolumen V_H ermitteln:

$$\tau = \frac{V_H}{\dot{V}} \quad \text{Formel 3-2}$$

Aus der Formel der Verweilzeit wurde das Hohlraumvolumen V_H bestimmt:

$$\tau = \frac{V_H}{\dot{V}} \Leftrightarrow V_H = \tau \cdot \dot{V} \quad \text{Formel 3-3}$$

Für die Verweilzeit ergibt sich $\tau = 10,38 \text{ min}$ bei einem Volumenstrom von $\dot{V} = 0,7 \text{ mL min}^{-1}$. Im Versuch wurde keine Diffusionslimitierung für das System gemessen, weshalb diese vorerst vernachlässigt wird (bestimmt nach der Beschreibung von Chmiel [Chmiel 2006]).

Tabelle 3-7: Gesamt- und Hohlraumvolumen für den Festbettreaktor.

Festbetthöhe h [cm]	Gesamtvolumen V [mL]	Hohlraumvolumen V_H [mL]
10	7,9	7,3

Untersucht wurde der Umsatz bei verschiedenen Substratkonzentrationen und unterschiedlichen Verweilzeiten. Ermitteln lässt sich darüber auch die

Raum-Zeit-Ausbeute, eine wichtige Kenngröße für die Produktivität des Reaktors. Sie ist definiert als die Produktmenge pro Zeit und Reaktorvolumen:

$$RZA = \frac{m_P}{t_R \cdot V_R} \quad \text{Formel 3-4}$$

In Langzeitversuchen wurde bei einer Substratkonzentration von 40 mM und einer Verweilzeit von 5,21 Minuten eine Raum-Zeit-Ausbeute von $613,2 \text{ g (L}^* \text{d)}^{-1}$ bestimmt, für eine Substratkonzentration von 20 mM wurde eine Raum-Zeit-Ausbeute von $311,1 \text{ g (L}^* \text{d)}^{-1}$ bestimmt (Umsätze siehe Abbildung 3–17 und Tabelle 3-8).

Tabelle 3-8: Umsätze und Raum-Zeit-Ausbeuten mit 20 mM und 40 mM Acetophenonkonzentration im Langzeitversuch ($t = 24 \text{ h}$), $\tau = 5,21 \text{ min}$.

Substratkonzentration [mM]	Umsatz [%]	RZA [$\text{g (L}^* \text{d)}^{-1}$]
20	95	311.1
40	93	613.2

Beispielhaft sind noch einmal die Umsätze für die 40 mM Acetophenonkonzentration aufgetragen:

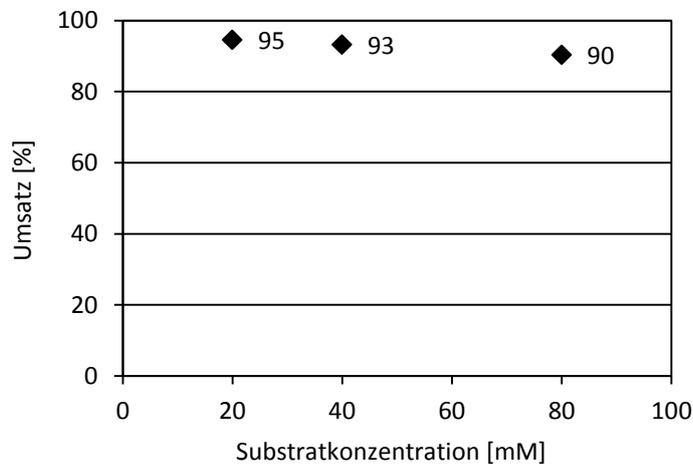


Abbildung 3–17: Abhängigkeit des Umsatzes von der Substratkonzentration, Variation der Acetophenonkonzentration: 20 mM, 40 mM, 80 mM; $\dot{V} = 0,07 \text{ mL min}^{-1}$, 18 % V V^{-1} Isopropanol, 1 mM NADH in KP_i -Puffer (0,1 M, pH 7,0), 30 °C, 124 U g^{-1} Träger, Verwendung des Trägers SHU 165, Trägermenge: 2,7 g

Die Ergebnisse belegen die Anwendbarkeit LbL-modifizierter Träger mit immobilisierter Alkohol-Dehydrogenase auch im kontinuierlich betriebenen Festbettreaktor. Das Immobilisat zeigte auch nach vielen Stunden bei kon-

stanter Flussrate einen hohen Umsatz > 93 %, eine hohe Stabilität und gute Raum-Zeit-Ausbeuten (siehe auch Tabelle 3-8).

Bei einer erhöhten Substratkonzentration sank der Umsatz geringfügig ($C_{\text{Acetophenon}}$ 20 mM, 95 % Umsatz auf $C_{\text{Acetophenon}}$ 80 mM, 90 % Umsatz) bei gleichbleibender Verweilzeit. Seine Ursache kann dies z.B. in der Substratlimitierung durch Diffusion haben. Die Verkürzung der Verweilzeit zeigte keinen Einfluss auf den Umsatz, was darauf schließen lässt, dass der Reaktor seine Leistungsgrenze noch nicht erreicht hat und relativ kurze Verweilzeiten gefahren werden können, ohne dass Einbußen entstehen. Es wurde vorerst keine weitere Optimierung am System vorgenommen.

3.3.3. Lagerfähigkeit des Immobilisates

Zur Einschätzung der Lagerfähigkeit der Enzyme und der Immobilisate wurden unterschiedliche Versuche durchgeführt, je nach Modifikation. Bei guter Lagerfähigkeit können größere Mengen produziert und in einsatzfähiger Form bereitgehalten werden oder aber auch an Projektpartner versandt werden.

3.3.3.1. Lagerung des Enzyms bei -20 °C

Die eingesetzte Alkohol-Dehydrogenase-´A` liegt nach dem Zellaufschluß und der Hitzefällung (siehe Material und Methoden 9.4) als partiell gereinigte Enzymlösung in Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7, für Enzym: ADH-´A`) vor. Eine zweite Alkohol-Dehydrogenase lag als Lyophilisat vor (Enzym: ADH 1.1.200, evocatal GmbH, TEA-Puffer 20 mM). Beide Enzyme werden in ihrer jeweiligen Form standardmäßig bei -20 °C gelagert, ohne Zusatz stabilisierender Agenzien. Für das Enzym ADH-´A` wird in der Literatur eine lange Lagerzeit unter diesen Bedingungen beschrieben [Goldberg 2010]. Über das Enzym ADH 1.1.200 liegen keine Informationen vor. Die partiell gereinigte Enzymlösung der ADH-´A` wurde in Aliquots von 6 – 11 mL eingefroren und nach Bedarf aufgetaut. Die Aktivität wurde über mehrere Einfrier- und Auftauzyklen untersucht (Abbildung 3–18).

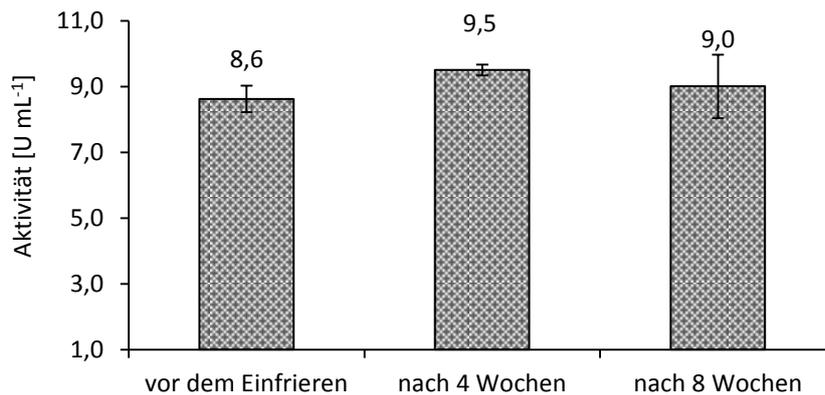


Abbildung 3–18: Lagerstabilität der ADH-‘A’ vor Einfrieren und Lagerung bei -20 °C, Reaktionsbedingungen: 80 mM Acetophenon, 18 % V V⁻¹ Isopropanol, 1 mM NADH, KP_i-Puffer (0,1 M, pH 7), Reaktionsvolumen 1 mL, 30 °C, mittlere Aktivität 8,57 (+/- 0,74), n = 2.

Über einen Zeitraum von 8 Wochen war trotz mehrfachem Auftauen und Einfrieren kein Aktivitätsverlust feststellbar (Abbildung 3–18). Die aus Abbildung 3–18 zu erkennende Zunahme an Aktivität ist auf Probleme bei der Versuchsdurchführung (Substrat Acetophenon ist im Wässrigen schlecht löslich) zurückzuführen (siehe auch Fehlerbalken bei dem Wert für 8 Wochen). Bei der Lagerung von Proteinen stellen diese eine potentielle Nahrungsquelle für Mikroorganismen dar, zusätzlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass die partiell gereinigte Enzymlösung unter Umständen noch Proteasen enthält. Die Lagerung von gefrorener Enzymlösung kann deshalb als ideale Lagerform betrachtet werden und die Entnahme von Teilmengen und ein Wiedereinfrieren sind möglich.

3.3.3.2. Lagerung des Immobilisates bei 4 °C

Um die Enzymstabilität im immobilisierten Zustand über einen längeren Zeitraum bewerten zu können, wurde kovalentes Immobilisat (GDA als Linkermolekül) nach dem Aktivitätstest in frischem Puffer bei 4 °C gelagert und über einen längeren Zeitraum in zwei Ansätzen wiederholt auf Aktivität untersucht (Abbildung 3–19).

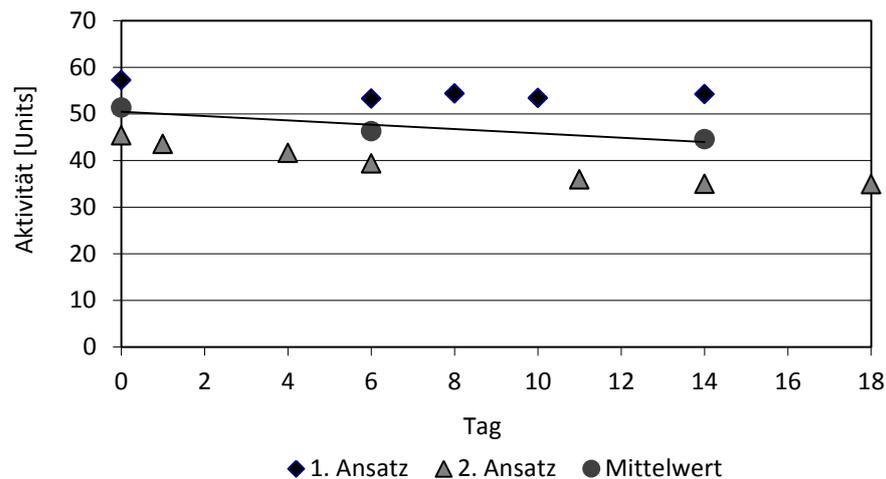


Abbildung 3–19: Repetitive-Batchversuche mit gefriergetrocknetem Immobilisat (Trisopor mit PEI 25 000 Beschichtung). Immobilisierung: kovalent mit GDA, ADH 1.1.200. Ansatz 1 und 2: 80 mg mL^{-1} Lyophilisat für Immobilisierung eingesetzt, Reaktionsbedingungen: Substrat Acetophenon 80 mM , $10 \% \text{ V V}^{-1}$ Isopropanol, TEA-Puffer 20 mM , $1,15 \text{ mM MgCl}_2$, $\text{pH } 7$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $V = 10 \text{ mL}$, Enzym wurde zwischen einzelnen Versuchen in TEA-Puffer 20 mM bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Dabei zeigte sich für den ersten Ansatz eine geringe Aktivitätsabnahme, für den 2. Ansatz eine etwas stärkere Abnahme. Die Ergebnisse wurden gemittelt und weisen auf einen geringen Aktivitätsverlust hin. Durch die mechanische Beanspruchung beim Abtrennen der Träger von der Substratlösung und durch die Spülvorgänge nach dem Versuch, ist durch die mechanische Beanspruchung aufgrund der Methode mit einem Verlust an Aktivität zu rechnen. Welcher Einfluss zu dem Aktivitätsverlust geführt hat, konnte für dieses Experiment nicht abschließend geklärt werden. Da der Aktivitätsverlust gering ist, kann von einer Eignung der Lagerungsbedingung bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ in Puffer ausgegangen werden, die Versuche belegen gleichzeitig noch einmal die stabile Verwendung des Immobilisates im Repetitive-Batch.

Ein weiterer Vorteil bei dem Modellsystem könnte die Verwendung des Cosubstrats Isopropanol ($10 - 18 \% \text{ V V}^{-1}$) darstellen, welches durch antimikrobielle Eigenschaften den Bewuchs der Immobilisate mit Mikroorganismen nach jedem Versuch einschränkt (das bedeutet es findet eine wiederholte Desinfizierung des Immobilisates statt).

3.3.3.3. Lagerung in lyophilisiertem Zustand

Die Herstellung von kovalent immobilisiertem Enzym ist mit einem gewissen Zeit- und Materialaufwand verbunden, so dass idealerweise eine größere Menge Immobilisat auf Vorrat produziert und gelagert wird. Damit ist der Bedarf über einen längeren Zeitraum sichergestellt und bei stabiler Enzymaktivität unter den jeweiligen Lagerbedingungen eine gleichbleibende Qualität an Immobilisat vorhanden. Da die Lagerfähigkeit durch Gefrier-

trocknung für Enzyme eine gute Konservierungsmethode darstellt, wurde Immobilisat mit kovalent über GDA immobilisierter ADH-'A` und ADH 1.1.200 gefriergetrocknet. Vor und nach der Gefriertrocknung wurden Aktivitätstests durchgeführt (siehe Abbildung 3–20).

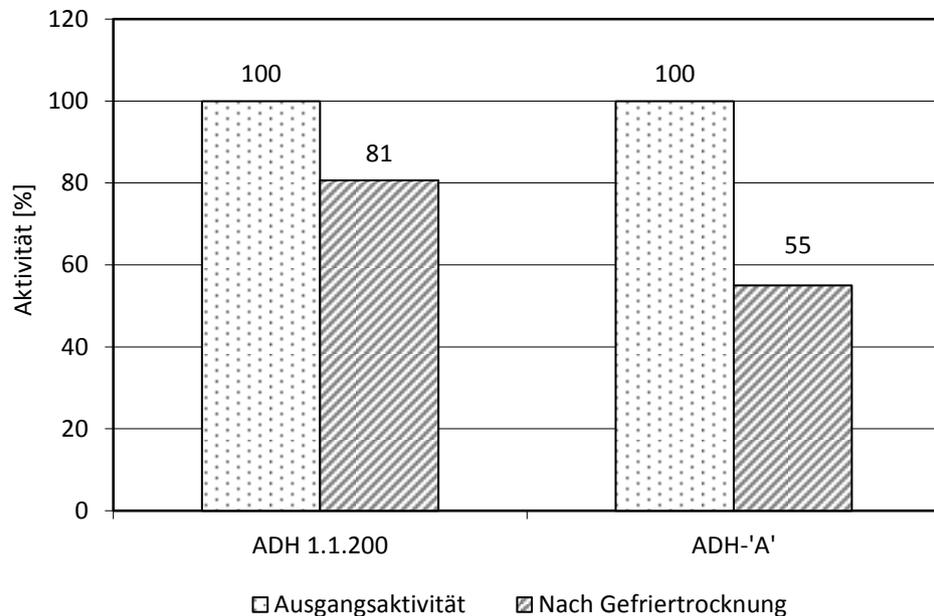


Abbildung 3–20: Gefriertrocknung von kovalenten (GDA) Immobilisaten. Ausgangsaktivität entspricht der Aktivität direkt nach der Immobilisierung, „nach Trocknung“ entspricht der Aktivität direkt nach der Gefriertrocknung. (Partikel: Trisopor mit PEI 25 000 Beschichtung) aus TEA-Puffer 20 mM (1,15 mM MgCl₂, pH 7) Enzym ADH 1.1.200 und KP_i-Puffer 0,1 M, pH 7, Enzym ADH-'A`, Vergleich der Aktivität vor und nach Gefriertrocknung prozentual, bezogen auf die Ausgangsaktivität mit 100 % (Lagerung bei - 20 °C).

Die Messungen zeigten, dass sich durch die Gefriertrocknung ein Aktivitätsverlust ergab. Dieser lag für die ADH 1.1.200 bei etwa 20 % und für die ADH-'A` bei etwa 50 %. Woraus dieser Aktivitätsverlust resultiert, konnte nicht abschließend geklärt werden.

Um die Inaktivierung durch Gefriertrocknung zu minimieren kommen verschiedene Methoden in Frage, die weiter untersucht werden sollten. Die Gefriertrocknung könnte z. B. aus unterschiedlichen Puffern oder anderen Lösungsmitteln untersucht werden oder es könnten Zusätze mit stabilisierendem Einfluss zugegeben werden, z. B. Sorbitol oder Glycerol.

Um die Stabilität der Immobilisate besser bewerten zu können und um zu prüfen, ob eine Lagerung des Lyophilisats bei Raumtemperatur möglich ist, bzw. der ungekühlte Versand erfolgen kann, wurde gefriergetrocknetes Immobilisat bei Raumtemperatur gelagert. Teilproben wurden entnommen und mithilfe des Standardaktivitätstests gemessen. Das Ergebnis ist in Abbildung 3–21 dargestellt.

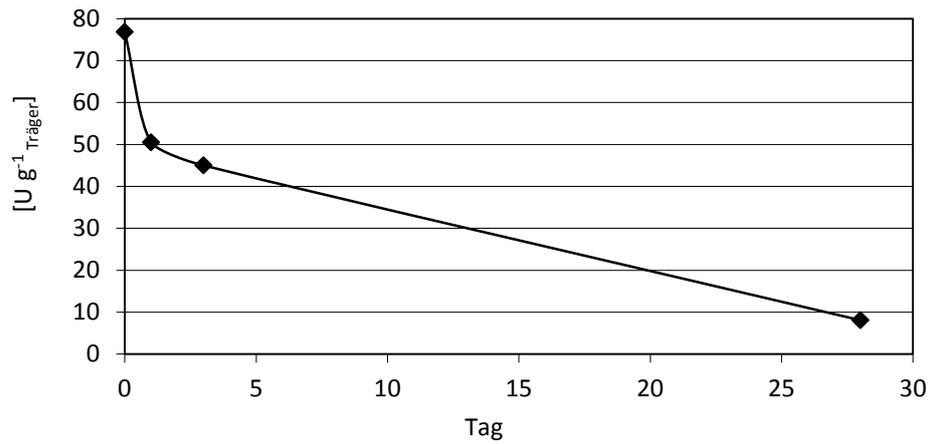


Abbildung 3–21: Lagerfähigkeit lyophilisierten Immobilisates bei Raumtemperatur (20 °C), Immobilisierung: kovalent immobilisierte ADH 1.1.200, Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer 20 mM (1,15 mM MgCl₂, pH 7), Substrat: 60 mM Acetophenon, T = 30 °C, 1 mM NADH, V = 10 mL.

Innerhalb von wenigen Tagen war ein starker Aktivitätsrückgang messbar, nach 30 Tagen besaß das Immobilisat nur etwa 10 % Restaktivität. Daraus kann geschlossen werden, dass die Lagerung des gefriergetrockneten Lyophilisats bei Raumtemperatur nicht ohne weiteres möglich ist und stattdessen eine Lagerung bei 4 °C in Puffer oder in tiefgefrorener Form erfolgen muss (siehe auch Kapitel 3.3.3).

3.4. Fazit

Die Ergebnisse zur Enzymimmobilisierung lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Sowohl die adsorptive als auch die kovalente Enzymimmobilisierung auf LbL-funktionalisierten Trägern sind möglich. Als am besten geeignete Beschichtung hat sich PEI herausgestellt.
- Die kovalente Immobilisierung zeigt eine hohe, für den Prozess geeignete Stabilität, wobei eine Aktivitätseinbuße durch die Art der Anbindung entsteht (Verlust von etwa 33 % Aktivität für das Enzym ADH-´A`).
- Das kovalente Immobilisat zeigt im Repetitive-Batch Experiment und beim Einsatz im Strömungsrohrreaktor eine hohe und gleichbleibende Aktivität und hohe Umsätze.
- Das Immobilisat besitzt bei Lagerung unter 4 °C in Puffer oder im gefriergetrockneten Zustand bei -20 °C eine hohe Stabilität, die Lagerung bei Raumtemperatur ist nicht möglich.
- Die LbL-Beschichtung lässt sich mit guten Ergebnissen auf unterschiedliche Trägersysteme auftragen (untersucht wurden LbL-modifizierte Glasträger und Sipernate)
- Die Übertragung der Beschichtung auf Sipernate erbrachte noch einmal eine Verbesserung der Enzymaktivität.

4. Selektive Adsorption von Wertstoffen

Die Isolierung eines Wertstoffs aus einem komplexen Stoffgemisch (Mehrstoffgemisch) kann hohe Aufarbeitungskosten verursachen. Wie in der Einleitung dargestellt stehen verschiedene Verfahren zur Auswahl, um eine Auftrennung vorzunehmen, wobei die Wahl der Methode gleichzeitig die Effektivität des Verfahrens bestimmt. Je selektiver, einfacher und energiesparender ein Verfahren ist, desto besser ist es geeignet.

In der Chromatographie wird die Auftrennung von Stoffgemischen mithilfe der Adsorption auf Feststoffphasen durchgeführt, zur Anwendung kommen Zeolithe, Kieselgel (SiO_2), Aluminiumoxid (ALOX) oder auch Kunstharze [Hart *et al.* 1990]. Gegenstand dieser Arbeit ist die Anwendung kostengünstiger und selektiver Feststoffphasen (siehe Abbildung 4–1).



Abbildung 4–1: Schema zur Untersuchung der Adsorption auf anorganischen Adsorbenten

Die Auftrennung von Alkohol-Ketongemischen durch Screenings geeigneter Materialgruppen und die Aufnahme von Adsorptionsisothermen und Durchbruchkurven wurde untersucht. Durch Verwendung selektiver Biokatalysatoren (Enantiomerenüberschuss > 99 %) wird dabei gezielt das gewünschte Isomer produziert und aufgereinigt, womit eine zusätzliche Enantiomerentrennung entfällt und der Adsorber somit keine enantiomerentrennenden Eigenschaften aufweisen muss. Da in erster Linie günstige Adsorber zum Einsatz kommen, sind diese besonders für einen späteren industriellen Einsatz von Interesse. Die Wahl des Adsorbens wurde im Hinblick auf eine möglichst hohe Kapazität und Selektivität zugunsten der Alkohole getroffen. Untersucht wurde die selektive Adsorption aus Medien unterschiedlicher Polarität, die durch den Verteilungskoeffizienten von Oktanol-Wasser K_{OW} beschrieben wird (Tabelle 4-1).

Tabelle 4-1: Oktanol-Wasser Verteilungskoeffizienten K_{OW} (auch als P-Wert bezeichnet) der untersuchten Lösungsmittel, Datenquelle Sicherheitsdatenblättern ¹AppliChem, ²Merck.

Lösungsmittel	K_{OW}
Essigsäureethylester (EtOAc ¹)	0,66
<i>tert</i> -Butylmethylester (MTBE ²)	1,06
Toluol ²	2,65
Heptan ²	4,66

Da für die Produktion ein Biokatalysator eingesetzt werden soll, muss auch der Einfluss der Lösungsmittelpolarität auf die Aktivität des Biokatalysators untersucht werden. Zu diesem Thema existiert bereits eine ganze Reihe von Veröffentlichungen, dabei zeigen sich allerdings keine Übereinstimmungen für die einzelnen Enzymsysteme. Abhängigkeiten konnten lediglich für einzelne Enzyme beschrieben werden [Laane *et al.* 1986, Gonzalo *et al.* 2007a und Filho *et al.* 2003]. Dieser Sachverhalt ist Gegenstand des 4. Kapitels und auch des 5. Kapitels.

4.1. Systemuntersuchung mit porösen Adsorbentien

Von einer Vielzahl an verschiedenen Adsorbentmaterialien wurden insbesondere anorganische Adsorbentien für die selektive Stoffbindung untersucht, gekennzeichnet durch Experimentalnummern „ExM-Nummern“. Diese sind vom Projektpartner Süd-Chemie AG festgelegte Experimentalbezeichnungen. Zunächst wurde eine Eingrenzung der geeigneten Materialien vorgenommen.

4.1.1. Screening zur Adsorption

Als Adsorptionsmedien wurden zunächst wässrige Systeme untersucht, da diese Medien eine breite Anwendung in der Biokatalyse finden. Anschließend wurde die Adsorption aus häufig verwendeten organischen Lösungsmitteln untersucht. Die Adsorption wurde über die Abnahme des Zielstoffes im Überstand bei Zugabe des Sorbens detektiert. Dafür wurden kommerziell bezogene Reinstoffe (Alkohole und Ketone) oder deren äquimolare Mischungen im jeweiligen Medium gelöst und definierte Mengen Adsorbentmaterial zugegeben.

Im ersten Ansatz wurden 22 unterschiedliche Adsorbentmaterialien untersucht, wobei es sich um natürliche und synthetische Tonerdmineralien handelte, z. B. Boehmit-Silikate und γ -Aluminiumoxide. Der Einsatz der Adsorbentmaterialien wurde ohne Vorbehandlung (Erhitzen, Trocknen) oder Modifizierung der Oberfläche durchgeführt.

Zunächst wurde die Adsorption des Alkohols *rac/meso*-2,5-Hexandiol aus vollentsalztem Wasser und wässrig-organischem Medium (Kaliumphosphatpuffer 0,1 M, pH 7 mit 18 % V V⁻¹ Isopropanol) auf unterschiedlichen Adsorbentien untersucht. Dabei konnte jedoch keine Abnahme der Alkohol- oder der Ketonkonzentration im Überstand nach Zugabe des Sorbens gemessen werden. Die Versuche haben bestätigt, dass Wasser aufgrund seiner hohen Polarität als Lösungsmittel ungeeignet ist, da sich das Adsorbens mit Wasser belädt und damit mögliche Bindungsstellen für den Alkohol blockiert, ein Sachverhalt der in der Literatur bereits beschrieben ist [Köhler *et al.* 1993].

Nachdem K. Goldberg den Trend von Aluminiumsilikaten und Aluminiumoxiden zur Auftrennung von Alkohol-Ketongemischen aus Essigsäureethylester beschreibt [Goldberg 2010], wurde ein Screening mit unterschiedlichen Tonerdmineralien aus Essigsäureethylester durchgeführt. Zusätzlich wurden Nullproben zur Kontrolle der Ausgangskonzentration gemessen. Für die Stoffgruppe der Aluminiumoxide und Aluminiumsilikate konnte ein eindeutiger Trend zur selektiven Adsorption des Alkohols 2,5-Hexandiol belegt werden (siehe Abbildung 4–2). Das Keton wurde dabei nicht oder nur in sehr geringen Mengen adsorbiert.

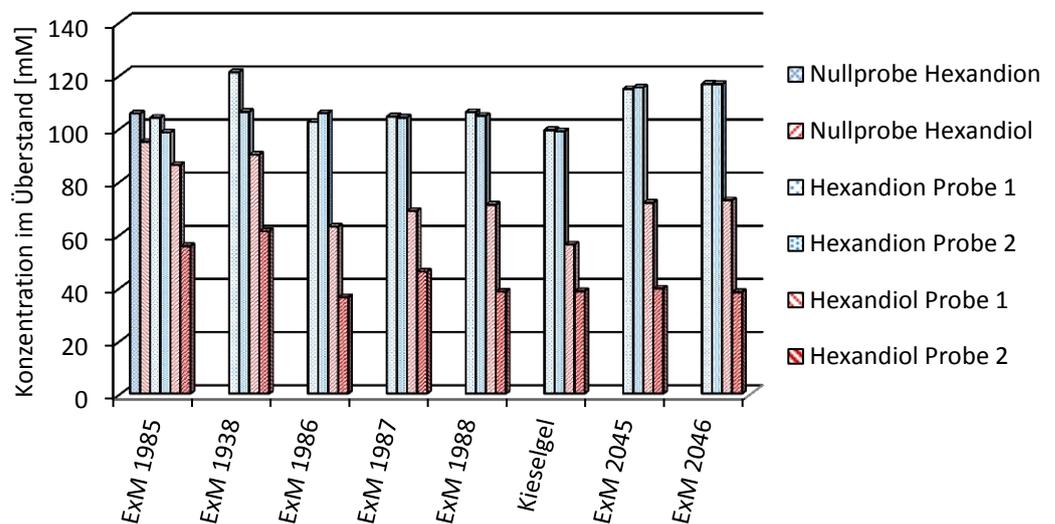


Abbildung 4–2: Screening unterschiedlicher Adsorber auf Basis von Aluminiumoxiden und Aluminiumsilikaten. Untersuchung der Bindungsfähigkeit für 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol aus Essigsäureethylester, V = 15 mL, Durchführung bei RT, 400 rpm.

Für weitere Tonerdmineralien war dieser Trend nicht erkennbar (siehe Abbildung 4–3). Zu verzeichnen war eine leichte Abnahme in der Konzentration des Alkohols und des Ketons, keine weitere Adsorbensklasse zeigte ein so klares Ergebnis wie die in Abbildung 4–2 dargestellten Aluminiumoxide und Aluminiumsilikate.

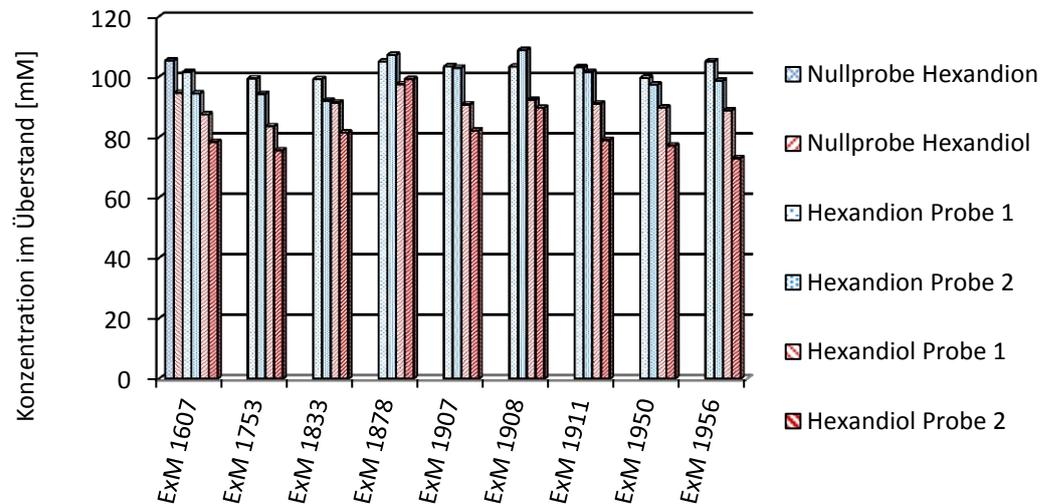


Abbildung 4–3: Screening unterschiedlicher Adsorber auf Basis natürlicher Tonerd-mineralien. Untersuchung der Bindungsfähigkeit für 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol aus Essigsäureethylester, V = 15 mL, Durchführung bei RT, 400 rpm.

4.1.2. Adsorbentien aus Alumosilikat

Ausgehend von den Ergebnissen des Screenings wurden die folgenden Versuche mit Aluminiumsilikat durchgeführt, um die Ergebnisse zu bestätigen. Dabei wurde der pulverförmige Adsorber Siral® 40 (ExM 1985) der Firma Sasol verwendet. Der Adsorber weist ein Aluminium zu Silikatverhältnis von 60 : 40 auf und wird deshalb auch als Alumosilikat bezeichnet. Die mittlere Teilchengröße d_{50} beträgt $50 \mu\text{m}$. Die BET-Oberfläche beträgt $512 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. Es wurden Versuche zur Adsorption des Alkohols aus Alkohol-Ketongemischen durch Adsorberzugabe zum Überstand in unterschiedlichen Medien durchgeführt. Die Nullproben zeigen die Ausgangskonzentrationen der Lösung vor Zugabe der Adsorber an, es wurde mit einem Volumen von 15 mL Überstand und Adsorbermengen von je 0,5 g bei Raumtemperatur gearbeitet.

Versuche zur Bestätigung der Ergebnisse aus dem Screening zeigen eine Abnahme des Alkohols aus dem Überstand von 71 % bei geringer Abnahme des Ketons (Abbildung 4–4). Die Adsorber wurden dreimal ausgetauscht (Gesamtadsorbermenge $4 \times 0,5 \text{ g}$) durch Zentrifugation und Abtrennen des Überstandes.

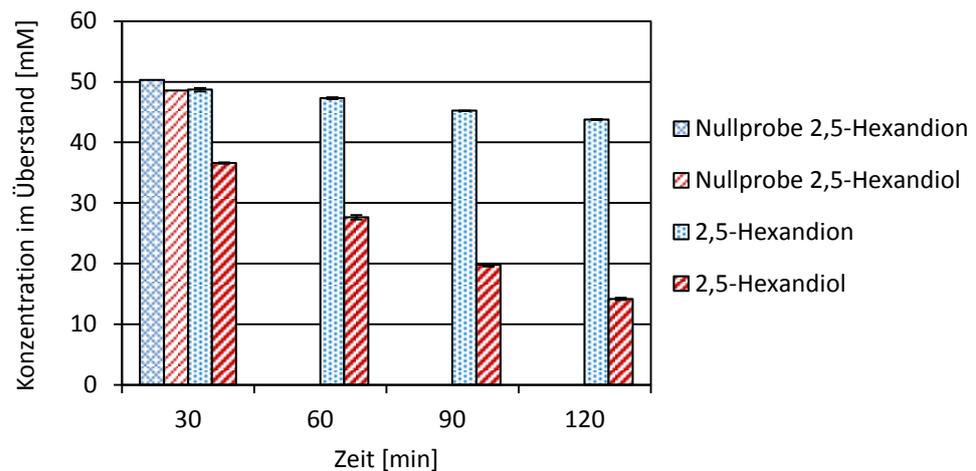


Abbildung 4–4: Adsorption von 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol aus Essigsäureethylester durch Adsorber Siral 40 (Alumosilikat), $V = 15 \text{ mL}$, RT, Austausch Adsorber $0,5 \text{ g}$ alle 30 Minuten, 150 rpm.

Versuche zur Adsorption des Alkohols 2,5-Hexandiol auf Alumosilikat Siral 40 aus dem organischen Lösungsmittel *tert*-Butylmethylether (MTBE) zeigten eine Abnahme des Alkohols im Überstand von 57,7 % und eine Abnahme des Ketons von 28 %. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung 4–5 graphisch dargestellt.

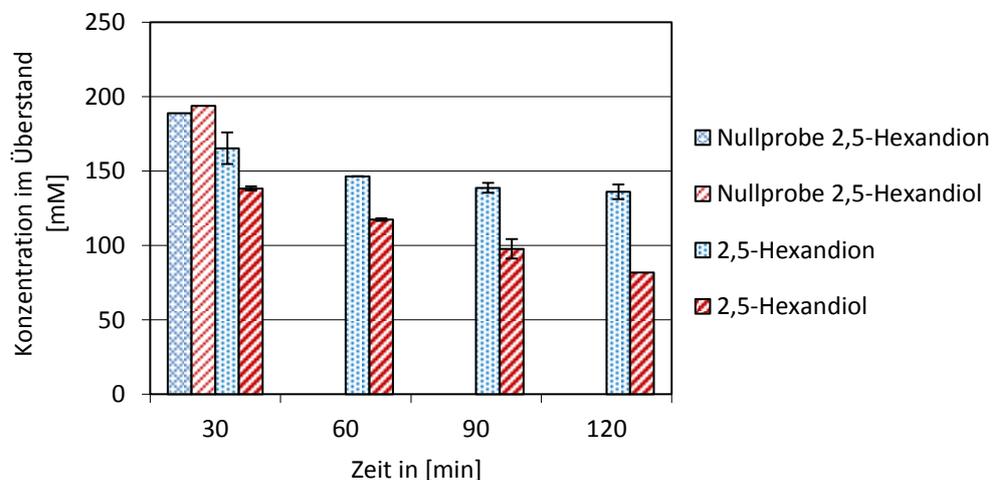


Abbildung 4–5: Adsorption von 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol aus MTBE durch Adsorber Siral 40 (Alumosilikat), $V = 15 \text{ mL}$, RT, Austausch Adsorber $0,5 \text{ g}$ alle 30 Minuten, 150 rpm.

Das Lösungsmittel Heptan stellt das unpolarste untersuchte Lösungsmittel dar, wobei sich die schlechte Löslichkeit des Zielmoleküls 2,5-Hexandiol für die Adsorptionsuntersuchungen als Problem erwies. Durch Zugabe von Isopropanol ($10 \% \text{ V V}^{-1}$) wurde die Löslichkeit des 2,5-Hexandiols verbessert und so eine Messung ermöglicht. Auf den Einfluss von Isopropanol auf die Adsorption wird in Kapitel 4.5.3 eingegangen. Gemessen wurde eine

Abnahme des Alkohols von 68 %, allerdings ohne Selektivität (Abnahme Keton 43,7 %), siehe Abbildung 4–6.

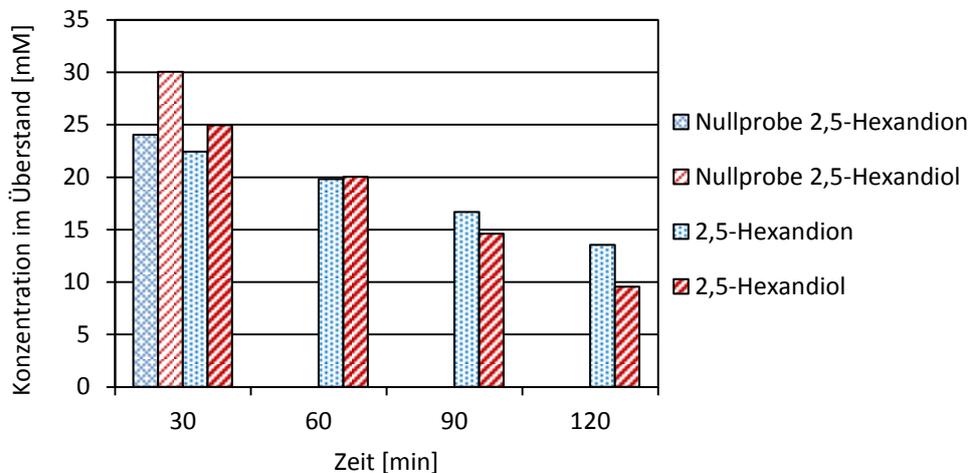


Abbildung 4–6: Adsorption von 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol aus Heptan (mit 10 % $V V^{-1}$ Isopropanol) durch Adsorber Siral 40 (Alumosilikat), $V = 15$ mL, RT, Austausch Adsorber 0,5 g alle 30 Minuten, 150 rpm.

Die Ergebnisse zeigen für die unterschiedlichen organischen Lösungsmittel eine Alkoholabnahme, also eine Abreicherung der polaren Komponente. Das Absinken der Alkoholkonzentration im Überstand betrug für das Alumosilikat in EtOAc 71 %, die Ketonkonzentration sank nur um 13 % ab. Für die Adsorption aus EtOAc ergibt sich damit eine relativ hohe Selektivität zugunsten des Alkohols. Die insgesamt stärkste Abnahme beider Komponenten wurde für Heptan bestimmt (Alkohol 68 %, Keton 43,7 %), womit dieses Lösungsmittel aufgrund des Fehlens der Selektivität für die gezielte Produktadsorption nicht in Frage kommt. Trotz Anwesenheit des zweiten Alkohols Isopropanol (Konkurrenz der Hydroxyfunktionen um Bindungsstellen), ist die Adsorption sowohl für den Alkohol, als auch für das Keton relativ hoch. Um gezielt eine Trennung von Keton und Alkohol zu erreichen, haben sich Essigsäureethylester und *tert*-Butylmethylether als geeignete Lösungsmittel für das untersuchte Alumosilikat erwiesen.

4.1.3. Adsorbentien aus γ -Aluminiumoxid

Für die Versuche mit γ -Aluminiumoxid wurde der pulverförmige Adsorber Puralox® KR-160 der Firma Sasol verwendet. Der Al_2O_3 -Gehalt beträgt 95 w w⁻¹ %, die mittlere Teilchengröße d_{50} beträgt 35 μm mit einer BET-Oberfläche von 160 $m g^{-1}$. Es wurden Versuche zur Konzentrationsabnahme von 2,5-Hexandion und 2,5-Hexandiol durch Adsorberzugabe in unterschiedlichen Medien durchgeführt. Zunächst wurde zur Bestätigung der Ergebnisse des Screenings (Kapitel 4.1.1) die Adsorption aus Essigsäureethylester untersucht (Abbildung 4–7). Das Ergebnis zeigt, dass der Alkohol mit 82,5 % aus dem Überstand adsorbiert wurde und die Adsorption des

Ketons mit 1,4 % innerhalb des Fehlers lag und daher messbar nicht stattfand.

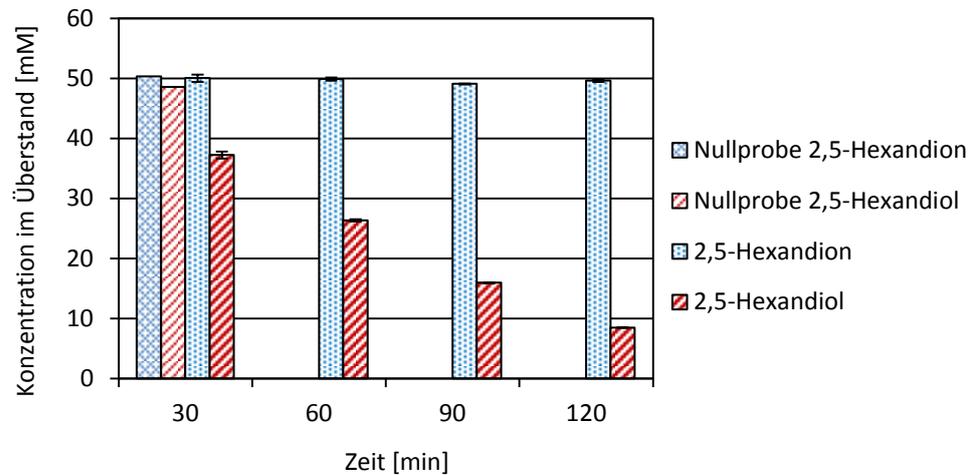


Abbildung 4-7: Adsorption von 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol aus Essigsäureethylester durch Adsorber 0,5 g Puralox KR-160 (γ -Aluminiumoxid), $V = 15$ mL, RT, Austausch Adsorber alle 30 Minuten, $n = 2$, 150 rpm.

Die Adsorption aus *tert*-Butylmethylether wurde ebenfalls untersucht (Abbildung 4-8). Die Konzentration des Alkohols nahm um 19 % ab, die Ketonkonzentration sank um 14,9 %. Das Ergebnis zeigt nur eine leichte Tendenz zugunsten der Adsorption des Alkohols, allerdings ist der Schwankungsbereich sehr hoch (siehe Fehlerbalken Abbildung 4-8), so dass Messungen von Adsorptionsisothermen eine bessere Auskunft geben.

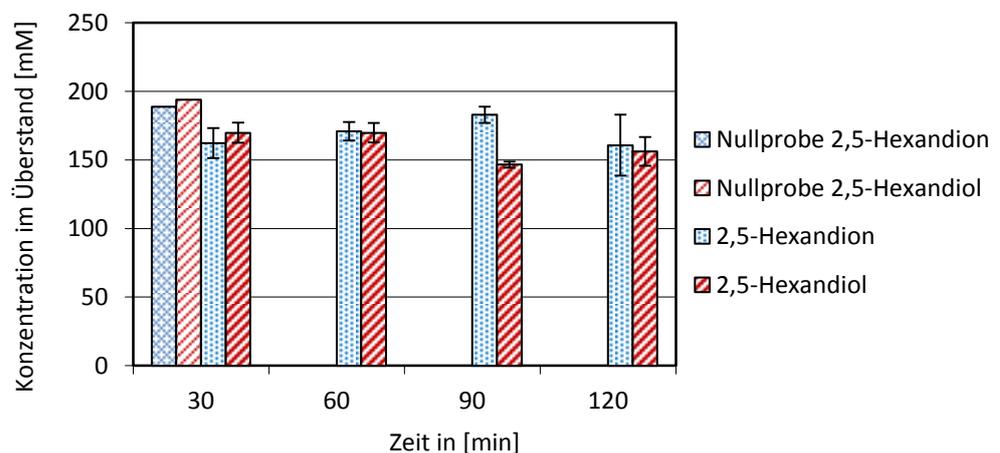


Abbildung 4-8: Adsorption von 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol aus MTBE durch Adsorber Puralox KR-160 (γ -Aluminiumoxid) 0,5 g, $V = 15$ mL, RT, Austausch Adsorber alle 30 Minuten, 150 rpm.

In dem unpolaren Lösungsmittel Heptan ergab sich wieder das Problem der schlechten Löslichkeit der Zielsubstanzen. Durch Zusatz von 10 % $V V^{-1}$ Isopropanol wurde die Löslichkeit erhöht und der Versuch konnte durchgeführt werden. Der Alkohol wurde mit 3,3 % adsorbiert, die Adsorption des Ketons liegt im Schwankungsbereich des Systems und fand daher messbar

nicht statt (Abbildung 4–9). Grundsätzlich zeigt sich im Versuch keine Selektivität, so dass das Lösungsmittel Heptan nicht in Frage kommt.

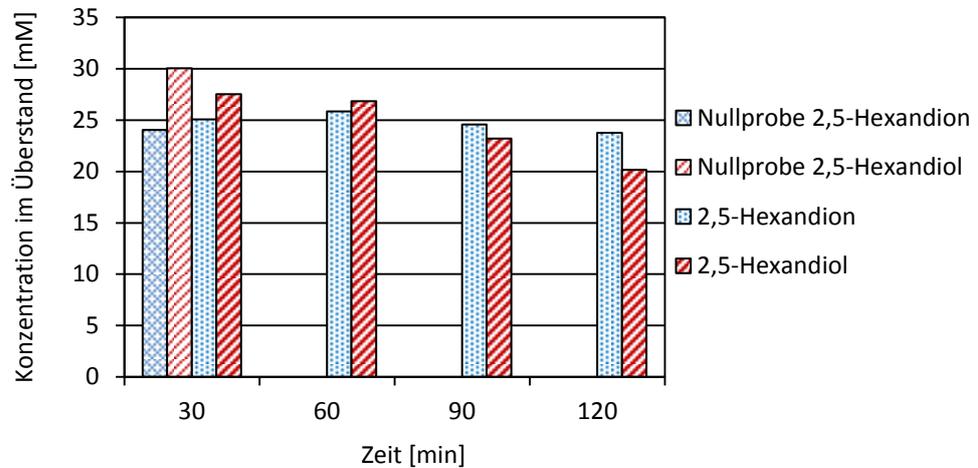


Abbildung 4–9: Adsorption von 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol aus Heptan (mit 10 % V V⁻¹ Isopropanol) durch Adsorber Puralox KR-160 (γ -Aluminiumoxid) 0,5 g, V = 15 mL, RT, Austausch Adsorber alle 30 Minuten, 150 rpm.

Die Ergebnisse (Abbildung 4–7) zur Adsorption auf Aluminiumoxid zeigen für EtOAc eine starke Selektivität zugunsten des Alkohols (Konzentrationsabnahme aus dem Überstand 41,5 mM bei Verwendung einer Gesamtmenge an Adsorbens von 2 g). Das Ergebnis für MTBE (Abbildung 4–8) fällt weniger klar aus, eine Selektivität ist aber erkennbar. So verringert sich durch Adsorberzugabe in Essigsäureethylester als auch in *tert*-Butylmethylether die Alkoholkonzentration im Überstand. Die Ketonkonzentration wurde bei Verwendung von Aluminiumoxid weniger stark beeinflusst als bei den Versuchen mit Alumosilikat, sie bleibt bei allen Lösungsmitteln annähernd konstant (aus Essigsäureethylester, Endkonzentration Hexandion 50 mM). Aus Heptan (mit 10 % V V⁻¹ Isopropanol) ist eine Abnahme beider Verbindungen zu verzeichnen, es ist keine Selektivität messbar. Bei der Verwendung leichtflüchtiger Lösungsmittel kann es zur Aufkonzentrierung der Stoffe durch Verdampfen des Lösungsmittels kommen. Ein weiteres Problem stellt die Verwendung der trockenen Adsorber dar, die sich mit Lösungsmittel sättigen und auch dadurch zu einem anfänglichen Konzentrationsanstieg der Einzelkomponenten führen. Zuverlässigere Daten zur Beladung mit der Zielkomponente können die Messungen der Adsorptionsisothermen liefern (siehe Kapitel 4.4).

4.1.4. Screening mit Kieselgel und Aluminiumoxid

Kieselgel stellt als amorphes Siliciumdioxid (SiO_2) ein häufig genutztes Adsorptionsmittel mit großer innerer Oberfläche dar. Verwendet wurde ein Standard-Kieselgel der Firma Merck, Typ: 9385, 230-400 mesh, 60 Å Porendurchmesser. Da sich dieses neben Al-Si-Mischphasen (Alumosilikat) im Screening (Abbildung 4–2) als geeignetes Adsorptionsmittel herausgestellt hat, wurde auch die Bindungsfähigkeit und die Selektivität von Kieselgel als Vergleichsmaterial untersucht (siehe Abbildung 4–10).

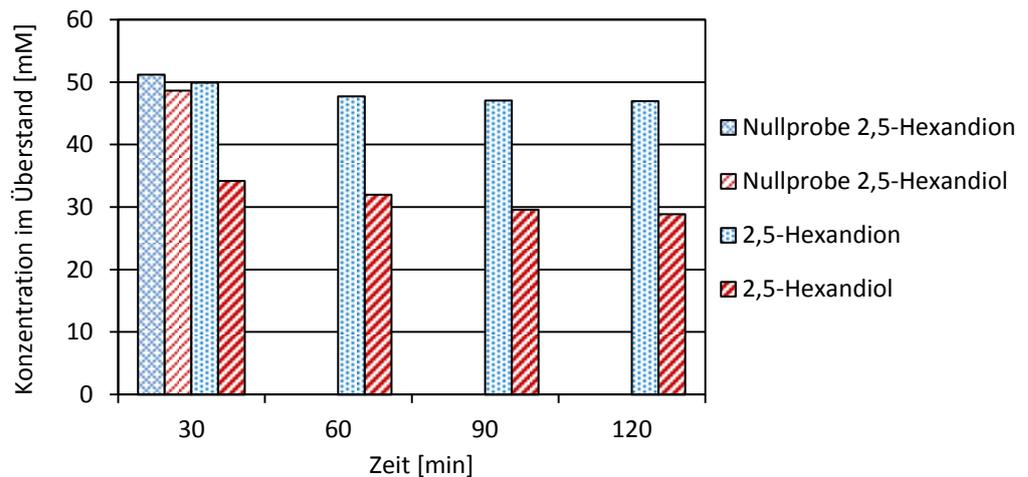


Abbildung 4–10: Adsorption von 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol aus Essigsäureethylester durch Standard-Kieselgel (230-400 mesh, 60 Å, Merck), Zugabe 3 g, $V = 15$ mL, Austausch Adsorber alle 30 Minuten, 150 rpm.

Die Ergebnisse belegen die Adsorptionsfähigkeit von Kieselgel gegenüber Alkoholen und Ketonen. Für das Kieselgel zeigt sich eine Selektivität zugunsten des Alkohols, es werden 41 % gebunden. Ähnlich wie bei den Versuchen mit Alumosilikat, wurde auch Keton in geringem Maße (8,2 %) gebunden. Im Versuch zeigt das Kieselgel im Vergleich zu Aluminiumsilikat und Aluminiumoxid keine ausgesprochen hohe Kapazität für den Alkohol 2,5-Hexandiol, einen genaueren Beleg kann allerdings erst die Messung von Adsorptionsisothermen liefern (Kapitel 4.4).

Neben Kieselgel sind kommerziell basische oder saure Aluminiumoxide als Kationentauscher erhältlich. Untersucht wurde deshalb die Adsorption des Alkohols 2,5-Hexandiol und des Ketons 2,5-Hexandion auf Standard-Aluminiumoxid basisch und Standard-Aluminiumoxid neutral der Firma Macherey-Nagel.

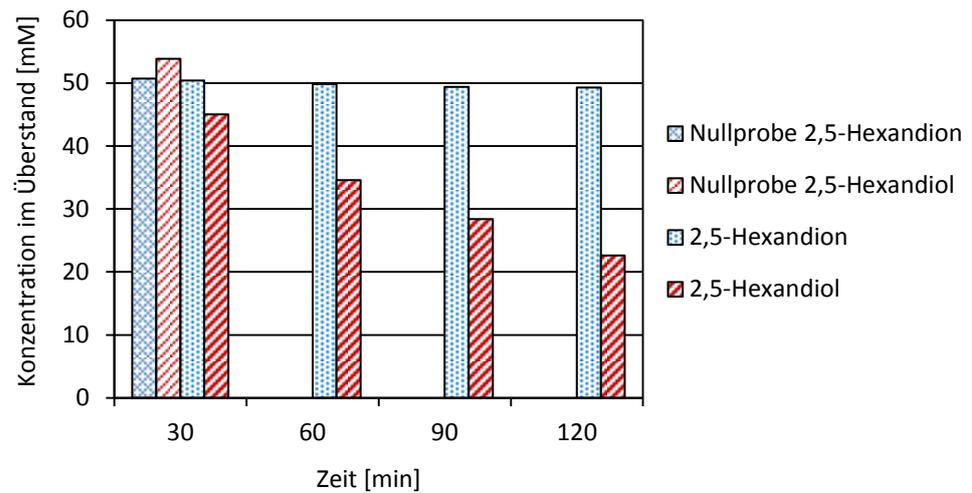


Abbildung 4-11: Adsorption von 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol aus Essigsäureethylester durch Adsorber Aluminiumoxid neutral, alle 30 Minuten Austausch Adsorber 0,5 g, Durchführung bei RT, V = 15 mL, 150 rpm.

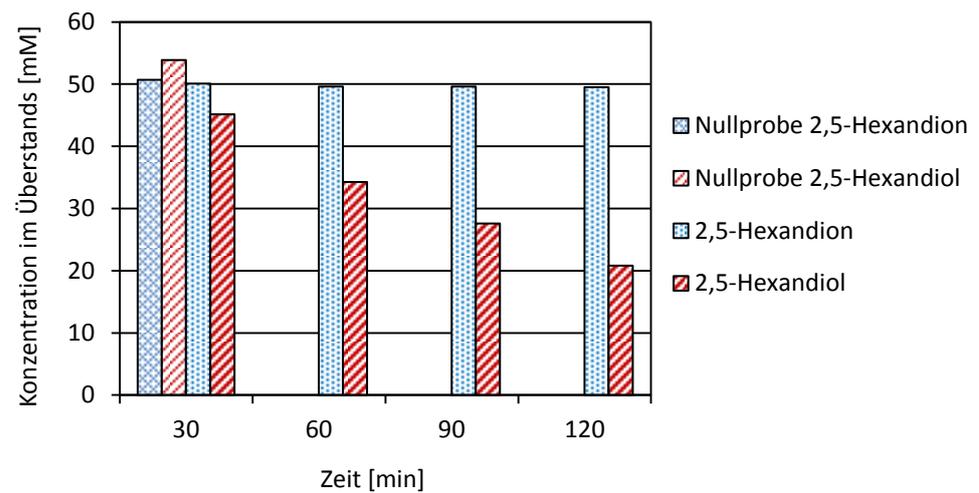


Abbildung 4-12: Adsorption von 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol aus Essigsäureethylester durch Adsorber Aluminiumoxid basisch, alle 30 Minuten Austausch Adsorber 0,5 g, Durchführung bei RT, V = 15 mL, 150 rpm.

Die Experimente 4-11 und 4-12 belegen die Fähigkeit der Aluminiumoxide zur selektiven Bindung des Alkohols. Ähnlich dem γ -Aluminiumoxid zeigt sich eine Selektivität, die mithilfe von Adsorptionsisothermen näher untersucht werden muss. Die Experimente zur Adsorption aus dem Überstand zeigen im organischen Medium keinen Unterschied zwischen dem neutralen und dem basischen Aluminiumoxid, die Adsorption des Alkohols liegt bei etwa 60 %, eine Adsorption des Ketons findet messbar nicht statt.

4.1.5. Adsorberharze

Ionentauscher finden aufgrund ihrer makroporösen Struktur, der chemischen Modifizierbarkeit durch funktionelle Gruppen und ihrer chemischen Beständigkeit eine breite Anwendung in unterschiedlichen Bereichen. Die stark sauren Kationentauscher Amberlite® IR120 Wasserstoff-Form und Natrium-Form besitzen eine Matrix aus sulphoniertem Polystyrol und werden ursprünglich für die Demineralisierung von Wasser eingesetzt. Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Bindung polarer Moleküle wurden die Kationentauscher auf selektive Adsorption des Alkohols aus Keton-Alkoholgemischen untersucht. Die Versuche wurden analog zu den bereits beschriebenen durchgeführt, als Lösungsmittel wurde MTBE verwendet.

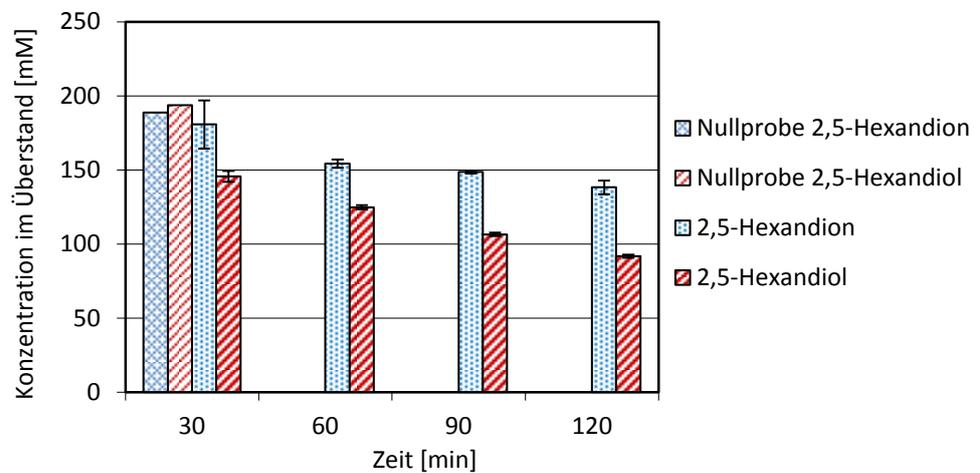


Abbildung 4-13: Adsorption auf Amberlite IR 120 H⁺-Form aus MTBE, 2,5-Hexandiol aus 150 mM Mischung 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol gelöst in MTBE, alle 30 Minuten Austausch der Adsorber 0,5 g, RT. 150 rpm.

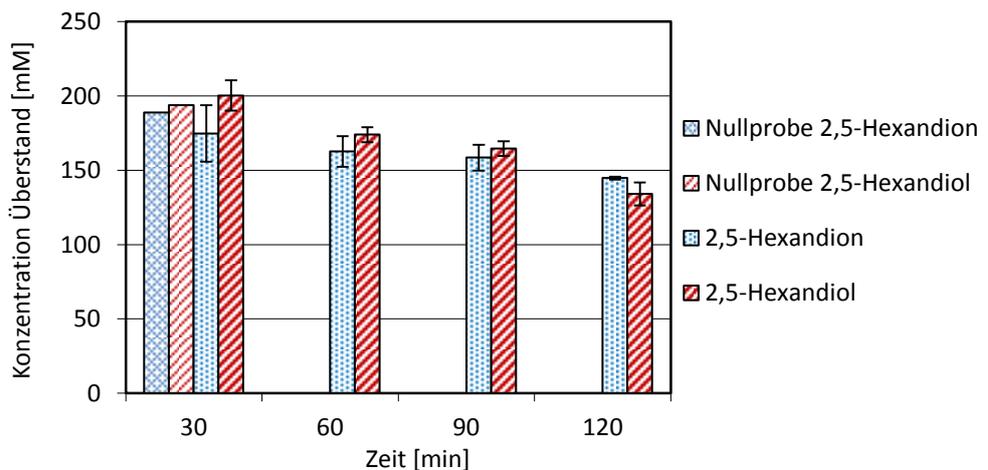


Abbildung 4-14: Adsorption auf Amberlite IR 120 Na⁺-Form aus MTBE, 2,5-Hexandiol aus 150 mM Mischung 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol gelöst in MTBE, alle 30 Minuten Austausch der Adsorber 0,5 g, RT, 150 rpm.

Amberlite IR 120 zeigte in wässrigem und organischem Medium keine eindeutige Selektivität. Sowohl Keton als auch der Alkohol werden gebunden, so dass diese Adsorber für eine selektive Auftrennung ungeeignet erscheinen. Das Ergebnis wurde durch Messungen von Adsorptionsisothermen überprüft (Abbildung 4–42 und Abbildung 4–43) und es wurde eine Selektivität zugunsten des Alkohols gemessen. Berechnungen des Projektpartners *CAM-D Technologies GmbH* weisen dabei auf einen Einfluss des Lösungsmittels hin (siehe Kapitel 4.4.5).

4.1.6. Adsorption aromatischer Verbindungen

Die als selektive Adsorber geeigneten Aluminiumoxide und Alumosilikate wurden auch auf die Adsorptionsfähigkeit weiterer Verbindungen untersucht. So zeigte sich für das aromatische Keton-Alkoholpaar 4-p-(Hydroxyphenyl)-butan-2-on (Himbeerketon) und *rac*-4-p-(Hydroxyphenyl)-butan-2-ol (Rhododendrol) eine geringe Selektivität zugunsten des Alkohols aus Essigsäureethylester (siehe Abbildung 4–15).

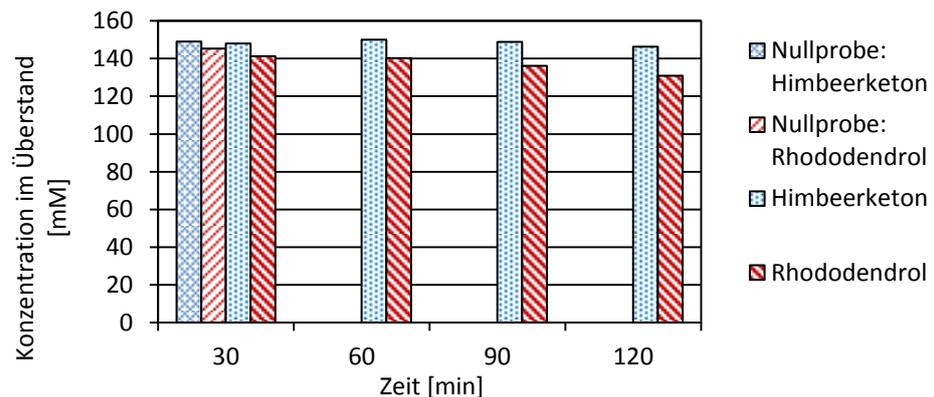


Abbildung 4–15: Adsorption von Himbeerketon und Rhododendrol aus Essigsäureethylester durch Adsorber Siral 40 (Alumosilikat), $V = 15$ mL, RT, 150 rpm, alle 30 Minuten Austausch der Adsorber 0,5 g.

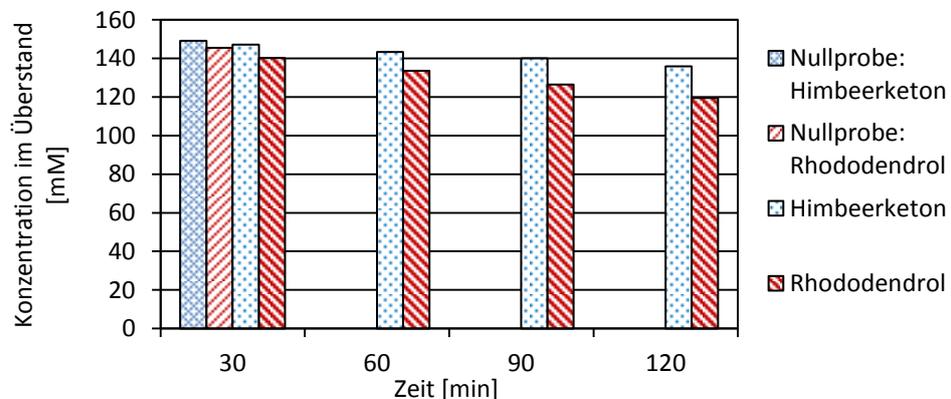


Abbildung 4–16: Adsorption von Himbeerketon und Rhododendrol aus Essigsäureethylester durch Adsorber Puralox KR-160 (γ -Aluminiumoxid), Reaktionsbedingungen wie Abbildung 4–15.

Die Adsorber Aluminiumoxid und Alumosilikat sind aufgrund der geringen Selektivität aus Essigsäureethylester für diese Trennaufgabe nicht geeignet. Inwieweit die Beladungsmenge für die Anwendung dennoch von Interesse ist, muss mithilfe von Adsorptionsisothermen (Kapitel 4.3) geklärt werden.

4.2. Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie stellt als schnell durchführbares, physikalisch-chemisches Trennverfahren mit hoher Trennleistung eine Methode zur Untersuchung von Stoffproben dar. Kommerziell wird als stationäre Phase in erster Linie Kieselgel eingesetzt, die Dünnschichtplatten sind kommerziell aber auch mit Aluminiumoxidbeschichtung erhältlich. Aluminiumoxide haben sich in den Versuchen zur Adsorption als selektive Adsorber herausgestellt, weshalb die Dünnschichtchromatographie als schnelle Detektionsmethode für die selektive Auftrennung näher untersucht wurde. Zur Bewertung der Trennleistung wird die Wanderungsgeschwindigkeit der Probenmoleküle mithilfe des Retentionsfaktors (R_f -Faktor) bewertet. Dieser gibt das Verhältnis der Wanderungstrecke des Substranzfleckes (S_{Substanz}) zu der des Lösungsmittels ($S_{\text{Lösungsmittel}}$) wieder:

$$R_f = \frac{S_{\text{Substanz}}[\text{cm}]}{S_{\text{Lösungsmittel}}[\text{cm}]} \quad \text{Formel 4-1}$$

Untersucht wurde die Wanderungstrecke unterschiedlicher Alkohole, Ketone oder aber Gemische der jeweiligen Stoffpaare in unterschiedlichen Lösungsmitteln. Die Spots wurden mit Färbelösung nach Seebach und anschließend Erwärmen sichtbar gemacht (siehe Kapitel 9.8).

Die Ergebnisse der Tests unterschiedlicher Lösungsmittel und Alkohol-Keton Kombinationen zeigten für 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol in Essigsäureethylester und *tert*-Butylmethylether gute Trenneigenschaften. So erzielt 2,5-Hexandion in Essigsäureethylester und in *tert*-Butylmethylether die höchsten R_f -Werte, der korrespondierende Alkohol 2,5-Hexandiol weist einen viel geringeren R_f -Wert auf, so dass beide Lösungsmittel für die Trennung in Frage kommen. Im Lösungsmittel Toluol zeigt sich für 2,5-Hexandion ein stark verminderter R_f -Wert, der Alkohol weist allerdings keine Wanderung auf, was auf eine starke Bindung an das ALOX hinweist. Für das Keton-Alkoholpaar 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol ergibt sich aufgrund der Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie eine Eignung von MTBE (0,64) > Essigsäureethylester (0,6) > Toluol (0,1) als Medium zur selektiven Auftrennung (Tabelle 4-3). Dabei liefert MTBE ein geringfügig besseres Ergebnis als Essigsäureethylester. Dargestellt ist neben den R_f -Werten auch die Differenz der R_f -Werte. Je größer die Differenz ist, desto

größer die Trennungsstrecke auf der Platte und desto besser das Trennergebnis (siehe auch Tabelle 4-2).

Tabelle 4-2: Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie mit unterschiedlichen Lösungsmitteln und 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol.

Substanz	Platte 1: EtOAc R_f		Platte 2: Toluol R_f		Platte 3: MTBE R_f	
2,5-Hexandion	0,77		0,11		0,73	
2,5-Hexandiol	0,17		0		0,09	
Hexandion/Hexandiol	0,16	0,76	0	0,11	0,08	0,74

Der ebenfalls untersuchte Produktalkohol 2,4-Pentandiol weist in EtOAc und MTBE einen niedrigen R_f -Wert ähnlich des 2,5-Hexandiols auf, für das korrespondierende Keton ergibt sich allerdings keine Wanderung (Tabelle 4-3). Unter Umständen spielen komplexe Oberflächenphänomene eine Rolle, die für dieses abweichende Ergebnis des 2,4-Pentandions verantwortlich sind. Die Ergebnisse wurden mehrfach überprüft.

Tabelle 4-3: Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie mit Toluol (mit 10 % V V⁻¹ Isopropanol) und 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol (Substratmix).

Keton/Alkohol	R_f	Differenz
2,5-Hexandion	0,69	0,43
2,5-Hexandiol	0,26	
2,3-Pentandion	0,20	0,68
2,3-Pentandiol	0,88	
2,4-Pentandion	0,06	0,21
2,4-Pentandiol	0,27	
Himbeerketon	0,46	0,18
Rhododendrol	0,28	

Die Verwendung der Lösungsmittel EtOAc und MTBE mit dem jeweiligen Alkohol-Ketonpaar und Aluminiumoxid als stationärer Phase resultiert in einer guten Auftrennung. Je kleiner das Trennungsverhältnis (Differenz der zu trennenden Substanzen) auf den DC-Platten ist, desto schwieriger wird die Trennung bei Verwendung des Adsorbens in Form einer Trennsäule (Festbett-Adsorber).

Es wurden zusätzlich Versuche zur Verwendung reinen Isopropanols oder Methanols als Lauf- bzw. Elutionsmittel durchgeführt. Der Zusatz von Isopropanol oder Methanol zum Laufmittel führt zu einem erhöhten Retentionsfaktor, was auf die Eignung als Elutionsmittel schließen lässt. Der Zusatz von 1 % V V⁻¹ Diethylamin wurde aufgrund der Basizität als Zusatz zur Verbesserung der Auftrennung untersucht, führte jedoch zu keiner verbesserten Trennung. Für 2,4-Pentandion/2,4-Pentandiol und Himbeerke-

ton/Rhododendrol wurde mit den untersuchten Lösungsmittelmischungen keine gute Trennung erzielt.

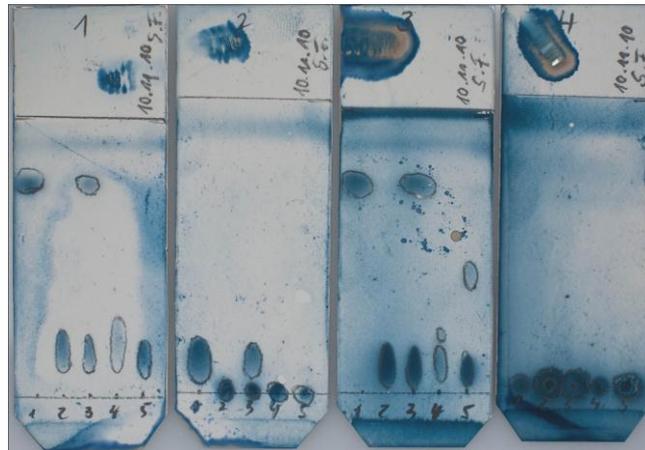


Abbildung 4–17: Dünnschichtchromatographie auf Aluminiumoxidplatten, Einsatz verschiedener organischer Lösungsmittel als mobile Phase, von links: EtOAc, Toluol, MTBE, Heptan. Substanzfleck (von links): 2,5-Hexandion, 2,5-Hexandiol, 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiolgemisch, Pentandion/Pentandiolgemisch, Toluolphase aus Enzymreaktion (ADH-‘A` mit Hexandion als Substrat).

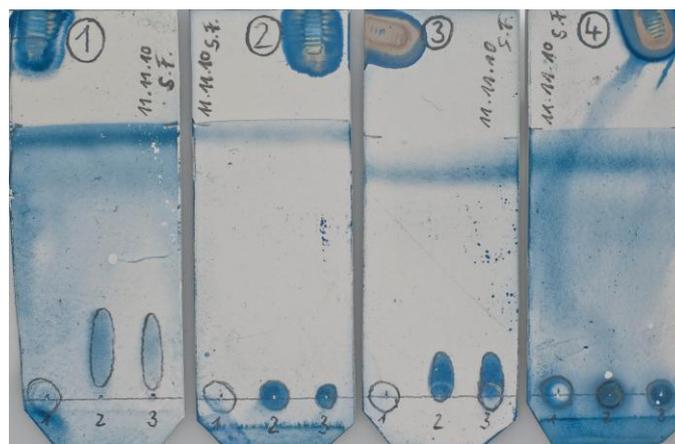


Abbildung 4–18: Dünnschichtchromatographie auf Aluminiumoxidplatten, Einsatz verschiedener organischer Lösungsmittel als mobile Phase, von links: EtOAc, Toluol, MTBE, Heptan. Substanzfleck (von links): 2,4-Pentandion, 2,4-Pentandiol, 2,4-Pentandion/2,4-Pentandiolgemisch.

Die Wanderungsstrecke der einzelnen Substanzen kann durch Verwendung von Lösungsmittelgemischen erhöht werden, dabei kommt dem Isopropanol als Eluent eine wichtige Rolle zu. Die Verwendung von Aluminiumoxidplatten zum Screening der Keton-Alkoholtrennung stellt eine geeignete Methode für eine erste Bewertung der Trennleistung dar.

4.3. Kinetik der Adsorption

Um besser beurteilen zu können wie lange das Erreichen eines Sättigungsgleichgewichts für die unterschiedlichen Adsorber dauert, wurden Versuche zur Adsorptionszeit durchgeführt. Die Adsorption wurde mit pulver-

förmigem Adsorber und mit Adsorbergranulaten aus dem Lösungsmittel Essigsäureethylester untersucht.

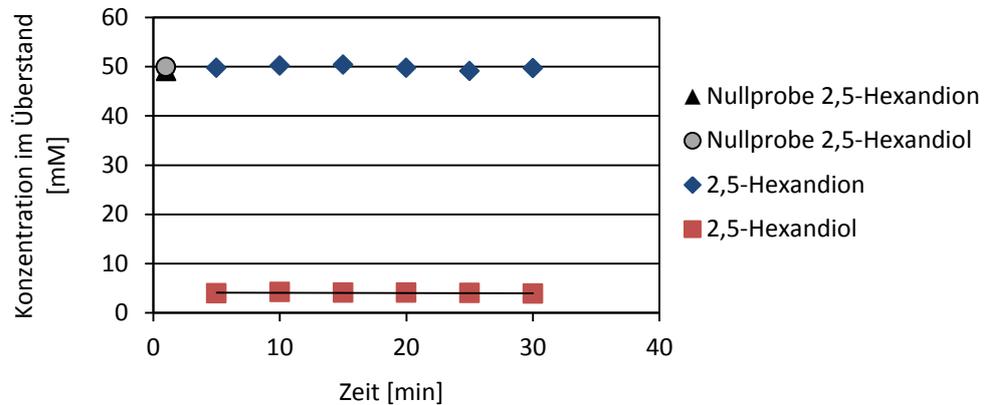


Abbildung 4–19: Test zum Zeitverlauf der selektiven Adsorption von äquimolaren Mengen an 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol (50 mM) aus Essigsäureethylester, Adsorber Puralox KR-160 (γ -Aluminiumoxid, pulverförmig), Adsorbermenge 3 g, RT, V = 15 mL, 400 rpm.

Der Konzentrationsverlauf bei der Adsorption auf pulverförmigem Adsorber (siehe Abbildung 4–19) ändert sich über einen Zeitverlauf von 30 Minuten nicht. Aus den Nullproben ist ersichtlich, dass die Anfangskonzentration von Keton und Alkohol 50 mM betrug. Die Alkoholkonzentration sank nach Zugabe des Adsorbers innerhalb von 5 Minuten auf 5 mM und blieb konstant. Dies deutet auf eine sehr schnelle Adsorption innerhalb von wenigen Minuten für den pulverförmigen Adsorber hin und stellt ein gutes Ergebnis dar.

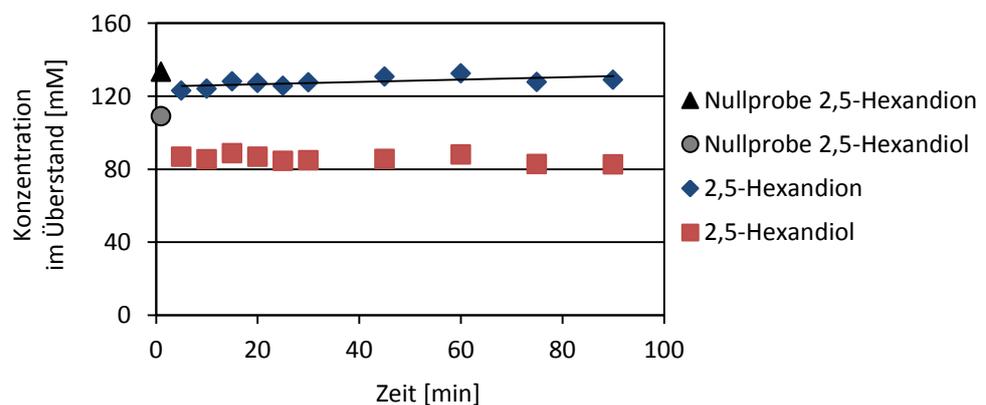


Abbildung 4–20: Verlauf der Adsorption von 2,5-Hexandion (130 mM) und 2,5-Hexandiol (110 mM) aus Essigsäureethylester, Adsorber Puralox KR-160 (Aluminiumoxid-Granulat), Adsorbermenge 3 g, V = 15 mL, RT, 400 rpm.

Die Adsorption von 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol aus Essigsäureethylester auf Aluminiumoxid-Granulat über einen Zeitverlauf von 90 Minuten zeigt für 2,5-Hexandiol einen Konzentrationsabfall (siehe Abbildung 4–20). Die Ketonkonzentration liegt nahe der Ausgangskonzentration und verändert sich kaum. Auch in diesem Fall wird ein gutes Ergebnis erzielt, allerdings

zeigt sich, dass die Zeitdauer länger ist, bis zur Einstellung eines Konzentrationsgleichgewichts.

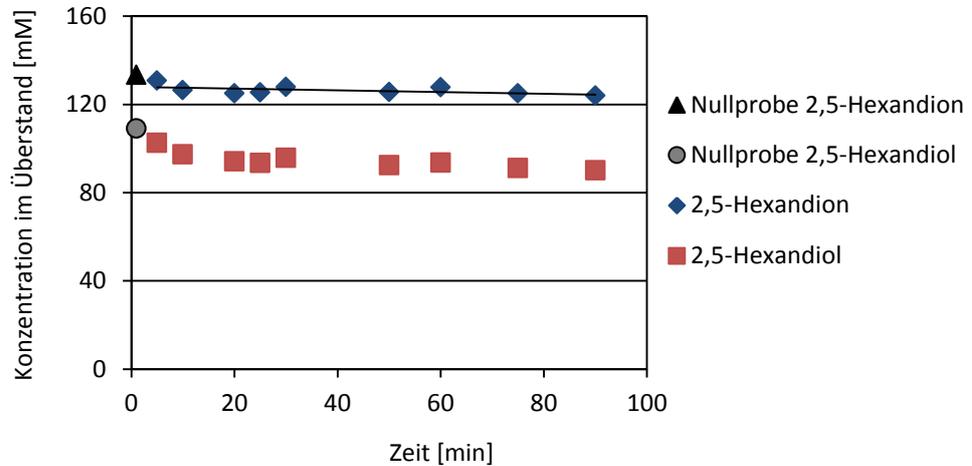


Abbildung 4–21: Verlauf der Adsorption von 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol aus Essigsäureethylester, Adsorber Siral 40 (Alumosilikat-Granulat 2073), Adsorbermenge 3 g, V = 15 mL, RT, 400 rpm.

Für das Alumosilikat-Granulat 2073 (Abbildung 4–21) wurde in den ersten Minuten häufiger Proben genommen, so dass eine geringfügige Abnahme der Konzentration beider Stoffe über die Zeit erkennbar ist. Die Alkoholkonzentration nimmt mit der Zeit weiter ab, die Ketonkonzentration verändert sich kaum.

Im Fall der Granulate ist die Zeitdauer grundsätzlich höher, bis der Konzentrationsausgleich zwischen Medium und Adsorber stattgefunden hat. Die Granulate eignen sich grundsätzlich, ein schnelleres Ergebnis wird allerdings mit den pulverförmigen Adsorbentien erzielt.

In der folgenden Tabelle sind noch einmal die Konzentrationen dargestellt.

Tabelle 4-4: Mittelwerte zur Adsorption auf granulierten Aluminiumoxiden und Alumosilikaten.

2070 Aluminiumoxid	2,5-Hexandion	2,5-Hexandiol
Mittelwert Konz. [mM] Überstand	127,60	84,95
Abweichung [%] von Nullprobe	4,5	28,4
2073 Alumosilikat	2,5-Hexandion	2,5-Hexandiol
Mittelwert Konz. [mM] Überstand	126,76	94,40
Abweichung [%] von Nullprobe	5,2	15,5

Für pulverförmige Adsorber läuft die Adsorption offenbar sehr schnell ab, da die Bindungsstellen gut zugänglich sind. Der Konzentrationsausgleich benötigt im Fall der Granulate mehr Zeit, was aus dem Verlauf der Konzentrationen gut erkennbar ist. Der verlangsamte Konzentrationsausgleich

der Granulate kann durch Bindemitteln zur Granulation, wie z. B. Gips, noch verstärkt sein [Hart *et al.* 1990].

4.4. Adsorptionsisothermen

Adsorptionsisothermen stellen eine graphische Auftragung der Beladung eines Stoffes (q) und der Gleichgewichtskonzentration des verbleibenden Sorbats in der Lösung (C_f) dar, dem Phasengleichgewicht. Mithilfe von Adsorptionsisothermen ist eine genauere Aussage hinsichtlich der Kinetik eines Adsorptionsprozesses möglich. Beschrieben werden der Gleichgewichtszustand zwischen Adsorption und Desorption und damit der Gleichgewichtszustand der Adsorption eines Stoffes. Isothermen müssen aufgrund komplexer Wechselwirkungen der gelösten Stoffe untereinander, des Einflusses des Lösungsmittels und der Eigenschaften des als Feststoff eingesetzten Adsorbens experimentell ermittelt werden. Dies gilt in besonderem Maße für Gemischtisothermen [Seidel-Morgenstern 1995]. Da die Adsorption mit der Temperatur variiert, ist eine konstante Temperatur eine der Grundbedingungen.

Mithilfe nicht-linearer Regression werden die Messdaten an verschiedene Modelle angepasst, welche die Vorgänge am Adsorbens unterschiedlich gut wiedergeben. Zur Beschreibung von Isothermen stehen einige Modelle zur Verfügung: die Langmuir Isotherme [Langmuir 1933], welche eine breite Akzeptanz besitzt und als praktische Methode zur Integration experimenteller Daten von Adsorptionsprozessen gilt; die Freundlich-Isotherme [Freundlich 1907] und die BET-Isotherme [Brunauer, Emmet, Teller 1938]. Die Langmuir Isotherme gibt einfache Adsorptionsphänomene gut wieder wobei Grundannahmen getroffen werden:

- Feste Anzahl an Bindungsstellen
- Gleichwertigkeit aller Bindungsstellen (homogene Oberfläche)
- Nur ein Sorbat, welches mit einer Bindungsstelle reagiert
- Keine Interaktion zwischen gebundenen Molekülen

Durch die Annahme der verfügbaren freien Bindungsstellen (B_s) auf der Oberfläche zur Anbindung der Zielmoleküle (PM), kann die Adsorption als Gleichgewichtsphänomen beschrieben werden:



Wobei B_sPM das Adsorbat darstellt, bzw. die Beladung. Daraus ergibt sich die Gleichgewichtskonstante K für den Vorgang der Adsorption:

$$K = \frac{[B_sPM]}{[B_s] + [PM]} \quad \text{Formel 4-3}$$

Die Konstante beschreibt die Affinität des Produktes zum Feststoff.

Für die Langmuir-Isotherme ergibt sich:

$$q = q_{\max} \frac{[bC_f]}{[1+bC_f]} \quad \text{Formel 4-4}$$

Die Auftragung von (C_f/q) gegen C_f führt zur Linearisierung, dem sogenannten Scatchard-Plot, aus dem sich die Langmuir Konstante b ergibt [Volesky 2003]. Diese Konstante steht mit der Arrhenius Gleichung über die Energie der Adsorption in Beziehung. Daraus folgt:

$$b = 1/K \text{ bzw.} \quad \text{Formel 4-5}$$

$$K = 1/b \quad \text{Formel 4-6}$$

Vereinfacht bedeutet dies:

$$b = 1/K = \frac{[B_sPM]}{[B_s]+[PM]} \quad \text{Formel 4-7}$$

Womit b das Gegenteil der Affinität darstellt.

Gemessen wurden Adsorptionsisothermen für Reinstoffe und Stoffgemische in unterschiedlichen Lösungsmitteln. Dabei wurden neben pulverförmigen Adsorbenten auch verschiedene Granulate untersucht, die vom Kooperationspartner Süd-Chemie AG zur Verfügung gestellt wurden.

4.4.1. Adsorptionsisothermen Alumosilikat

Für den Reinstoff 2,5-Hexandiol und das Stoffgemisch 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol wurden Adsorptionsisothermen aus unterschiedlichen Lösungsmitteln auf pulverförmigem Alumosilikat gemessen.

Da die Adsorption aus Essigsäureethylester im Screening vielversprechend verlief, wurde zunächst dieses Lösungsmittel untersucht.

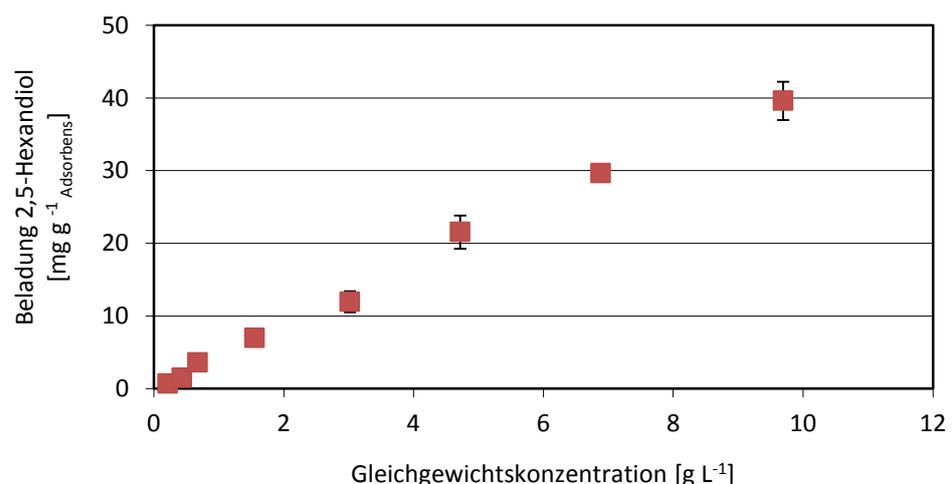


Abbildung 4–22: Adsorptionsisotherme für 2,5-Hexandiol (150 mM) gelöst in EtOAc, $V = 1\text{ mL}$, $t = 60\text{ min}$, RT, 350 rpm auf Rotationsschüttler, Adsorbent Siral 40 (Alumosilikat), $n = 2$. Die ermittelte Langmuir Gleichgewichtskonstante beträgt $K = 4,6\text{ g L}^{-1}$, $b = -0,22\text{ g L}^{-1}$, $q = 75,4\text{ mg g}^{-1}$.

Für die Adsorption aus Essigsäureethylester zeigt sich eine gute Bindung des 2,5-Hexandiol mit einer maximalen Bindung $> 50 \text{ mg g}^{-1}$. Die Isotherme folgt dem Langmuir-Typ und erreicht den Sättigungszustand $q_{\text{max}} = 50 \text{ mg g}^{-1}$, der in Einzelexperimenten separat ermittelt wurde und ab dem keine weitere Produktaufnahme mehr möglich ist. Bei den Versuchen handelt es sich um Doppelbestimmungen, es zeigt sich eine gute Reproduzierbarkeit der Messdaten (Abbildung 4–22). Die Langmuir Gleichgewichtskonstante beträgt $K = 4$ und liegt damit im Vergleich zu den Daten der folgenden Isothermen relativ hoch, was durch den Umstand der niedrigen Anfangsbeladung zustande kommt. Je steiler der Anfangsanstieg der Isotherme, desto höher ist die Affinität zum Adsorbens auch bei geringen Konzentrationen. Da die Isotherme eines Reinstoffs einen Ideal-Zustand darstellt, das Ziel allerdings in der Adsorption des Produktalkohols aus Stoffgemischen besteht, wurde zusätzlich der Einfluss bei Anwesenheit des korrespondierenden Ketons untersucht (siehe Abbildung 4–23).

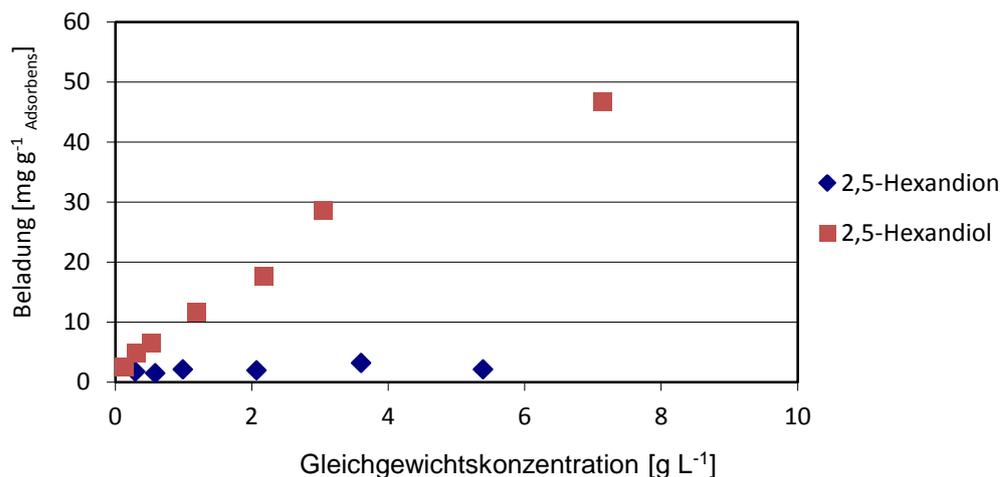


Abbildung 4–23: Adsorptionsisotherme für Gemisch von 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol (100 mM) gelöst in Essigsäureethylester, $V = 2 \text{ mL}$, $t = 60 \text{ min}$, 350 rpm, Adsorber Siral 40 (Alumosilikat), RT.

Bei Anwesenheit des Ketons zeigt sich für den Zielalkohol eine geringfügig reduzierte Beladungsmenge in Essigsäureethylester. Die selektive Trennung mithilfe des Adsorbens ergibt sich aus der Isotherme, allerdings werden (wie schon in den Experimenten zur Adsorption aus dem Überstand gemessen) auch geringe Mengen des Ketons adsorbiert.

Für die Adsorptionsisotherme aus MTBE ergibt sich folgender Verlauf:

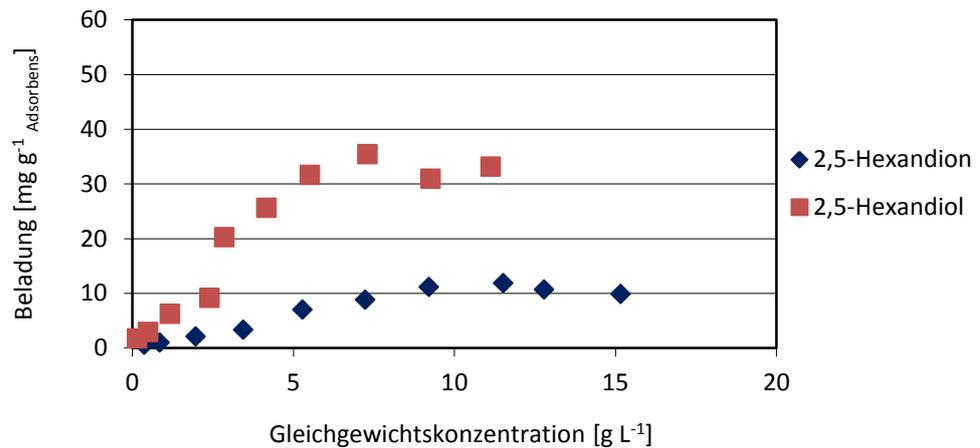


Abbildung 4–24: Adsorptionsisotherme für 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol (150 mM) gelöst in MTBE, $V = 1\text{ mL}$, $t = 60\text{ min}$, RT, 350 rpm, Adsorber Siral 40 (Alumosilikat).

Neben Essigsäureethylester hat sich *tert*-Butylmethylether in den Versuchen als geeignetes Lösungsmittel für die selektive Adsorption erwiesen (siehe Abbildung 4–24) und die Versuchsergebnisse zur Adsorption konnten bestätigt werden. Es ist klar erkennbar, dass der Alkohol bevorzugt und in höherer Konzentration gebunden wird. Das Keton wurde mit einer Beladungsmenge von etwa 12 mg g^{-1} gebunden. Im hohen Konzentrationsbereich wurden in den Experimenten starke Schwankungen beobachtet.

Die zusammengefassten Reinstoffisothermen für 2,5-Hexandiol aus unterschiedlichen Lösungsmitteln, geben die Abhängigkeit der Adsorption des Zielalkohols vom Lösungsmittel gut wieder. Wie in den vorhergehenden Versuchen wurde Heptan wieder mit Isopropanol $10\% \text{ V V}^{-1}$ versetzt um die Löslichkeit des Zielmoleküls zu gewährleisten.

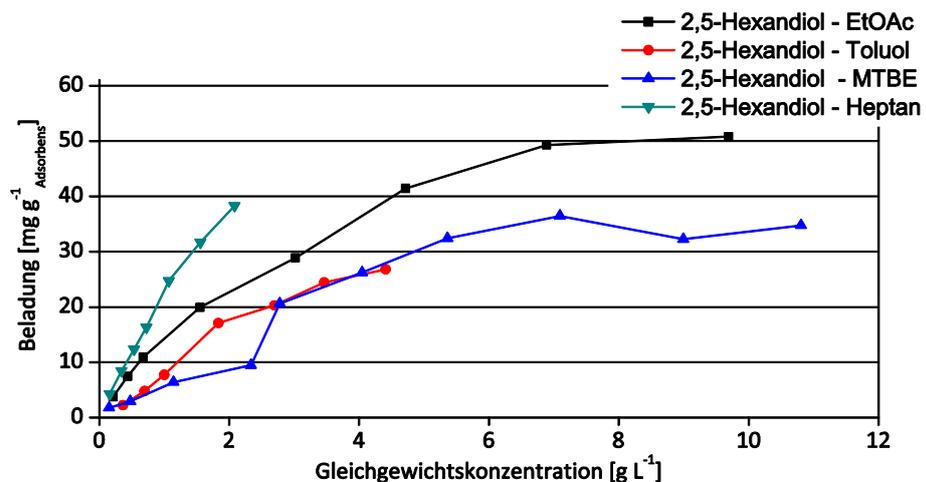


Abbildung 4–25: Adsorptionsisothermen für 2,5-Hexandiol für das Adsorbens Siral 40 (Alumosilikat, pulverförmig) in Abhängigkeit vom Lösungsmittel, $V = 1\text{ mL}$, RT.

Die Wahl des Lösungsmittels kann in Abhängigkeit der am besten geeigneten Bedingungen erfolgen. Für das Trennproblem der 2,5-Hexandiol Abtrennung aus Keton-Alkoholgemischen eignen sich EtOAc oder MTBE, wobei immer auch geringe Mengen Keton auf dem Alumosilikat-Träger adsorbieren.

4.4.2. Adsorptionsisothermen γ -Aluminiumoxid

Für den Reinstoff 2,5-Hexandiol und das Stoffgemisch 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol wurden ebenfalls Adsorptionsisothermen aus unterschiedlichen Lösungsmitteln auf Puralox KR-160 Aluminiumoxid-Pulver gemessen. Zunächst wurden Versuche mit Essigsäureethylester durchgeführt.

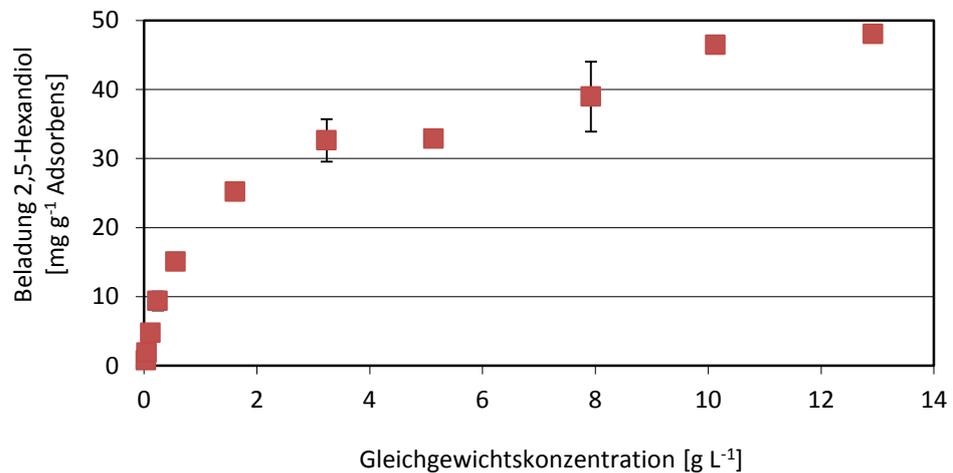


Abbildung 4–26: Adsorptionsisotherme für 2,5-Hexandiol (150 mM) gelöst in EtOAc, $V = 1 \text{ mL}$, $t = 60 \text{ min}$, RT, Puralox KR-160 Aluminiumoxid, $n = 2$. Die ermittelte Langmuir Gleichgewichtskonstante beträgt $1,1 \text{ g L}^{-1}$, $b = 0,89 \text{ g L}^{-1}$, $q = 48 \text{ mg g}^{-1}$.

Die Adsorption des Reinstoffes 2,5-Hexandiol aus EtOAc zeigt schon im geringen Konzentrationsbereich eine hohe Beladung des Adsorbens, erkennbar durch den steilen Anstieg der Isotherme (Abbildung 4–26). Die Langmuir Konstante ist mit 1,1 relativ gering und drückt die hohe Affinität des Zielmoleküls zum Feststoff im niedrigen Konzentrationsbereich aus. Im Vergleich zum Alumosilikat ist die maximale Beladbarkeit des Alkohols für das Aluminiumoxid etwas niedriger.

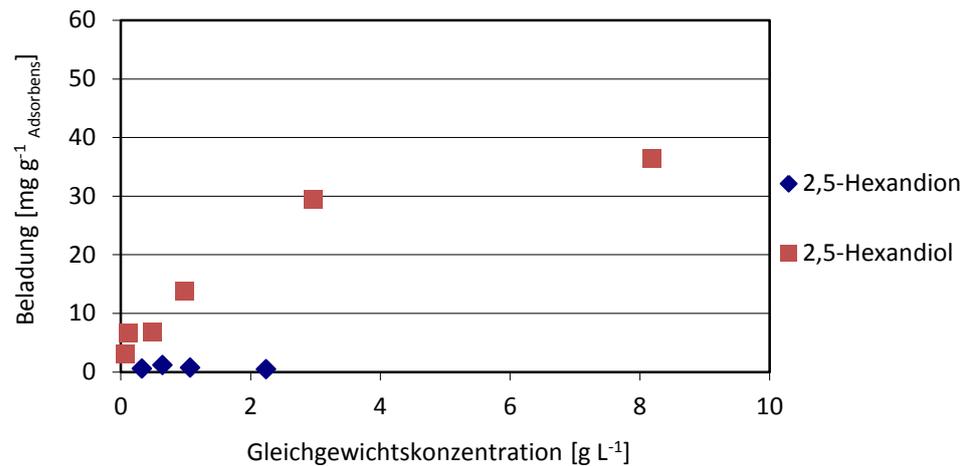


Abbildung 4-27: Adsorptionsisothermen für 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol ($C_{\max} = 100 \text{ mM}$) gelöst in Essigsäureethylester, $V = 2 \text{ mL}$, $t = 60 \text{ min}$, 350 rpm , Adsorber Puralox KR-160 (γ -Aluminiumoxid), durch fehlende Datenpunkte 2,5-Hexandion nicht auswertbar.

Für das Stoffgemisch zeigt sich die starke Selektivität des Aluminiumoxids zugunsten des Alkohols (Abbildung 4-27). Es wurde kaum Diketon adsorbiert, die maximale Beladung mit dem Zielalkohol lag für das Stoffgemisch geringfügig niedriger als für den Reinstoff. Aufgrund der geringen Ketonadsorption sind für das 2,5-Hexandion kaum Messpunkte darstellbar.

Die Adsorption des Zielalkohols durch Aluminiumoxid aus MTBE hat sich in den Screeningversuchen als vielversprechend erwiesen.

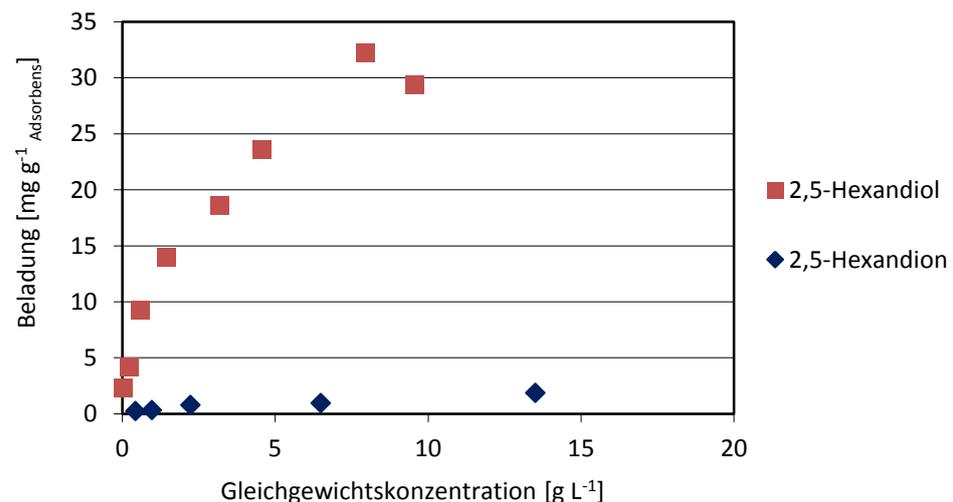


Abbildung 4-28: Adsorptionsisotherme für 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol ($C_{\max} = 150 \text{ mM}$) gelöst in MTBE, $V = 1 \text{ mL}$, $t = 60 \text{ min}$, RT, Puralox KR-160 Aluminiumoxid.

Auch für die Adsorption aus MTBE ergibt sich eine hohe Beladung mit dem Alkohol schon bei niedrigen Konzentrationen, was das Aluminiumoxid in Kombination mit MTBE als guten Adsorber auszeichnet (Abbildung 4–28). Durch die hohe Beladung schon im niedrigen Konzentrationsbereich kann bei einer gleichgewichtslimitierten Reaktion das Reaktionsgleichgewicht beim *in-situ* Einsatz positiv beeinflusst werden und die Reaktion beschleunigt werden.

Das Keton wurde nur in sehr geringen Konzentrationen gebunden.

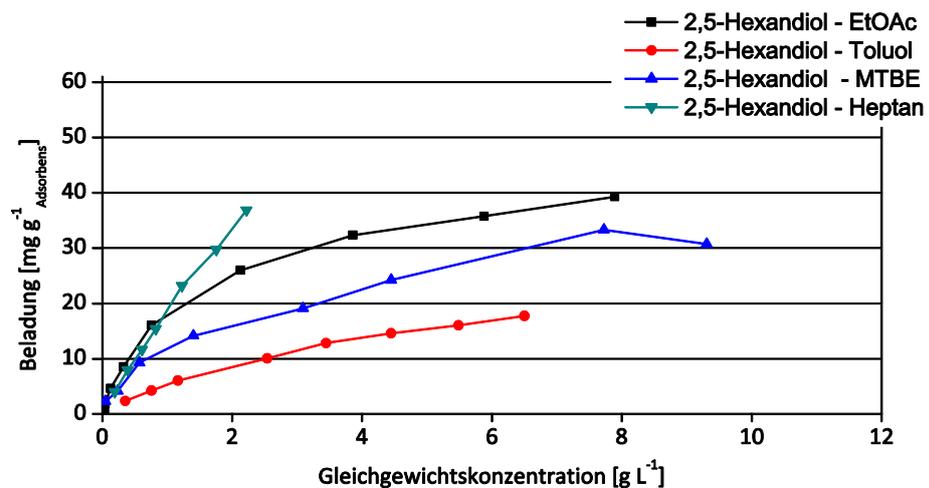


Abbildung 4–29: Adsorptionsisothermen für 2,5-Hexandiol für Adsorber Puralox KR-160 (γ -Aluminiumoxid) in Abhängigkeit vom Lösungsmittel, $V = 1 \text{ mL}$, RT, 350 rpm.

Die Zusammenfassung der Reinstoffisothermen von 2,5-Hexandiol aus unterschiedlichen Lösungsmitteln zeigt wieder eine Abhängigkeit der Adsorption vom Lösungsmittel (Abbildung 4–29), so dass für das jeweilige Adsorptionsproblem gezielt die richtige Kombination gewählt werden muss.

Da die enzymatische Umsetzung des 2,5-Hexandions über das Intermediat 5-Hydroxyhexan-2-on führt, liegt eine weitere Verbindung mit einer Hydroxygruppe vor, die theoretisch adsorbiert werden könnte. Dies wurde im Experiment überprüft (siehe Abbildung 4–30).

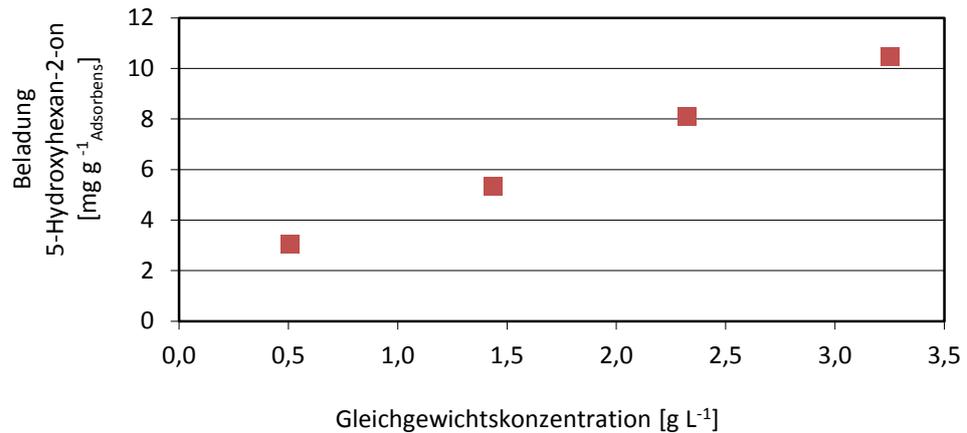


Abbildung 4–30: Adsorptionsisotherme für 5-Hydroxyhexan-2-on (Intermediat) gelöst in Toluol (mit 10 % V V⁻¹ Isopropanol), V = 2 mL, t = 60 min, RT, Adsorber Puralox KR-160 (γ -Aluminiumoxid).

Die Ergebnisse belegen für das Zwischenprodukt 5-Hydroxyhexan-2-on eine geringfügige Adsorption aus Toluol (mit Zusatz von 10 % V V⁻¹ Isopropanol). Es muss davon ausgegangen werden, dass neben dem Zielprodukt auch geringe Mengen des Intermediats auf dem Adsorbens gebunden werden und dass dieser Fall übertragbar ist, also auch in anderen Lösungsmitteln auftritt.

4.4.3. Adsorptionsisothermen Kieselgel

Um die Leistungsfähigkeit der untersuchten synthetischen anorganischen Adsorber Aluminiumoxid und Alumosilikat mit etablierten Systemen vergleichen zu können, wurden Adsorptionsisothermen von Standard-Kieselgel (Kieselgel Merck Typ 9385 230-400 mesh, 60 Å) in denselben Systemen angefertigt. Die Adsorption aus einem Stoffgemisch aus Essigsäureethylester mit Kieselgel ergibt folgenden Isothermenverlauf:

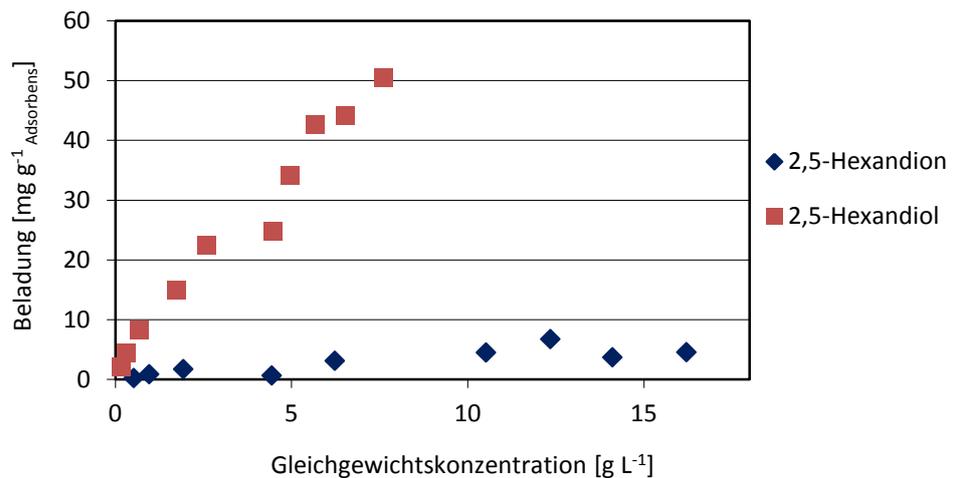


Abbildung 4–31: Adsorptionsisotherme für 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol ($C_{\text{max}} = 150 \text{ mM}$), gelöst in Essigsäureethylester, $V = 2 \text{ mL}$, $t = 60 \text{ min}$, RT, Adsorber: Standard Kieselgel.

Für die Adsorption von 2,5-Hexandiol mithilfe von Kieselgel aus EtOAc ergibt sich für den Messbereich eine lineare Isotherme, eine Sättigungsgrenze kann aus den ermittelten Daten nicht abgelesen werden (Abbildung 4–31). Mit steigender Konzentration im Überstand steigt allerdings auch die Menge adsorbierten Diketons linear an. Im Bereich niedriger Konzentration ist die Beladung nicht so hoch wie die des Aluminiumoxids. Damit weist Kieselgel bei der Adsorption aus Essigsäureethylester eine eingeschränkte Selektivität und eine niedrigere Beladung bei geringer Konzentration auf (siehe Abbildung 4–31), ist aber für einen Einsatz geeignet.

Für die Adsorption des Stoffgemisches aus dem Lösungsmittel MTBE mithilfe von Kieselgel ergibt sich:

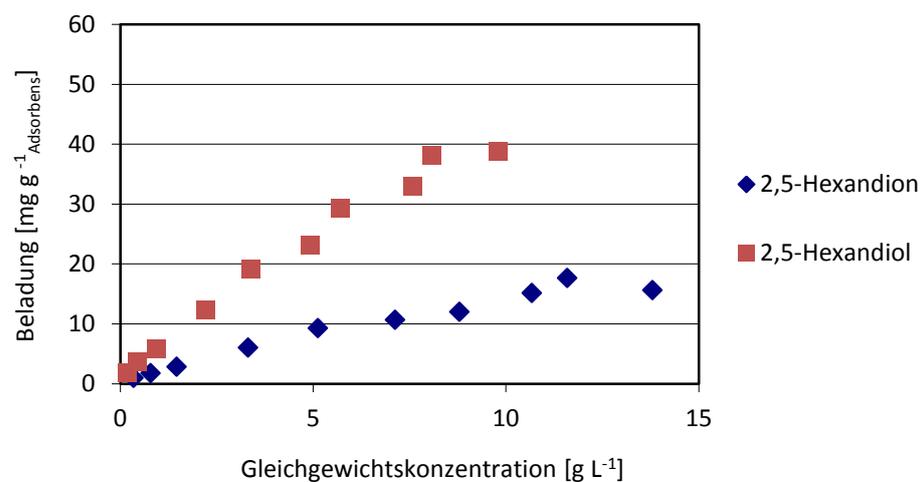


Abbildung 4–32: Adsorptionsisotherme für 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol, Adsorption aus MTBE, $V = 1 \text{ mL}$, $t = 60 \text{ min}$, RT, Adsorber Standard Kieselgel.

Die Isotherme aus MTBE weist eine schlechtere Selektivität zwischen Alkohol und Keton auf (Abbildung 4–32). Es ergibt sich sowohl für den Alkohol als auch für das Keton eine lineare Isotherme mit abweichender Steigung zur Isotherme aus EtOAc (Abbildung 4–31), adsorbiert wurde ein Stoffgemisch beider Stoffe. Damit ist Kieselgel für die selektive Adsorption unter Verwendung von MTBE eher ungeeignet.

4.4.4. Adsorptionsisothermen granulierter Adsorber

Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf prozessrelevante Adsorber zu gewährleisten, wurden neben pulverförmigen Adsorbentien auch Granulate untersucht (Tabelle 4-5). Soweit verfügbar wurden die bereits untersuchten Adsorbentien in granulierter Form untersucht. Gemessen wurden Adsorptionsisothermen für die Adsorption von 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol aus unterschiedlichen Lösungsmitteln.

Tabelle 4-5: Übersicht der Granulate unterschiedlicher Zusammensetzung.

Bezeichnung	Anteile $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ [%]	Teilchengröße (D_{50}) [μm]	BET [m^2/g]	Porendurchmesser [nm]	Porenvolumen [$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$]
1997 Puralox KR 160	95 ALOX	432	150	15,1	0,59
2010 (experimentelles Granulat)	60 : 40	540	472	5,8	0,72
2014 (Aluminiumoxid-Granulat)	81 ALOX	215	243	8,2	0,5

Bei den Granulaten handelt es sich um Adsorbentien unterschiedlicher Zusammensetzung, aber auch unterschiedlicher Geometrie, so dass je nach Art der Anwendung gewählt werden kann (siehe Abbildung 4–33).

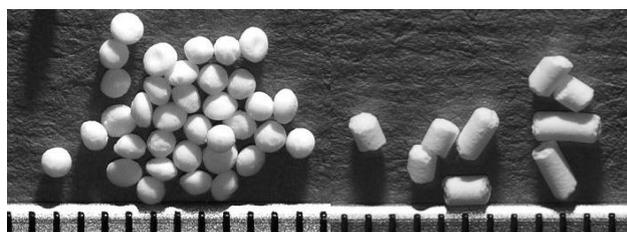


Abbildung 4–33: Granulate, links 2070 (Aluminiumoxid), rechts 2073 (Alumosilikat) aus unterschiedlichen Herstellungsprozessen.

Gemessen wurden die Isothermen aus Stoffgemischen (2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol) in unterschiedlichen Lösungsmitteln. Zu jedem Granulat wurde eine zusammenfassende Graphik erstellt.

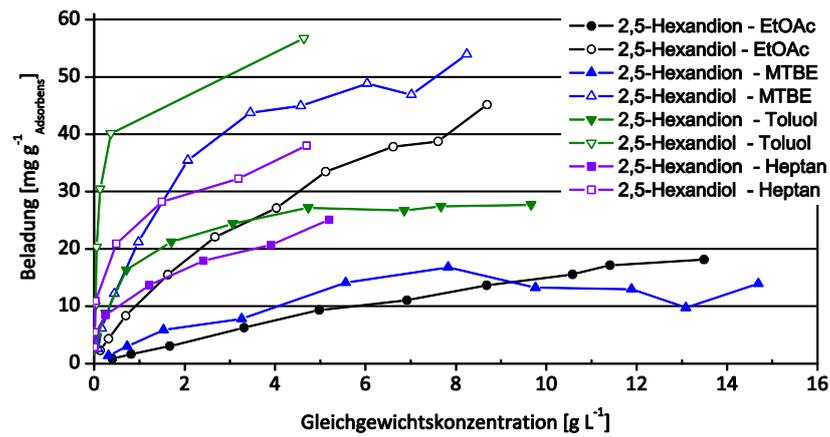


Abbildung 4–34: Adsorptionsisothermen von 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol $C_{\max} = 150 \text{ mM}$ für Adsorbens 2010 (Alumosilikat, experimentelles Granulat) in Abhängigkeit vom Lösungsmittel, $V = 1 \text{ mL}$, RT, 350 rpm.

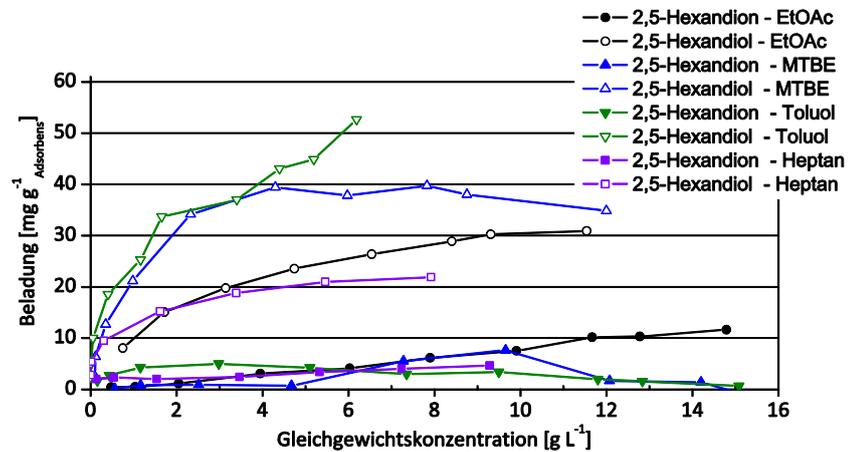


Abbildung 4–35: Adsorptionsisothermen von 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol $C_{\max} = 150 \text{ mM}$ für Adsorbens Puralox KR 160, Aluminiumoxid-Granulat ExM 1997 in Abhängigkeit vom Lösungsmittel, $V = 1 \text{ mL}$, RT, 350 rpm.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich auch die Adsorbergranulate zur selektiven Adsorption eignen. Dabei zeigt sich für das Alumosilikat Granulat 2010 wie schon in den vorhergegangenen Untersuchungen eine verminderte Selektivität, da auch Diketon gebunden wird (Abbildung 4–34).

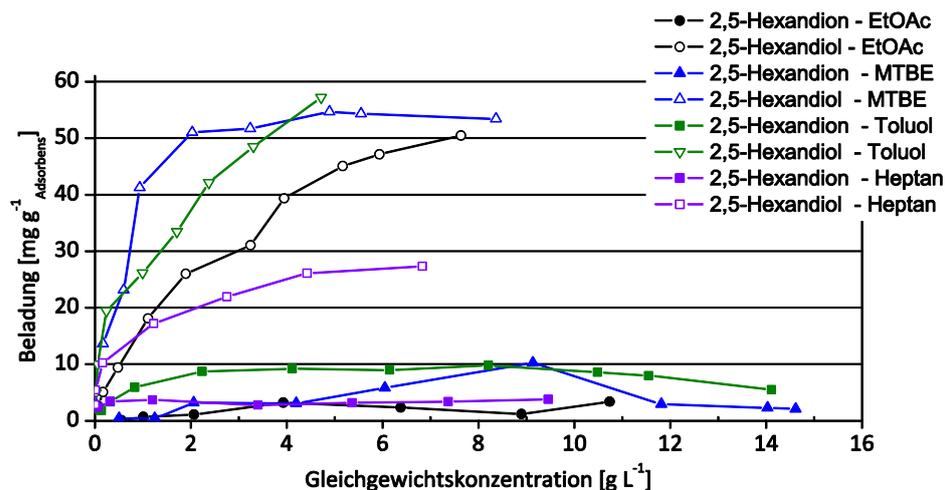
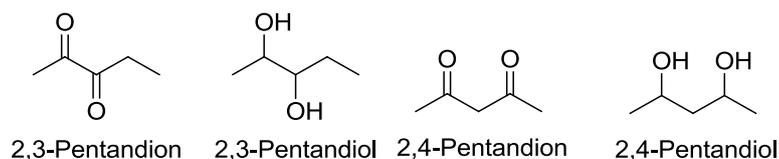


Abbildung 4–36: Adsorptionsisothermen von 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol
 $C_{\max} = 150 \text{ mM}$ für Aluminiumoxid-Granulat ExM 2014 in Abhängigkeit vom Lösungsmittel, $V = 1 \text{ mL}$, RT, 350 rpm.

Die Adsorbergranulate Puralox KR-160 Aluminiumoxid (1997) und 2014 Aluminiumoxid, zeigen eine gute Selektivität. Das Granulat 2014 adsorbiert bei niedrigen Konzentrationen sehr gut und zeigt im Experiment eine höhere Kapazität für den Zielalkohol (Abbildung 4–36). Alle Granulate weisen die mit pulverförmigen Adsorbentien gemessene Selektivität zugunsten des Alkohols auf. Bei den Granulaten handelt es sich um stark poröse Adsorbentien, so dass die Beladung mit dem Zielalkohol hoch ausfällt ($> 40 - 50 \text{ mg g}^{-1}$). Für alle Ansätze zur Messung mit den Granulaten im Lösungsmittel Heptan wurden $10\% \text{ V V}^{-1}$ Isopropanol zugesetzt, um die Löslichkeit der Alkohole zu erhöhen. Im Experiment hat sich gezeigt, dass die Granulate unterschiedliche Stabilität je nach Herstellungsmethode aufweisen (mündliche Information des Projektpartners Süd-Chemie AG), so dass für die Anwendung im Prozess eine Anpassung der Stabilität des Granulates vorgenommen werden sollte.

4.4.5. Untersuchung weiterer Verbindungen und Adsorber

Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse zur selektiven Adsorption auf weitere Alkohol-Ketonpaare zu untersuchen, wurden Experimente mit 2,3-Pentandion/2,3-Pentandiol, 2,4-Pentandion/2,4-Pentandiol und Himbeerketon/Rhododendrol durchgeführt.



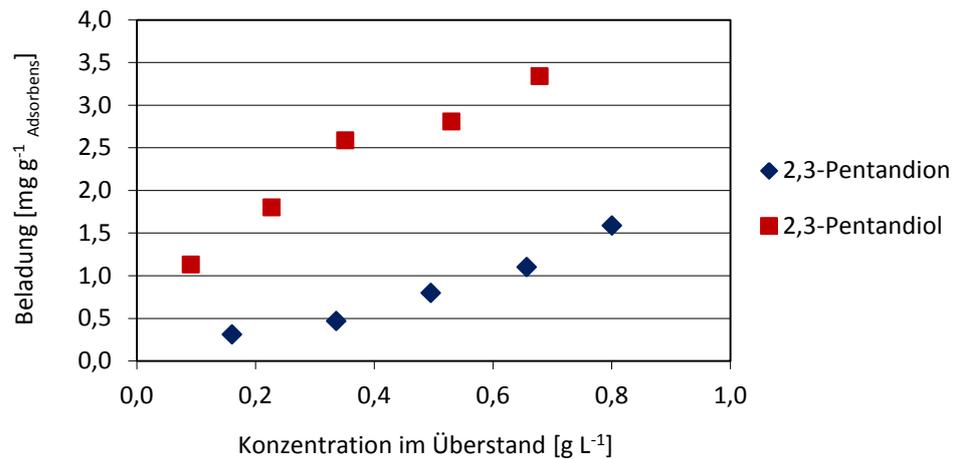


Abbildung 4–37: Adsorptionsisotherme 2,3-Pentandion/2,3-Pentandiol ($C_{\max} = 10 \text{ mM}$) in EtOAc, $V = 2 \text{ mL}$, $t = 60 \text{ min}$, 150 rpm , RT, Adsorber Siral 40 (Alumosilikat, pulverförmig).

Die Untersuchung zur Adsorption von 2,3-Pentandion/2,3-Pentandiol wurde im niedrigen Konzentrationsbereich durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen eine Selektivität zugunsten des 2,3-Pentandiols aus EtOAc, allerdings werden sowohl der Alkohol als auch das Keton adsorbiert (Abbildung 4–37). Untersuchungen mit 2,4-Pentandion/2,4-Pentandiol mit pulverförmigen Adsorbentien weisen eine Abweichung von den bisherigen Ergebnissen auf und sind im Folgenden dargestellt (siehe auch Kapitel 4.2).

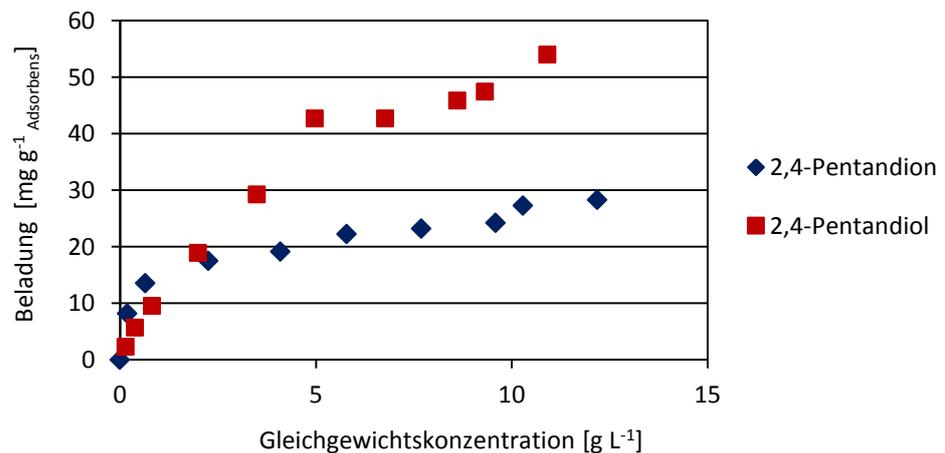


Abbildung 4–38: Adsorptionsisotherme für 2,4-Pentandion/2,4-Pentandiol ($C_{\max} = 150 \text{ mM}$) aus EtOAc, $V = 2 \text{ mL}$, $t = 60 \text{ min}$, RT, Adsorber Siral 40 (Alumosilikat, pulverförmig)

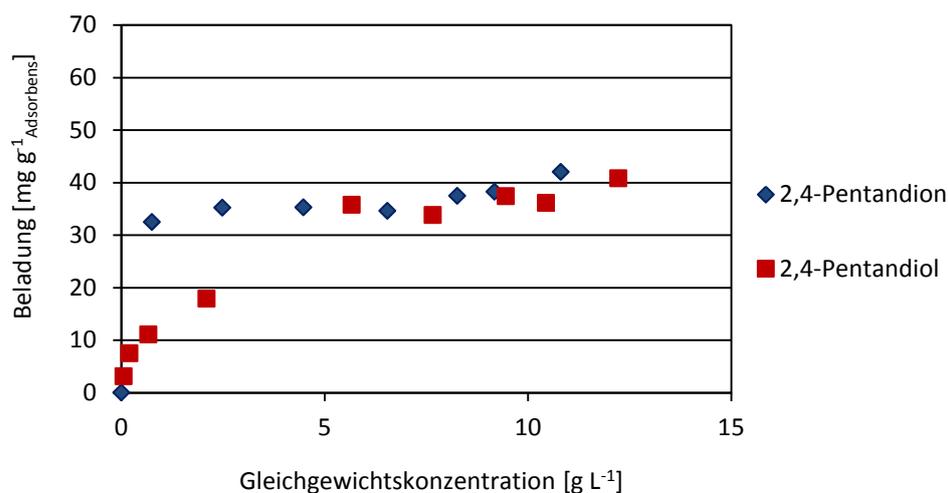
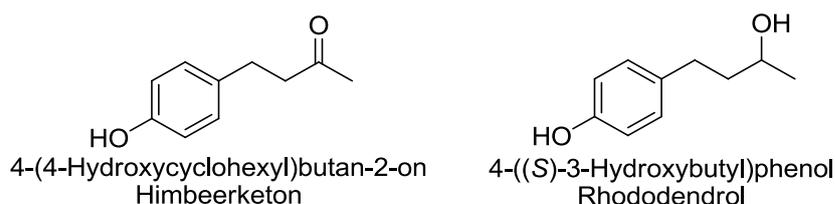


Abbildung 4–39: Adsorptionsisotherme für 2,4-Pentandion/2,4-Pentandiol ($C_{\text{max}} = 150 \text{ mM}$) aus EtOAc, $V = 2 \text{ mL}$, $t = 60 \text{ min}$, RT, Adsorber Puralox KR-160 (γ -Aluminiumoxid, pulverförmig).

Das Alumosilikat Siral 40 (Abbildung 4–38) bindet eine höhere Konzentration 2,4-Pentandiol als das Aluminiumoxid Puralox KR-160 (Abbildung 4–39). Im niedrigen Konzentrationsbereich zeigt sich allerdings eine relativ hohe Beladung mit 2,4-Pentandion (Abbildung 4–39). Für das Aluminiumoxid liegt die maximale Beladung für Alkohol und Keton mit 40 mg g^{-1} Adsorbens in etwa gleich, so dass keine Selektivität vorliegt. Im niedrigen Konzentrationsbereich ist die Anbindung des Ketons an das Aluminiumoxid offenbar höher als beim Alumosilikat, dieser Sachverhalt sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein, um den zugrunde liegenden Mechanismus der Anbindung zu klären. Abweichungen wurden bereits im Kapitel 4.2 beschrieben, dort wurde bereits die stärkere Ketonanbindung belegt.

Um neben der Adsorptionsfähigkeit für aliphatische Verbindungen auch die Bindung von Aromaten bewerten zu können, wurde das Keton-Alkoholpaar Himbeerketon/Rhododendrol untersucht, verwendet wurde pulverförmiges Aluminiumoxid Pural SB (Al_2O_3 75 %).



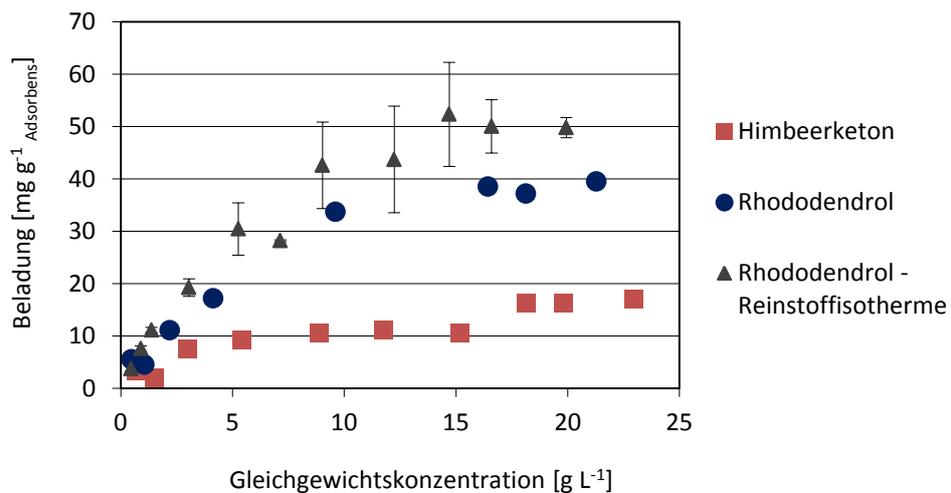


Abbildung 4–40: Adsorptionsisotherme für Himbeerketon und Rhododendrol in EtOAc ($C_{\max} = 150 \text{ mM}$), $V = 2 \text{ mL}$, $t = 60 \text{ min}$, 150 rpm , Adsorber Pural SB. Zusätzlich dargestellt: Reinstoffisotherme von Rhododendrol (gleiche Bedingungen, EtOAc), $n = 2$.

In Abbildung 4–40 sind die Adsorptionsisothermen des Reinstoffs Rhododendrol und die Adsorption aus einem Stoffgemisch von Himbeerketon und Rhododendrol in EtOAc dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass bevorzugt der Alkohol gebunden wurde. Es ist eine deutliche Abweichung der Reinstoffisotherme zu erkennen, was darauf hinweist, dass sich bei Anwesenheit des Ketons, die Beladungsmenge des Alkohols verringert. Ein Sachverhalt der bei Anwesenheit weiterer Stoffe (z. B. des Cosubstrats) zusätzlich verstärkt werden kann und auch bei den Festbettversuchen beobachtet wurde (siehe Kapitel 4.6). In Abbildung 4–40 zeigt sich für das untersuchte Stoffsystem eine Selektivität, die allerdings nicht sehr stark ausgeprägt ist.

In ersten Experimenten wurde bereits die Adsorption von Keton und Alkohol auf dem Ionentauscher Amberlite gemessen (siehe Kapitel 4.1.5). Die Messung von Adsorptionsisothermen wurde durchgeführt, um zu überprüfen, wie hoch die Kapazität für den Alkohol ist und ob sich die Ionentauscher als selektive Adsorber einsetzen lassen. Den Versuchen waren theoretische Berechnungen des Projektpartners CAM-D Technologies GmbH vorausgegangen. Dabei wurden Molekular-Dynamik-Simulationen mit dem CHARMM-Kraftfeld (**C**hemistry at **H**ARvard **M**acromolecular **M**echanics) [MacKerell *et al.* 1998] durchgeführt. Die Temperatur betrug 298 K und als Simulationsdauer t wurden insgesamt 300 ps gewählt. Nach 100 ps erfolgte die thermodynamische Gleichgewichtseinstellung. Anschließend wurde die Dynamik des Systems weitere 200 ps im thermodynamischen Gleichgewicht simuliert.

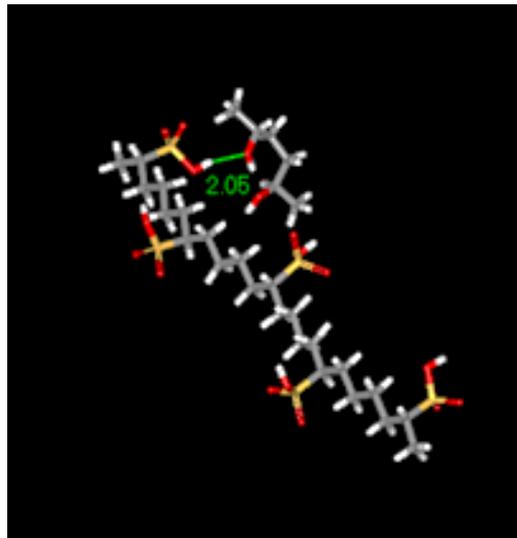


Abbildung 4–41: Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen Polysulfonat und 2,5-Hexandiol (Simulation des Projektpartners CAM-D Technologies GmbH).

Für das Lösungsmittel Essigsäureethylester wurden unter den Simulationsbedingungen keine Wechselwirkungen des Alkohols mit den Polysulfonaten beobachtet. Im Lösungsmittel *tert*-Butylmethylether hingegen wurde bei der Simulation die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Polymer und Alkohol erfasst. Aus den Simulationen wurde gefolgert, dass eine Adsorption von 2,5-Hexandiol aus *tert*-Butylmethylether bevorzugt stattfinden wird, da vermutlich Wechselwirkungen des Alkohols mit Essigsäureethylester über Wasserstoffbrückenbindungen in Konkurrenz zur Adsorption des Alkohols auf dem Feststoff stehen. Aufgrund der Simulation wurde gefolgert, dass sich in *tert*-Butylmethylether aus sterischen Gründen keine stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Alkohol und dem Sauerstoffatom des Ethers ausbilden und es daher zur verstärkten Adsorption des Alkohols auf dem Feststoff kommt.

Bei den experimentellen Messungen wurde als Ergebnis die Adsorption des Alkohols aus MTBE auf den funktionellen Gruppen der Sulfonate $\text{SO}_2\text{OH-OHR}$ und SO(OH)O-HOR über Wasserstoffbrückenbindungen erwartet. Dieser Mechanismus würde die Sulfonate zu geeigneten Adsorbenten in Kombination mit dem Lösungsmittel MTBE machen.

Im Folgenden sind die Adsorptionsisothermen zur Adsorption von 2,5-Hexandiol und 2,5-Hexandiol aus *tert*-Butylmethylether auf den Kationentauschern dargestellt:

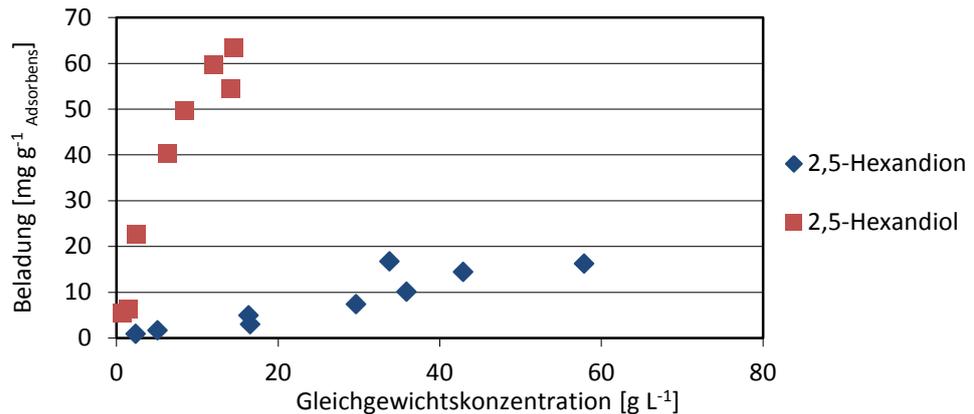


Abbildung 4–42: Adsorptionsisothermen für 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol (C_{\max} 150 mM), gelöst in MTBE, $V = 2\text{ mL}$, RT, 150 rpm, Amberlite IR 120 H^+ -Form.

Die Isotherme zur Auftrennung von 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol zeigte für Amberlite-Wasserstoff eine relativ gute Selektivität und eine hohe Beladung mit dem Zielmolekül 2,5-Hexandiol bei geringer Adsorption des Ketons (siehe Abbildung 4–42). Bereits im niedrigen Konzentrationsbereich (10 g L^{-1}) erreichte die Beladung hohe Werte von $> 50\text{ mg g}^{-1}$ und bindet damit höhere Konzentrationen des 2,5-Hexandiols als die untersuchten Aluminiumoxide, bei geringerer Selektivität, da auch Keton adsorbiert wird.

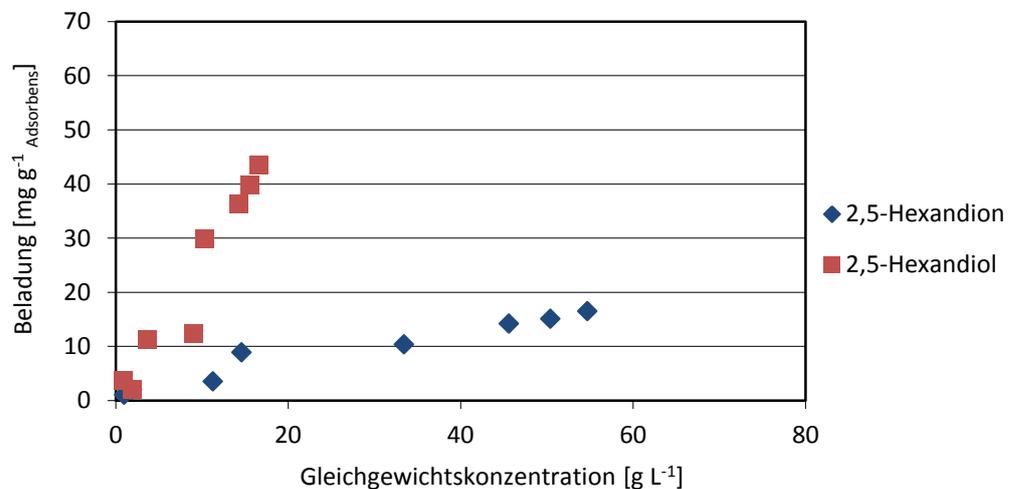


Abbildung 4–43: Adsorptionsisothermen für 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol (C_{\max} 150 mM), gelöst in MTBE, $V = 2\text{ mL}$, RT, 150 rpm, Amberlite IR 120 Na^+ Form.

Auch die Natrium-Form des Amberlite zeigte eine selektive Adsorption zugunsten des Alkohols aus *tert*-Butylmethylether (Abbildung 4–43). Die gebundene Menge ist allerdings geringer (30 mg g^{-1} bei 10 g L^{-1} im Überstand), so dass die Natrium-Form weniger geeignet erscheint.

Die Adsorberharze weisen hohe Kapazitäten für 2,5-Hexandiol auf. Die Selektivität ist dagegen nicht so stark ausgeprägt wie bei den Aluminiumoxiden, beide Kationentauscher adsorbieren zusätzlich Keton in geringer Menge (C_{\max} etwa $16,5 \text{ mg g}^{-1}$). Das Lösungsmittel *tert*-Butylmethylether hat sich in den Versuchen als sehr geeignet herausgestellt, die Molekular-Dynamik-Simulationen könnten dabei helfen, den experimentell sehr hohen Aufwand durch Vorhersagen der Anbindung zu reduzieren. In der Folge sollte untersucht werden inwieweit sich Vorhersagen zur Selektivität von Adsorbentien treffen lassen und die Versuche als Vergleich mit EtOAc durchgeführt werden.

4.4.6. Fazit zu den Adsorptionsisothermen

Die Ergebnisse für die pulverförmigen Adsorber Kieselgel, Alumosilikat und Aluminiumoxid mit 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol sind in der folgenden Tabelle noch einmal zusammengefaßt:

Tabelle 4-6: Zusammengefaßte Daten der Adsorptionsisothermen Alumosilikat, Kieselgel und Aluminiumoxid. Daten wurden den Isothermen entnommen, es handelt sich nicht in allen Fällen um die maximale Beladbarkeit q_{\max} , sondern eine Annäherung. Selektivität (Formel 9-11) angegeben wenn im Versuch sowohl Keton als auch Alkohol untersucht wurden.

Adsorber	Medium	Kapazität [mg g^{-1}]		Selektivität
		2,5-Hexandion	2,5-Hexandiol	[-]
Alumosilikat	EtOAc	-	50	-
	EtOAc	4	48	0,92
	MTBE	13	35	0,73
	Toluol	-	27	-
	Heptan +10% V V ⁻¹ Isopropanol	-	39	-
γ -Aluminiumoxid	EtOAc	-	49	-
	EtOAc	1	38	0,97
	MTBE	2,5	32	0,93
	Toluol	-	19	-
	Heptan +10% V V ⁻¹ Isopropanol	-	38	-
Kieselgel	EtOAc	8	50	0,86
	MTBE	19	40	0,68

Die Versuche zeigen für Kieselgel, Aluminiumoxid und Alumosilikat eine deutliche Affinität zugunsten des Produktalkohols. Für die reine Kieselgelphase war aus der Isotherme eine hohe Kapazität bei unvollständiger Selektivität erkennbar. Die Mischphase aus Aluminium und Silikat, das Alumosilikat, zeigt eine gute Selektivität aus Essigsäureethylester (siehe Abbildung 4–22), die Kapazität ist allerdings niedriger als die des Kieselgels. Für das γ -Aluminiumoxid ist die Selektivität am höchsten, allerdings zeigt sich deutlich, dass die Kapazität für das Zielprodukt viel niedriger ausfällt (siehe Abbildung 4–26 und Abbildung 4–27). Als Lösungsmittelphase für die Adsorption zeigt sich neben dem Essigsäureethylester der *tert*-Butylmethylether als am besten geeignet. So weist die Kombination aus γ -Aluminiumoxid und *tert*-Butylmethylether (Abbildung 4–27) die höchste Beladung im niedrigen Konzentrationsbereich auf, dargestellt durch den steilen Anstiegsbereich der Isotherme. Damit erweist sich diese Kombination aus Lösungsmittel und Adsorber als besonders geeignet für die Bindung des Produktalkohols aus einer enzymatischen Reaktion.

Grundsätzlich kommen alle drei Adsorber für die Auftrennung in Frage, wobei Aluminiumoxid die geringste Adsorption des Ketons zeigt und damit eine hohe Selektivität aufweist (aus EtOAc 0,97, aus MTBE 0,93). Folglich kommt es zu einer geringen Verunreinigung durch Keton bei Verwendung des Adsorbers Aluminiumoxid in Kombination mit EtOAc und *tert*-Butylmethylether. Für das Alumosilikat wird die höchste Selektivität aus EtOAc (0,92) erzielt, dabei wird allerdings auch Keton adsorbiert.

Das zusätzlich untersuchte Adsorberharz Amberlit (Kapitel 4.4.5) weist neben den Aluminiumoxiden und Aluminiumsilikaten eine hohe Selektivität und hohe Kapazität für den Produktalkohol 2,5-Hexandiol aus *tert*-Butylmethylether auf und ist damit auch ein sehr geeigneter Adsorber zur Abtrennung des Hexandiols.

Die gemessenen Isothermen folgen überwiegend dem Modell nach Langmuir, einzig die Isotherme für 2,4-Pentandion/2,4-Pentandiol zeigt Abweichungen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht wurden. Die Versuche mit den Systemen 2,3-Pentandion/2,3-Pentandiol und Himbeerketon/Rhododendrol zeigen, dass sich mithilfe der Adsorber weitere Keton-Alkoholgemische auftrennen lassen.

Da es sich bei den Isothermen um experimentelle Daten handelt, deren Bestimmung der Einzelpunkte einen hohen Arbeitsaufwand erfordert und die aufgrund der komplexen Vorgänge an den heterogenen Oberflächen der Adsorber keinen Vergleich zu ähnlichen Daten zulassen, ist eine Abschätzung der Genauigkeit der Daten schwierig. So wurde in der Regel eine Gleichgewichtseinstellung nach $t = 60$ Minuten abgewartet, welche sich zumindest für die pulverförmigen Adsorber als hinreichend erwies (siehe Ergebnisse zur Kinetik der Adsorption Kapitel 4.3). In Kapitel 5 (Prozessentwicklung) wird untersucht, in wieweit sich die Adsorber tatsächlich für den Einsatz in der Praxis eignen.

4.5. Untersuchungen zur *in-situ* Adsorption

Die *in-situ* Adsorption von Reaktionsprodukten, Nebenprodukten oder die gezielte Zu-Dosierung von Substraten kann im Bereich der Biokatalyse eine herausragende Bedeutung gewinnen, wenn mithilfe dieser Techniken Inhibierungsphänomene, thermodynamische Limitierungen oder toxische Effekte von Substrat oder Produkt umgangen werden können.

Anwendung finden diese Techniken unter dem Stichwort ISPR (*in-situ* product removal). Der *in-situ* Einsatz wirft allerdings einige Fragen hinsichtlich der Anwendung und des Einsatzes auf. So kann der direkte Einsatz selektiver Adsorber im Reaktionsgemisch zur Adsorption des Zielprodukts aber gleichzeitig auch zur Adsorption von Cofaktoren, Zellen oder Enzymen durch Physi- oder Chemisorption führen und den Prozess damit nachteilig beeinflussen. Bei einem Reaktionsgemisch handelt es sich häufig um ein komplexes Stoffgemisch, in welchem Konzentrationsverschiebungen durch Verbrauch und Produktion einzelner Stoffe die Gesamtzusammensetzung verändern, so dass die Definition des optimalen Betriebspunktes schwierig ist. Geklärt werden muss auch, an welchem Prozesspunkt der Adsorber getauscht und regeneriert oder verworfen werden muss, also ab wann keine weitere Stoffaufnahme mehr erfolgt. Während der Versuche mit Mehrstoffgemischen wurde deutlich, dass es zur reduzierten Produktadsorption durch Anwesenheit weiterer Stoffe kommt (z.B. Cosubstrat, siehe auch Untersuchungen in Kapitel 4.5.3).

Ein weiterer wichtiger Punkt ist das verwendete Reaktionsmedium, da abhängig von der Verwendung von wässrigen, wässrig-organischen oder organischen Reaktionssystemen, diese sehr unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Der direkte Einsatz der Adsorber im Reaktionsgemisch ist Gegenstand der folgenden Versuche.

4.5.1. Adsorption des Cofaktors

Untersucht wurde die Adsorption des wasserlöslichen Cofaktors NADH auf Adsorbermaterialien aus wässrig-organischem Reaktionsmedium und Puffer. Die Untersuchung auf NADH im Überstand erfolgte spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm. Die unbehandelten Adsorber wurden direkt zum Ansatz gegeben (siehe auch Kapitel 9.9.3).

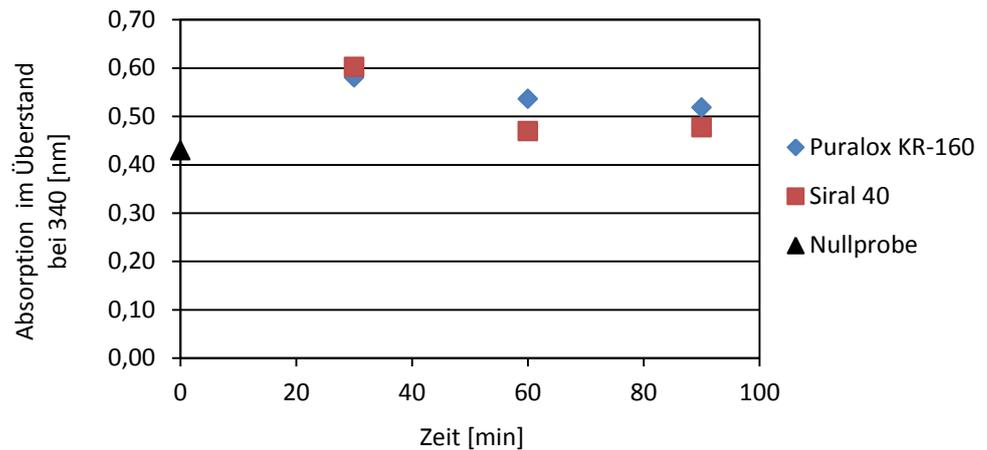


Abbildung 4–44: Adsorption des Cofaktors NADH (1 mM) aus KP_i -Puffer (0,1 M, pH 7) mit 18 % $V V^{-1}$ Isopropanol auf Adsorber Siral 40 (Alumosilikat) und Puralox KR-160 (Aluminiumoxid), 4 g Adsorber auf 20 mL Ansatzvolumen.

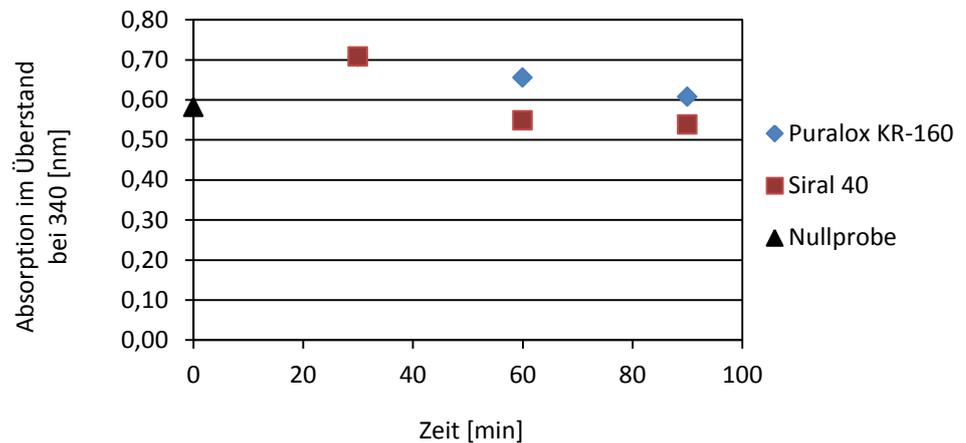


Abbildung 4–45: Adsorption des Cofaktors NADH (1 mM) aus KP_i -Puffer (0,1 M, pH 7) auf Adsorber Siral 40 (Alumosilikat) und Puralox KR-160 (γ -Aluminiumoxid), 4 g Adsorber auf 20 mL Ansatzvolumen.

Die Ergebnisse (Abbildung 4–44 und Abbildung 4–45) zeigen, dass es im Vergleich zur Nullprobe anfangs zu einer Zunahme der Adsorption kommt. In der Folge ist keine Abnahme der Konzentration des Cofaktors messbar. Es wird davon ausgegangen, dass keine messbare Menge Cofaktor auf dem Adsorber bindet. Die anfängliche Zunahme der Absorption beruht aller Wahrscheinlichkeit nach auf staubförmigen Verunreinigungen der Partikel, die sich im Medium lösen. Um dies zu vermeiden könnten die Adsorber vor den Versuchen gespült werden. Eine Behandlung mit organischem Lösungsmittel wäre vorzuziehen, da sich dieses anschließend besser aus den Adsorbentien, z.B. über Vakuum oder mittels Erwärmen, entfernen lässt.

4.5.2. Vorbehandlung der Adsorber

Die Frage einer Vorbehandlung der Adsorber, um staubförmige Verunreinigungen zu entfernen und den Adsorber zu konditionieren, wirft gleichzeitig die Frage auf in welchem Medium der Adsorber zum Einsatz kommt und ob vorher eine Trocknung etc. erfolgen muss. Untersucht wurde der Effekt des Equilibrierens durch Spülen der Partikel mit Wasser oder KP_i -Puffer.

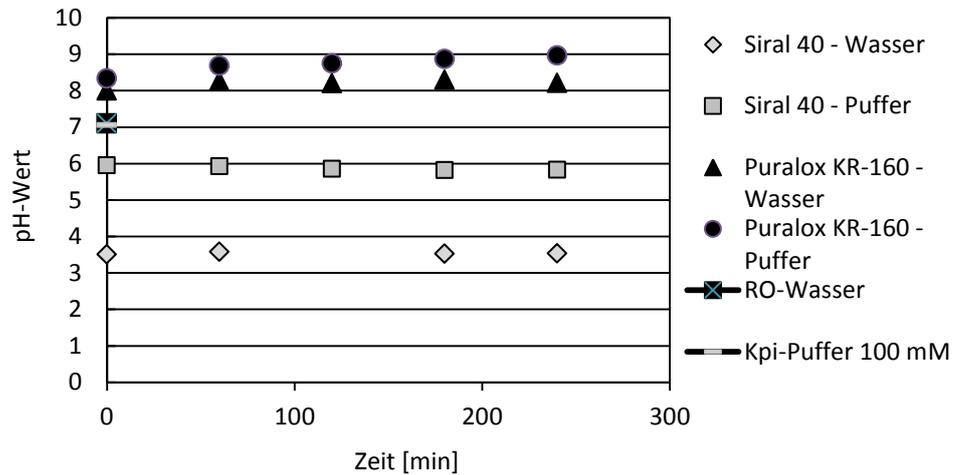


Abbildung 4-46: Änderung des pH-Werts bei Zugabe der Adsorber Siral 40 (Alumosilikat) und Puralox KR-160 (Aluminiumoxid) zu RO-Wasser oder KP_i -Puffer (0,1 M, pH 7), es wurden 3 g Adsorber (Siral 40) bzw. 1,5 g Adsorber, Puralox KR-160 zu 15 mL Ansatzvolumen gegeben, RT.

Bei der Zugabe der Adsorber zu Wasser oder Kaliumphosphatpuffer wurde eine Änderung im pH-Wert gemessen (siehe Abbildung 4-46). Der auftretende pH-Shift ist von der Art der Adsorber abhängig. Die Alumosilikat Partikel Siral 40 senken den pH-Wert um 1-3,5 Einheiten in den sauren Bereich ab. Die Zugabe von Aluminiumoxid Puralox KR-160 erhöht den pH-Wert. Bei dieser Verschiebung kann der Herstellungsprozess (z. B. eine Fällungsreaktion aus dem Basischen oder Sauren) eine Rolle spielen. Die Verwendung von Puffer anstelle von Wasser führt auch zu einem pH-Shift, dieser fällt allerdings schwächer aus.

Weiter wurde der Einfluss einer Vorbehandlung der Partikel auf den pH vor dem eigentlichen Versuch untersucht. Eine Möglichkeit diesem Effekt vorzubeugen ist das Waschen der Adsorber mit Puffer, vor der eigentlichen Anwendung. Dabei muss bedacht werden, dass Wasser gut an diese Adsorberklassen bindet und deshalb nach dem Waschvorgang sehr aufwendig entfernt werden muss. Desweiteren muss überprüft werden, ob die Adsorber nach der Vorbehandlung weiterhin ihre hohe Kapazität besitzen oder ob sich die Vorbehandlung negativ auswirkt.

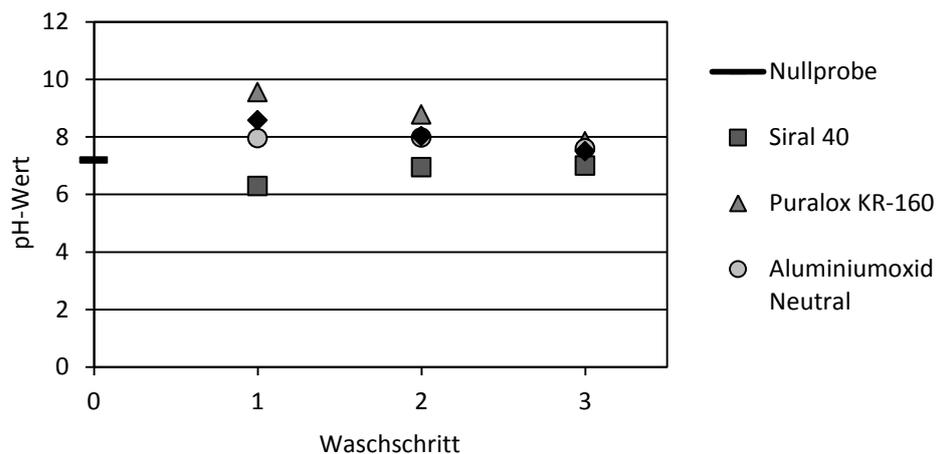


Abbildung 4-47: Änderung des pH-Werts bei dreimaligem Waschen des Adsorbens in KPi -Puffer (pH 7,2), Verwendung von 3 g Adsorber und 15 mL Puffer pro Ansatz, Test verschiedener Adsorber bei RT.

Die Ergebnisse in Abbildung 4-47 zeigen, dass sich der pH-Wert der Adsorber durch Spülen mit Puffer neutralisieren lässt. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die anschließende Trocknung, die möglichst unter Standardbedingungen erfolgen sollte, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

4.5.3. Einfluss der Cofaktorregenerierung

Für Alkohol-Dehydrogenase katalysierte Reaktionen werden zur Regenerierung des Cofaktors häufig Cosubstrate eingesetzt (substratgekoppelte Cofaktorregenerierung). Damit katalysiert das Enzym sowohl eine Reduktions- als auch eine Oxidationsreaktion und regeneriert auf diesem Wege den Cofaktor NADH. Das Cosubstrat kann beim *in-situ* Einsatz allerdings die selektive Adsorption beeinflussen. Um den Einfluss des Cosubstrats Isopropanol, welches gleichzeitig auch Cosolvent ist, bewerten zu können, wurde die Adsorption des Zielalkohols 2,5-Hexandiol bei unterschiedlichen Isopropanolkonzentrationen (0-30 % V V^{-1}) untersucht.

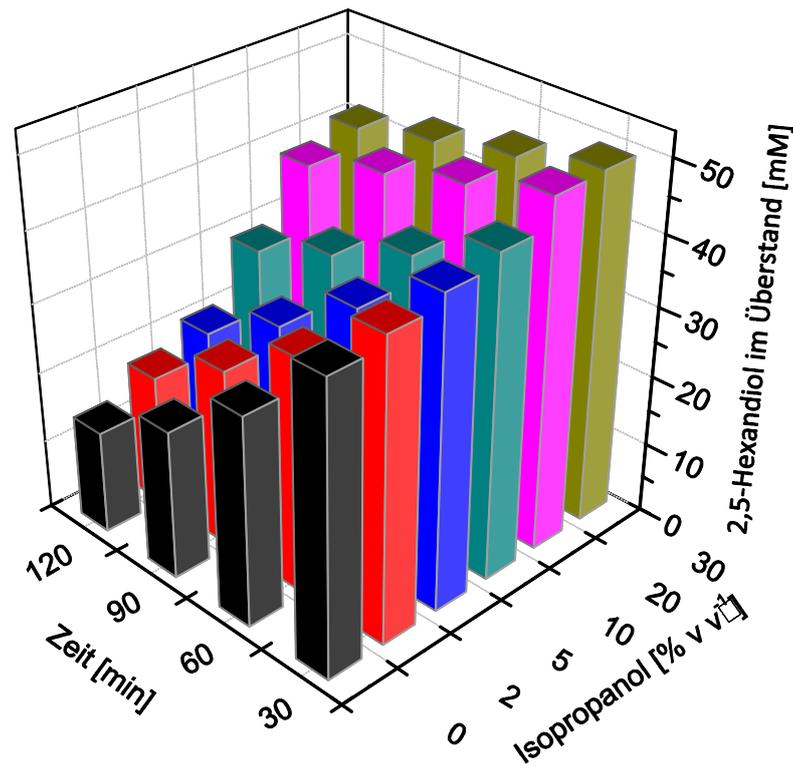


Abbildung 4–48: Einfluss des Cofaktors Isopropanol auf die selektive Adsorption von 2,5-Hexandiol, stufenweise Extraktion von *rac/meso*-2,5-Hexandiol mit dem Adsorber Siral 40 (Alumosilikat) aus Essigsäureethylester.

Die Untersuchung der Adsorption von 2,5-Hexandiol bei verschiedenen Isopropanolkonzentrationen zeigt eine verminderte Adsorptionsleistung bei hohen Isopropanol-Konzentrationen (Abbildung 4–48). Dargestellt ist die Konzentrationsabnahme im Überstand bei Austausch der Adsorber alle 30 Minuten. Die beste Adsorptionsleistung (höchste Abnahme des 2,5-Hexandiols im Überstand bei Zugabe der Adsorber) findet bei einer Isopropanolkonzentration von 0 % statt. Je höher die Isopropanolkonzentration, desto geringer die adsorbierte Menge an 2,5-Hexandiol. Dieses Ergebniss wurde mit unterschiedlichen Adsorbentien aus Aluminiumoxid und Alumosilikat bestätigt. Aus dem Ergebnis folgt, dass eine niedrige Isopropanolkonzentration zu einer besseren Adsorptionsleistung führt. Wahrscheinlich handelt es sich um eine Konkurrenzreaktion der Hydroxyfunktionen um Bindungsstellen auf dem Adsorber. Dabei können Lösungsmittelleffekte eine Rolle spielen, ähnlich der durch die Simulation des Projektpartners CAM-D Technologies beobachteten (siehe hierzu Kapitel 4.4.5).

4.5.4. *In-situ* Einsatz der Adsorber

Durch die Zugabe des Adsorbers zu einer Reaktion sollte die Konzentration der Zielmoleküle im Überstand sinken, da diese auf dem Adsorber gebunden werden. Um die Adsorption des enzymatischen Produkts zu bestätigen, wurde ein Überschuss des Zielalkohols (2S,5S)-Hexandiol in einer 2-Phasenreaktion aus KP_i -Puffer (Phase 1), welche das Enzym enthält und Toluol (Phase 2), welche das Substrat und $10\% V V^{-1}$ Isopropanol enthält, produziert. Nach ausreichender Umsetzung bzw. hoher Produktkonzentration wurde die Toluolphase abgenommen, auf zwei Gefäße verteilt und mit zwei unterschiedlichen Adsorbentien versetzt. Es wurden Alumosilikat (Siral 40) und γ -Aluminiumoxid (Puralox KR-160) verwendet.

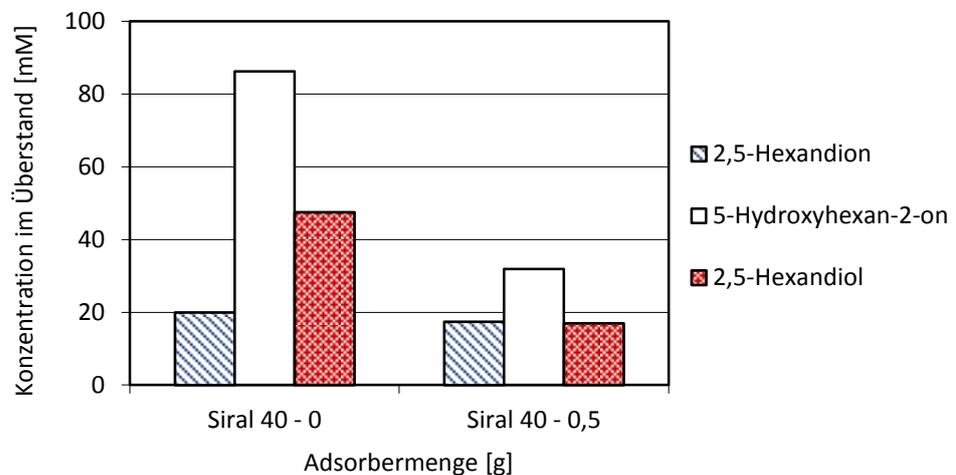


Abbildung 4–49: Adsorption von enzymatisch produziertem (2S,5S)-Hexandiol aus Toluol (mit $10\% V V^{-1}$ Isopropanol), dargestellt ist die Konzentration der Stoffe in der Ausgangslösung (Nullprobe) und nach Zugabe von 0,5 g Adsorber Alumosilikat (Siral 40).

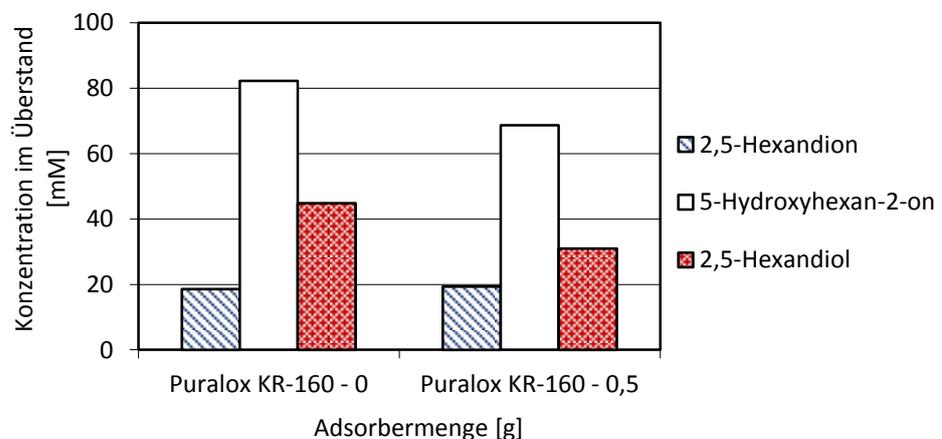


Abbildung 4–50: Adsorption von enzymatisch produziertem (S2,S5)-Hexandiols aus Toluol (mit $10\% V V^{-1}$ Isopropanol), Nullprobe und nach Zugabe von 0,5 g Adsorber Puralox KR-160 (Aluminiumoxid).

Das Ergebnis in Abbildung 4–49 und Abbildung 4–50 zeigt eine eindeutige Abnahme der Produktkonzentration für beide Adsorber, die für das Aluminosilikat mit 30,5 mM deutlich höher ausfällt als für das ALOX mit 14 mM. Bei beiden Adsorbieren nimmt allerdings auch die Konzentration des Zwischenprodukts (5-Hydroxyhexan-2-on) im Überstand ab, beim Adsorber Aluminosilikat um 54 mM und beim ALOX um 13,63 mM. Die Substratkonzentration wird kaum beeinflusst.

Damit werden die Anfangsversuche zur Adsorption bestätigt, die diesen Sachverhalt bereits beschreiben (siehe Kapitel 4.1.2 und 4.1.3). Neben der Bindung des Zielprodukts kommt es zu einer Anlagerung von Zwischenprodukt, was im Falle einer *in-situ* Adsorption zu einem Verlust an Endprodukt führen kann, wenn dieses Bindungsstellen belegt und nicht weiter umgesetzt wird. Wenn von der Einstellung eines Gleichgewichts in der Konzentration des Adsorptivs zwischen Fluidphase und Feststoff ausgegangen wird, sollte das Zwischenprodukt desorbieren und weiter umgesetzt werden, in diesem Falle könnte der Feststoff auch zur kontinuierlichen Freisetzung des Substrats dienen (als Reservoir).

Um die Reaktionsendprodukte gezielt *in-situ* zu adsorbieren, wurde der Adsorber (γ -Aluminiumoxid) dem Reaktionsgemisch zugesetzt. Als Kontrolle wurde ein zweiter, identischer Reaktionsansatz ohne Adsorber gestartet. Das Enzym ADH-A` wurde kovalent auf porösen Glaträgern immobilisiert. Zum ersten Ansatz wurden 1,6 g Adsorber hinzugegeben.

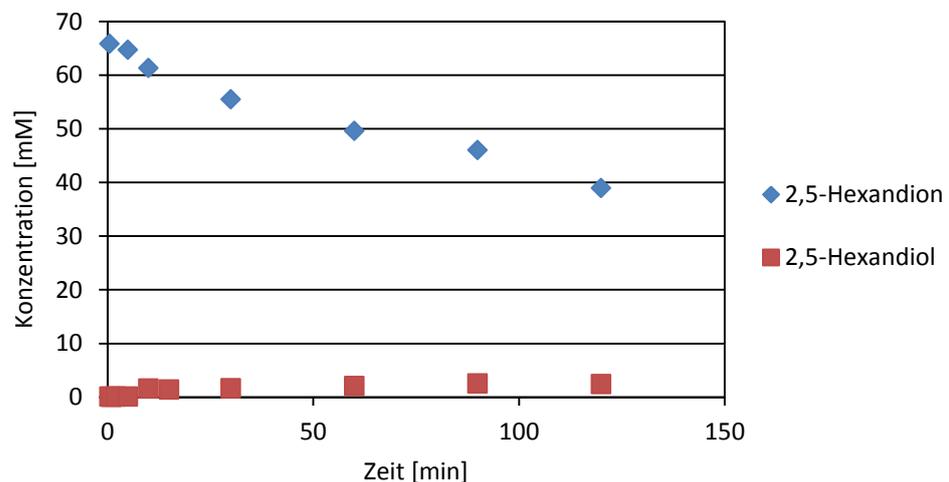


Abbildung 4–51: Umsetzung von 2,5-Hexandion mit ADH-A` immobilisiert auf Trisoperl-Trägern und Zugabe von Südchemie-Partikeln Puralox KR-160 (γ -Aluminiumoxid), Substratlösung: Toluol mit 2,5-Hexandion (80 mM), 18 % V V⁻¹, T = 30 °C, 200 rpm.

Die Abnahme des Substrats 2,5-Hexandion ist deutlich erkennbar, während nur eine geringe Produktzunahme zu beobachten ist (Abbildung 4–51). Das Produkt wird auf dem Adsorber gebunden. Im Vergleich zum Ansatz ohne Adsorberzugabe zeigt sich der Unterschied:

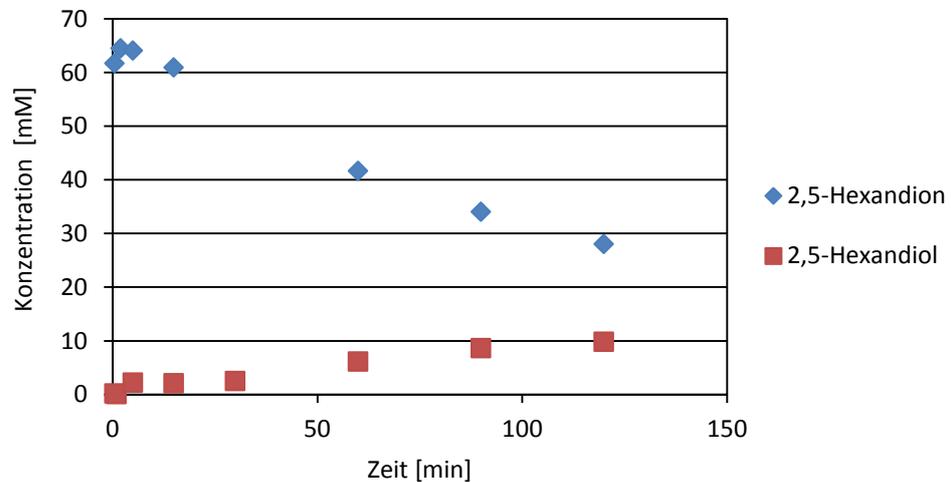


Abbildung 4–52: Umsetzung von 2,5-Hexandion mit auf Trisoperl immobilisierter ADH- α , Substratlösung: Toluol mit 2,5-Hexandion (80 mM), 18 % $V V^{-1}$, $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 rpm.

Der Einfluss des Adsorbers ist deutlich erkennbar (Abbildung 4–52). Im zweiten Ansatz ist wieder eine deutliche Substratabnahme erkennbar, die Produktkonzentration steigt allerdings auch deutlich an, das Zwischenprodukt konnte nicht quantifiziert werden. Auffällig ist, dass im ersten Reaktionsansatz in der gleichen Zeit auch weniger Substrat umgesetzt wurde. Im Experiment wurde beobachtet, dass sich der Adsorber und Immobilisat aneinander lagern, wodurch eine zusätzliche Diffusionslimitierung entstehen könnte. Da die Adsorber Wassermoleküle binden, könnte es durch den Adsorber auch zur Entfernung von Wassermolekülen vom Immobilisat kommen und damit zu einer schnelleren Inaktivierung des Enzyms.

Für die Elution des Produkts vom Adsorber müssen die unterschiedlichen Partikel voneinander getrennt werden, da gebundenes Enzym bei der Elution mit reinem organischem Lösungsmittel denaturiert. Eine Abtrennung des Immobilisates vom Adsorber könnte durch eine Immobilisierung auf Magnetträgern erreicht werden. Wird anstelle von Immobilisat freies Enzym und Adsorber verwendet, adsorbiert das Enzym durch Physi- und Chemisorption auf dem Adsorber, womit eine anschließende Produktelution und Wiederverwendung von Enzym oder Adsorber ebenfalls erschwert wird. Aufgrund der durchgeführten Versuche wurde beschlossen, die räumliche Trennung von Katalysator und Adsorber näher zu untersuchen

und die Adsorber als Festbett einzusetzen. Damit wird der aufwendige Zusatzschritt zur Abtrennung der Partikel umgangen.

4.6. Charakterisierung der Adsorber im Festbett

Die Verwendung der Adsorber in einem Festbett ist die effektivste Nutzung des Reaktorvolumens und des Konzentrationsgradienten, welcher die treibende Kraft des Bindungsprozesses darstellt. Die Kombination der Parameter von Sorptionsgleichgewicht, dem Stoffübergang und dem Flussverhalten durch das Festbett bestimmen die Leistung des Prozesses, die sich letztendlich durch die Betriebszeit bzw. die Zeit bis zum Durchbruch ausdrückt [Volesky 2003].

Zur Charakterisierung der Adsorber für die Verwendung in Form eines Festbettes wurde der Zeitpunkt bis zur maximalen Beladung in Form von Durchbruchkurven bestimmt. Am Ausgang des Festbettes wurde der Zeitpunkt bestimmt, zu dem die Ausgangskonzentration der Eingangskonzentration entspricht. Im Idealfall ist die Durchbruchkurve steil und zeigt wenig Tailing, in der Praxis werden durch die Messungen S-förmige Verläufe erhalten, da das Festbett durch Kanalbildung, Rückvermischung und dem Auftreten von Totvolumina vom idealen Strömungsrohr abweicht [Bart, Gemmingen 2005]. Die Trennung des Stoffgemisches beruht auf Wechselwirkungen der zu trennenden Komponenten mit der stationären Phase. Die Adsorber befinden sich nicht wie beim *in-situ* Ansatz im Reaktionsgefäß, sondern werden extern in Form einer Adsorber-Einheit eingesetzt, wodurch eine automatisierte Schaltung beliebig vieler Adsorbersäulen ermöglicht wird, welche im Wechsel beladen und eluiert werden können. Je kleiner die verwendeten Partikel, desto besser das Volumen-zu-Oberflächenverhältnis und desto geringer die auftretende Diffusionslimitierung, wobei es zu technischen Problemen in Form eines Druckabfalls kommen kann. Als ideale Partikelgrößen werden in der Literatur Größen zwischen 0,5 – 2 mm beschrieben [Schmidt-Traub 2005].

Im Festbett wurde das in Kapitel 4.1.3 als stark selektiv gemessene Puralox KR-160 γ -Aluminiumoxid als Pulver und als Granulat eingesetzt. Gemessen wurden Durchbruchkurven der Reinstoffe und Stoffgemische, als mobile Phase wurde *tert*-Butylmethylether eingesetzt. Als alternatives Adsorbens käme der Einsatz von Alumosilikat (siehe auch Kapitel 4.4.1) infrage, dessen Selektivität niedriger ist, dass allerdings höhere Alkoholkonzentrationen bindet. Alternativ könnte der Kationentauschers Amberlite IR 120 (siehe hierzu Kapitel 4.4.5) verwendet werden, dessen Selektivität allerdings schlechter als die des Aluminiumoxids ist.

Tabelle 4-7: Eigenschaften der im Reaktor eingesetzten Adsorbentien, Aluminiumoxid pulverförmig und Granulat.

Adsorbens	Oberfläche BET [$\text{m}^2 \text{g}^{-1}$]	Mittlere Teilchengröße [μm]	verwendete Menge [g]
Puralox KR-160, Aluminiumoxid, Pulver	160	35	5,2
Puralox KR 160, Aluminiumoxid, Granulat	150	432	6,51

Für den Einsatz der Adsorber in einem Festbett galt es zunächst, eine physikalische Charakterisierung durchzuführen (Tabelle 4-8). Aus der Festbetthöhe von 15,5 cm und dem Säuleninnendurchmesser von 1 cm ergibt sich ein Säuleninnenvolumen von 12,17 mL. Für die Bestimmung der Verweilzeit wurde mit einer Flussrate von $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ gearbeitet und 2,5-Hexandion als Tracermolekül eingesetzt (siehe 9.10.1) um die Verweilzeit τ zu bestimmen und darüber rechnerisch auch die Porosität ε (Formel 9-14). Das Hohlraumvolumen setzt sich in diesem Fall aus der Summe des Hohlraumvolumens (auch als freies Volumen bezeichnet) und dem Porenvolumen zusammen und wurde ebenfalls experimentell bestimmt (siehe Kapitel 9.10.1).

 Tabelle 4-8: Ergebnisse der physikalischen Charakterisierung des Adsorber-Festbettes (Gesamtvolumen 12,17 mL) Adsorber Puralox KR-160 (γ -Aluminiumoxid) als Pulver und als Granulat.

Adsorbens	Verweilzeit [min]	Hohlraumvolumen [mL]	Porosität
Puralox KR-160 Aluminiumoxid, Pulver	24	7,2	0,59
Puralox KR-160 Aluminiumoxid-Granulat	31	9,3	0,76

Für die Messung der Durchbruchkurven wurde die mit trockenem Adsorbens befüllte Säule mit reinem Lösungsmittel gespült, so dass sich ein Gleichgewicht einstellt und sich keine Luftblasen mehr in der Säule befanden. Zur Probennahme wurde am Adsorberausgang mittels eines Fraktionssammlers alle 2 Minuten automatisch das Sammelgefäß gewechselt. Den Erwartungen nach sollte der pulverförmige Adsorber aufgrund des besseren Oberfläche-zu-Volumen Verhältnisses die größere Kapazität aufweisen, in der Säule mit granuliertem Adsorber konnte allerdings eine größere Menge des Adsorbers untergebracht werden. Nach der Inbetriebnahme bildete sich aufgrund des Druckanstiegs (auf 1 Bar) ein technisch bedingtes Totvolumen am Anfang der Säule aus. Die ermittelten Werte stellen trotz eventueller Fehler gute Richtwerte dar.

Im Folgenden sind die Durchbruchkurven für 2,5-Hexandiol gelöst in MTBE auf dem Adsorber Aluminiumoxid dargestellt, in Tabelle 4-9 werden am Schluss die Messungen zusammenfassend dargestellt.

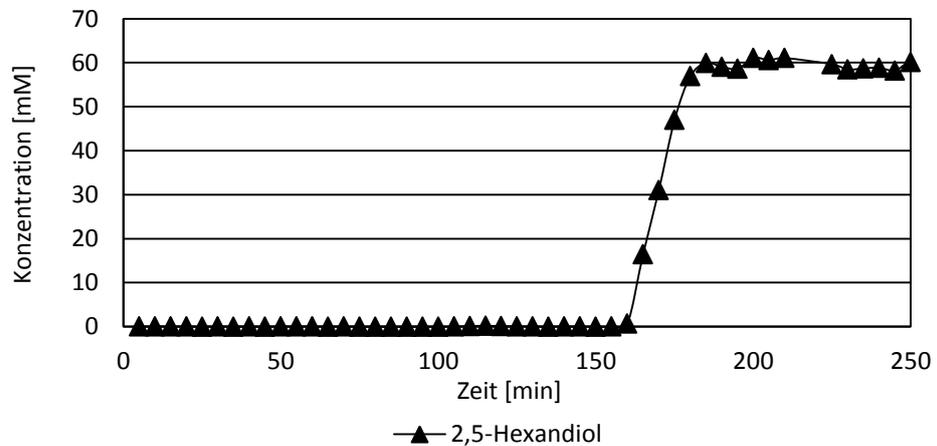


Abbildung 4-53: Durchbruchkurve von 2,5-Hexandiol (60 mM) für das Adsorberpulver Puralox KR-160 (γ -Aluminiumoxid, pulverförmig), 5,2 g, Flußrate $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, nach 255 min Elution mit Isopropanol.

Die Durchbruchkurve für 2,5-Hexandiol ergibt einen steilen Anstieg nach 160 Minuten (Abbildung 4-53). Vorher tritt kein 2,5-Hexandiol aus der Säule aus, was der Fall wäre, wenn keine Interaktion des Alkohols mit dem Adsorber stattfinden würde. Der Fall ist in Abbildung 4-54 durch das 2,5-Hexandion dargestellt, welches nach 25-30 Minuten eluiert.

Da das Ziel in der Auftrennung von Stoffgemischen besteht, wurden Durchbruchkurven von äquimolaren Keton-Alkoholgemischen gemessen:

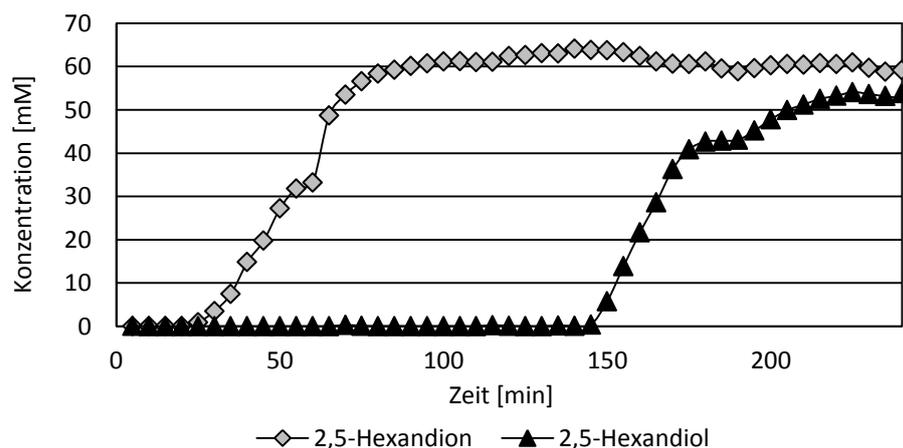


Abbildung 4-54: Durchbruchkurve des Gemisches 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol (60 mM) für Adsorber Puralox KR-160 (γ -Aluminiumoxid, pulverförmig), 5,2 g, Flußrate $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, nach 220 min Elution mit Isopropanol.

Das Ergebnis in Abbildung 4-54 unterstreicht die Resultate der Vorhergegangenen Untersuchungen. Das Keton tritt sehr früh aus der Säule aus

(nach 25-30 Minuten), während der Alkohol, der mit der Festphase wechselwirkt, recht spät austritt (nach etwa 150 – 160 Minuten). Interessant ist der Sachverhalt, dass sich die Zeitdauer bis zum Durchbruch bei Verwendung einer Keton-Alkoholmischung verkürzte, was ein Zeichen für den Einfluss des Ketons auf die selektive Adsorption des Alkohols ist. Die Durchbruchskurve hat zusätzlich einen flacheren Verlauf als bei der Adsorption des reinen Alkohols (Abbildung 4–53).

Die Ergebnisse bestätigen die durch vorhergehende Experimente postulierte Keton-Alkoholtrennung mithilfe von Aluminiumoxid auch für die Verwendung im Festbett. Aus Voruntersuchungen war bekannt, dass sich Isopropanol und Methanol für die Elution eignen:

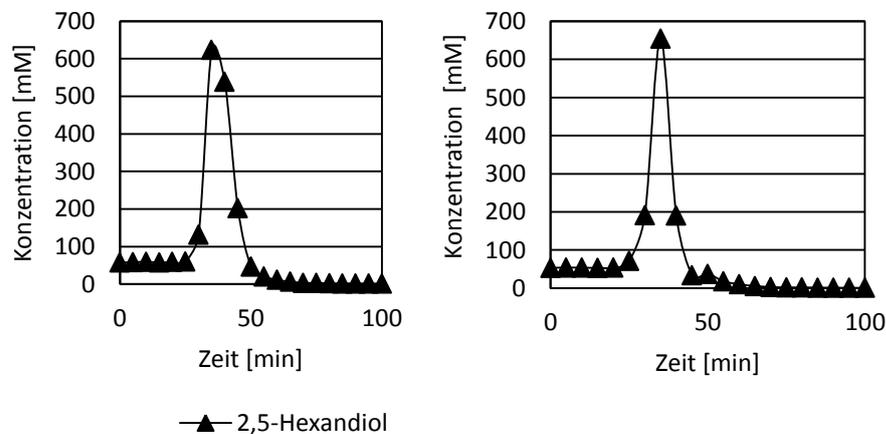


Abbildung 4–55: Elutionskurven für 2,5-Hexandiol mittels Isopropanol (rein) als Elutionsmittel, links: Reinstoff, rechts Elution nach Adsorption aus Stoffgemisch, $V = 1 \text{ mL min}^{-1}$, Puralox KR-160, (Aluminiumoxid, pulverförmig).

Das Ergebnis in Abbildung 4–55 zeigt, dass die Elution mit Isopropanol als Elutionsmittel ein gutes Ergebnis liefert. Dabei wurde die gesamte adsorbierte Menge desorbiert. Der Elutionspeak des Reinstoffes ist erkennbar breiter als der des Stoffgemisches.

Die Durchbruchskurven wurden auch für Granulat gemessen, da dieses technisch eher als Säulenpackung Einsatz findet. Im Folgenden ist die Durchbruchskurve von 2,5-Hexandiol in MTBE mit dem Adsorber Aluminiumoxid Granulat, dargestellt.

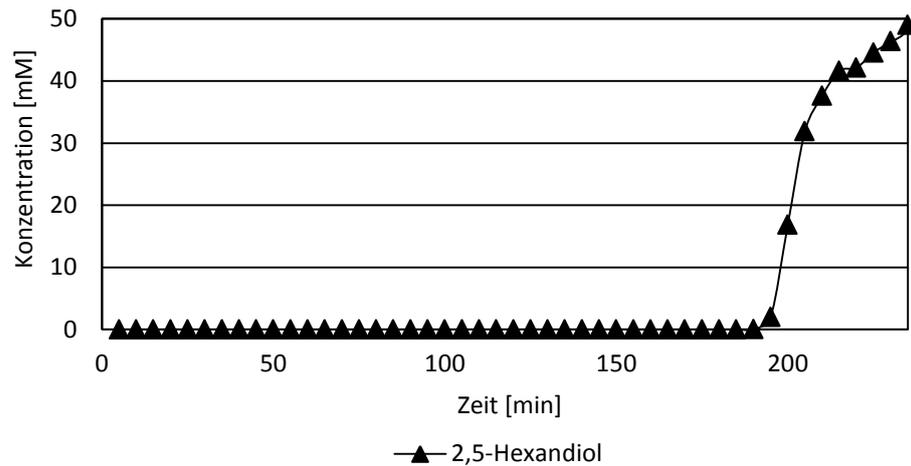


Abbildung 4-56: Durchbruchskurve von 2,5-Hexandiol (60 mM) für Adsorbergranulat Puralox KR-160 (Aluminiumoxid-Granulat), 6,51 g, Flußrate $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, nach 205 min Elution mit Isopropanol.

Und die Durchbruchskurve bei Verwendung des Stoffgemisches:

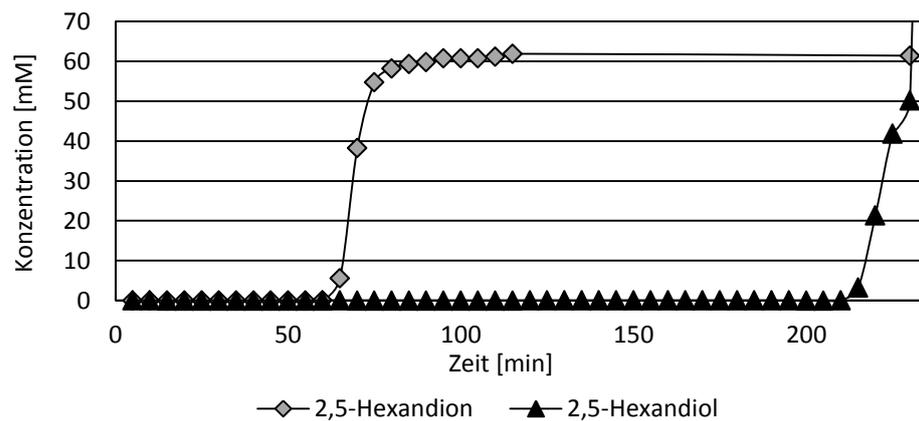


Abbildung 4-57: Durchbruchskurve des Gemisches 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol (60 mM) für Puralox KR-160 (Aluminiumoxid-Granulat) 6,51 g, Flußrate $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, nach 205 min Elution mit Isopropanol.

Entgegen den Erwartungen verlängert sich für die Mischung die Durchbruchzeit des Alkohols (siehe Abbildung 4-57 im Vergleich zu Ergebnis Abbildung 4-56). Allerdings war die verwendete Adsorbiermenge größer (siehe Tabelle 4-9). Das Ergebnis zeigt eindeutig die Eignung des Granulates zur selektiven Stofftrennung, die Durchbruchskurven in Abbildung 4-57 weisen einen idealen Verlauf auf (steiler Anstieg). Die Elution wurde wieder unter Verwendung von Isopropanol durchgeführt:

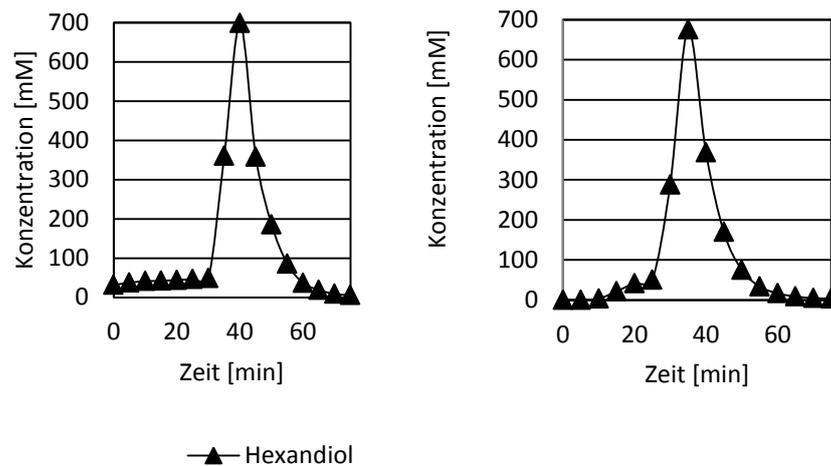


Abbildung 4–58: Elutionskurven für 2,5-Hexandiol mittels Isopropanol (rein) als Elutionsmittel, links: Reinstoff, rechts Elution nach Adsorption aus Stoffgemisch, $V = 1 \text{ mL min}^{-1}$, Puralox KR-160 (Aluminiumoxid-Granulat).

Die Elution mithilfe von Isopropanol zeigte den gewünschten Effekt, eine vollständige Elution wurde erreicht (siehe Abbildung 4–58).

Zusammenfassend sind die gemessenen Ergebnisse noch einmal in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tabelle 4-9: Gegenüberstellung der berechneten Adsorptionskapazitäten beider Adsorbentien mit Verwendung der kleinsten ermittelten Beladungszeiten (Pulver-Beladungszeit: 140 min; Granulat-Beladungszeit: 190 min) bei einer Flussrate von $0,3 \text{ ml min}^{-1}$.

Sorbens	Adsorber Menge [g]	gebundene Konzentration 2,5-Hexandiol [mM]	Gebundene Konzentration [mM g^{-1}]	Gebundene Menge [mg]	Beladung [mg g^{-1}]
Puralox KR-160 Aluminiumoxid Pulver	5,2	2,5	0,48	297,74	57,26
Puralox KR-160, Aluminiumoxid Granulat	6,51	3,29	0,51	389,19	59,78

Die Messungen der Durchbruchkurven belegen die Eignung der Adsorber für die selektive Adsorption. Das Zielprodukt 2,5-Hexandiol wurde sowohl als Reinstoff als auch als Stoffgemisch lange zurückgehalten, bis die Beladungsgrenze überschritten wurde und der Durchbruch erfolgte. Das Substrat (2,5-Hexandion) tritt hingegen relativ früh aus der Säule aus.

Für den Adsorber Puralox KR-160-Pulver (γ -Aluminiumoxid, 5,2 g) erfolgte der Durchbruch des Reinstoffes 2,5-Hexandiol (60 mM) nach 152,5 (+/- 7,5) Minuten, siehe Abbildung 4–53, bei dem Stoffgemisch 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol liegt der Durchbruch bei etwa 149 Minuten (siehe Abbildung 4–54). Die Adsorption wurde also durch die Anwesenheit des Substrats (2,5-

Hexandion) beeinflusst und die Beladungszeit verkürzt sich. Die gebundene Menge 2,5-Hexandiol ist in Tabelle 4-9 dargestellt und bewegt sich für die verwendete Adsorbermenge Pulver bzw. Granulat zwischen 300-400 mg. Damit werden von 1 Kg Adsorber rund 60 g Produkt gebunden, im Fall des Aluminiumoxids ist dies als hoch-selektiv zu betrachten.

Für Puralox KR-160 Aluminiumoxid-Granulat (6,51 g) liegt die Beladungszeit für den Reinstoff 2,5-Hexandiol (60 mM) bei 200 Minuten (siehe Abbildung 4-56) und für das Stoffgemisch 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol bei 220 Minuten (siehe Abbildung 4-57). In diesem Fall kam es zu einem späteren Durchbruch, was auf den Einfluss des zweiten anwesenden Stoffes, des 2,5-Hexandions zurück zu führen war.

Die Elutionsfraktion begann sowohl für den Reinstoff als auch das Stoffgemisch in allen Fällen etwa 25 Minuten nach Umstellung auf die Elution, nach 80 Minuten war die Elution abgeschlossen, da sich kein Produkt mehr im Elutionsstrom befand. Die Elution beim Reinstoff resultiert in einem relativ breiten Elutionspeak während die Elution bei Beladung aus einem Stoffgemisch in einem schmalen Peak resultierte. Vermutlich kommt es bei Adsorption des Reinstoffes zu keinen Interaktionen weiterer Stoffe, weshalb größere Mengen 2,5-Hexandiol adsorbiert werden, daraus ergibt sich eine etwa 15 Minuten längere Beladungszeit.

Im Vergleich bindet das Puralox KR-160 Aluminiumoxid-Granulat aufgrund der größeren Adsorbermenge mehr 2,5-Hexandiol. Auf diesen Sachverhalt weisen auch die Beladungszeiten hin (Aluminiumoxid-Pulver: geringste Beladungszeit 140 Minuten) und für (Aluminiumoxid-Granulat: geringste Beladungszeit 190 Minuten). Das Granulat weist allerdings auch ein größeres Hohlraumvolumen auf, was für eine Flussrate von $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ einen Zeitversatz von 7 Minuten für Adsorption und Elution bedeutet. Die Elutionsdauer liegt für beide Adsorbentien im Mittel bei 75 Minuten (bei einer Flussrate von $0,3 \text{ mL min}^{-1}$).

Da es sich bei den gepackten Säulen um selbstgepackte Säulen handelte, welche ohne Standardprozedur oder definierten Betriebsdruck gepackt wurden, muss die Reproduzierbarkeit der Festbettpackung hinterfragt werden. So wurden mehrere Beladungs- und Elutionszyklen erfolgreich gefahren und dadurch die Mehrfachverwendung des Adsorbers geprüft. Bei den ersten Spülgängen der gepackten Säulen zeigte sich bei allen Adsorbermodifikationen ein geringer Austrag an pulverförmigem Adsorberstaub, der sich nach einiger Zeit am Boden des Auffangbehälters absetzt und eine Verunreinigung darstellt. Aus diesem Grund sollte der Adsorber vor dem eigentlichen Einsatz vorgespült werden. Die Ergebnisse belegen den erfolgreichen Einsatz der Adsorber im Festbett und die Ergebnisse zur selektiven Adsorption auf Aluminiumoxiden.

4.6.1. Berechnung der Durchbruchzeit T_R

Anhand der Messdaten der Adsorptionsisothermen kann die Zeit des Durchbruchs T_R für den Festbettadsorber berechnet werden. Dadurch ist ein Abgleich der experimentellen Daten von Durchbruchkurven und Adsorptionsisothermen möglich.

Ausgehend von den Parametern der physikalischen Charakterisierung des Festbettreaktors ist der Zeitpunkt t_0 (Formel 4-8) durch die physikalische Charakterisierung des Festbettadsorbers bekannt (siehe Kapitel 4.6). Die Porosität ε wurde experimentell ermittelt (siehe Tabelle 4-8 bzw. Formel 9-14):

$$t_0 = \frac{V_H \cdot \varepsilon}{\dot{V}} \quad \text{Formel 4-8}$$

Das Phasengleichgewicht C_f ergibt sich durch:

$$C_f = \frac{1 - \varepsilon_{\text{gesamt}}}{\varepsilon_{\text{gesamt}}} \quad \text{Formel 4-9}$$

Daraus lässt sich die Zeit des Durchbruchs berechnen:

$$T_R = \frac{V_H \varepsilon}{\dot{V}} \left(1 + \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \left(\frac{q \cdot C_f}{C_f} \right) \right) \quad \text{Formel 4-10}$$

Für das Puralox KR-160 γ -Aluminiumoxid-Granulat ergibt sich für eine Flussrate $\dot{V} = 0,3 \text{ mL min}^{-1}$ und eine Verweilzeit von $\tau = 31 \text{ min}$ eine theoretische Durchbruchzeit von $T_R = 228 \text{ min}$. Im Experiment wurde eine Durchbruchzeit von $T_R = 210 \text{ min}$ ermittelt:

$$T_R = \frac{9,3 \text{ mL} \cdot 0,764}{0,3 \text{ mL min}^{-1}} \cdot (1 + 0,309 \cdot 28) = 228,6 \text{ min}$$

Die Abweichung von 18,4 min kann sich z. B. durch Fehler in der Bestimmung der Porosität ergeben. Insgesamt stimmen die Zeiten gut überein und die Abweichung von etwa 8 % ist als gering einzustufen. Die Kenntnis der Durchbruchzeit ist von großer Bedeutung für das automatisierte Schalten der Anlage, da ein falscher Zeitzyklus mit einem verfrühten Durchbruch zu Produktverlust führen würde.

4.7. Fazit

Die Ergebnisse des Kapitels zur selektiven Adsorption lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die selektive Abtrennung von Diolen aus Alkohol-Ketongemischen, ist mithilfe von synthetischen anorganischen Alumosilikaten, Aluminiumoxiden, Kieselgel oder Ionentauschern möglich.
- Die höchsten Selektivitäten wurden mit Alumosilikat und Aluminiumoxid in den Lösungsmitteln Essigsäureethylester und *tert*-Butylmethylether erzielt, wobei für den Adsorber γ -Aluminiumoxid die geringste Adsorption des Ketons nachgewiesen werden konnte (siehe Absatz 4.4.6).
- Die Polarität des Lösungsmittels hat einen starken Einfluss auf die selektive Adsorption, die höchsten Anbindungen des Alkohols an das Adsorbens resultierten aus *tert*-Butylmethylether und Essigsäureethylester.
- Das zur substratgekoppelten Cofaktorregenerierung verwendete Isopropanol hat einen negativen, wahrscheinlich kompetitiven Einfluss auf die Produktadsorption. Als Alternative könnte der Cofaktor unter Verwendung eines zweiten Enzyms mit einem anderen Cosubstrat regeneriert werden. Der große Nachteil besteht in der Anpassung der Bedingungen an zwei Enzyme, da auch das zweite Enzym z.B. eine hohe Stabilität in organischen Lösungsmitteln aufweisen muss.
- Die selektive Auftrennung unter Einsatz des Sorbens in Form eines Adsorber-Festbettes liefert gute Ergebnisse.
- Zur Elution hat sich Isopropanol als sehr geeignet erwiesen, mit dem Vorteil, dass es als Cosubstrat bereits im System vorhanden ist.

5. Prozessentwicklung zur Feinchemikalienproduktion

5.1. Automatisierte Produktion mit Adsorption

Zur Produktion großer Mengen hochreiner Feinchemikalien bietet sich die enzymatische Produktion in einem kontinuierlich betriebenen Rührkessel oder Strömungsrohrreaktor an. Der Folgeschritt besteht in der Aufarbeitung der Produkte und der Regeneration oder dem Austausch des Biokatalysators. Der Prozessschritt der Aufarbeitung verursacht häufig hohe Kosten, so dass alternative, kostengünstigere Wege der Produktabtrennung gesucht werden.

Des Weiteren entstehen Kosten für den Biokatalysator. Je länger dieser in der kontinuierlichen Produktion eingesetzt werden kann und je höher die Stabilität des Enzyms und die der Anbindung an den Trägerstoff ist, desto wirtschaftlicher ist der gesamte Prozess. In der Literatur ist der Einsatz von Enzymen in organischen Lösungsmitteln in vielen Quellen belegt [Bornscheuer *et al.* 2005, Faber 2011, Carrea *et al.* 2008]. Organische Medien bestehen vorwiegend aus organischen Lösungsmitteln. Häufig werden geringe Mengen Wasser zugesetzt, um die katalytische Funktion des Enzyms zu gewährleisten. In der Literatur wird von zahlreichen Beispielen berichtet, in denen in organischen Lösungsmitteln keine Enzymaktivität messbar war, sofern nicht ein Restwasseranteil zur Verfügung stand [Guisán 2010, Gonzalo *et al.* 2007 b]. In der Mehrheit der organischen Lösungsmittel sind Enzyme nicht löslich [Chin *et al.* 1994], da Enzyme aufgrund ihrer Oberfläche zum Aggregieren neigen. Daher dient die Immobilisierung neben dem Enzymrückhalt dem Erhalt der größeren Oberfläche. Für einen kontinuierlichen Prozess muss über einen Rückhalt der Enzyme in Form einer Immobilisierung nachgedacht werden. Für den im Rahmen dieser Arbeit etablierten kontinuierlichen Prozess wird eine kovalente Iminbindung mithilfe von Glutardialdehyd zur Immobilisierung verwendet. Der immobilisierte Biokatalysator muss den Scherkräften im Betrieb und einem eventuellen Wechsel des Lösungsmittels standhalten, so dass der Verlust an Biokatalysator während des Prozesses so gering wie möglich gehalten werden kann. Nicht nur die Stabilität und die Aktivität, sondern die geringen Kosten und die Wiederverwendbarkeit entscheiden letztlich über die Eignung eines immobilisierten Biokatalysators [Hanefeld *et al.* 2009].

Das Ziel dieser Arbeit ist die Zusammenführung der zuvor dargelegten selektiven Produktadsorption und der stabilen kovalenten Enzymimmobilisierung in einem kontinuierlichen, automatisch gesteuerten Prozess. Die automatische Steuerung wurde über zwei 10-Wege Ventile durchgeführt, welche nach programmierbarem Zeitintervall über einen Computer und ein

Matlabskript gesteuert wurden (siehe eingetragene Ventile im Schema Abbildung 5–1).

5.1.1. Aufbau der Anlage

Die Anlage bestehend aus dem Reaktor mit immobilisiertem Enzym, der Molekularsieb-Adsorbereinheit zur Wasserabtrennung und der Adsorbereinheit zur Produktabtrennung, wurden über Teflonkapillaren und mithilfe von Magnetventilen verschaltet. Das Ventil direkt hinter dem Reaktor ermöglichte eine Probenahme im laufenden Betrieb. Die dargestellten Pumpen P1 und P2 wurden kontinuierlich betrieben. Die Pumpe P1 für die Substratlösung wurde mit einer Flussrate von $0,1 \text{ mL min}^{-1}$ betrieben, die Pumpe P2 für die Elution des Adsorbats mit einer Flussrate von $0,05 \text{ mL min}^{-1}$. Die Pumpe P3 wird zum Spülen des Reaktors mit Puffer-Cofaktorlösung genutzt und jeweils einmalig am Anfang eingesetzt, sie wird dadurch nicht dauerhaft für den Betrieb der Anlage benötigt.

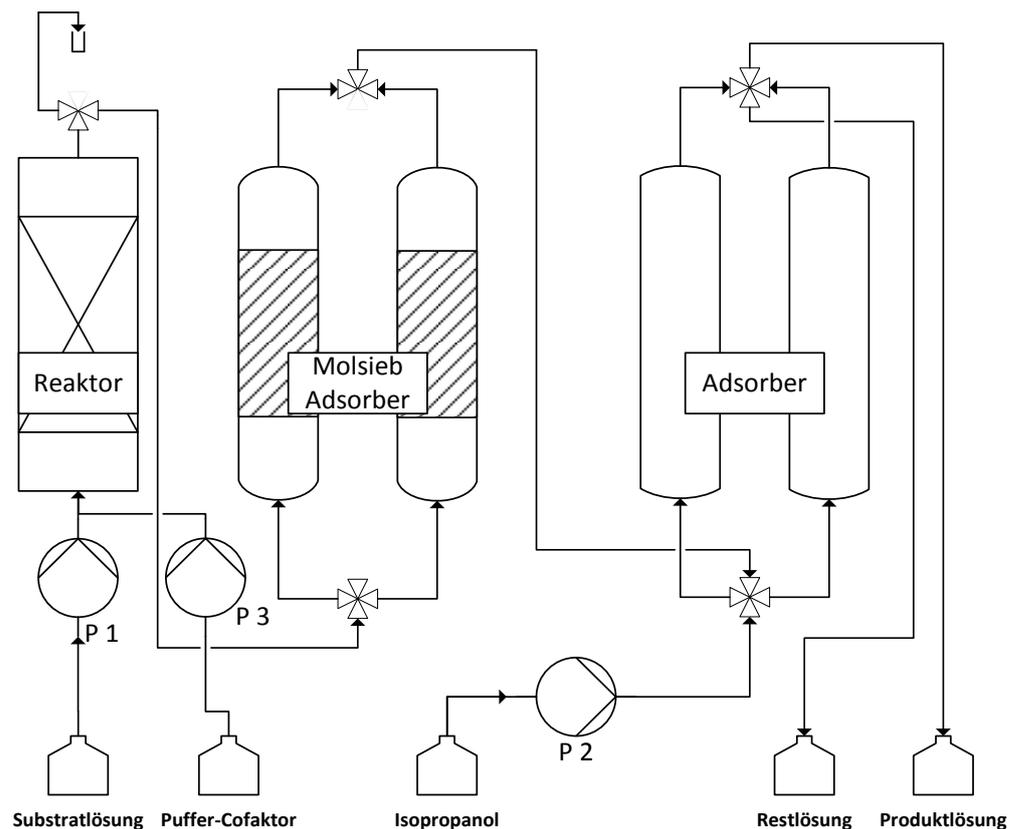


Abbildung 5–1: Schemazeichnung der Anlage zur kontinuierlichen Diolproduktion.

5.2. Kontinuierliche Produktion im Festbettreaktor

Der Vorteil eines Festbettreaktors ist die kontinuierliche Produktion bei geringem Reaktionsvolumen (siehe Abbildung 5–2), bei der es in der Regel nicht zu einer Rückvermischung kommt wie z. B. in einem kontinuierlichen Rührkessel. Die Produktbildung findet ebenfalls schneller statt als in einem kontinuierlich betriebenen Rührkessel, da die Produktkonzentration über die Länge des Reaktors steigt [Liese *et al.* 2006]. Für eine wirtschaftliche Versorgung des Enzyms mit Cofaktor kann dieser entweder in geringer Konzentration kontinuierlich im Substratstrom nachgeliefert werden oder besser noch, im System fixiert werden [Wichmann 1981].



Abbildung 5–2: Enzymreaktor.

Einen Idealfall für Ein-Enzym-Reaktionen mit substratgekoppelter Cofaktorregenerierung stellt die Bindung des Cofaktors NADH in der aktiven Tasche des Enzyms vor der Substratbindung dar. Dies ist der Fall, wenn die Bindung des Cofaktors an erster Stelle steht (Ordered bi-bi Mechanismus). Typische Beispiele sind Reaktionen von Alkohol-Dehydrogenasen aus *Pseudomonas spec.* [Bradshaw *et al.* 1992]. Sowohl die reduzierte als auch die oxidierte Form des Cofaktors werden in wässriger Lösung thermisch deaktiviert. In Versuchen wurde in 0,1 M Natriumphosphatpuffer bei pH 7 und 25 °C eine Halbwertszeit für NADH von 27 Stunden bestimmt. In 0,1 M Tris-Puffer bei pH 7 und 25 °C für NADH betrug die Halbwertszeit 330 Stunden [Wong *et al.* 1981]. Mithilfe der maximalen Zykluszahl (*Total Turnover Number*, TTN), wird der Umsatz an Mol-Produkt ins Verhältnis zum Verbrauch an Cofaktor gesetzt:

$$TTN (NAD^+) = \frac{\text{mol Produkt}}{\text{mol Cofaktor}} \quad \text{Formel 5-1}$$

Bei einer Gesamtproduktionszeit von 63 Stunden mit einer Flussrate von 0,1 mL min⁻¹ (siehe Abbildung 5–7) und einer mittleren Verweilzeit von 12,3 min (Kapitel 5.3.1), ergeben sich 307,3 Verweilzeiten in 63 Stunden.

Bei einer Produktkonzentration von 21,2 mM (2S,5S)-Hexandiol werden in dieser Zeit 6,52 mol L⁻¹ Produkt gebildet bei einem Einsatz von 1 mM NAD⁺ (Kapitel 5.3.3). Daraus folgt eine TTN von:

$$TTN (\text{Cofaktor}) = \frac{6,52 \text{ mol}}{0,001 \text{ mol}} = 6515$$

Das bedeutet, dass mit einem sehr geringen Einsatz an Cofaktor eine relativ hohe Menge Produkt hergestellt werden kann. Leider finden sich in der Literatur keine Vergleichswerte. Zu beachten ist, dass der Austrag von Wasser (und darüber eventuell auch Cofaktor) während der Reaktion nicht in die Betrachtung einbezogen wurde. Dieser Sachverhalt bedarf der Überprüfung und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein (siehe hierzu auch Kapitel 5.3.3).

5.3. Charakterisierung des Festbettreaktors

Um den Festbettreaktor mit Immobilisat zur kontinuierlichen Produktion einsetzen zu können, wurden Versuche zur Verweilzeitverteilung, zum Cofaktoreintrag und zur Katalysatorstabilität durchgeführt. Der Betrieb des Reaktors sollte mit nachgeschalteter Adsorption und mit *tert*-Butylmethylether als Medium durchgeführt werden. Die Substratlösung und der Reaktor wurden auf eine Temperatur von 30 °C temperiert der idealen Temperatur für die Reaktion der Alkohol-Dehydrogenase [Kosjek *et al.* 2004].

5.3.1. Verweilzeitverteilung

Die Messung der Verweilzeitverteilung wurde mithilfe von 1-Octanol als Tracersubstanz bei einer Flussrate von 0,3 mL min⁻¹ durchgeführt. Als Immobilisat wurden mittels LbL-oberflächenmodifizierte Fällungskieselsäuren (Sipernate PBS 100) mit einem Durchmesser von 100 µm verwendet (siehe Tabelle 5-1), es wurden keine Wechselwirkung der Träger mit dem 1-Octanol beobachtet. Die Festbetthöhe betrug 12,5 cm (3 g Immobilisat).

Die Messungen ergaben eine mittlere Verweilzeit von 12,3 +/- 1,3 min. Da in allen weiteren Versuchen mit derselben Trägersorte gearbeitet wurde, kann im Folgenden mit einer Verweilzeit von 12,5 min bei einer Flussrate von 0,3 mL min⁻¹ gerechnet werden. Durchführung und Berechnung siehe Kapitel 9.5.3.5.

Es ergibt sich ein Gesamtvolumen V_{ges} für den Reaktor von:

$$V_{\text{ges}} = \tau \cdot \dot{V} = (12,3 \pm 1,3 \text{ min}) \cdot 0,3 \text{ mL min}^{-1} = 3,3 \text{ bzw. } 4,1 \text{ ml}$$

Abbildung 5–3: Verweilzeitsummenfunktion $E(t)$ des Reaktors mit Octanol als Tracersubstanz, $\dot{V} = 0,3 \text{ mL min}^{-1}$.

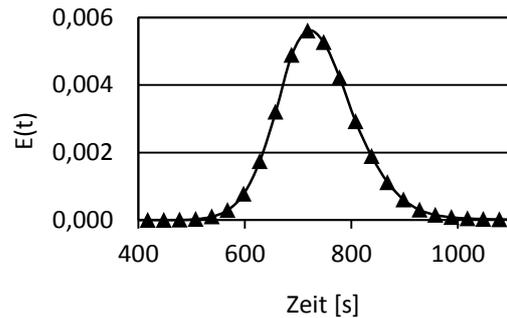


Tabelle 5-1: Eigenschaften der eingesetzten Träger für die Enzymimmobilisierung. Die Träger wurden nach der LbL-Methode mit PEI 25000 oder PEI 2000 beschichtet.

Trägerbezeichnung	PBS 100
Partikelgröße [μm]	100
Oberfläche BET [$\text{m}^2 \text{g}^{-1}$]	150
Porenvolumen [mL g^{-1}]	1,21
Porenradius [\AA]	349

5.3.2. Substratkonzentration und Verweilzeit

Um die optimalen Betriebspunkte zu ermitteln, wurden Versuche mit unterschiedlicher Substratkonzentration und Verweilzeit durchgeführt. Ziel war neben einem hohen Umsatz des Substrates 2,5-Hexandion zum Endprodukt (2*S*,5*S*)-Hexandiol vor allem eine stabile Produktion. Da es sich bei der katalysierten Reaktion um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, kann es zur Rückreaktion kommen. Die Thermodynamik der Reaktion limitiert damit ab einem bestimmten Umsatzpunkt den weiteren Substratumsatz. Gleichzeitig wird allerdings eine ausreichende Verweilzeit benötigt, um genug Substrat bzw. Intermediat zum Endprodukt umzusetzen. Die Flussrate determiniert die Verweilzeit der Moleküle im Reaktor und hat damit direkte Auswirkung auf den Umsatz, die Produktausbeute und die Selektivität. Zur Ermittlung der optimalen Betriebsparameter wurde der Festbettreaktor bei unterschiedlicher Substratkonzentration (40, 60, 80, 120 mM) und unterschiedlicher Verweilzeit (Flussrate 0,1 und 0,3 mL min⁻¹) betrieben. Das Substrat und der Reaktor wurden auf 30 °C temperiert, alle Versuche wurden unter isothermen Bedingungen durchgeführt und der Reaktor bis zum Erreichen des jeweiligen stabilen Betriebspunktes betrieben (in der Regel 5 Verweilzeiten).

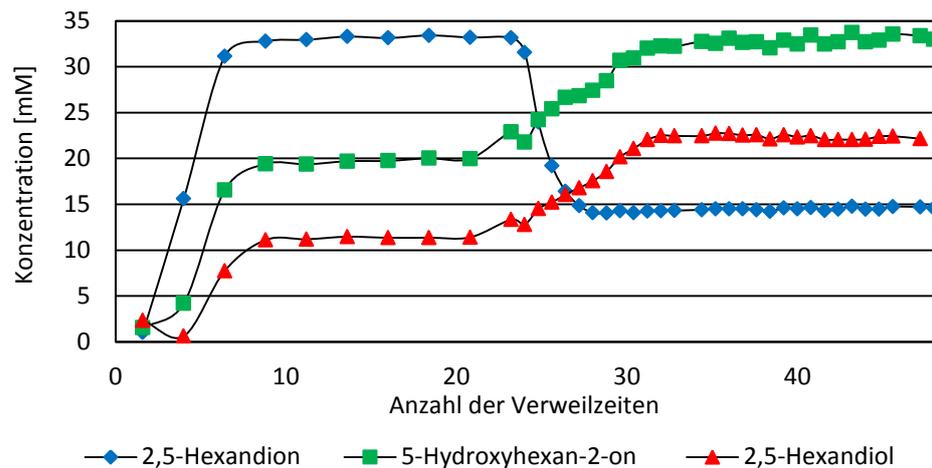


Abbildung 5-4: Kontinuierliche Produktion von (2S,5S)-Hexandiol im Festbettreaktor (Betthöhe: 12,5 cm, Immobilisat: PEI 100 μm , 2,5-Hexandion 80 mM, 5 % V V^{-1} Isopropanol in MTBE. Die Substratlösung wurde zusätzlich mit K_P -Puffer gesättigt. Temperatur 30 $^\circ\text{C}$, Flussrate 0,3 ml min^{-1} , nach 23,2 Verweilzeiten wurde die Flussrate auf einen Wert von 0,1 ml min^{-1} reduziert.

Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 5-2 und Tabelle 5-3 dargestellt:

Tabelle 5-2: Ergebnisse der Messung verschiedener Substratkonzentrationen bei einer Flussrate von 0,3 mL min^{-1} mit Immobilisat PEI 100 μm (ADH-'A' kovalent auf Fällungskieselsäure immobilisiert).

Substratkonzentration [mM]	Umsatz [%]	Produktausbeute [%]	Selektivität [%]	Produktkonzentration [mM]	Intermediatkonzentration [mM]
60	59	18,5	31,5	10,6	16,2
70	51,2	16,4	32,6	11,3	20,2
100	46,3	14	30,3	13,5	34

Tabelle 5-3: Ergebnisse der Messung verschiedener Substratkonzentrationen bei einer Flussrate von 0,1 mL min^{-1} mit Immobilisat PBS 100 (ADH-'A' kovalent auf Fällungskieselsäure immobilisiert).

Substratkonzentration [mM]	Umsatz [%]	Produktausbeute [%]	Selektivität [%]	Produktkonzentration [mM]	Intermediatkonzentration [mM]
35	89,8	48,6	54,2	16,6	12,6
60	85,6	36	43,3	21,2	21,9
70	79	31,8	41,2	22	32,8
100	73	25,4	35,2	25,1	57,6

Aus Tabelle 5-2 und Tabelle 5-3 ist ersichtlich, dass eine erhöhte Verweildauer zu einem höheren Umsatz führt. Bei einer anfänglichen Flussrate von 0,1 mL min^{-1} wurde für eine Substratkonzentration von 60 mM eine Produktkonzentration von 21 mM erreicht. Mit einer Flussrate von 0,3 mL min^{-1} wurde eine Produktkonzentration von 10,6 mM erzielt. Da es sich bei der Modellreaktion um eine 2-stufige Reaktion mit Zwischenpro-

dukt handelt, findet kein direkter Umsatz zum Produkt statt, deshalb hat die Verweildauer einen relativ großen Einfluss auf die Produktkonzentration. Die weiteren Ergebnisse aus den beiden Tabellen belegen diese Annahme. Verglichen mit einer Flussrate von $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ ergeben sich für Flussraten von $0,1 \text{ mL min}^{-1}$ bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen insgesamt höhere Umsätze und Produktausbeuten. Eine Erhöhung der Substratkonzentration führt zu einer Abnahme des Umsatzes und der Produktausbeute. Da es sich um eine thermodynamisch limitierte Reaktion handelt, steigt die Konzentration des Zwischenprodukts, dieses wird aber nicht weiter zum Produkt umgesetzt. Die Zunahme an Zwischenprodukt stellt wiederum einen Nachteil für die nachgeschaltete Produktadsorption dar, da auch das Intermediat 5-Hydroxyhexan-2-on an das Adsorbens bindet und Bindungsstellen belegt. Um bei steigender Substratkonzentration höhere Produktkonzentrationen zu erreichen, müsste die Umsetzung zum Endprodukt durch Verschieben des Reaktionsgleichgewichtes beschleunigt werden. Für die Reaktion im Festbettreaktor wurde für die Versuche zur kontinuierlichen Produktion eine Substratkonzentration von 60 mM gewählt. Dies stellt einen Kompromiss dar, um die Konzentration des Zwischenprodukts niedrig zu halten aber dennoch hohe Umsätze zu erzielen und damit dem Hauptziel, der stabilen Produktion näher zu kommen. Das organische Lösungsmittel MTBE kann hohe Substratkonzentrationen lösen, so dass Umsätze mit 2 M Ketonkonzentration möglich sind. Ideal wäre eine Reaktion ohne Zwischenprodukt, wie in Kapitel 3.3.2 dargestellt.

5.3.3. Lösungsmittelverwendung und Cofaktoreintrag

Um in organischen Lösungsmitteln katalytisch aktiv zu sein, benötigt die Alkohol-Dehydrogenase-A einen Restwasseranteil von $1 \% \text{ V V}^{-1}$ [Gonzalo *et al.* 2007 b]. Das Wasser ist ebenfalls nötig, um den wasserlöslichen Cofaktor NADH bzw. NAD^+ zu lösen und in das System einzubringen. Der Cofaktor wiederum wird von der Alkohol-Dehydrogenase für die Umsetzung des Substrats benötigt.

Um das Enzym trotz Verwendung von organischem Medium mit Cofaktor und Puffer zu versorgen, wurde der Reaktor vor der eigentlichen Umsetzung des Substrats mit 20 mL Puffer-Cofaktor Lösung (1 mM NAD^+ gelöst in Kaliumphosphatpuffer $0,1 \text{ M}$, $\text{pH } 7$) für mindestens 60 Minuten gespült. Anschließend wurde umgestellt auf Substratlösung der Zusammensetzung *rac*-2,5-Hexandion 60 mM , gelöst in puffergesättigtem MTBE mit Zusatz von $5 \% \text{ V V}^{-1}$ Isopropanol für die substratgekoppelte Cofaktorregenerierung. Um eine Aussage zur Effektivität dieser Methode treffen zu können, wurde eine Puffer-Cofaktor Lösung zyklisch über das Immobilisat gepumpt

und die NADH Konzentration mithilfe spektralphotometrischer Messungen bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt.

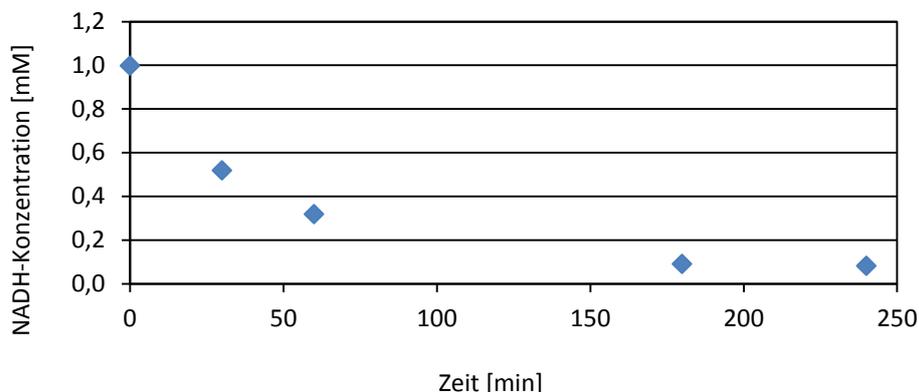


Abbildung 5-5: Abnahme der Cofaktorkonzentration im Überstand über die Zeit durch Spülen des Immobilisates mit 1 mM NADH Lösung in KPi -Puffer 0,1 M, pH 7.

Die Abnahme des Cofaktors (Abbildung 5-5) belegt eine Abreicherung von NADH aus dem Überstand und damit eine Anreicherung von NADH im Immobilisat. Die anschließende Aktivitätsmessung zeigte eine hohe Enzymaktivität, so dass davon ausgegangen wird, dass der Cofaktor tatsächlich vom Enzym gebunden wird bzw. diesem zur Verfügung steht. Die Methode der Vorsättigung mit Cofaktor wird damit als erfolgreich angesehen und weiter genutzt. Um den Einfluss der Wasserphase und der Cofaktor-Vorsättigung zu bewerten, wurde der Reaktor mit einer 40 mM 2,5-Hexandionlösung in MTBE mit 5 % V V^{-1} Isopropanol ohne vorherigen Spülvorgang und ohne wassergesättigtes MTBE betrieben, dargestellt in folgender Abbildung 5-6.

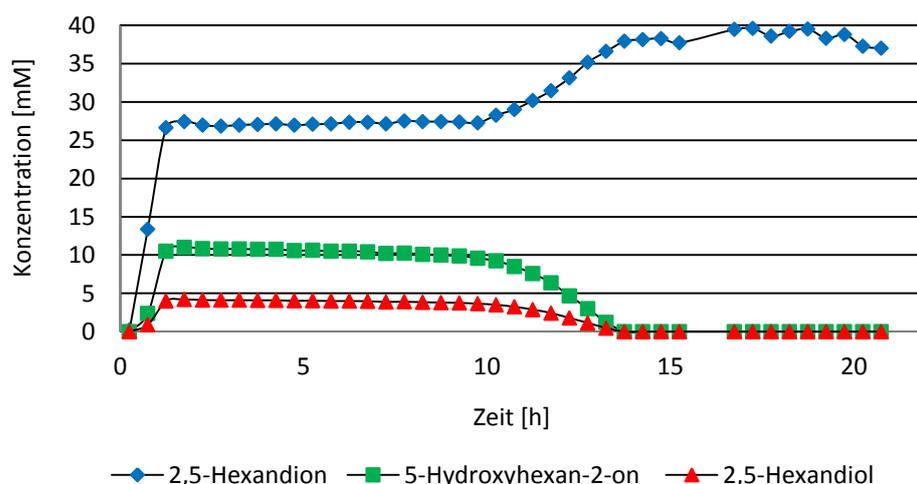


Abbildung 5-6: Kontinuierliche Produktion von (2S,5S)-Hexandiol im Festbettreaktor (Betthöhe 11,1 cm, Immobilisat PBS 50, Enzym ADH-'A'), Substrat 40 mM 2,5-Hexandion und 5 % V V^{-1} Isopropanol in MTBE, Flussrate $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, $30 \text{ }^\circ\text{C}$. 5-Hydroxyhexan-2-on

Wie aus Abbildung 5–6 ersichtlich, nahm die Enzymaktivität im Verlauf der Reaktion ab. Nach 13,3 Stunden wurde kein Edukt mehr umgesetzt. Der Reaktor wurde anschließend mit KPi -Puffer gespült und das Immobilisat mit einer Puffer-Cofaktor-Lösung (1 mM NAD^+ in KPi -Puffer 0,1 M, pH 7) regeneriert. Im Anschluss wurde der Reaktor mit puffergesättigter Substratlösung erneut in Betrieb genommen. Das Ergebnis ist in Abbildung 5–7 dargestellt.

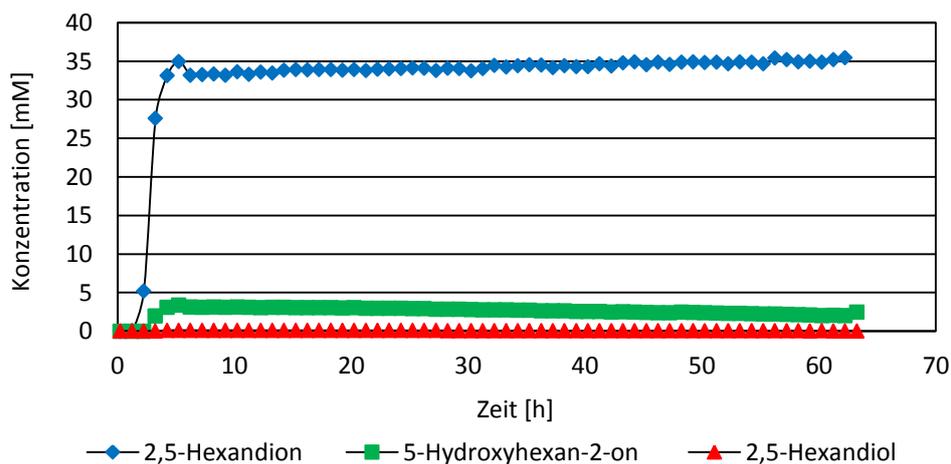


Abbildung 5–7: Kontinuierliche Produktion von (2S,5S)-Hexandiol im Festbettreaktor (Betthöhe 11,1 cm, Immobilisat PBS 50, Enzym ADH-‘A’), Substrat 40 mM 2,5-Hexandion und 5 % V V^{-1} Isopropanol in MTBE, Flussrate $0,1 \text{ mL min}^{-1}$, $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

Bei Einsatz von regeneriertem Immobilisat konnten nur sehr geringe Produktkonzentrationen gemessen werden. Die Intermediatkonzentration betrug knapp 4 mM und nahm mit der Zeit weiter ab. Aufgrund des Ergebnisses kann von einer irreversiblen Deaktivierung des Enzyms ausgegangen werden. Demnach ist eine Aktivierung durch erneutes Spülen mit Puffer und Cofaktor nicht mehr möglich. Der wässrige Puffer schützt das Enzym vor dem Kontakt mit dem Lösungsmittel, da sich aller Wahrscheinlichkeit nach Salzbrücken zwischen Kaliumphosphatpuffer und Enzym ausbilden und das Enzym stabilisieren. Die ADH-‘A’ wird je Dimer durch 10 solcher Salzbrücken stabilisiert, was aller Wahrscheinlichkeit nach die hohe Stabilität des Enzyms in organischen Lösungsmitteln erklärt [Karabec *et al.* 2010]. In der Literatur wird die Deaktivierung von Enzymen durch Entzug des für die katalytische Aktivität benötigten Wassers durch Lösungsmittel beschrieben, wobei das Enzym wahrscheinlich erst durch den direkten Kontakt mit dem Lösungsmittel denaturiert [Steinsiek 2006, Faber 2006]. Ausgehend von den erzielten Ergebnissen wird ein ähnlicher Mechanismus bei der Desaktivierung der ADH-‘A’ vermutet. Dies deutet darauf hin, dass der Wasserfilm eine wichtige Rolle spielt und dieser unter allen Umständen aufrechterhalten werden muss, um die Stabilität und Aktivität des Enzyms zu gewährleisten, wie von Gonzalo [Gonzalo *et al.* 2007 b] bereits be-

beschrieben. Dabei spielen die wasserbindenden Fällungskieselsäuren als Adsorber für Flüssigkeiten unter Umständen eine Schlüsselrolle, da sie das nötige Potential zum Binden einer hohen Menge Wasser in das System einbringen und auf diese Weise die Enzymaktivität im organischen System erhalten (siehe Abbildung 5–8).

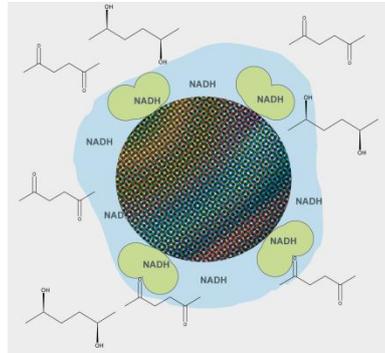


Abbildung 5–8: Schema zum Prinzip der wasserbindenden Eigenschaften von Sipernaten (Wasserfilm blau, organisches Lösungsmittel grau, Enzym gelb dargestellt).

5.3.4. Trocknung des Produktstroms

Die notwendige Versorgung des Enzyms mit Wasser zum Erhalt der katalytisch aktiven Konformation stellt für die selektive Produktabtrennung einen Nachteil dar. Aufgrund seiner hohen Polarität bindet Wasser bevorzugt am Adsorber und belegt damit Bindungsstellen für die Alkoholadsorption (siehe Kapitel 4). Aus diesem Grund wurde das Wasser selektiv über Molekularsieb abgetrennt, welches der Adsorbersäule vorgeschaltet wurde. Durch die geringe Porenweite des Molekularsieves (Typ 3A) wurde sichergestellt, dass nur Wassermoleküle gebunden wurden. Versuche mit Substrat und Produkt zeigten keine Anbindung. Den Herstellangaben nach werden 15 % Wasser gebunden. Das Molekularsieb muss also je nach Wassergehalt der Substratlösung nach einer bestimmten Betriebsdauer getauscht werden. Der Wassergehalt der Substratlösung (60 mM 2,5-Hexandion, 5 % $V V^{-1}$ Isopropanol in MTBE) wurde nach dem Karl-Fischer Verfahren (DIN 51777) [Fischer 1935] bestimmt und ergab einen Wassergehalt von 2,5 %. Für eine Flussrate von $0,1 \text{ mL min}^{-1}$ und unter den beschriebenen Bedingungen resultiert damit eine Verwendungsdauer von etwa 60 Minuten pro Gramm Molekularsieb, bis auf ein zweites Festbett mit regeneriertem Molekularsieb umgeschaltet werden muss.

5.3.5. Stabilität des Immobilisates

Um die Stabilität des Immobilisates im Reaktor unter Produktionsbedingungen bewerten zu können, wurde dieser über einen längeren Zeitraum betrieben. Aus der Produktkonzentration, bzw. aus dem Umsatz U_1 bzw. U_2

zu zwei verschiedenen Zeitpunkten t_1 und t_2 , konnte eine Deaktivierung des Biokatalysators gemessen werden. Dieser Sachverhalt wird durch die Deaktivierungskonstante (Formel 5-2) beschrieben:

$$k_{deact} = -\frac{\ln \frac{U_2}{U_1}}{t_2 - t_1} \quad \text{Formel 5-2}$$

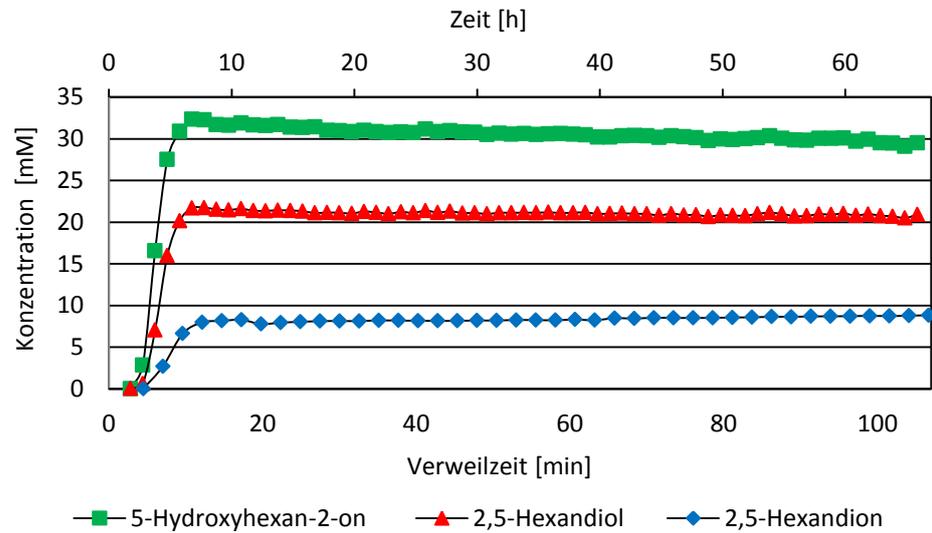


Abbildung 5–9: Langzeitversuch zur kontinuierlichen Produktion von (S2,S5)-Hexandiol im Festbettreaktor (Betthöhe 12,5 cm, Immobilisat 100 μm Sipernat mit PEI 25000 Beschichtung, Enzym ADH-‘A’), Substrat 60 mM 2,5-Hexandion, 5 % V V^{-1} Isopropanol in MTBE, Flussrate 0,1 mL min^{-1} , 30 $^{\circ}\text{C}$, $\tau = 37,5 \text{ min}$, RZA 36,6 $\text{g l}^{-1} \text{d}^{-1}$.

Die Berechnung der Deaktivierungskonstante erfolgt über den Umsatz:

Tabelle 5-4: Umsatz und Zeit zur Berechnung der Deaktivierungskonstante, es ergibt sich: $k_{deakt} = 1,09 \cdot 10^{-5} \text{ min}^{-1}$.

Zeit [min]	Umsatz (U) [%]
285	84,32
3945	81

Durch Berechnung der Halbwertszeit mithilfe der Deaktivierungskonstante ergibt sich die Halbwertszeit des Enzyms. Das ist diejenige Zeit, nach welcher sich die Enzymaktivität halbiert:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_{deakt}} \quad \text{Formel 5-3}$$

Die Enzymaktivität halbiert sich nach $t_{1/2} = 44,1$ Tagen bei Verwendung der kovalent immobilisierten ADH-´A` auf der oberflächenmodifizierten Fällungskieselsäure. Erreicht wird dieser Wert durch Vorsättigung des Immobilisates mit Puffer-Cofaktorlösung. Damit weist das Immobilisat eine hohe Stabilität bei kontinuierlichem Reaktorbetrieb in MTBE auf. Modifikationen zur Erhöhung der Stabilität sind denkbar, waren aber nicht Gegenstand weiterer Untersuchungen.

5.4. Kontinuierliche Produktadsorption

Die Verwendung von Adsorbentien in Form eines Festbettes wird als effektivste Sorptionsmethode beschrieben, wobei die Leistung von den zur Sorption verwendeten Partikeln abhängt. Der große Vorteil besteht unter anderem im einfachen Scale-Up durch Zuschalten einer weiteren Säule durch parallel- oder Serienschaltung. Für die einzelne Säule im präparativen Maßstab wird in der Regel ein Durchmesser von 1,5 Meter und 5 Meter Höhe nicht überschritten [Volesky 2003].



Abbildung 5–10: Adsorbentensäulen mit Puralox KR-160.

Zur kontinuierlichen Produktadsorption wurden zwei Superperformance-Glassäulen (Typ: 150-10) eingesetzt. Beide wurden mit einer Festbetthöhe von 15,5 cm und 1 cm Durchmesser eingesetzt. Als Adsorbentgranulat wurden je Säule 6,5 g Puralox KR-160 Aluminiumoxid-Granulat verwendet. Die verwendete Gesamtadsorbentoberfläche betrug 976,5 m². Die optimalen Betriebsparameter wurden in Versuch zur maximalen Beladung mittels Adsorptionsisothermen und die Beladungszeit über Durchbruchkurven ermittelt (siehe Kapitel 4.6). Eine physikalische Charakterisierung der Adsorbent wurde ebenfalls durchgeführt und ist im Kapitel zur Adsorption (Kapitel 4) detailliert beschrieben. Ermittelt wurde eine Adsorptionskapazität von etwa 60 mg g⁻¹ bei einer Flussrate von 0,3 mL min⁻¹ und einer Beladungszeit von 190 Minuten.

Das Produkt konnte mithilfe von Isopropanol erfolgreich eluiert werden. Isopropanol befand sich als Cosubstrat bereits im System, dadurch wird keine weitere Chemikalie in das System eingebracht. Die komplette Desorption der gebundenen Moleküle war in kurzer Zeit möglich (Ergebnis

aus GC-Messungen, Konzentrationen von Edukt oder Produkt im Elutionsstrom nicht mehr nachweisbar), siehe auch Kapitel 4.6, Abbildung 4–55 und Abbildung 4–58.

5.4.1. Inbetriebnahme der Anlage

Vor Inbetriebnahme der Anlage wurden sämtliche Lösungen, der Reaktor und die Adsorbersäule auf 30 °C erwärmt. Um das Enzym mit der für die katalytische Aktivität benötigten Wassermenge und mit Cofaktor zu versorgen, wurde mit 0,1 M KP_i -Pufferlösung gespült, pH 7, 1 mM NAD^+ . Nach 60 Minuten wurde das System auf Substratlösung (60 mM 2,5-Hexandion in puffergesättigtem MTBE und 5 % V V⁻¹ Isopropanol) umgestellt. Der Reaktor wurde in Betrieb genommen bis ein stabiler Betriebspunkt erreicht wurde und sich keine Luftblasen mehr im System befanden. Mit Erreichen des Gleichgewichtszustands wurde getrocknetes Molekularsieb in die Adsorbereinheit gefüllt und an den Reaktor angeschlossen. Anschließend wurde am Auslauf die Adsorbersäule mit dem Adsorbergranulat angeschlossen und mittels Fraktionssammler kontinuierlich Proben genommen. Nach hinreichend langer Adsorptionszeit wurde auf Elution mittels reinem Isopropanol umgeschaltet. Aufgrund der Vormessungen wurde das Umschaltintervall auf 13,3 Stunden gestellt und automatisch die Adsorbersäule gewechselt und die Elution (Flussrate 0,05 mL min⁻¹) begonnen, um einen verfrühten Durchbruch und den damit verbundenen Verlust an Produkt auszuschließen.

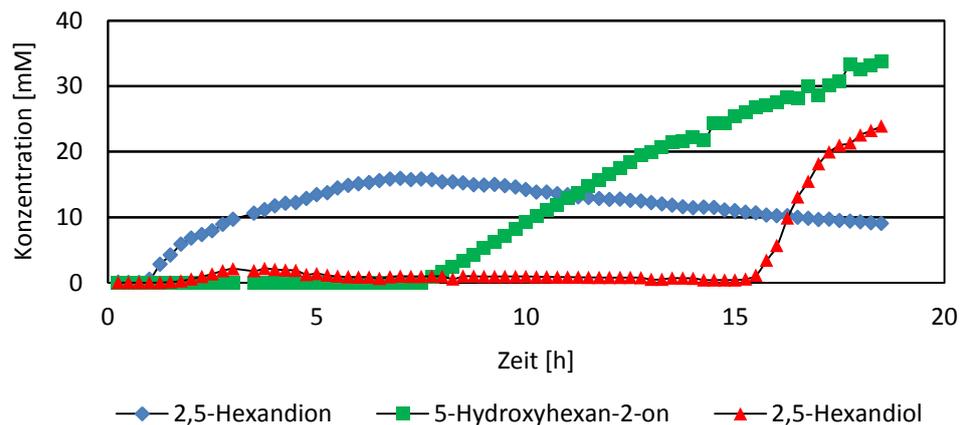


Abbildung 5–11: Konzentrationsverlauf und Durchbruch am Adsorbersäulenausgang. Reaktionsbedingungen: 2,5-Hexandion 60 mM, 5 % V V⁻¹ Isopropanol in MTBE, Cofaktor-Vorsättigung mit 1 mM NAD^+ gelöst in KP_i -Puffer 0,1 M, pH 7, Puralox KR-160 (Aluminiumoxid-Granulat) 6,75 g Flussrate 0,1 mL min⁻¹, T = 30 °C.

Aus der graphischen Auftragung der Konzentrationsverläufe in Abbildung 5–11 ist ersichtlich, dass der Großteil des Substrats umgesetzt wurde. Während der gesamten Laufzeit trat eine geringe Menge an Produkt aus dem

Adsorber aus, hingegen kein Intermediat. Nach 7,5 Stunden kam es zum Durchbruch des Intermediats, die Produktkonzentration blieb weiter niedrig. Wahrscheinlich verdrängt das Diol das Hydroxyketon von den Bindungsstellen. Der Durchbruch des Produkts (2*S*,5*S*)-Hexandiol erfolgte nach 15,25 Stunden. Durch Verwendung von Isopropanol als Cosubstrat und dem Intermediat 5-Hydroxyhexan-2-on befinden sich neben dem Zielprodukt (2*S*,5*S*)-Hexandiol noch zwei weitere Verbindungen mit Hydroxygruppen im System. In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass Isopropanol einen negativen Einfluss auf die Adsorption besitzt (siehe Kapitel 4.5.1). Grundsätzlich würde sich die Elution bei höherer Flussrate durchführen lassen, aber in dem automatisierten Setup ist die Produktionszeit im Reaktor der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, weshalb eine verminderte Elutionszeit gewählt wurde. Die Erhöhung der Produktionsrate durch Erweiterung der Produktionskapazität würde an dieser Stelle zu einer Optimierung führen.

Die Versuche wurden wiederholt, um das Ergebnis zu überprüfen. Vor dem Zuschalten des Adsorbers und nach Beendigung der Adsorption wurden Proben direkt am Reaktorausgang genommen. Vor Zuschalten der Adsorption zeigte sich am Reaktorausgang ein Umsatz von 86,5 % (+/- 0,6 %) und eine Produktausbeute von 39,7 % (+/- 0,25 %). Nach Beendigung des Produktionslaufs und der Adsorption wurde ein Umsatz von 83,8 % (+/- 0,04 %) und eine Produktausbeute von 42,7 % (+/- 1,2 %) gemessen (die Messungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt). Die höhere Produktausbeute gegen Ende der Produktion, gemessen am Reaktorausgang, kann ihre Ursache in einer verbesserten Substratsättigung haben. Unter Umständen haben sich Totvolumina im Reaktor während des Betriebs zurückgebildet. Das Ergebnis zeigt, dass die Produktion auf kontinuierlich hohem Niveau möglich ist und unterstreicht das Ergebnis der hohen Stabilität des Immobilisates aus Abschnitt 3.3. Es wurde eine stabile Produktion betrieben und eine Raum-Zeit-Ausbeute von 44,3 g L⁻¹ d⁻¹ erreicht.

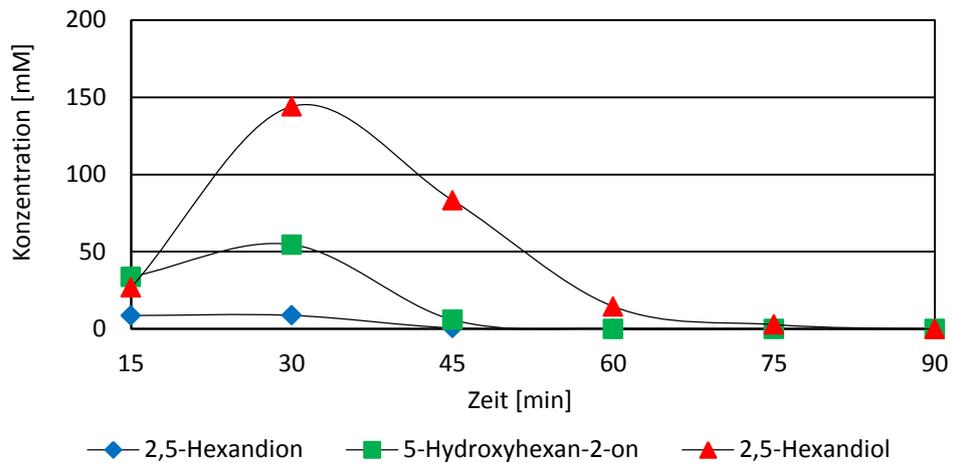


Abbildung 5–12: Elutionsprofil am Adsorbersäulenausgang, Elution mittels Isopropanol (rein) mit einer Flussrate von $0,05 \text{ mL min}^{-1}$, (Linien als visuelle Hilfe eingetragen, tatsächlicher Verlauf kann abweichen).

Aus Abbildung 5–12 ist ersichtlich, dass im Elutionsstrom sowohl Substrat, Intermediat und Produkt enthalten sind. Mengenmäßig überwiegt dabei mit 85 - 88 % das Endprodukt, es finden sich aber etwa 11 % Intermediat und 4 - 5 % Substrat (GC-Analyse). Eine Ursache liegt darin, dass die im Hohlraumvolumen enthaltene Flüssigphase vor der Elution nicht entfernt wurde und mit eluiert wird. Die Produktreinheit hätte durch das Verwerfen eines Teils der ersten Elutionsfraktion verbessert werden können.

Ein effektives Verfahren, um eine höhere Reinheit des Endprodukts zu erzielen, ist die Kühlungskristallisation [Haberland 2003]. Dabei wird mithilfe eines Rotationsverdampfers die Lösungsmittelphase entfernt und die konzentrierte Produktlösung mit Isoheptan überschichtet und bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert, bis sich das (2*S*,5*S*)-Hexandiol in Form von Kristallen am Gefäßboden absetzt. Das Produkt aus der Anlage wurde auf diese Weise aufgereinigt. Die Kristalle wurden gefiltert und getrocknet. Die Reinheit des (2*S*,5*S*)-Hexandiols betrug $> 99 \%$, mit einem Enantiomerenüberschuss $ee > 99 \%$ (GC-Analyse). Mittels NMR-Analyse wurden neben dem Zielprodukt eine geringe, aber nicht näher quantifizierte Menge Restwasser und wenige Verunreinigungen detektiert.



Abbildung 5–13: Kristalle des Endprodukts (2S,5S)-Hexandiol, produziert in der automatisierten Anlage mit nachgeschalteter Adsorption mittels Aluminiumoxid und Umkristallisation bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Isoheptan.



Abbildung 5–14: Kristalle des Endprodukts (2S,5S)-Hexandiol, produziert in der automatisierten Anlage mit nachgeschalteter Adsorption mittels Aluminiumoxid.

5.4.2. Automatisierung der Anlage

Durch die Automatisierung der Anlage (siehe Abbildung 5–16) war es möglich, eine zeitgesteuerte Adsorption und Elution durchzuführen, ohne die Anlage ständig kontrollieren zu müssen. Eine Automatisierung bietet sich bei Verwendung mehrerer Adsorbersäulen an, um die Anlage kontinuierlich im 24-Stunden Betrieb zu nutzen.

Für die automatisierte Produktion hat es sich als vorteilhaft erwiesen, zwei getrennte Adsorbereinheiten für Wasser zu benutzen, so dass auch in diesem Fall bei Sättigung eines Molekularsiebes auf das zweite umgestellt werden kann. Alternativ kann mit einem großen Adsorber-Festbett gearbeitet werden, was aufgrund des großen Hohlraumvolumens allerdings auch größere Spülvolumina erfordert.

Die Schaltung der Anlage wurde über zwei 10-Wegeventile vorgenommen, die über einen Mikrocontroller angesteuert wurden. Mithilfe eines in Matlab geschriebenen Skripts war die zeitabhängige Schaltung möglich.

Für die Produktion hat sich eine Flussrate von $0,1 \text{ mL min}^{-1}$ als geeignet erwiesen, womit sich für den Festbettreaktor eine Verweilzeit von 37,5 Minuten ergab. Da die Elution schneller zu bewerkstelligen war als die Adsorption, wurde die Elutionspumpe mit einer Flussrate von $0,05 \text{ mL min}^{-1}$ betrieben. Das Intervall zum Wechseln der Säule betrug 13,3 Stunden und die Beladung erfolgte diskontinuierlich. Die Zeit wurde experimentell ermittelt. Auf diese Weise war die Elution möglich, bevor es zum Durchbruch des Produkts kam. Jede Anlage muss an diesem Punkt auf ihre Einzelsysteme abgestimmt werden. Wirtschaftlich wäre in jedem Fall eine schnelle Elution des Produkts, damit die Adsorbersäule wieder einsetzbar ist. Da in diesem Fall allerdings ein kontinuierlicher Produktionsbetrieb in Abhängigkeit von der Produktivität des Reaktors angestrebt war, wurde die Flussrate der Elution an die Produktionsrate des Reaktors angepaßt. Auf diese Weise wurden Prozesszeiten von 80 Stunden realisiert.



Abbildung 5–15: Ausschnitt aus der Gesamtanlage, Reaktorsäule (links) und zwei Säulen mit Molekularsieb zur Abtrennung von Wasser. Zwei Pharmacia-Pumpen und die Schaltzentrale mit den Magnetventilen.



Abbildung 5–16: Gesamtprozess, aufgebaute Anlage mit Steuerung, Wasserbad, Substratbehälter, Autosampler, Pumpen, Magnetventilschaltung (Mitte) und Reaktoren.

5.5. Kosten und Wirtschaftlichkeit

In diesem Kapitel werden die entstehenden Kosten und die Wirtschaftlichkeit des Prozesses dargestellt.

Zwei Grundvoraussetzungen für die erfolgreiche Platzierung eines Produkts am Markt sind eine bestehende Nachfrage und ein Nettoerlös, welcher über den Produktionskosten liegt.

Sind die Anlagenbestandteile bereits vorhanden, fallen bei kontinuierlichem Betrieb Kosten für das Lösungsmittel/Medium (MTBE), das Cosubstrat (Isopropanol), das Substrat (2,5-Hexandion) und den Cofaktor (NAD⁺) an. Zusätzliche Faktoren sind Energiekosten, Chemikalien und Produktions- oder Anschaffungskosten für den Biokatalysator. Die recherchierten Preise für diese Bestandteile sind in Tabelle 5-5 dargestellt:

Tabelle 5-5: Kosten für Chemikalien (Recherche 24.10.2011 Sigmaaldrich.com), Standardversuchsbedingungen, Substratkonzentration 60 mM.

Chemikalie	Verbrauch pro 100 τ	Kosten [€]	Gesamtkosten [€]
MTBE (HPLC > 99,8 %)	356,25 mL	153,25 L	2,18
Isopropanol (HPLC >99,9%)	206,25 mL	133,45/25 L	1,10
2,5-Hexandion (>98%)	2,73 mL	87,40/100 g	2,36
NAD ⁺ (> 96,5%)	0,0133	154,80/10 g	0,21
		Gesamtkosten	5,85

Graphische aufgetragen fallen folgende Kosten je 100 Verweilzeiten an:

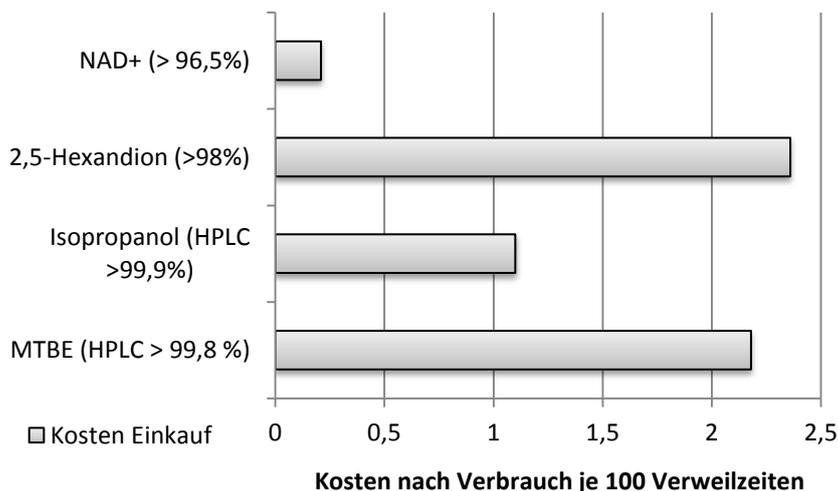


Abbildung 5-17: Kosten für Cofaktor, Lösungsmittel und Reaktanten je 100 Verweilzeiten (Produktion von 0,49 g 2S,5S-Hexandiol). Die Preise basieren auf den Preisen nach Tabelle 5-5, Großhandelspreise weichen ab. Zusätzlich fallen Kosten für die Produktion oder den Kauf und die Immobilisierung des Biokatalysators an (die Kosten sind an dieser Stelle nicht miteinbezogen worden, da der Biokatalysator selber gewonnen und immobilisiert wurde).

Wird von einer Produktion von etwa 360 mg über eine Zeit von 65 Stunden ausgegangen, können je 100 Verweilzeiten etwa 485 mg (2S,5S)-Hexandiol produziert werden. Je nach Verkaufspreis ergibt sich ein Erlös von etwa 8 Euro (ein Zehntel Einkaufspreis entspricht etwa Großhandelspreis). Die Wirtschaftlichkeit eines biokatalytischen Verfahrens hängt stark von der Wiederverwendung bzw. der Verwendungsdauer des Biokatalysators ab. Im Prozess wurde eine Produktivität von $44,3 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erreicht. Für Feinchemikalien stellt dies eine gute Produktivität dar [Goldberg 2010]. Der erreichte Umsatz liegt im Bereich von 85 %, für Feinchemikalien sollte dieser 90-95 % erreichen [Bommarius *et al.* 2004]. Durch die selektive Anbindung des Produkts und gezielte Elution wird das Produkt in konzentrierter Form erhalten, wodurch ein Vergleich zu bestehenden Prozessen schwierig ist. Durch weitere Optimierungen kann die Produktreinheit verbessert und die Produktionskapazität erhöht werden. Zusätzlich müsste untersucht werden welche Lösungsmittel rezyklierbar sind. Um die Produktreinheit zu erhöhen, könnte entweder die erste Elutionsfraktion mit den Verunreinigungen aus dem Hohlraumvolumen verworfen werden oder die Säule durch Luftdruck entleert werden. Ein Spülschritt wurde nicht getestet, dieser würde wahrscheinlich aufgrund der Konzentrationsdifferenz zu der verfrühten Elution eines Teils des Produkts führen. In diesem Fall müsste geklärt werden, welche Verluste noch akzeptabel sind.

5.6. Übertragbarkeit

Versuche mit unterschiedlichen Alkoholen und Ketonen haben gezeigt, dass die selektive Adsorption der polaren Alkoholverbindung in mehreren Fällen möglich ist. Die Beladungsmengen, Durchbruchzeiten und die Regenerationsfähigkeit des Adsorbers müssen experimentell bestimmt werden. Diese Rahmendaten sind für den Betrieb der Anlage von großer Wichtigkeit. Prinzipiell handelt es sich bei der Anlage um einen relativ einfachen Aufbau. Im Festbettreaktor kann eine beliebige Alkohol-Dehydrogenase immobilisiert und ein passendes Medium gewählt werden. Bei den in dieser Arbeit vorgestellten synthetischen anorganischen Adsorbentien, muss ein organisches Lösungsmittel als Adsorptionsmedium gewählt werden, in welchem das Enzym eine hohe Stabilität aufweist und die Adsorption der Zielkomponente mit dem Adsorber möglich ist.

In dieser Arbeit ist auch der Umsatz des Modell-Substrats Acetophenon im selben Reaktor untersucht worden (siehe Kapitel 3.3.2). Da es sich um eine direkte Umsetzung ohne Zwischenprodukt handelt und die Umsetzung im wässrigen Milieu stattfindet, sind kurze Verweilzeiten ausreichend, um hohe Umsätze zu realisieren, so dass die Übertragbarkeit gegeben ist.

5.7. Fazit

Die Ergebnisse des Kapitels zur Reaktionsführung lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Immobilisierte Alkohol-Dehydrogenase-´A` wurde erfolgreich in organischem Lösungsmittel zur kontinuierlichen Ketonreduktion im Festbettreaktor eingesetzt.
- Der notwendige Restwasseranteil und der Cofaktor wurden mittels Vorspülung mit Puffer in das System eingebracht.
- Durch Nachschalten des selektiven Adsorbers in Form eines Festbettes konnte der produzierte Alkohol (2S,5S)-Hexandiol selektiv aus dem Reaktionsgemisch abgetrennt werden. Durch getakteten Einsatz von zwei Adsorbereinheiten konnte der kontinuierliche Betrieb mit diskontinuierlicher Adsorption realisiert werden.
- Durch Vorschalten eines Molekularsiebes wurde das zur Reaktion benötigte Restwasser abgetrennt, bevor dieses auf dem Adsorber binden konnte. Auf diese Weise wurde der Adsorber effektiv geschützt.
- Durch die Steuerung der Anlage mithilfe von zwei Magnetventilen über ein Matlabskript mit Zeitschleifenfunktion wurde die Anlage erfolgreich automatisiert und es konnten Prozesszeiten von 80 Stunden realisiert werden.

6. Diskussion

An dieser Stelle werden die Ergebnisse in Form einer übergreifenden Diskussion eingeordnet und bewertet.

Über die Immobilisierung von Enzymen auf Polyelektrolytschichten existiert wenig Literatur. Das Verfahren wurde für diese Anwendung bisher kaum etabliert, obwohl das Beschichtungsverfahren mittlerweile in vielen unterschiedlichen Bereichen eine Anwendung findet. Dies liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit an dem nicht unerheblichen Aufwand zum reproduzierbaren Aufbringen der Polyelektrolyt-Einzelschichten und der Überprüfung auf vollständige Beschichtung einer Oberfläche mit der wenigen Nanometer dicken Schicht. Insgesamt eine Methode, die sich nicht ohne Weiteres in einem biochemischen Labor etablieren lässt. Die Immobilisierung auf Polyelektrolyten findet indirekt bei der Immobilisierung auf Polymerträgern statt, so dass diese Materialien bereits Verwendung finden [Bahulekar *et al.* 1991, Guisán 2010]. Dabei handelt es sich prinzipiell um dasselbe Material, allerdings besteht dabei in der Regel der komplette Träger aus dem Polymer. Der Vorteil an der LbL-Technik ist die Möglichkeit der Beschichtung eines beliebigen Trägermaterials oder einer beliebigen Oberfläche unter milden Bedingungen.

Sowohl die adsorptive als auch die kovalente Immobilisierung von Enzymen auf LbL-oberflächenmodifizierten Trägern ließ sich erfolgreich durchführen. Dabei zeigte sich, dass Polyallylamin-Hydrochlorid (PAH) für die Enzymanbindung wenig geeignet ist. Sowohl die einfache Anbindung als auch der wiederholte Einsatz zeigte eine sehr niedrige Enzymaktivität. Hingegen zeigte sich auf Polyethylenimin (PEI) die höchste Enzymaktivität nach der Immobilisierung und behielt diese auch bei Verwendung im Repetitive-Batch. Damit zeigen Polyethylenimin und die Variationen der PEI-Beschichtung die höchste Enzymaktivität. Die Literaturrecherche zeigt, dass für dieses Polymer insgesamt sehr positive Immobilisierungserfolge erzielt wurden und das Polymer von der Food and Drug Administration der USA als „direct food additive“ zugelassen wurde [Bahulekar *et al.* 1991].

Polyethylenimin bietet Aminofunktionen zur Bindung von Glutardialdehyd, so dass die kovalente Immobilisierung erfolgreich durchgeführt wurde. Zusätzlich konnte die adsorptive Immobilisierung im Experiment nachgewiesen werden und auch in der Literatur finden sich Verweise auf eine erfolgreiche Anbindung über ionische Wechselwirkungen [Mateo *et al.* 2000].

Neben der erfolgreichen Immobilisierung auf LbL-modifizierten porösen Glaträgern wurde die PEI-Beschichtung auch auf makroporösen Sipernaten[®] untersucht. Neben der Anbindung der Enzyme gelang es im Experiment, die Fähigkeit der Sipernate[®] zur Bindung von Flüssigkeiten zu nut-

zen. So wurde das Immobilisat vor Verwendung in organischem Lösungsmittel mit einer Puffer-Cofaktoralösung gespült, da das Enzym für die katalytische Aktivität eine mikrowässrige Umgebung benötigt [Gonzalo *et al.* 2007 b]. Mithilfe dieser Vorbehandlung wurde eine Zykluszahl von 6515 erzielt und das Immobilisat zeigte eine stabile Aktivität im kontinuierlichen Betrieb > 65 Stunden mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 44$ Tagen unter Verwendung von puffergesättigtem *tert*-Butylmethylether als Reaktionsmedium. Grundsätzlich bietet die Verwendung organischer Lösungsmittel die Möglichkeit hohe Substratkonzentrationen zu lösen, so dass Substratkonzentrationen von 2 M und höher denkbar sind.

Im Experiment gelang der Nachweis, dass bei einer Immobilisierungsdauer von einer Stunde schon der Großteil der Enzyme gebunden wurde (siehe Kapitel 3.1) und die kovalente Immobilisierung eine hohe Stabilität im Repetitive-Batch Experiment zeigte (siehe Kapitel 3.3.1). Für die Parameter pH-Wert, Temperatur und Enantioselektivität zeigte sich durch die Immobilisierung keine Veränderung. Die Möglichkeit, kovalentes Immobilisat zu lagern und dadurch bei Bedarf auch größere Mengen zur Verfügung zu haben, zeigen die Ergebnisse zur Lyophilisierung in Kapitel 3.3.3. Durch die Gefriertrocknung kommt es je nach Eigenschaften der Alkohol-Dehydrogenase zu einem Aktivitätsverlust zwischen 20-50 %. Zusätzlich mit dem Aktivitätsverlust, der sich durch eine kovalente Immobilisierung ergibt, muss die Wirtschaftlichkeit eruiert werden. Allerdings bieten alle Methoden Potential zur Verbesserung. Eine Nachbehandlung des frischen Immobilisates mit Aminosäure-Puffer-Lösung vor Gefriertrocknung oder Gefriertrocknung aus unterschiedlichen Medien kann dabei schon zu einer Aktivitätsverbesserung führen. Dies wurde aber im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht. Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, dass sich LbL-beschichtete Träger sehr gut zur Immobilisierung von Enzymen eignen.

Obwohl Aluminiumoxide schon lange Verwendung in der Chromatographie finden und zur Trennung von Cellulose, Dextran, halogenierten Verbindungen aus Wasser, organischen Säuren aus Kohlenwasserstoffen, Phosphat, Mercaptan und Fluorid aus Trinkwasser eingesetzt wurden, ist über die Trennung von Alkoholen aus Keton-Alkoholgemischen keine Literatur zu finden. Berichtet wird lediglich von dem Einsatz zur Entfernung von Wassermolekülen zur Trocknung organischer Lösungsmittel als Labormethode. Aluminiumoxide füllen mit ihrer Funktion allerdings eine wichtige Lücke in der Anwendung, da die Isolation von Diolen aus Mischungen mit dem korrespondierenden Keton ein häufiges Problem in der Abtrennung aufgrund physikalischer Ähnlichkeit besteht. Falls aufgrund einer unvollständigen

Umsetzung entweder der Alkohol oder das Keton abgetrennt werden sollen, bedarf es hoch selektiver aber kostengünstiger Adsorbentien. Diesen Zweck erfüllen Aluminiumoxide und Alumosilikate. Inwieweit sich herkömmliche Aluminiumoxide von γ -Aluminiumoxiden in der Bindungsfähigkeit unterscheiden, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig geklärt werden. Die höchsten Selektivitäten wurden mit γ -Aluminiumoxid erzielt (für EtOAc 0,97 und 0,93 für MTBE). Dabei spielen Al-OH und Al^{3+} Gruppen bei der Bindung polarer Moleküle mit großer Wahrscheinlichkeit eine wichtige Rolle. So besitzt Aluminiumoxid Brønstedt Wirkung als Protonen-Donor durch isolierte Hydroxylgruppen an der Oberfläche des Adsorbens. Bei Dehydroxylierungsreaktionen wirkt es als Lewis-Säure (Elektronenakzeptor) über die Al^{3+} Bindungsstellen [Ballinger *et al.* 1991]. Die Kombination aus Aluminium mit Silikaten in Form von Alumosilikaten führt zur Entstehung starker Lewis-Säuregruppen durch Austausch von Si^{4+} mit Al^{3+} Ionen und einer geringen Menge von Brønsted-Säuregruppen [Daniell *et al.* 2000]. Aus der Literatur sind Untersuchungen zum Einfluss der Kettenlänge von Diolen bei der Modifikation von Silica bekannt. Je nachdem, ob es sich um eine ungerade oder gerade Anzahl von C-Atomen handelt, kommt es zur Interaktion von Hydroxygruppen mit den Silanol-Gruppen [Balard *et al.* 1988]. Diese Versuche wurden allerdings an pyrogenem Silicium durchgeführt, wobei es sich bei den in dieser Arbeit verwendeten Adsorbentien um aus Lösung gefällte Adsorbentien handelt, es könnte sich allerdings um einen ähnlichen Mechanismus handeln. Die Versuche belegen außerdem den großen Einfluss der Polarität der Lösungsmittel. Versuche aus Wasser führen aufgrund der hohen Polarität des Wassers zu keiner nachweisbaren Adsorption des Alkohols, da es zum Wettbewerb der Hydroxyfunktionen um Bindungsstellen kommt. Heptan ist als Lösungsmittel zu unpolar, so dass schon das Lösen der Substrate und Produkte für die Versuche Schwierigkeiten bereitete und nur mit Isopropanol-Zusatz gelang. Am besten eignen sich Essigsäureethylester mit einem Oktanol-Wasser Verteilungskoeffizienten $K_{OW} = 0,7$ und *tert*-Butylmethylether mit einem $K_{OW} = 1$ (siehe auch Tabelle 4-1) für die selektive Adsorption von Diolen auf Alumosilikaten oder Aluminiumoxiden. Dass die Wechselwirkung des Lösungsmittels mit dem Feststoff einen weiteren Einfluss spielt, zeigen die Berechnungen des Projektpartners CAM-D (siehe Kapitel 4.4.5). Denkbar wäre auch die Untersuchung von Mischungen unterschiedlicher Verhältnisse der Lösungsmittel, dieser Sachverhalt wurde allerdings nicht näher untersucht. Als geeignetes Screening wurden Versuche mit Dünnschichtchromatographie-Platten aus Aluminiumoxid und Versuche zur Adsorption aus dem Überstand etabliert. Eine Beurteilung der Kapazität wurde mithilfe von Adsorptionsisothermen (Kapitel 4.3) und Durchbruchkur-

ven (Kapitel 4.6) vorgenommen. Diese belegen eindeutig die guten Trennungsergebnisse aus den Versuchen zur Adsorption und zeigen eine sehr gute Eignung der Adsorbentien zur selektiven Adsorption von Diolen, mit einer Kapazität für γ -Aluminiumoxid von 50-60 mg pro Gramm Adsorber. Die Ergebnisse sind dabei nicht übertragbar, sondern müssen für jede Stoffkombination experimentell ermittelt werden. So hat sich bei der Untersuchung des Einflusses der Cofaktorregenerierung (Kapitel 4.5.3) eindeutig gezeigt, dass je höher die Konzentration des Co-Substrates Isopropanol ist (untersucht wurden 0-30 % v v⁻¹), desto niedriger ist die adsorbierte Diolmenge. In diesem Fall kann es sich um eine Konkurrenz der Hydroxyfunktionen um Bindungsstellen auf dem Adsorber handeln. Das Ergebnis unterstreicht noch einmal die Notwendigkeit, Vor- und Nachteile abzuwägen und alle Prozesskombinationen zu klären. Gerade ein *in-situ* Einsatz eines Feststoffes bei gleichzeitiger Verwendung freier oder immobilisierter Enzyme wirft die Frage auf, wie das Zielmolekül zurückgewonnen werden soll und ob das Enzym auf dem Feststoff adsorbiert. Bei Verwendung von immobilisiertem Enzym muss die Trennung des Adsorbers und des Immobilisates problemlos möglich sein. Aufgrund von Versuchen zur *in-situ* Adsorption, in welchen sich die grundsätzliche Durchführbarkeit gezeigt hat (Kapitel 4.5.4), wurde beschlossen in der Prozessentwicklung den Weg der räumlichen Trennung von Reaktion und Adsorption zu gehen. Das Immobilisat wird in einem separaten Reaktor eingesetzt, die Adsorption findet in externen Adsorbereinheiten statt. Dieses System bietet die höchste Flexibilität und ist problemlos erweiterbar.

Bei der Produktion der Feinchemikalie (2*S*,5*S*)-Hexandiol durch asymmetrische Reduktion von 2,5-Hexandion handelt es sich um eine Modellreaktion. Theoretisch kann ein beliebiges Substrat umgesetzt werden. Für die selektive Adsorption muss allerdings die Eignung der Adsorber, deren Kapazität und die Zeit des Durchbruchs bei Einsatz im Festbett charakterisiert werden. Enantiomerenreines (2*S*,5*S*)-Hexandiol findet vielfältige Anwendung, so stellt es z. B. die Ausgangssubstanz zur Synthese des DuPhos™ Übergangsmetallliganden (1,2-Bis(phosphonalo))ethan oder von BPE (1,2-Bis(phosphonalo)benzol) dar [Burk 1991, Burk *et al.* 1995]. Verwendung in der pharmazeutischen Industrie findet es als Building-Block im Arzneimittel Cucubalol gegen Tuberkulose [Cheng *et al.* 2002] oder PNU-142721, einem Wirkstoff gegen HIV [Wishka *et al.* 1998]. Die biokatalytische Produktion von enantiomerenreinem 2,5-Hexandiol ist in der Literatur bereits beschrieben. Die Produktionsbeschreibung von (2*R*,5*R*)-Hexandiol (ee > 99 %) im kontinuierlichen 2 Liter Membranreaktor mit Glucose als Cosubstrat und Ganzzellkatalyse (21 g L⁻¹ Zellmasse trocken) mit *Lactobacillus kefir* findet sich bei Haberland [Haberland *et al.* 2002 a und b]. Es wurde eine

Raum-Zeit-Ausbeute von $64 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ für eine Prozessperiode von 5 Tagen erreicht. Ein Nachteil dieses Prozesses stellt die Verwendung von Glucose als Cosubstrat zur substratgekoppelten Cofaktorregenerierung dar, da die Umsetzung von 1 Mol Glucose zu 1 Mol Milchsäure führt und somit zu einer starken Veränderung des pH-Wertes. Da es sich um eine Ganzzellkatalyse mit ruhenden Zellen handelt, entstehen Nebenprodukte und die produzierten Flüssigkeitsmengen, aus denen das Produkt durch Extraktion mit Lösungsmittel aufgereinigt werden muss, sind relativ groß, so dass große Abfallmengen an Lösungsmittel entstehen.

Die Adsorption auf Amberlite XAD-Harzen wurde untersucht. Dabei wiesen diese nur eine geringe Kapazität von $10 \text{ } \mu\text{mol g XAD}^{-1}$ auf. Ein weiterer Prozess zur Produktion von (2*R*,5*R*)-Hexandiol nutzt 2 Membranen zur Auftrennung [Schroer, Lütz 2009]. Mithilfe einer Membran findet eine *in-situ* Acetonabtrennung statt, mit einer zweiten Membran wird das Produkt aus dem Substratstrom abgetrennt. Unter Nutzung rekombinanter *E. coli* Zellen, in denen eine Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* exprimiert wurde, konnte eine Raum-Zeit-Ausbeute von $170 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erzielt werden ($17,9 \text{ g Produkt g Feuchtzellmasse}^{-1}$). Für die Aufkonzentrierung des Produkts wurde Essigsäureethylester verwendet, welches mithilfe eines Rotationsverdampfers entfernt wurde. Aussagen zur Selektivität der Membran werden allerdings keine getroffen. Durch Versuche, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, ist das Problem der schlechten Selektivität für die kleinen Moleküle bekannt. So wurde mit unterschiedlichen Membranen gearbeitet und der Übertritt von Produkt aber auch von Substrat beobachtet. Die Membranen besitzen keine oder nur eine geringe Selektivität zwischen Keton und Alkohol, was wiederum die Verwendung selektiv adsorbierender Feststoffe notwendig macht. Zu diesem Sachverhalt findet sich in der genannten Literatur allerdings keine Stellungnahme.

Für die Produktion von (2*S*,5*S*)-Hexandiol wurde ein Festbettreaktor gewählt, der eine hohe Enzymaktivität bei kleinem Reaktionsvolumen gewährleistet. Das Enzym wurde für den Einsatz im Reaktor kovalent auf LbL-modifiziertem Sipernat immobilisiert. Als Reaktionsmedium wurde *tert*-Butylmethylether verwendet. Im Experiment gelang der Nachweis, dass ein Vorspülen des Immobilisates mit Puffer-Cofaktoralösung (1 mM NAD^+) die Enzymaktivität für mehr als 60 Stunden (Kapitel 5.3.3) gewährleistet. Mithilfe der über einen Computer gesteuerten Magnetventile und einem Substratstrom von $0,1 \text{ mL min}^{-1}$ und Elutionsstrom von $0,05 \text{ mL min}^{-1}$ gelang die kontinuierliche Produktion mit nachgeschalteter Adsorption bei simultaner Elution der zweiten Adsorbersäule. Als Adsorber wurden kostengünstige Aluminiumoxid-Granulate über viele Zyklen eingesetzt. Beim kontinu-

ierlichen Betrieb wurden ein Umsatz von 86-89 % und eine Raum-Zeit-Ausbeute von $44,3 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ bei 60 mM Substratkonzentration erreicht. Da es sich bei der Reduktion von 2,5-Hexandion zu 2,5-Hexandiol um eine Reaktion mit dem Zwischenprodukt 5-Hydroxyhexan-2-on handelt, muss die Verweilzeit recht hoch gewählt werden, um eine möglichst hohe Endproduktkonzentration zu erreichen (siehe Kapitel 5.3.2). Bei dem Umschalten zwischen mehreren Adsorbersäulen, befinden sich ungebundene Reste von Substrat und Intermediat im Zwischenvolumen. Bei dem Umschalten der Säulen wurde allerdings das Hohlraumvolumen nicht entleert, so dass es durch Sammeln des Gesamtelutionsvolumens zu einer leichten Verunreinigung mit Zwischenprodukt und Substrat kommt. Ein besseres Ergebnis wurde für das Substrat Acetophenon im Festbettreaktor erzielt. Bei einer Substratkonzentration von 40 mM konnte eine Raum-Zeit-Ausbeute von $613,2 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ für das Produkt S-Phenylethanol erzielt werden.

Insgesamt hat die automatisierte, kontinuierliche Produktion mit nachgeschalteter Adsorption überzeugend funktioniert, aus der Literatur ist kein vergleichbares Verfahren bekannt. An dem Reaktorsetup mit nachgeschalteter Adsorption wurden keine Optimierungen vorgenommen, es kann allerdings davon ausgegangen werden, dass eine weitere Umsatzsteigerung möglich ist. Um die Anlage wirtschaftlich betreiben zu können, muss der *tert*-Butylmethylether recycelt werden, Substrat nachdosiert und das akkumulierende Aceton aus dem *tert*-Butylmethylether entfernt oder zumindest verdünnt werden.

In dieser Arbeit konnte erfolgreich ein neues Verfahren zur kontinuierlichen Produktion des Alkohols (2S,5S)-Hexandiol mit nachgeschalteter Adsorption auf γ -Aluminiumoxid aus *tert*-Butylmethylether etabliert werden.

7. Zusammenfassung

Es wurde ein neuartiges Verfahren zur enzymatischen Diolproduktion in dem organischen Lösungsmittel *tert*-Butylmethylether mit integrierter, kontinuierlicher und kostengünstiger Produktabtrennung realisiert. Durch Einsatz von Ventilen wurde die Anlage zusätzlich automatisiert.

Die Untersuchung der einzelnen Prozesskomponenten wurde in Einzelversuchen charakterisiert und bewertet, im Prozess wurden anschließend die vielversprechendsten Komponenten eingesetzt. Der Prozess kann unterteilt werden in:

- eine kontinuierliche Produktionseinheit mit immobilisiertem Biokatalysator in Form eines Festbettes
- eine Adsorbereinheit zur selektiven Produktabtrennung mit vorgeschalteter Adsorbereinheit zur Entfernung von Wasser

Die automatisierte Steuerung mithilfe eines Computers erfolgte über Magnetventile und ein Skript mit Zeitschleifenfunktion. Die Elution wurde durch Spülen mit Isopropanol realisiert, welches im Prozess bereits als Cosubstrat zur substratgekoppelten Cofaktorregenerierung eingesetzt wird.

Bei dem zur Produktion eingesetzten Biokatalysator handelt es sich um die Alkohol-Dehydrogenase-*'A'*, welche ursprünglich aus dem Bakterium *Rhododoccus ruber* DSM 44541 stammt, durch Überexpression rekombinant in *E. coli* verfügbar ist und eine hohe Stabilität in unterschiedlichen Medien aufweist.

Für die Immobilisierung wurden unterschiedliche Polymerbeschichtungen untersucht, welche auf porösen Materialien wie Glas oder Fällungskieselsäuren (Sipernaten) nach dem Layer-by-Layer Verfahren aufgebracht waren. Untersucht wurde neben der kovalenten Anbindung durch Linkermoleküle auch die adsorptive Anbindung. Für den Prozess erwies sich die kovalente Anbindung aufgrund der höheren Stabilität als geeignet, es wurden Aktivitäten von bis zu 242 U g^{-1} erzielt. Die Immobilisierung der ADH-*'A'* zeigte keinen Einfluss auf den Enantiomerenüberschuss von $> 99,9 \%$.

Die Adsorption von polaren Komponenten auf Aluminiumoxiden ist in der Literatur beschrieben [Hart *et al.* 1990], wird allerdings hauptsächlich zur Abtrennung von Wasser aus organischen Lösungsmitteln genutzt. Aus Voruntersuchungen war die selektive Anbindung polarer Komponenten auf Aluminiumoxiden aus Essigsäureethylester bekannt. Ausgehend von diesen Versuchen konnte eine Abhängigkeit der Adsorption von der Polarität des Lösungsmittels nachgewiesen werden. Neben Adsorptionsisothermen zur kinetischen Charakterisierung wurden Durchbruchkurven zur thermodynamischen Charakterisierung der Adsorber gemessen. Bei Wiederverwen-

dung des Adsorbers zeigte sich keine Verschlechterung der Trennleistung. Der Nachweis eines schnellen Detektionssystems zur Differenzierung der Adsorption polarer Komponenten aus unterschiedlichen Lösungsmitteln mittels Dünnschichtchromatographie-Platten aus Aluminiumoxid wurde durchgeführt. Neben dem Modell-Keton-Alkoholpaar 2,5-Hexandion und *rac/meso*-2,5-Hexandiol wurden einige weitere Keton-Alkoholpaare untersucht.

Im Prozess wurden die einzelnen Komponenten verschaltet und mithilfe der immobilisierten ADH-A` kontinuierlich (2S,5S)-Hexandiol in einem Festbettreaktor produziert. Der von dem Enzym benötigte Cofaktor Nicotinamid-Adenindinukleotid in Wasser, wurde durch Vorspülen des Immobilisates mit Puffer-Cofaktorklösung eingebracht. Mithilfe dieser Methode wurde eine Zykluszahl (TTN) von 6515 erzielt und ein stabiler Betrieb des Reaktors > 100 Verweilzeiten (> 65 Stunden), mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 44,3 g L⁻¹d⁻¹ ermöglicht. Dem Reaktor wurde eine Adsorbereinheit aus Molekularsieb nachgeschaltet, um den Adsorber wasserfrei zu halten. Dahinter wurde die Adsorbereinheit zur Produktabtrennung in Form von zwei Festbettreaktoren zur selektiven Produktadsorption mithilfe von synthetischen anorganischen Aluminiumoxiden geschaltet. Die Aluminiumoxide wiesen im Einzelexperiment in MTBE eine hohe Selektivität zugunsten des produzierten Alkohols auf (0,93), so dass sie einen idealen Adsorber zur selektiven Abtrennung von Alkoholen aus Reaktionsgemischen darstellen.

Der Prozess zur Synthese chiraler Alkohole mit selektiver Abtrennung konnte mit hohen Umsätzen und Raum-Zeit-Ausbeuten etabliert werden. Grundsätzlich kann die Anlage mit einem beliebigen Keton-Alkoholpaar betrieben werden, durch Vorarbeiten müssen allerdings geeignete Adsorber identifiziert werden. Das in dieser Arbeit vorgestellte Reaktorkonzept eignet sich zur stabilen Produktion von Spezialchemikalien in organischen Lösungsmitteln und ist über Zuschalten weiterer Säulen oder Upscaling des Reaktors auf einfache Weise erweiterbar.

8. Ausblick

Die vorgestellten Arbeiten stellen grundlegende Charakterisierungen dar und bieten die Möglichkeit zur weiteren Forschung, zur Erweiterung und der Optimierung. Dies wurde an entsprechender Stelle im Text der Arbeit bereits beschrieben, darum soll hier noch einmal ein umfassender Ausblick gegeben werden.

Die Verwendung organischer Lösungsmittel als Reaktionsmedium bietet die Möglichkeit hohe Substratkonzentrationen der häufig schlecht löslichen Ketone zu lösen. Wwelche maximalen Konzentrationen sich einstellen lassen, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein, Konzentrationen > 2 M sollten sich dabei realisieren lassen. Dabei muss allerdings über die Regeneration bzw. Rezyklierung des Reaktionsmediums nachgedacht werden. Bei Verwendung eines Systems zur Substratgekoppelten Cofaktorre-generierung akkumuliert sich z.B. das Aceton, welches entweder über den Tausch eines Teils des Reaktionsmediums verdünnt werden müsste, oder aber z.B. über eine Selektive Membran oder selektive Adsorber abgetrennt werden könnte, hier ergibt sich ein weiterer Forschungsbedarf. Ein weitere wichtiger Punkt bei Verwendung organischen Lösungsmittels als Reaktionsmedium ist der kontinuierliche Austrag von Wasser. Durch Verwendung von puffergesättigtem MTBE wurde dieser zwar niedrig gehalten und ein Betrieb > 100 Verweilzeiten realisiert, es muss allerdings kritisch hinterfragt werden, ob ein Wasseraustrag und darüber eventuell auch ein Austrag von Cofaktor stattfindet. Dieser Sachverhalt sollte Gegenstand weiterer Forschung sein. Eine weitere Frage ist die Stabilität des Cofaktors unter den Betriebsbedingungen, selbst wenn kein Austrag über das Wasser stattfindet. Die Bindung des Cofaktors auf LbL-beschichteten Partikeln sollte auch eingehend untersucht werden.

Die Verwendung eines Festbettreaktors mit immobilisiertem Enzym zur kontinuierlichen Produktion bietet keine Möglichkeit auf das Endprodukt zu selektieren. Wie in der Arbeit bereits dargelegt kann das akkumulierende Aceton nicht über Anlegen eines Vakuums oder mithilfe eines Stripping Verfahrens kontinuierlich entfernt werden, wodurch die Folgereaktion (Reaktion vom Intermediat 5-Hydroxyhexan-2-on zum Endprodukt (2S,5S-Hexan-2-ol)) nicht beschleunigt werden kann. Ein CSTR bietet mehrere dieser Möglichkeiten, so dass sich Umsätze > 90 % realisieren lassen und dass unter Umständen sogar eine weitere aufwendige Isolierung des Endproduktes mithilfe selektiver Adsorption ganz entfällt.

Als alternatives Verfahren zur Auftrennung der Keton-Alkoholgemische kommt die Technik des SMBs (Simulated Moving Bed) in Frage. Mithilfe

dieses Verfahrens lässt sich die Auftrennung von Stoffen die sich ansonsten nur schlecht trennen lassen, kontinuierlich betreiben. Der Nachteil dieser Technik besteht allerdings in den hohen Investitionskosten für die Anlage und den Betrieb. Eine weitere Einschränkung ergibt sich dadurch, dass zwei unterschiedliche Fraktionen aufgetrennt werden, sich allerdings keine Einzelfraktionen aus komplexen Mischungen isolieren lassen. Inwiefern dieses System eine Alternative darstellt sollte näher untersucht werden. Unter Umständen ist das in dieser Arbeit dargelegte Verfahren kostengünstiger, mithilfe des SMB-Verfahrens sind allerdings größere Produktionsmengen möglich, so dass die Nachfrage des Marktes nach dem Produktalkohol eventuell einen weiteren Faktor zur Bewertung darstellen kann.

9. Material und Methoden

9.1. Biokatalysatoren, Chemikalien und Partikel

Acetophenon > 98 % GC	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Alkohol-Dehydrogenase- γ (ADH- γ) aus <i>Rhodococcus ruber</i> , DSM 44541 überexprimiert in <i>E. coli</i> Tuner (DE3), pET22b+, lyophilisierte Zellen	Prof. W. Kroutil, Institut für Organische und Bioorganische Chemie, Graz, Österreich
Alkohol-Dehydrogenase 1.1.200	Vom Projektpartner <i>evocatal GmbH</i> , technisches Enzym
ALOX N Dünnschichtplatten	Macherey-Nagel
Trisoperl-Träger	<i>VitraBio GmbH</i> , Steinach, Deutschland
(<i>rac</i>)-2,5-Hexandiol	<i>Sigma Aldrich Inc.</i> , Steinheim, Deutschland
Molekularsieb UOP Typ 3A	<i>Sigma-Aldrich Inc.</i> , Steinheim, Deutschland
oberflächenmodifizierte Trisoperl- und Trisopor-Träger	<i>Surflay Nanotec</i> , Berlin, Deutschland
Trisopor	<i>VitraBio GmbH</i> , Steinach, Deutschland
γ -Aluminiumoxid (Puralox® KR-160) (Al ₂ O ₃ 95,1 %) D ₅₀ = 35 μ m	Muster von <i>Sasol</i> , Hamburg, Deutschland freundlicherweise zur Verfügung gestellt (bezogen von <i>Süd-Chemie AG</i> , München, Deutschland)
Alumosilikat (Siral® 40) (Al ₂ O ₃ 75 %, Verhältnis 60 % : SiO ₂ 40 %) D ₅₀ = 50 μ m	Muster von <i>Sasol</i> , Hamburg, Germany freundlicherweise zur Verfügung gestellt (bezogen von <i>Süd-Chemie AG</i> , München, Deutschland)
Pural® SB (Al ₂ O ₃ 75 %) D ₅₀ = 45 μ m	Muster von <i>Sasol</i> , Hamburg, Germany freundlicherweise zur Verfügung gestellt (bezogen von <i>Süd-Chemie AG</i> , München, Deutschland)
1997 (Al ₂ O ₃ 94,8 %) D ₅₀ = 432 μ m	Aluminiumoxid-Extrudat, <i>Süd-Chemie AG</i> , München, Deutschland)
2010 (Al ₂ O ₃ 60 % : SiO ₂ 40 %)	Aluminiumoxid-Granulat (experimentell) <i>Süd-Chemie AG</i> , München, Deutschland)
2014 (Al ₂ O ₃ 81 %)	Aluminiumoxid-Granulat, <i>Süd-Chemie AG</i> , München, Deutschland
2070 (Al ₂ O ₃ 97,3 %)	γ -Aluminiumoxid-Granulat, <i>Süd-Chemie AG</i> , München, Deutschland
2073 (Al ₂ O ₃ 60 % : SiO ₂ 40 %)	Alumosilikat-Granulat, <i>Süd-Chemie AG</i> , München, Deutschland
Aluminiumoxid basisch	<i>Macherey-Nagel</i> , Düren, Deutschland
Aluminiumoxid neutral	<i>Macherey-Nagel</i> , Düren, Deutschland
Amberlite® IR-120 (H ⁺ /Na ⁺ -Form)	<i>Lanxess</i> , Leverkusen, Deutschland
Polyamid®	<i>DOW</i> , Schwalbach, Germany
Fällungskieselsäuren Sipernate®	Firma <i>Evonik</i> , (bezogen von <i>Südchemie AG</i> , München, Germany)

Standardchemikalien, Lösungsmittel und Salze wurden von *Fluka Chemie AG* (Buchs, Schweiz), *Merck KGaA* (Darmstadt, Deutschland) oder *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Deutschland) bezogen.

9.2. Geräte

Autosampler Marathon	<i>Hoechst AG</i> , Burladingen, Deutschland
Consta Metric 3000 (Substratpumpe)	<i>Milton Roy</i> , Ivyland, USA
Fish-Clip®	Bürkle, Bad Bellingen, Deutschland
Gaschromatograph Agilent 6890 Series	<i>Agilent Technologies GmbH</i> , Waldbronn, Deutschland
Gaschromatographie-Säule: Varian CP Chirasil-Dex CB, 25 m x 0,32 mm	<i>CS-Chromatographie Service GmbH</i> , Langerwehe, Deutschland
Gelelektrophoresekammer HorizonR 58	<i>Life Technologies, Inc.</i> , Gaithersburg, MD, USA
Magnetrührer RCT basic	<i>IKA GmbH</i> , Staufen, Deutschland
Magnetventil 10er	<i>Valco Instruments & co</i> , USA
pH-Meter 766 Calimatic	<i>Knick Elektronische Messgeräte</i> , Berlin, Deutschland
Mikropipetten Eppendorf Research	<i>Eppendorf AG</i> , Hamburg, Deutschland
Pharmacia LKB-HPLC Pumpe 2248	<i>Pharmacia/LKB</i> , Uppsala, Schweden
Präzisionswaage CP224S	<i>Sartorius AG</i> , Göttingen, Deutschland
Pumpe L-6000 A	<i>Merck-Hitachi</i>
Rotationsverdampfer Büchi Rotavapor	<i>Büchi Labortechnik GmbH</i> , Flawil, Schweiz
Spektralphotometer UVIKON 930	<i>Kontron Instruments AG</i> , Schlieren, Schweiz
Spektralphotometer UVIKONXL	<i>BioTek Instruments, Inc.</i> , Winooski, VT, USA
Superperformance 10 Max. Volumen 14.5 mL Superperformance Max Volumen 1.45 mL	<i>Merck KGaA</i> , Darmstadt, Deutschland
Thermomixer TSI	<i>Biometra GmbH</i> , Göttingen, Deutschland
Ultraschall-Desintegrator Sonifier II W-250/W-450 „Classic“	<i>Branson Ultrasonics & Co</i> , Danbury, CT, USA
Vortexer Minishaker MS2	<i>IKA</i> , Wilmington, NC, USA
Wasserbad E 100	<i>Louda GmbH</i> , Lauda-Königshofen, Deutschland
Wasserbad RM 6	<i>Louda GmbH</i> , Lauda-Königshofen, Deutschland
Wasserbadschüttler Gyrotory	<i>New Brunswick Scientific Co., Inc.</i> , Edison, NJ, USA
Wärmeschrank	<i>Memmert</i> , Schwabach, Deutschland
Zentrifuge Avanti J-25	<i>Beckmann-Coulter</i> , Fullerton, CA, USA
Zentrifuge 5415 D	<i>Eppendorf AG</i> , Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0 R	<i>Thermo Scientific</i> , Waltham, MA, USA

9.3. Synthese von 5-Hydroxyhexan-2-on

Das Intermediat 5-Hydroxyhexan-2-on ist kommerziell nicht erhältlich und wurde als Referenzverbindung für die Kalibration der Gaschromatographie durch Reduktion über Natriumborhydrid aus 2,5-Hexandion nach einer Standardvorschrift synthetisiert [siehe auch Goldberg 2010]. Das Produkt wurde über Kieselgel gereinigt und in Form eines gelben Öls erhalten.

9.4. Zellaufschluss und Isolierung der ADH-´A`

9.4.1. Zellaufschluss und Hitzefällung

Die lyophilisierten Zellen von *E. coli* Tuner (DE3), pET22b+, wurden freundlicherweise von Prof. W. Kroutil (Institut für Chemie, Graz, Österreich) zur Verfügung gestellt. Für den Zellaufschluss wurden die Zellen in Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7) für 30 Minuten bei 30 °C und 150 rpm suspendiert (pro 100 mL Puffer 1 g Lyophilisat), auf 50 mL Falcon-Röhrchen aufgeteilt und auf Eis gekühlt. Die Zellsuspension wurde mithilfe von Ultraschall (4 X 3 min, Duty cycle 70 % Output 5, 12 oder 18 mm Spitze) aufgeschlossen. Durch anschließende Zentrifugation bei 10 000 rpm und 4 °C für 35 Minuten wurden grobe Zellbestandteile abgetrennt und der Überstand daraufhin bei 130 rpm und 65 °C für 25 Minuten einer Hitzefällung unterzogen. Denaturierte Bestandteile wurden in einem anschließenden Zentrifugationsschritt bei 10 000 rpm, 4 °C für 45 Minuten abgetrennt. Der Überstand wurde in dieser Form als partiell gereinigte Enzymlösung in Aliquots eingefroren und bei -20 °C gelagert. Von der Enzymlösung wurden nach dem Zellaufschluss zur genauen Charakterisierung jeweils Bradford-Proteinbestimmung [Bradford 1976] (Kapitel 9.4.2), Aktivitätstest (Kapitel 9.4.4) und Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Kapitel 9.4.3) durchgeführt.

9.4.2. Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford

Die Proteinbestimmung wurde nach der Standardmethode von Bradford [Bradford 1976] im 1 mL Maßstab durchgeführt. Als Färbelösung wurde Bio-Rad Proteinassay-Lösung eingesetzt. Der sich bildende Farbstoff-Protein-Komplex wurde im Spektralphotometer bei 595 nm Wellenlänge und 25 °C gemessen.

Für einen 1 mL Assay wurden 50 µL verdünnter Probe mit 950 µL vorbereiteter Färbelösung versetzt, 3 Minuten inkubiert und im Spektralphotometer gemessen. Die Färbelösung (Bio-Rad Proteinassay-Lösung) mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250 wurde mit Wasser im Verhältnis 1:5 angesetzt und mithilfe einer BSA-Verdünnungsreihe kalibriert. Der

Farbstoff bildete einen Komplex mit den Aminosäuren, so dass sich das Absorptionsmaximum von 470 nach 595 nm verschob.

9.4.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Bestimmung des Reinheitsgrades bzw. der Menge an Fremdprotein, wurde die partiell gereinigte Enzymlösung auf 12,5 %igen SDS-Gelen aufgetrennt. Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde nach dem Standardverfahren von Laemmli durchgeführt [Laemmli 1970]. Precision Plus Protein Dual Color Standard Marker der Firma Bio-Rad wurde als Referenz zur Bestimmung des Proteingewichtes genutzt.

9.4.4. Standardaktivitätsassay

Die Aktivitätsassays für partiell gereinigte Enzymlösung, Überstände und Waschfraktionen wurden in 1 mL Volumen auf einem Thermomixer bei 30 °C und 10 000 rpm durchgeführt. Die Probe wurde mit Kaliumphosphatpuffer 0,1 M, pH 7 (ADH-´A`) oder TEA-Puffer 20 mM (1,15 mM MgCl₂), pH 7 (ADH 1.1.200 in Form von Lyophilisat) und NADH (1 mM) versetzt und auf 30 °C temperiert. Durch Zugabe der Substratlösung (z. B. Acetophenon 60 mM und 10 % V V⁻¹ Isopropanol) wurde die Reaktion gestartet. Nach definierten Zeitintervallen wurden 70 µL Probe entnommen und zu 70 µL vorgelegtem Essigsäureethylester gegeben, für 20 Sekunden durchmischt und anschließend bei 13200 rpm mit einer Tischzentrifuge 1 Minute zentrifugiert. Die organische Phase wurde abgenommen und gaschromatographisch untersucht. Bei Verwendung nicht wässriger Systeme wurde die Probe im gleichen Probenvolumen Lösungsmittel gelöst und durchmischt und zügig durch Zentrifugation abgetrennt. Der Probenüberstand wurde für die GC-Messung überführt.

9.4.5. Batch-Assay

Ansätze mit größeren Volumina (z. B. 10 mL) wurden in 100 – 150 mL Erlenmeyerkolben im Wasserbad (30 °C) oder in einem Enzymkolben mit Heizmantel durchgeführt. Bei Zweiphasensystemen oder im Fall immobilisierter Enzyme wurde mithilfe eines hängenden Magnetrührers (Fish-Clip®) durchmischt, um Scherkräfte zu minimieren. Im Fall schlecht löslicher Ketone hat es sich als vorteilhaft erwiesen, diese in Isopropanol vorzulösen, anschließend alle weiteren Komponenten zuzugeben und die Reaktion mit Zugabe der Enzymlösung zu starten. Alternativ kann wie beim Standardaktivitätsassay die Reaktion durch Zugabe einer Substrat-Cofaktorklösung gestartet werden. Bei Versuchen im Repetitive-Batch wurde nach Abschluss des ersten Batches die Produktlösung abgetrennt und

mit gleichem Volumen Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7,0) gewaschen, anschließend wurde der nächste Batch durchgeführt.

9.4.6. Reaktionstechnische Charakterisierung

Der Umsatz χ berechnet sich nach dem Substratumsatz zum Zeitpunkt X [S] und dem Substratum zum Zeitpunkt 0 [S]₀ nach der folgenden Formel:

$$\chi = \frac{[S]_0 - [S]}{[S]_0} \cdot 100 [\%] \quad \text{Formel 9-1}$$

Die Ausbeute errechnet sich nach folgender Formel:

$$\eta_A = \frac{[P]}{[S]_0} \cdot 100 [\%] \quad \text{Formel 9-2}$$

Die Raum-Zeit-Ausbeute RZA ist eine wichtige ökonomische Kenngröße. Sie wird auch als Reaktorproduktivität bezeichnet und berechnet sich aus der Masse des synthetisierten Produktes pro Tag und pro Reaktorvolumen.

$$\text{RZA} = \frac{m_P}{V_R \cdot t_R} \quad \text{Formel 3-4}$$

Die Selektivität S errechnet sich nach:

$$S = \frac{[P]}{[S]_0 - [S]_{\text{end}}} \quad \text{Formel 9-3}$$

9.5. Immobilisierung von Alkohol-Dehydrogenasen

9.5.1. Adsorptive Immobilisierung

Zu einer Einwaage von 200 mg Trägern wurde Enzym gelöst in Puffer gegeben, das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 5 mL. Der Ansatz wurde bei 4 °C und 100 rpm auf dem Rotationsschüttler inkubiert, der Überstand abgenommen und die Immobilisate dreimal mit demselben Volumen an KP_i-Puffer gewaschen (3 X 4 bzw. 5 mL). Sowohl Überstand als auch die Waschlösung wurden hinsichtlich Proteinmenge und Enzymaktivität analysiert.

Zur adsorptiven Enzymanbindung auf oberflächenfunktionalisierten Partikeln wurde eine Verdünnung partiell gereinigter Enzymlösung oder Lyophilisat in Puffer gelöst (TEA 20 mM, pH 7) und zu einer definierten Trägermenge gegeben (etwa 100 mg mL⁻¹). Der Ansatz wurde für 180 Minuten im Kühlraum bei 4 °C und 150 rpm inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und mehrmals mit Puffer gewaschen (je Waschschrift 4-5 mL Puffer). Die Überstände und Waschfraktionen wurden auf Proteingehalt und Aktivität untersucht.

9.5.2. Kovalente Immobilisierung

Feuchte oder getrocknete Partikel wurden mit 2,5 % $V V^{-1}$ Glutardialdehydlösung in Wasser (25 mL g^{-1}) suspendiert und für 60 Minuten bei 150 rpm im Schüttler und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ aktiviert. Nach der Aktivierung weisen die Partikel eine rötliche bis braune Färbung auf. Der Überstand wurde verworfen. Die Partikel wurden mit drei Volumenäquivalent RO-Wasser (doppelt destilliert) analog zur Behandlung mit Glutardialdehydlösung gewaschen, um das ungebundene Glutardialdehyd zu entfernen.

Nach der Aktivierung erfolgt die Anbindung der Enzyme. Dazu wurde Enzymlösung zu den Partikeln gegeben und mindestens 3 Stunden bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ und 150 rpm inkubiert. Anschließend wurde der Überstand mit einer Pipette abgenommen und das Immobilisat mit Puffer gewaschen, um unvollständig gebundenes Enzym zu entfernen. Die Waschfraktion und der Überstand wurden auf Aktivität und Proteingehalt hin untersucht.

9.5.3. Charakterisierung immobilisierter ADH

9.5.3.1. Immobilisierungsausbeute

Die Immobilisierungsausbeute η_I errechnet sich nach Subtraktion der Produkte aus Aktivität A und Volumen von Waschfraktion und Überstand, normiert auf das Anfangsvolumen und die Aktivität des freien Enzyms und setzt diese ins Verhältnis:

$$\eta_I = \frac{(A_0 \cdot V_0) - (A_1 \cdot V_1) - (A_2 \cdot V_2)}{A_0 \cdot V_0} \cdot 100 \% \quad \text{Formel 9-4}$$

9.5.3.2. Theoretische Aktivität der Immobilisate

Die theoretische Aktivität A_i gibt die maximal mögliche Enzymaktivität pro Gramm Träger an, davon ausgehend, dass die immobilisierten Enzyme die gleiche Aktivität wie das freie Enzym aufweisen, bezogen auf die Immobilisierungsausbeute:

$$A_{i_{\text{theoretisch}}} = \frac{\eta_I \cdot A_0 \cdot V_0}{m} \cdot 100 \% \quad \text{Formel 9-5}$$

9.5.3.3. Aktivitätsausbeute

Die Aktivitätsausbeute η_A setzt die experimentell bestimmte Aktivität und die theoretisch berechnete Aktivität ins Verhältnis und gibt Auskunft über einen eventuellen Verlust an Aktivität.

$$\eta_A = \frac{A_0 - A_1 - A_2}{A_{i_{theoretisch}}} \cdot 100 \% \quad \text{Formel 9-6}$$

9.5.3.4. Charakterisierung des Festbettreaktors

Als Festbettreaktoren wurden Glassäulen der Firma Merck eingesetzt (Superperformance 150-10). Die Festbetthöhe betrug 15,5 cm, der Durchmesser 1 cm (Gesamtvolumen 12,17 mL). Zu Beginn wurde eine physikalische Charakterisierung durchgeführt (siehe 0).

9.5.3.5. Verweilzeitverteilung des Festbettreaktors

Eine Bestimmung der Verweilzeitverteilung wurde durchgeführt, um die Abweichung von einem idealen Strömungsrohr beurteilen zu können. Zunächst wurde der mit Immobilisat gefüllte Reaktor mit einer puffergesättigten (KP_i-Puffer 0,1 M, pH 7) *tert*-Buthylmethylether-Lösung bis zur Blasenfreiheit mit einer Flussrate von 0,3 mL min⁻¹ gespült. Über ein vorgeschaltetes Injektionsventil mit einer 20 µL Injektionsschleife wurde ein Puls 1-Oktanol auf das System gegeben. Am Säulenausgang wurde mithilfe des Fraktionssammlers automatisch im 30-Sekunden Takt das Probengefäß gewechselt. Mithilfe der Formel 9-7 gibt E(t) die Wahrscheinlichkeit für ein Volumenelement an, welches zum Zeitpunkt t = 0 in den Reaktor eintritt, ihn nach einer bestimmten Zeit t wieder zu verlassen [Baerns et al. 1999]. Totvolumina in den Kapillaren wurden berücksichtigt, indem die Messung ohne Säule wiederholt wurde.

Die Verweilzeitverteilung E(t) ergibt sich aus:

$$E(t) = \frac{\dot{n}}{n_0} = \frac{\dot{V} \cdot c(t)}{\int_0^\infty \dot{V} \cdot c(t) dt} \quad \text{Formel 9-7}$$

Durch konstanten Volumenstrom vereinfacht sich die Gleichung:

$$E(t) = \frac{c_i}{\sum_{i=1}^{\infty} c_i \cdot \Delta t_i} \quad \text{Formel 9-8}$$

Die mittlere Verweilzeit ergibt sich aus:

$$\tau = \frac{\sum t_i \cdot c_i \cdot \Delta t_i}{\sum c_i \cdot \Delta t_i} \quad \text{Formel 9-9}$$

Die Standardabweichung σ der mittleren Verweilzeit ergibt sich aus:

$$\sigma = \sqrt{\int_0^{\infty} t^2 \cdot E(t) dt} = \sqrt{\frac{\sum t_i^2 \cdot c_i \cdot \Delta t_i}{\sum c_i \cdot \Delta t_i}} \quad \text{Formel 9-10}$$

9.6. Adsorptive Produktabtrennung

Sämtliche Adsorber und DC-Platten wurden in dem Zustand eingesetzt, wie sie vom Hersteller zur Verfügung gestellt wurden. Es erfolgte keine Vorbehandlung (z. B. thermischer Art zur Trocknung oder ein Equilibrieren durch Spülen) oder weitere Modifikationen, sofern nicht in der Durchführung angemerkt.

9.6.1. Adsorption in wässrigem Medium

Zu 20 mL einer 50 mM Lösung 2,5-Hexandion und 50 mM *rac/meso*-2,5-Hexandiol in RO-Wasser (pH 7) wurden 3 g Partikel hinzugegeben und der Ansatz bei 150 rpm auf einem Rotationsschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach definierten Zeiten wurden 400 µL Probe entnommen und in der Tischzentrifuge bei 13 200 rpm für 2 Minuten zentrifugiert, um verbliebene Partikelbestandteile abzutrennen. Vom Überstand wurden 300 µL mit 300 µL Essigsäureethylester durch starkes Mixen für 15 Sekunden extrahiert und 1 Minute bei 13 200 rpm zentrifugiert. Die organische Phase wurde abgenommen und gaschromatographisch vermessen.

Durch Kalibration mit Lösungen bekannter Konzentration und mittels Extraktionskoeffizienten, Extraktion von 2,5-Hexandion und 2,5-Hexandiol aus Wasser, wurde in wässrige Konzentration umgerechnet, da bei einmaliger Extraktion nicht die vollständige Menge an Edukt/Produkt aus Wasser extrahiert wurde.

9.6.2. Adsorption in organisch-wässrigem Medium

Durch Lösen von 50 mM 2,5-Hexandion/(*rac/meso*-2,5-Hexandiol in 18 % V V⁻¹ Isopropanol und KP_i-Puffer (0,1 M, pH 7)), wurde eine Stammlösung hergestellt. Von dieser wurden 15 mL zu 3 g Adsorbens gegeben und auf dem Schüttler bei 150 rpm und RT inkubiert. Nach definierten Zeiten wurden 200 µL Probe entnommen und in der Tischzentrifuge zum Abtrennen von Partikeln bei 13 200 rpm für 1 Minute zentrifugiert. 100 µL des Überstandes wurden abgenommen und mit 100 µL Essigsäureethylester extrahiert. Die organische Phase wurde gaschromatographisch vermessen.

9.6.3. Adsorption in organischem Medium

Durch Lösen von 50 mM 2,5-Hexandion und *rac/meso*-2,5-Hexandiol im jeweiligen organischen Lösungsmittel wurde eine Stammlösung hergestellt.

Vom Reaktionsansatz wurden 15 mL zu 0,5 g Partikel gegeben und bei RT auf dem Schüttler bei 150 rpm für 30 Minuten inkubiert. Es wurden 200 µL Probe genommen und für 1 Minute bei 13 200 rpm in der Tischzentrifuge zur Abtrennung von Partikeln zentrifugiert. Vom Überstand wurden 100 µL in ein GC-Vial überführt und vermessen. Je nach Art der Adsorption (stufenweise oder kontinuierlich) wurden zum Reaktionsansatz weitere 0,5 g Partikel gegeben und weitere 30 Minuten inkubiert. Die Prozedur wurde solange vollzogen bis die Gesamtmasse an Partikeln im Ansatz bei 2 g oder mehr liegt (kontinuierliche Adsorption). Bei stufenweiser Adsorption wurden nach jedem 30 Minutenschritt die Partikel durch Zentrifugation abgetrennt und neue, trockene Partikel zum Überstand gegeben.

9.7. Adsorptionsisothermen

Für die Messung der Adsorptionsisothermen wurde eine Stammlösung des Analyten im zu untersuchenden Lösungsmittel in einer Konzentration von 100-150 mM angesetzt und eine Verdünnungsreihe angefertigt. Die Analytkonzentrationen der Verdünnungen wurden gaschromatographisch bestimmt.

In 5 mL Glasfläschchen wurden je 200 mg Adsorber eingewogen und mit den unterschiedlich konzentrierten Ansätzen der Verdünnungsreihe inkubiert. Reines Lösungsmittel dient als Referenz. Die Inkubation erfolgt für 60 Minuten auf einem Rotationsschüttler bei Raumtemperatur. 1 mL des Überstandes wurde für eine Minute bei 13 200 rpm zur Adsorbatabtrennung zentrifugiert. Die Quantifizierung des Analyten erfolgt mit 100 µL des Überstandes.

Aus den erhaltenen Werten für die Beladung q , wurde die Selektivität nach der Formel 9-11 berechnet:

$$S = \frac{[q \text{ Alkohol}]}{[q \text{ Alkohol}] + [q \text{ Keton}]} \quad \text{Formel 9-11}$$

9.8. Dünnschichtchromatographie

Als Detektionssystem zur selektiven Auftrennung von Alkohol-Ketongemischen auf Aluminiumoxid, wurden ALOX N-Dünnschichtplatten ($200 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, Porenweite etwa 60 \AA , Herstellerangaben) eingesetzt. Stammlösungen verschiedener Alkohol-Ketonpaare gelöst in reinem Essigsäureethylester wurden nach Standardprozedur durch Tüpfeln aufgetragen (2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol, 2,3-Pentandion/2,3-Pentandiol, 2,4-Pentandion/2,4-Pentandiol, Himbeerketon/Rhododendrol). Als Laufmittel wurden gängige organische Lösungsmittel getestet (Essigsäureethylester, Toluol, *tert*-Butylmethylether und Heptan). Daneben wurden Mischungen

aus organischen Lösungsmitteln mit dem Cosubstrat Isopropanol untersucht.

Die Spots wurden durch Färbereagenz nach Seebach und anschließendem Erwärmen mit einem Heißluftfön entwickelt.

Die Wanderungstrecke (Retentionsfaktor, R_f) errechnet sich nach folgender Formel:

$$R_f = \frac{S}{L} \quad \text{Formel 9-12}$$

R_f - Retentionsfaktor, S - Substanzfleck, L - Lösungsmittelfront

Zusammensetzung des Färbereagenz nach Seebach:

Tabelle 9-1: Zusammensetzung der Färbereagenz nach Seebach.

Substanz	Menge
Cer(IV)sulfat-Tetrahydrat	2.5 g
Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat	6.25 g
Aqua dest.	225 mL
konz. Schwefelsäure	25 mL

9.9. *In-situ* Produktabtrennung

Mithilfe selektiver Adsorber kann Produktadsorption *in-situ* durchgeführt werden. Der Vorteil besteht in dem vereinfachten Aufbau, da in der Regel nur 1 Reaktor verwendet wird. In diesem finden die Produktion und die Produktisolation statt. Der kontinuierliche Abzug des Produktes würde das thermodynamische Gleichgewicht der Reaktion beeinflussen und den Umsatz beschleunigen. Die *in-situ* Abtrennung wurde sowohl im wässrigen, als auch im organischen System untersucht:

9.9.1. Reduktion im Zweiphasensystem

In einem 2-Phasensystem - wässrige Phase: partiell gereinigte Enzymlösung ADH- α in KP_i -Puffer mit NADH (1 mM), organische Phase: wassergesättigtes Toluol + 10 % $V V^{-1}$ Isopropanol - wurde 2,5-Hexandion als Substrat vorgelegt und enzymatisch zum Produkt (2S,5S)-Hexandiol umgesetzt. Durchmischt wurde nur die Toluolphase mit einem hängenden Magnetprüher (Fish-Clip-System) bei 100 rpm. In definierten Intervallen wurde die Produktkonzentration in der organischen Phase mittels GC bestimmt. Cofaktor (NADH 1 mM) und Substrat wurden nachdosiert, in Abhängigkeit vom Umsatz. Nach Ablauf der Reaktion wurden 3 mL der organische Phase abgenommen, zu 0,5 g vorgelegtem Adsorber gegeben und 30 Minuten auf dem Rotationsschüttler bei 150 rpm und RT inkubiert, um die selektive Adsorption des Reaktionsproduktes zu evaluieren.

9.9.2. Reduktion im organischen System

Für den Versuch wurde kovalentes Immobilisat verwendet, Herstellung siehe Kapitel 9.5.2.

Für die Sättigung von Toluol mit Puffer wurden 30 mL KP_i -Puffer (0,1 M, pH 7) mit 10 mL Toluol für eine Minute stark durchmischt und die Toluolphase für die Verwendung im Versuch abgenommen. Das Reaktionsgesamtvolumen für jeden Ansatz betrug 10 mL. Zunächst wurden die Träger in 1 mM NADH in Puffer gelöst und durchmischt. Im Folgenden wurden 8,8 mL puffergesättigtes Toluol und 1 mL Isopropanol (10 % $V V^{-1}$) zugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2,5-Hexandion gestartet. Zu definierten Zeiten wurden 50 μ L Probe genommen, mit 50 μ L Toluol verdünnt und gaschromatographisch vermessen.

9.9.3. Adsorptionsverhalten gegenüber NADH

Um die Adsorption des Cofaktors NADH bei Zugabe eines Adsorbers bewerten zu können, wurden Versuche zur Adsorption des Cofaktors durchgeführt. Die Adsorption wurde aus wässriger bzw. wässrig-organischer Stammlösung untersucht. Stammlösung wässrig: 20 mL 0,1 M KP_i -Puffer pH 7 und 14,2 mg NADH (1 mM). Stammlösung wässrig-organisch: 16,4 mL 0,1 M KP_i -Puffer pH 7, 3,6 mL Isopropanol (18 % $V V^{-1}$), 14,2 mg NADH (1 mM). Für die Reaktionsdurchführung wurden 4 g Partikel zu 20 mL der jeweiligen Stammlösung gegeben und bei RT auf einem Rotationsschüttler (150 rpm) inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden 200 μ L Probe genommen, 2 Minuten bei 13 200 rpm zentrifugiert und 100 μ L vom Überstand mit wässriger bzw. organisch-wässriger Lösung verdünnt.

Die Proben wurden im Photometer bei 340 nm und 25 °C gemessen, die jeweilige Stammlösung wurde als Referenz gemessen.

9.9.4. Einfluss des Cosubstrats auf die Adsorption

Es wurden Stammlösungen der jeweiligen Alkohol-Ketonpaare im zu untersuchenden organischen Lösungsmittel und unterschiedlicher Isopropanolkonzentration angesetzt (0 %, 2 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 % $V V^{-1}$). Diese liegen im Bereich der zur Cofaktorregenerierung eingesetzten Konzentrationen.

Es wurden 15 mL der Stammlösungen zu 0,5 g Adsorbens gegeben und bei 150 rpm auf einem Rotationsschüttler für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde bei 4000 rpm (4 °C) für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand gaschromatographisch analysiert. Der Überstand wurde erneut zu 0,5 g Adsorber gegeben und für 30 Minuten inkubiert. Insgesamt wurden durch mehrfaches Wiederholen dieses Zykluses 2 g Adsorber eingesetzt.

9.10. Charakterisierung der Adsorber-Festbettpackung

9.10.1. Hohlraumvolumen und Porosität des Festbetts

Der zu untersuchende Adsorber wurde in eine vorbereitete Superperformancesäule (Typ: 150-10) trocken eingefüllt und durch leichte mechanische Erschütterungen verdichtet. Das Volumen V_R der Adsorptionssäulen wurde aus Festbetthöhe und Durchmesser der Säule errechnet. Die Verweilzeit τ wurde experimentell mittels Tracer bestimmt. Dafür wurde die Säule zunächst mit *tert*-Butylmethylether gespült, anschließend mit 2,5-Hexandion in Essigsäureethylester (Tracer-Molekül) umgestellt. Das Totvolumen der Kapillaren wurde bestimmt, indem der Versuch ohne Säule durchgeführt wurde. Die tatsächliche Verweilzeit ist aus der Differenz der beiden Verweilzeiten bestimmbar. Das Hohlraumvolumen ist in diesem Fall definiert als die Summe aus Hohlraumvolumen und Porenvolumen.

Aus der Verweilzeit τ lässt sich das Hohlraumvolumen V_H folgendermaßen bestimmen:

$$V_H = \dot{V} \cdot \tau \quad \text{Formel 9-13}$$

Mithilfe des Hohlraumvolumens V_H kann die Porosität ε der Schüttung in der Säule, definiert als Anteil des Hohlraumvolumens am Reaktorvolumen V_R [Stieß 2009] aus Gleichung (Formel 9-14) bestimmt werden:

$$\varepsilon = \frac{V_H}{V_R} \quad \text{Formel 9-14}$$

Dadurch ist das Hohlraumvolumen V_H für sämtliche Volumina V_R einer Schüttung bestimmbar.

9.10.2. Durchbruchs- und Elutionskurven

Das Sorptiv wurde im zu untersuchenden Lösungsmittel gelöst und mittels einer Pumpe auf die vorgespülte, blasenfrei gepackte Säule gegeben und am Auslauf der Säule mittels Fraktionssammler aufgefangen. Nach hinreichend langer Beladungszeit, ermittelt durch Berechnungen aus den Vorexperimenten, wurde mit der Elution mittels Isopropanol begonnen. Aus der Auftragung der Alkohol- bzw. Ketonkonzentration gegen die Zeit ergeben sich Durchbruchs- und Elutionskurven.

9.10.3. Kristallisation des Reinstoffes (2S,5S)-Hexandiol

Um eine höhere Produktreinheit zu erzielen kann der Alkohol (2S,5S)-Hexandiol durch Umkristallisation als Reinstoff (Reinheit > 99 %) erhalten werden. Dafür wurde das Lösungsmittel mittels eines Rotationsverdampfers entfernt bis ein gelblicher, dickflüssiger Überstand verbleibt. Dieser

wurde mit wenigen Millilitern Isohexan überschichtet und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Kühlraum gelagert, nach einigen Tagen bilden sich weiße Kristalle. Der Prozess kann durch Zugabe von Kristallisationskeimen beschleunigt werden. Die Kristalle wurden abfiltriert, mit kaltem Isohexan gewaschen und anschließend getrocknet.

9.11. Analytik

Die gaschromatographischen Untersuchungen wurden mit folgenden Einstellungen durchgeführt:

Tabelle 9-2: Verwendete Methoden der GC-Analytik.

Methode	2,5-Hexandion/ 2,5-Hexandiol	2,4-Pentandion/ 2,4-Pentandiol	Acetophenon /S-Phenylethanol
Temperaturprogramm	95 °C / 9,6 min 155 °C / 2,4 min	95 °C / 9,6 min 155 °C / 2,4 min	110 °C / 15 min
Detektortemperatur [°C]	250	250	250
Trägergasfluss [ml min ⁻¹]	40	40	40
Make-Up (He) [ml min ⁻¹]	45	45	45
Luftfluss [mL min ⁻¹]	450	450	450
Injektortemperatur [°C]	220	220	220
Splitverhältnis	5 : 1	5 : 1	5 : 1
Splitfluss [ml min ⁻¹]	9,9	9,9	10
Säulenvordruck [bar]	0,388	0,385	0,411
Säulenfluss [mL min ⁻¹]	2	2	2

Die Messungen wurden an einem Agilent 6890 Series Gaschromatographen durchgeführt. Es wurde eine chirale Säule Varian CP Chirasil-Dex CB. 25 m x 0,32 mm, Säulenummer: 9082217 verwendet. Als Trägergas wurde Wasserstoff eingesetzt. Im Folgenden sind die Kalibrationsgeraden dargestellt:

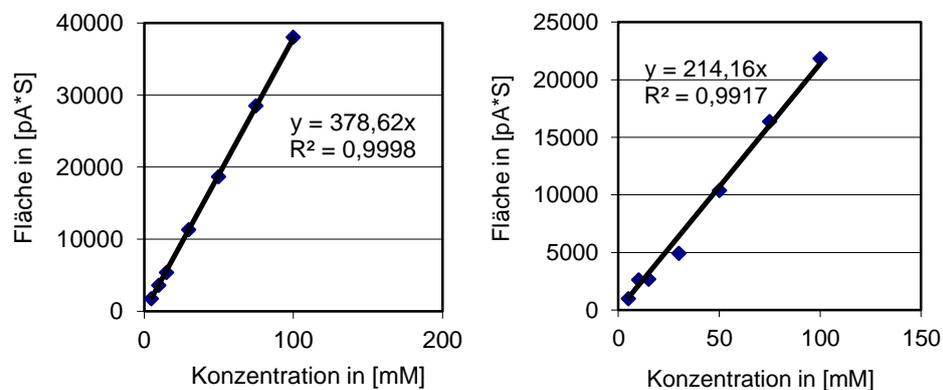


Abbildung 9–1: Kalibrationskurven, links Acetophenon, rechts 1-Phenylethanol.

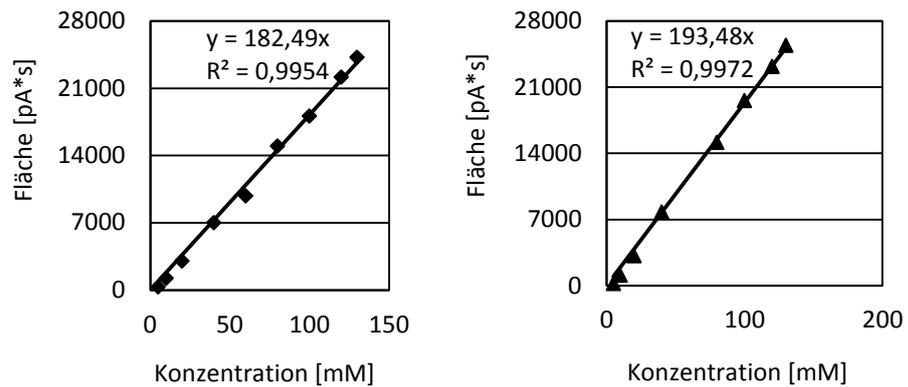


Abbildung 9-2: Kalibrationskurven, links 2,5-Hexandion, rechts 2,5-Hexandiol.

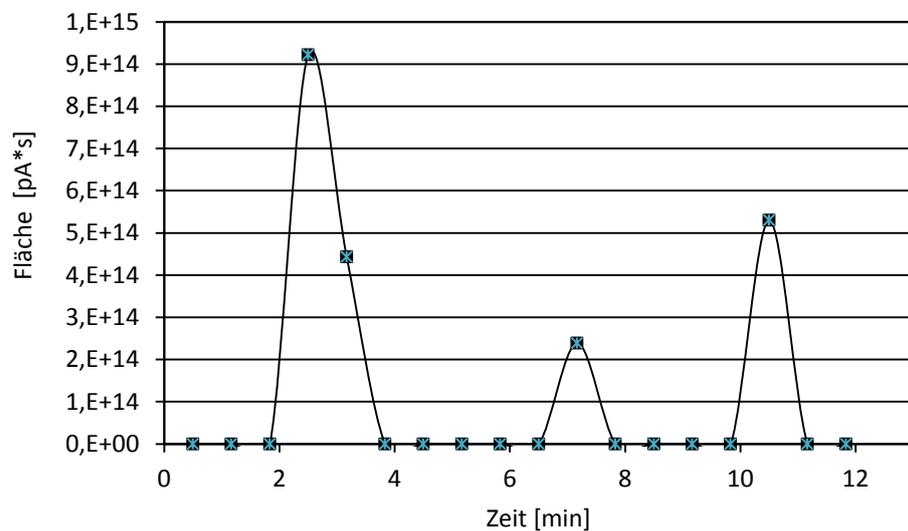


Abbildung 9-3: GC-Spektrum, Peak 1 (2,5 Min): Substrat 2,5-Hexandion, Peak 2 (7 Min): Intermediat 5-Hydroxyhexan-2-on, Peak 3 (10,5 Min): Endprodukt (2S,5S)-Hexandiol.

9.12. Matlab-Skript

```

1  gui_Singleton = 1;
2  gui_State = struct('gui_Name',    mfilename, ...
3                    'gui_Singleton', gui_Singleton, ...
4                    'gui_OpeningFcn', @StrPaul_OpeningFcn, ...
5                    'gui_OutputFcn', @StrPaul_OutputFcn, ...
6                    'gui_LayoutFcn', [], ...
7                    'gui_Callback', []);
8  if nargin && ischar(varargin{1})
9      gui_State.gui_Callback = str2func(varargin{1});
10 end
11 if narginout

```

```
12 [varargout{1:nargout}] = gui_mainfcn(gui_State, varargin{:});
13 else
14     gui_mainfcn(gui_State, varargin{:});
15 end
16 function StrPaul_OpeningFcn(hObject, eventdata, handles, varargin)
17 handles.output = hObject;
18 guidata(hObject, handles);

19 %%%%%% --- Initiale Prozeduren ---- %%%%%%%
20 s =serial('COM1','BaudRate',19200,'StopBits',1,'DataBits',8);
21 fopen(s)
22 fprintf(s,'5')
23 fclose(s)
24 delete(s)
25 clear s
26 % --- Outputs from this function are returned to the command line.
27 function varargout = StrPaul_OutputFcn(hObject, eventdata, handles)
28 varargout{1} = handles.output;

29 % --- Executes on button press in start.
30 function start_Callback(hObject, eventdata, handles)
31 function intervalschalter1_Callback(hObject, eventdata, handles)
32 i=get(handles.intervalschalter1,'Userdata')
33 if i==0
34     set(handles.intervalschalter1,'Userdata',1)
35 else
36     set(handles.intervalschalter1,'Userdata',0)
37 end
38 r=1
39 while (get(handles.intervalschalter1,'Userdata')==1)
40     v=get(handles.Ventil1,'Userdata')
41     if v==1
42         c='1'
43         v=0
44         t1 = 'LOAD'
45         ts1= 'Adsorption'
46         ts2= 'Elution'
47     else
48         c='2'
49         v=1
50         t1 = 'INJEKT'
51         ts1= 'Elution'
52         ts2= 'Adsorbtion'
53     end
54     s =serial('COM1','BaudRate',19200, 'Parity','none', 'StopBits',1,'DataBits',8)
55     fopen(s)
56     fprintf(s,c)
57     fclose(s)
58     set(handles.Ventil1,'Userdata',v)
59     set(handles.statusv1,'String',t1)
```

```
60     set(handles.texts1,'String', ts1)
61     set(handles.texts2,'String', ts2)
62     if r==1
63         pause(str2double(get(handles.edit1,'String')))
64         r=0
65     else
66         pause(str2double(get(handles.edit2,'String')))
67         r=1
68     end
69 End

70 % --- Executes on button press in intervalschalter2.
71 function intervalschalter2_Callback(hObject, eventdata, handles)
72 j=get(handles.intervalschalter2,'Userdata')
73     if j==0
74         set(handles.intervalschalter2,'Userdata',1)
75     else
76         set(handles.intervalschalter2,'Userdata',0)
77     end
78 m=1
79 while (get(handles.intervalschalter2,'Userdata')==1)
80     w=get(handles.Ventil2,'Userdata')
81     if w==1
82         d='4'
83         w=0
84         t2 = 'LOAD'
85         tsampler='Probe (inaktiv)'
86     else
87         d='8'
88         w=1
89         t2 = 'INJEKT'
90         tsampler= 'Probe (aktiv)'
91     end
92     s =serial('COM1','BaudRate',19200, 'Parity','none','StopBits',1,'DataBits',8)
93     fopen(s)
94     fprintf(s,d)
95     fclose(s)
96     set(handles.Ventil2,'Userdata',w)
97     set(handles.statusv2,'String',t2)
98     set(handles.sampler,'String', tsampler)
99     if m==1
100         pause(str2double(get(handles.edit3,'String')))
101         m=0
102     else
103         pause(str2double(get(handles.edit4,'String')))
104         m=1
105     end
106 end

107 function edit3_Callback(hObject, eventdata, handles)
```

```
108 function edit3_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
109 if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'),
    get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
110     set(hObject,'BackgroundColor','white');
111 end

112 function edit4_Callback(hObject, eventdata, handles)
113 function edit4_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
114 if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'),
    get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
115     set(hObject,'BackgroundColor','white');
116 end

117 function edit1_Callback(hObject, eventdata, handles)
118 function edit1_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
119 if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'),
    get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
120     set(hObject,'BackgroundColor','white');
121 end

122 function edit2_Callback(hObject, eventdata, handles)
123 function edit2_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
124 if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'),
    get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
125     set(hObject,'BackgroundColor','white');
126 end

127 function hintergrund_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
128 axes(hObject)
129 imshow('back.jpg')
130 % --- Taster für manuelle Steuerung von Ventil1 ---
131 function Ventil1_Callback(hObject, eventdata, handles)
132 v=get(handles.Ventil1,'UserData')
133 if v==1
134     c='1'
135     v=0
136     t1 = 'LOAD'
137     ts1= 'Adsorption'
138     ts2= 'Elution'
139 else
140     c='2'
141     v=1
142     t1 = 'INJEKT'
143     ts1= 'Elution'
144     ts2= 'Adsorption'
145 end
146 s =serial('COM1','BaudRate',19200, 'Parity','none','StopBits',1,'DataBits',8)
147 fopen(s)
148 fprintf(s,c)
149 fclose(s)
```

```
150 set(handles.Ventil1,'Userdata',v)
151 set(handles.statusv1,'String',t1)
152 set(handles.texts1,'String', ts1)
153 set(handles.texts2,'String', ts2)
154 % --- Taster für manuelle Steuerung von Ventil2 ---
155 function Ventil2_Callback(hObject, eventdata, handles)
156 v=get(handles.Ventil2,'Userdata')
157 if v==1
158     d='4'
159     v=0
160     t2 = 'LOAD'
161     tsampler='Probe (inaktiv)'
162 else
163     d='8'
164     v=1
165     t2 = 'INJEKT'
166     tsampler= 'Probe (aktiv)'
167 end
168 s =serial('COM1','BaudRate',19200, 'Parity','none','StopBits',1,'DataBits',8)
169 fopen(s)
170 fprintf(s,d)
171 fclose(s)
172 set(handles.Ventil2,'Userdata',v)
173 set(handles.statusv2,'String',t2)
174 set(handles.sampler,'String', tsampler)
```

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström (10^{-10} m)
A	Enzymaktivität [$\mu\text{mol}/\text{min}$]
A_i	Enzymaktivität Immobilisat [$\mu\text{mol}/\text{min}$]
AC	Aceton
AD	Außendurchmesser
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
AL	Aluminium
ALOX	Aluminiumoxid
Bs	Bindungsstellen
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
BTM	Biotrockenmasse
c	Konzentration
C_f	Phasengleichgewicht
d_{pr}	Porendurchmesser [μm]
d	Tag [d]
DC	Dünnschichtchromatographie
DSM	Deutsche Sammlung Mikroorganismen
E	Enzym
EC	Enzymklassifikation (enzyme commission)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>ee</i>	Enantiomerenüberschuss
EMR	Enzym-Membran-Reaktor
EtOAc	Essigsäureethylester
ExM	Experimentalnummer (Adsorber in Entwicklung)
GC	Gaschromatographie
GDA	Glutardialdehyd
ID	Innendurchmesser [μm]
IP	Isopropanol
ISPR	<i>in-situ</i> Produkt Abtrennung (<i>in-situ</i> product removal)
IUPAC	International Union of Pure And Applied Chemistry
K	Konstante
k_{deakt}	Deaktivierungsrate [min^{-1}]
K_{ow}	Oktanol-Wasser Verteilungskoeffizient
KP_i	Kaliumphosphat
K_S	Sorptionskoeffizient
LB	Langmuir-Blodgett
LbL	Layer-by-Layer
LM	Lösungsmittel
M	Molare Masse [g mol^{-1}]
m_p	Produktmenge
MTBE	tertiärer Butylmethylether
MW	Molekulargewicht [g mol^{-1}]
n	Anzahl Messungen (Mehrfachmessung)
NAD^+	β -1,4-Nicotinamidadenindinucleotid (oxidierte Form)
NADH	β -1,4-Nicotinamidadenindinucleotid (red. Form)
NADHP	β -1,4-Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (red.)
NMR	Kernspinresonanz (nuclear magnetic resonance)
[P]	Produkt

PAH	Polyallylamin-Hydrochlorid
PEI	Polyethylenimin
PFR	Strömungsrohr (plug flow reactor)
PM	Zielmolekül (Produktmolekül)
ps	Pikosekunden [ps]
q	Beladung [mg g^{-1}]
r	Radius
<i>rac</i>	Racemisch
R_f	Retentionsfaktor
RO	Reverse Osmose
rpm	revolutions per minute [min^{-1}]
RT	Raumtemperatur [$^{\circ}\text{C}$]
<i>RZA</i>	Raum-Zeit-Ausbeute [g(L*d)^{-1}]
S	Selektivität
[S]	Substrat
S_0	Substratkonzentration zum Zeitpunkt 0
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
S_{end}	Substratkonzentration Endpunkt [mmol]
Shu	Experimentalbezeichnung LbL-Partikel
$S_{\text{Lösungsmittel}}$	Wanderungsstrecke Lösungsmittel [cm]
SMB	Simulated Moving Bed
SP	Produktselektivität
S_{substanz}	Wanderungsstrecke Substrat [cm]
STR	gerührter Satzreaktor (Stirred-Tank Reaktor)
T	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]
t_0	Zeitpunkt 0
$t_{1/2}$	Halbwertszeit [h]
t_R	Reaktionszeit [d]
T_R	Durchbruchzeit [min]
<i>TTN</i>	Zykluszahl (Total Turnover Number)
U	Units [$\mu\text{mol min}^{-1}$]
U_1	Umsatz zum Zeitpunkt 1 [%]
V	Volumen [L]
\dot{V}	Flussrate [mL min^{-1}]
v	Reaktionsrate [μmol]
v_{Ai}	Anfangsgeschwindigkeit immobil. Enzym [$\mu\text{mol min}^{-1}$]
v_f	Anfangsgeschw. freier Biokatalysator [$\mu\text{mol min}^{-1}$]
V_{ges}	Gesamtvolumen [mL]
V_H	Hohlraumvolumen [mL]
V_R	Reaktorvolumen [mL]
v_{max}	maximale Reaktionsrate [μmol]
$\% V V^{-1}$	Volumenprozent
ε	Porosität
τ	Verweilzeit
X	Umsatz
σ	Standardabweichung
η_A	Ausbeute
η	Effektivitätsfaktor
η_i	Immobilisierungsausbeute

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1–1:	Prinzip der Silanisierung, Einführung funktioneller Aminofunktionen.....	13
Abbildung 1–2:	Immobilisierung auf LbL-modifizierten Trägern mithilfe von Glutardialdehyd (GDA) als Linker, zuerst Aktivierung mit GDA dann Enzymimmobilisierung.....	14
Abbildung 1–3:	Layer-by-Layer Technik, Überziehen einer geladenen Oberfläche mit Polyelektrolyten gegensätzlicher Ladung führt zu Schichtbildung, beispielhaft aufgeführt sind die Polyelektrolyte Polyethylenimin und Polyallylamin.	14
Abbildung 1–4:	Schema zur Erläuterung der Vorgänge bei der Stoffadsorption.....	16
Abbildung 1–5:	Schema zur Erläuterung der Bindung von Wasser durch Aluminiumoxid.....	18
Abbildung 1–6:	Schema zur enzymatischen Reduktion von prochiralen Ketonen mit	21
Abbildung 1–7:	Zeit-Ort-Diagramm für den kontinuierlichen Rührkesselreaktor (STR)	22
Abbildung 2–1:	Schema Prozessentwicklung und Aufbau der Dissertation (Teil I-III).....	24
Abbildung 3–1:	Schema zum Vorgehen bei der Enzymimmobilisierung..	26
Abbildung 3–2:	Rasterelektronenaufnahme von Trisoperl-Partikeln.....	26
Abbildung 3–3:	Vergleich der Literaturwerte der Aktivitäten und Wiederverwendbarkeit von Trisoperl PMGK L 17/05 Amino 222 [Goldberg 2010], 0,2 g Träger, Reaktionsbedingungen: 80 mM Acetophenon, 18 % V V ⁻¹ Isopropanol, 1 mM NADH in KP _i -Puffer (0,1 M, pH 7), Reaktionsvolumen 10 mL, 30 °C, kovalente Immobilisierung des Enzyms ADH-´A`	27
Abbildung 3–4:	Immobilisierungs- und Aktivitätsausbeute ADH-´A`, mit modifizierten Trisoperl-Trägern von Surflay Nanotec, Bedingungen: 80 mM Acetophenon, 18 % V V ⁻¹ Isopropanol, 1,0 mM NADH in KP _i -Puffer (0,1 M, pH 7,0), Reaktionsvolumen 10 mL, 30 °C, Immobilisierung von etwa 0,3 U mg ⁻¹ Enzymträger.	29
Abbildung 3–5:	Repetitive-Batch-Versuche mit Immobilisaten, Verwendung der oberflächenmodifizierten Trisoperl Träger von Surflay Nanotec, 2 mL einer 10 % V V ⁻¹ Suspension der Träger in Wasser, Reaktionsbedingungen: 80 mM Acetophenon, 18 % V V ⁻¹ Isopropanol, 1,0 mM NADH in KP _i -Puffer (0,1 M, pH 7,0), Reaktionsvolumen 10 mL, 30 °C.....	30

- Abbildung 3–6: Enzymimmobilisierung mit ADH 1.1.200 auf unterschiedlichen PEI-Polymeren (Variation des Molekulargewichts), Träger: Trisoperl, Reaktionsbedingungen: Standardaktivitätstest TEA-Puffer 20 mM mit Acetophenon 60 mM, 10 % V V⁻¹ Isopropanol, V = 10mL, 30 °C. Immobilisierungsausbeuten > 91 %. 33
- Abbildung 3–7: Produktzunahme in *tert*-Butylmethylether mit adsorptiv immobilisierter ADH 1.1.200 auf PEI 100 µm Partikeln (Lyophilisatkonzentration für Immobilisierung 60 mg mL⁻¹), 100 µL 1 mM NADH, 8830 µL puffergesättigtem *t*-Butylmethylether, Substrat: Acetophenon 60 mM, 10 % V V⁻¹ Isopropanol, t = 30 °C, V = 10 mL, 250 rpm, n = 2 (+/- 0,11), Aktivität Immobilisat: 9,2 U g⁻¹..... 34
- Abbildung 3–8: Vergleich der Aktivität von freiem gegenüber kovalent mittels Glutardialdehyd immobilisiertem Enzym ADH-´A` in KP_i-Puffer 0,1 M, pH 7, 200 mg, Substrat 60 mM Hexandion, T = 30°C, V = 1 mL, Träger: Trisopor (Partikelgröße 100-200 µm, Porengröße 49 nm) mit PEI 25000 Beschichtung. 35
- Abbildung 3–9: Enzym ADH 1.1.200 kovalent immobilisiert auf Surflay Partikeln Trisoperl mit PEI 25 000 Beschichtung. Abhängigkeit der Aktivität von der eingesetzten Enzymkonzentration. Reaktionsbedingungen: 80 mM Acetophenon, 10 % V V⁻¹ Isopropanol, 1 mM NAD⁺ in TEA-Puffer (20 mM, 1,15 mM MgCl₂, pH 7). Reaktionsvolumen: 10 mL, 30 °C..... 37
- Abbildung 3–10: Einfluss des pH-Werts auf die Aktivität immobilisierter ADH-´A` (Trisopor Partikel mit PEI 25 000 Beschichtung), Substrat 60 mM 2,5-Hexandion, 30 °C, V = 1 mL, (n = 2), 15 mg Immobilisat je Experiment..... 38
- Abbildung 3–11: Bestimmung des Einflusses der Temperatur auf die Aktivität immobilisierter ADH-´A` (Trisopor Partikel mit PEI 25 000 Beschichtung), Substrat 60 mM Hexandion in KP_i-Puffer 0,1 M, pH 7, 1 mM NADH, V = 1 mL, untersucht wurde die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit (t = 10 Min). Je 20 mg Immobilisat bzw. 400 µL Enzymlösung je Experiment, (n = 2). 39
- Abbildung 3–12: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen, LbL-beschichtete Fällungskieselsäuren, links oberflächenmodifizierte 50 µm Partikel mit immobilisierter ADH 1.1.200 bei 5.000-facher Vergrößerung, rechts 100 µm Partikel bei 100-facher Vergrößerung (eigene Aufnahmen). 40

- Abbildung 3–13: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen, LbL-beschichtete Oberflächen der Fällungskieselsäuren, links 300 µm Partikel mit immobilisierter ADH 1.1.200 bei 40.000-facher Vergrößerung, rechts 700 µm Partikel mit immobilisierter ADH 1.1.200 bei 40.000-facher Vergrößerung (eigene Aufnahmen). 40
- Abbildung 3–14: Enzymimmobilisierung ADH 1.1.200 adsorptiv und kovalent auf LbL-beschichteten Fällungskieselsäuren unterschiedlicher Durchmesser mit PEI 25 000-Polymerbeschichtung. Immobilisierung mit 5 % V V⁻¹ Glutardialdehyd (GDA), 1 Stunde aktiviert. Immobilisierung für 3 Stunden, 150 rpm, 4 °C. Lyophilisatkonzentration 60 mg mL⁻¹, Substrat Acetophenon 60 mM, 10 % V V⁻¹ Isopropanol, TEA-Puffer 20 mM, pH 7, V = 10 mL. 41
- Abbildung 3–15: Bestimmung der spezifischen Oberfläche mithilfe der BET-Methode, Trägermaterial: kommerzielles Sipernat und Sipernat mit PEI 25 000 Beschichtung im Vergleich. 43
- Abbildung 3–16: Repetitive-Batch mit ADH-´A` über GDA auf Trisopor mit PEI 25 000 Beschichtung immobilisiert. Je Versuch wurden 2 Ansätze durchgeführt, um die Wiederverwendbarkeit der Immobilisate durch Mehrfacheinsatz zu untersuchen. Reaktionsbedingungen für alle Ansätze: 80 mM Acetophenon, 18 % V V⁻¹ Isopropanol, 1 mM NADH in KP_i-Puffer (0,1 M, pH 7), Reaktionsvolumen 10 mL, T = 30 °C, n = 2. 44
- Abbildung 3–17: Abhängigkeit des Umsatzes von der Substratkonzentration, Variation der Acetophenonkonzentration: 20 mM, 40 mM, 80 mM; V = 0,07 mL min⁻¹, 18 % V V⁻¹ Isopropanol, 1 mM NADH in KP_i-Puffer (0,1 M, pH 7,0), 30 °C, 124 U g⁻¹ Träger, Verwendung des Trägers SHU 165, Trägermenge: 2,7 g. 46
- Abbildung 3–18: Lagerstabilität der ADH-´A` vor Einfrieren und Lagerung bei -20 °C, Reaktionsbedingungen: 80 mM Acetophenon, 18 % V V⁻¹ Isopropanol, 1 mM NADH, KP_i-Puffer (0,1 M, pH 7), Reaktionsvolumen 1 mL, 30 °C, mittlere Aktivität 8,57 (+/- 0,74), n = 2. 48
- Abbildung 3–19: Repetitive-Batchversuche mit gefriergetrocknetem Immobilisat (Trisopor mit PEI 25 000 Beschichtung). Immobilisierung: kovalent mit GDA, ADH 1.1.200. Ansatz 1 und 2: 80 mg mL⁻¹ Lyophilisat für Immobilisierung eingesetzt, Reaktionsbedingungen: Substrat Acetophenon 80 mM, 10 % V V⁻¹ Isopropanol, TEA-Puffer 20 mM, 1,15 mM MgCl₂, pH 7, T = 30 °C, V = 10 mL, Enzym wurde

	zwischen einzelnen Versuchen in TEA-Puffer 20 mM bei 4 °C gelagert.....	49
Abbildung 3–20:	Gefriertrocknung von kovalenten (GDA) Immobilisaten. Ausgangsaktivität entspricht der Aktivität direkt nach der Immobilisierung, „nach Trocknung“ entspricht der Aktivität direkt nach der Gefriertrocknung. (Partikel: Trisopor mit PEI 25 000 Beschichtung) aus TEA-Puffer 20 mM (1,15 mM MgCl ₂ , pH 7) Enzym ADH 1.1.200 und KPi-Puffer 0,1 M, pH 7, Enzym ADH-A, Vergleich der Aktivität vor und nach Gefriertrocknung prozentual, bezogen auf die Ausgangsaktivität mit 100 % (Lagerung bei - 20 °C).	50
Abbildung 3–21:	Lagerfähigkeit lyophilisierten Immobilisates bei Raumtemperatur (20 °C), Immobilisierung: kovalent immobilisierte ADH 1.1.200, Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer 20 mM (1,15 mM MgCl ₂ , pH 7), Substrat: 60 mM Acetophenon, T = 30 °C, 1 mM NADH, V = 10 mL.	51
Abbildung 4–1:	Schema zur Untersuchung der Adsorption auf anorganischen Adsorbentien	53
Abbildung 4–2:	Screening unterschiedlicher Adsorbentien auf Basis von Aluminiumoxiden und Aluminiumsilikaten. Untersuchung der Bindungsfähigkeit für 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol aus Essigsäureethylester, V = 15 mL, Durchführung bei RT, 400 rpm.	55
Abbildung 4–3:	Screening unterschiedlicher Adsorbentien auf Basis natürlicher Tonerdmineralien. Untersuchung der Bindungsfähigkeit für 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol aus Essigsäureethylester, V = 15 mL, Durchführung bei RT, 400 rpm.	56
Abbildung 4–4:	Adsorption von 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol aus Essigsäureethylester durch Adsorbentien Siral 40 (Alumosilikat), V = 15 mL, RT, Austausch Adsorbentien 0,5 g alle 30 Minuten, 150 rpm.	57
Abbildung 4–5:	Adsorption von 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol aus MTBE durch Adsorbentien Siral 40 (Alumosilikat), V = 15 mL, RT, Austausch Adsorbentien 0,5 g alle 30 Minuten, 150 rpm.....	57
Abbildung 4–6:	Adsorption von 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol aus Heptan (mit 10 % V V ⁻¹ Isopropanol) durch Adsorbentien Siral 40 (Alumosilikat), V = 15 mL, RT, Austausch Adsorbentien 0,5 g alle 30 Minuten, 150 rpm.	58
Abbildung 4–7:	Adsorption von 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol aus Essigsäureethylester durch Adsorbentien 0,5 g Puralox KR-160 (γ-Aluminiumoxid), V = 15 mL, RT, Austausch Adsorbentien alle 30 Minuten, n = 2, 150 rpm.	59

- Abbildung 4–8: Adsorption von 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol aus MTBE durch Adsorber Puralox KR-160 (γ -Aluminiumoxid) 0,5 g, V = 15 mL, RT, Austausch Adsorber alle 30 Minuten, 150 rpm. 59
- Abbildung 4–9: Adsorption von 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol aus Heptan (mit 10 % V V⁻¹ Isopropanol) durch Adsorber Puralox KR-160 (γ -Aluminiumoxid) 0,5 g, V = 15 mL, RT, Austausch Adsorber alle 30 Minuten, 150 rpm. 60
- Abbildung 4–10: Adsorption von 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol aus Essigsäureethylester durch Standard-Kieselgel (230-400 mesh, 60 Å, Merck), Zugabe 3 g, V = 15 mL, Austausch Adsorber alle 30 Minuten, 150 rpm. 61
- Abbildung 4–11: Adsorption von 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol aus Essigsäureethylester durch Adsorber Aluminiumoxid neutral, alle 30 Minuten Austausch Adsorber 0,5 g, Durchführung bei RT, V = 15 mL, 150 rpm. 62
- Abbildung 4–12: Adsorption von 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol aus Essigsäureethylester durch Adsorber Aluminiumoxid basisch, alle 30 Minuten Austausch Adsorber 0,5 g, Durchführung bei RT, V = 15 mL, 150 rpm. 62
- Abbildung 4–13: Adsorption auf Amberlite IR 120 H⁺-Form aus MTBE, 2,5-Hexandiol aus 150 mM Mischung 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol gelöst in MTBE, alle 30 Minuten Austausch der Adsorber 0,5 g, RT. 150 rpm. 63
- Abbildung 4–14: Adsorption auf Amberlite IR 120 Na⁺-Form aus MTBE, 2,5-Hexandiol aus 150 mM Mischung 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol gelöst in MTBE, alle 30 Minuten Austausch der Adsorber 0,5 g, RT, 150 rpm. 63
- Abbildung 4–15: Adsorption von Himbeerketon und Rhododendrol aus Essigsäureethylester durch Adsorber Siral 40 (Alumosilikat), V = 15 mL, RT, 150 rpm, alle 30 Minuten Austausch der Adsorber 0,5 g. 64
- Abbildung 4–16: Adsorption von Himbeerketon und Rhododendrol aus Essigsäureethylester durch Adsorber Puralox KR-160 (γ -Aluminiumoxid), Reaktionsbedingungen wie Abbildung 4–15. 64
- Abbildung 4–17: Dünnschichtchromatographie auf Aluminiumoxidplatten, Einsatz verschiedener organischer Lösungsmittel als mobile Phase, von links: EtOAc, Toluol, MTBE, Heptan. Substanzfleck (von links): 2,5-Hexandion, 2,5-Hexandiol, 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiolgemisch, Pentandion/Pentandiolgemisch, Toluolphase aus Enzymreaktion (ADH-A` mit Hexandion als Substrat). ... 67

- Abbildung 4–18: Dünnschichtchromatographie auf Aluminiumoxidplatten, Einsatz verschiedener organischer Lösungsmittel als mobile Phase, von links: EtOAc, Toluol, MTBE, Heptan. Substanzfleck (von links): 2,4-Pentandion, 2,4-Pentandiol, 2,4-Pentandion/2,4-Pentandiolgemisch. 67
- Abbildung 4–19: Test zum Zeitverlauf der selektiven Adsorption von äquimolaren Mengen an 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol (50 mM) aus Essigsäureethylester, Adsorber Puralox KR-160 (γ -Aluminiumoxid, pulverförmig), Adsorbermenge 3 g, RT, V = 15 mL, 400 rpm. 68
- Abbildung 4–20: Verlauf der Adsorption von 2,5-Hexandion (130 mM) und 2,5-Hexandiol (110 mM) aus Essigsäureethylester, Adsorber Puralox KR-160 (Aluminiumoxid-Granulat), Adsorbermenge 3 g, V = 15 mL, RT, 400 rpm. 68
- Abbildung 4–21: Verlauf der Adsorption von 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol aus Essigsäureethylester, Adsorber Siral 40 (Alumosilikat-Granulat 2073), Adsorbermenge 3 g, V = 15 mL, RT, 400 rpm. 69
- Abbildung 4–22: Adsorptionsisotherme für 2,5-Hexandiol (150 mM) gelöst in EtOAc, V = 1 mL, t = 60 min, RT, 350 rpm auf Rotationsschüttler, Adsorber Siral 40 (Alumosilikat), n = 2. Die ermittelte Langmuir Gleichgewichtskonstante beträgt $K = 4,6 \text{ g L}^{-1}$, $b = -0,22 \text{ g L}^{-1}$, $q = 75,4 \text{ mg g}^{-1}$ 71
- Abbildung 4–23: Adsorptionsisotherme für Gemisch von 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol (100 mM) gelöst in Essigsäureethylester, V = 2 mL, t = 60 min, 350 rpm, Adsorber Siral 40 (Alumosilikat), RT. 72
- Abbildung 4–24: Adsorptionsisotherme für 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol (150 mM) gelöst in MTBE, V = 1 mL, t = 60 min, RT, 350 rpm, Adsorber Siral 40 (Alumosilikat). 73
- Abbildung 4–25: Adsorptionsisothermen für 2,5-Hexandiol für das Adsorbens Siral 40 (Alumosilikat, pulverförmig) in Abhängigkeit vom Lösungsmittel, V = 1 mL, RT. 73
- Abbildung 4–26: Adsorptionsisotherme für 2,5-Hexandiol (150 mM) gelöst in EtOAc, V = 1 mL, t = 60 min, RT, Puralox KR-160 Aluminiumoxid, n = 2. Die ermittelte Langmuir Gleichgewichtskonstante beträgt $1,1 \text{ g L}^{-1}$, $b = 0,89 \text{ g L}^{-1}$, $q = 48 \text{ mg g}^{-1}$ 74
- Abbildung 4–27: Adsorptionsisothermen für 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol ($C_{\text{max}} = 100 \text{ mM}$) gelöst in Essigsäureethylester, V = 2 mL, t = 60 min, 350 rpm, Adsorber Puralox KR-160 (γ -Aluminiumoxid), durch fehlende Datenpunkte 2,5-Hexandion nicht auswertbar. 75

Abbildung 4–28: Adsorptionsisotherme für 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol ($C_{\max} = 150$ mM) gelöst in MTBE, $V = 1$ mL, $t = 60$ min, RT, Puralox KR-160 Aluminiumoxid.	75
Abbildung 4–29: Adsorptionsisothermen für 2,5-Hexandiol für Adsorber Puralox KR-160 (γ -Aluminiumoxid) in Abhängigkeit vom Lösungsmittel, $V = 1$ mL, RT, 350 rpm.	76
Abbildung 4–30: Adsorptionsisotherme für 5-Hydroxyhexan-2-on (Intermediat) gelöst in Toluol (mit 10 % $V V^{-1}$ Isopropanol), $V = 2$ mL, $t = 60$ min, RT, Adsorber Puralox KR-160 (γ -Aluminiumoxid).	77
Abbildung 4–31: Adsorptionsisotherme für 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol ($C_{\max} = 150$ mM), gelöst in Essigsäureethylester, $V = 2$ mL, $t = 60$ min, RT, Adsorber: Standard Kieselgel.	78
Abbildung 4–32: Adsorptionsisotherme für 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol, Adsorption aus MTBE, $V = 1$ mL, $t = 60$ min, RT, Adsorber Standard Kieselgel.	78
Abbildung 4–33: Granulate, links 2070 (Aluminiumoxid), rechts 2073 (Alumosilikat) aus unterschiedlichen Herstellungsprozessen.	79
Abbildung 4–34: Adsorptionsisothermen von 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol $C_{\max} = 150$ mM für Adsorbens 2010 (Alumosilikat, experimentelles Granulat) in Abhängigkeit vom Lösungsmittel, $V = 1$ mL, RT, 350 rpm.	80
Abbildung 4–35: Adsorptionsisothermen von 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol $C_{\max} = 150$ mM für Adsorbens Puralox KR 160, Aluminiumoxid-Granulat ExM 1997 in Abhängigkeit vom Lösungsmittel, $V = 1$ mL, RT, 350 rpm.	80
Abbildung 4–36: Adsorptionsisothermen von 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol $C_{\max} = 150$ mM für Aluminiumoxid-Granulat ExM 2014 in Abhängigkeit vom Lösungsmittel, $V = 1$ mL, RT, 350 rpm.	81
Abbildung 4–37: Adsorptionsisotherme 2,3-Pentandion/2,3-Pentandiol ($C_{\max} = 10$ mM) in EtOAc, $V = 2$ mL, $t = 60$ min, 150 rpm, RT, Adsorber Siral 40 (Alumosilikat, pulverförmig).	82
Abbildung 4–38: Adsorptionsisotherme für 2,4-Pentandion/2,4-Pentandiol ($C_{\max} = 150$ mM) aus EtOAc, $V = 2$ mL, $t = 60$ min, RT, Adsorber Siral 40 (Alumosilikat, pulverförmig)	82
Abbildung 4–39: Adsorptionsisotherme für 2,4-Pentandion/2,4-Pentandiol ($C_{\max} = 150$ mM) aus EtOAc, $V = 2$ mL, $t = 60$ min, RT, Adsorber Puralox KR-160 (γ -Aluminiumoxid, pulverförmig).	83

- Abbildung 4–40: Adsorptionsisotherme für Himbeerketon und Rhododendrol in EtOAc ($C_{\max} = 150 \text{ mM}$), $V = 2 \text{ mL}$, $t = 60 \text{ min}$, 150 rpm , Adsorber Pural SB. Zusätzlich dargestellt: Reinstoffisotherme von Rhododendrol (gleiche Bedingungen, EtOAc), $n = 2$ 84
- Abbildung 4–41: Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen Polysulfonat und 2,5-Hexandiol (Simulation des Projektpartners CAM-D Technologies GmbH). 85
- Abbildung 4–42: Adsorptionsisothermen für 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol ($C_{\max} 150 \text{ mM}$), gelöst in MTBE, $V = 2 \text{ mL}$, RT, 150 rpm , Amberlite IR 120 H^+ -Form. 86
- Abbildung 4–43: Adsorptionsisothermen für 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol ($C_{\max} 150 \text{ mM}$), gelöst in MTBE, $V = 2 \text{ mL}$, RT, 150 rpm , Amberlite IR 120 Na^+ Form. 86
- Abbildung 4–44: Adsorption des Cofaktors NADH (1 mM) aus KP_i -Puffer (0,1 M, pH 7) mit 18 % V V^{-1} Isopropanol auf Adsorber Siral 40 (Alumosilikat) und Puralox KR-160 (Aluminiumoxid), 4 g Adsorber auf 20 mL Ansatzvolumen. 91
- Abbildung 4–45: Adsorption des Cofaktors NADH (1 mM) aus KP_i -Puffer (0,1 M, pH 7) auf Adsorber Siral 40 (Alumosilikat) und Puralox KR-160 (γ -Aluminiumoxid), 4 g Adsorber auf 20 mL Ansatzvolumen. 91
- Abbildung 4–46: Änderung des pH-Werts bei Zugabe der Adsorber Siral 40 (Alumosilikat) und Puralox KR-160 (Aluminiumoxid) zu RO-Wasser oder KP_i -Puffer (0,1 M, pH 7), es wurden 3 g Adsorber (Siral 40) bzw. 1,5 g Adsorber, Puralox KR-160 zu 15 mL Ansatzvolumen gegeben, RT. 92
- Abbildung 4–47: Änderung des pH-Werts bei dreimaligem Waschen des Adsorbens in KP_i -Puffer (pH 7,2), Verwendung von 3 g Adsorber und 15 mL Puffer pro Ansatz, Test verschiedener Adsorber bei RT. 93
- Abbildung 4–48: Einfluss des Cofaktors Isopropanol auf die selektive Adsorption von 2,5-Hexandiol, stufenweise Extraktion von *rac/meso*-2,5-Hexandiol mit dem Adsorber Siral 40 (Alumosilikat) aus Essigsäureethylester. 94
- Abbildung 4–49: Adsorption von enzymatisch produziertem (2S,5S)-Hexandiol aus Toluol (mit 10 % V V^{-1} Isopropanol), dargestellt ist die Konzentration der Stoffe in der Ausgangslösung (Nullprobe) und nach Zugabe von 0,5 g Adsorber Alumosilikat (Siral 40). 95
- Abbildung 4–50: Adsorption von enzymatisch produziertem (S2,S5)-Hexandiols aus Toluol (mit 10 % V V^{-1} Isopropanol),

	Nullprobe und nach Zugabe von 0,5 g Adsorber Puralox KR-160 (Aluminiumoxid).....	95
Abbildung 4–51:	Umsetzung von 2,5-Hexandion mit ADH-´A` immobilisiert auf Trisoperl-Trägern und Zugabe von Südchemie-Partikeln Puralox KR-160 (γ -Aluminiumoxid), Substratlösung: Toluol mit 2,5-Hexandion (80 mM), 18 % V V ⁻¹ , T = 30 °C, 200 rpm.	96
Abbildung 4–52:	Umsetzung von 2,5-Hexandion mit auf Trisoperl immobilisierter ADH-´A`, Substratlösung: Toluol mit 2,5-Hexandion (80 mM), 18 % V V ⁻¹ , T = 30 °C, 200 rpm.....	97
Abbildung 4–53:	Durchbruchskurve von 2,5-Hexandiol (60 mM) für das Adsorberpulver Puralox KR-160 (γ -Aluminiumoxid, pulverförmig), 5,2 g, Flußrate 0,3 mL min ⁻¹ , nach 255 min Elution mit Isopropanol.	100
Abbildung 4–54:	Durchbruchskurve des Gemisches 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol (60 mM) für Adsorber Puralox KR-160 (γ -Aluminiumoxid, pulverförmig), 5,2 g, Flußrate 0,3 mL min ⁻¹ , nach 220 min Elution mit Isopropanol.	100
Abbildung 4–55:	Elutionskurven für 2,5-Hexandiol mittels Isopropanol (rein) als Elutionsmittel, links: Reinstoff, rechts Elution nach Adsorption aus Stoffgemisch, V = 1 mL min ⁻¹ , Puralox KR-160, (Aluminiumoxid, pulverförmig).....	101
Abbildung 4–56:	Durchbruchskurve von 2,5-Hexandiol (60 mM) für Adsorbergranulat Puralox KR-160 (Aluminiumoxid-Granulat), 6,51 g, Flußrate 0,3 mL min ⁻¹ , nach 205 min Elution mit Isopropanol.	102
Abbildung 4–57:	Durchbruchskurve des Gemisches 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol (60 mM) für Puralox KR-160 (Aluminiumoxid-Granulat) 6,51 g, Flußrate 0,3 mL min ⁻¹ , nach 205 min Elution mit Isopropanol.	102
Abbildung 4–58:	Elutionskurven für 2,5-Hexandiol mittels Isopropanol (rein) als Elutionsmittel, links: Reinstoff, rechts Elution nach Adsorption aus Stoffgemisch, V = 1 mL min ⁻¹ , Puralox KR-160 (Aluminiumoxid-Granulat).	103
Abbildung 5–1:	Schemazeichnung der Anlage zur kontinuierlichen Diolproduktion.....	108
Abbildung 5–2:	Enzymreaktor.....	109
Abbildung 5–3:	Verweilzeitsummenfunktion E(t) des Reaktors mit Octanol als Tracersubstanz, V = 0,3 mL min ⁻¹	111
Abbildung 5–4:	Kontinuierliche Produktion von (2S,5S)-Hexandiol im Festbettreaktor (Betthöhe: 12,5 cm, Immobilisat: PEI 100 μ m, 2,5-Hexandion 80 mM, 5 % V V ⁻¹ Isopropanol in	

- MTBE. Die Substratlösung wurde zusätzlich mit KP_i -Puffer gesättigt. Temperatur 30 °C, Flussrate 0,3 ml min⁻¹, nach 23,2 Verweilzeiten wurde die Flussrate auf einen Wert von 0,1 ml min⁻¹ reduziert. 112
- Abbildung 5–5: Abnahme der Cofaktorkonzentration im Überstand über die Zeit durch Spülen des Immobilisates mit 1 mM NADH Lösung in KP_i -Puffer 0,1 M, pH 7. 114
- Abbildung 5–6: Kontinuierliche Produktion von (2S,5S)-Hexandiol im Festbettreaktor (Betthöhe 11,1 cm, Immobilisat PBS 50, Enzym ADH-´A`), Substrat 40 mM 2,5-Hexandion und 5 % V V⁻¹ Isopropanol in MTBE, Flussrate 0,3 mL min⁻¹, 30 °C. 5-Hydroxyhexan-2-on..... 114
- Abbildung 5–7: Kontinuierliche Produktion von (2S,5S)-Hexandiol im Festbettreaktor (Betthöhe 11,1 cm, Immobilisat PBS 50, Enzym ADH-´A`), Substrat 40 mM 2,5-Hexandion und 5 % V V⁻¹ Isopropanol in MTBE, Flussrate 0,1 mL min⁻¹, 30 °C..... 115
- Abbildung 5–8: Schema zum Prinzip der wasserbindenden Eigenschaften von Sipernaten (Wasserfilm blau, organisches Lösungsmittel grau, Enzym gelb dargestellt). 116
- Abbildung 5–9: Langzeitversuch zur kontinuierlichen Produktion von (S2,S5)-Hexandiol im Festbettreaktor (Betthöhe 12,5 cm, Immobilisat 100 µm Sipernat mit PEI 25000 Beschichtung, Enzym ADH-´A`), Substrat 60 mM 2,5-Hexandion, 5 % V V⁻¹ Isopropanol in MTBE, Flussrate 0,1 mL min⁻¹, 30 °C, $\tau = 37,5$ min, RZA 36,6 g l⁻¹ d⁻¹. 117
- Abbildung 5–10: Adsorbersäulen mit Puralox KR-160..... 118
- Abbildung 5–11: Konzentrationsverlauf und Durchbruch am Adsorbersäulenausgang. Reaktionsbedingungen: 2,5-Hexandion 60 mM, 5 % V V⁻¹ Isopropanol in MTBE, Cofaktor-Vorsättigung mit 1 mM NAD⁺ gelöst in KP_i -Puffer 0,1 M, pH 7, Puralox KR-160 (Aluminiumoxid-Granulat) 6,75 g) Flussrate 0,1 mL min⁻¹, T = 30 °C. 119
- Abbildung 5–12: Elutionsprofil am Adsorbersäulenausgang, Elution mittels Isopropanol (rein) mit einer Flussrate von 0,05 mL min⁻¹, (Linien als visuelle Hilfe eingetragen, tatsächlicher Verlauf kann abweichen). 121
- Abbildung 5–13: Kristalle des Endprodukts (2S,5S)-Hexandiol, produziert in der automatisierten Anlage mit nachgeschalteter Adsorption mittels Aluminiumoxid und Umkristallisation bei – 20 °C in Isoheptan..... 122

Abbildung 5–14: Kristalle des Endprodukts (2S,5S)-Hexandiol, produziert in der automatisierten Anlage mit nachgeschalteter Adsorption mittels Aluminiumoxid.	122
Abbildung 5–15: Ausschnitt aus der Gesamtanlage, Reaktorsäule (links) und zwei Säulen mit Molekularsieb zur Abtrennung von Wasser. Zwei Pharmacia-Pumpen und die Schaltzentrale mit den Magnetventilen.	124
Abbildung 5–16: Gesamtprozess, aufgebaute Anlage mit Steuerung, Wasserbad, Substratbehälter, Autosampler, Pumpen, Magnetventilschaltung (Mitte) und Reaktoren.	124
Abbildung 5–17: Kosten für Cofaktor, Lösungsmittel und Reaktanten je 100 Verweilzeiten (Produktion von 0,49 g 2S,5S-Hexandiol). Die Preise basieren auf den Preisen nach Tabelle 5-5, Großhandelspreise weichen ab. Zusätzlich fallen Kosten für die Produktion oder den Kauf und die Immobilisierung des Biokatalysators an (die Kosten sind an dieser Stelle nicht miteinbezogen worden, da der Biokatalysator selber gewonnen und immobilisiert wurde).	125
Abbildung 9–1: Kalibrationskurven, links Acetophenon, rechts 1-Phenylethanol.	150
Abbildung 9–2: Kalibrationskurven, links 2,5-Hexandion, rechts 2,5-Hexandiol.	151
Abbildung 9–3: GC-Spektrum, Peak 1 (2,5 Min): Substrat 2,5-Hexandion, Peak 2 (7 Min): Intermediat 5-Hydroxyhexan-2-on, Peak 3 (10,5 Min): Endprodukt (2S,5S)-Hexandiol.	151

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1:	Von Projektpartner Surflay Nanotec nach der LbL-Methode beschichtete poröse Trisoperl Glas-Träger (Bezeichnung: PMGK L 05/01) für die kovalente Immobilisierung mittels GDA.	29
Tabelle 3-2:	Kovalente Immobilisierung von ADH auf vom Projektpartner Surflay Nanotec nach der LbL-Methode mit Polyethylenimin (PEI) beschichteten Trisoperl-Trägern, Typ: PMGK L 05/01, Substrat 60 mM Acetophenon, Standardaktivitätstest bei 30 °C.	32
Tabelle 3-3:	Variation der Immobilisierungsdauer (1-3 Stunden) und erzielte Aktivität des Immobilisates bei anschließender Messung, sowie theoretische Aktivität und Proteingehalt von Überstand und Waschfraktion, Träger je Ansatz 0,2 g Trisopor mit PEI 25000 Beschichtung, 5 mL partiell gereinigte Enzymlösung ADH-A` 8 U mL-1, Aktivitätsmessung mit Acetophenon 60 mM bei 30 °C (Standardbedingungen). Immobilisierungsausbeute wurde errechnet über Proteingehalt im Überstand und Waschfraktion.	36
Tabelle 3-4:	Immobilisierungs- und Aktivitätsausbeute zur Bestimmung der Anbindungsmenge bei Variation der Lyophilisatkonzentration.	37
Tabelle 3-5:	Ergebnisse zur Messung der Immobilisate auf beschichteten Fällungs-kieselsäuren, Reaktionsbedingungen siehe Abbildung 3–14.	42
Tabelle 3-6:	Ergebnisse zur Untersuchung der Oberfläche nach BET (gemessen vom Projektpartner Süd-Chemie AG), Gegenüberstellung von unbeschichteten (kommerziellen) Sipernaten und LbL-beschichteten Sipernaten.	42
Tabelle 3-7:	Gesamt-und Hohlraumvolumen für den Festbettreaktor.	45
Tabelle 3-8:	Umsätze und Raum-Zeit-Ausbeuten mit 20 mM und 40 mM Acetophenonkonzentration im Langzeitversuch (t = 24 h), $\tau = 5,21$ min.	46
Tabelle 4-1:	Oktanol-Wasser Verteilungskoeffizienten K_{OW} (auch als P-Wert bezeichnet) der untersuchten Lösungsmittel, Datenquelle Sicherheitsdatenblättern ¹ AppliChem, ² Merck.	54
Tabelle 4-2:	Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie mit unterschiedlichen Lösungsmitteln und 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol.	66

Tabelle 4-3:	Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie mit Toluol (mit 10 % V V ⁻¹ Isopropanol) und 2,5-Hexandion/2,5-Hexandiol (Substratmix).	66
Tabelle 4-4:	Mittelwerte zur Adsorption auf granulierten Aluminiumoxiden und Alumosilikaten.	69
Tabelle 4-5:	Übersicht der Granulate unterschiedlicher Zusammensetzung.....	79
Tabelle 4-6:	Zusammengefaßte Daten der Adsorptionsisothermen Alumosilikat, Kieselgel und Aluminiumoxid. Daten wurden den Isothermen entnommen, es handelt sich nicht in allen Fällen um die maximale Beladbarkeit q _{max} , sondern eine Annäherung. Selektivität (Formel 9-11) angegeben wenn im Versuch sowohl Keton als auch Alkohol untersucht wurden.	88
Tabelle 4-7:	Eigenschaften der im Reaktor eingesetzten Adsorbentien, Aluminiumoxid pulverförmig und Granulat.	99
Tabelle 4-8:	Ergebnisse der physikalischen Charakterisierung des Adsorber-Festbettes (Gesamtvolumen 12,17 mL) Adsorber Puralox KR-160 (γ-Aluminiumoxid) als Pulver und als Granulat.	99
Tabelle 4-9:	Gegenüberstellung der berechneten Adsorptionskapazitäten beider Adsorbentien mit Verwendung der kleinsten ermittelten Beladungszeiten (Pulver-Beladungszeit: 140 min; Granulat-Beladungszeit: 190 min) bei einer Flussrate von 0,3 ml min ⁻¹	103
Tabelle 5-1:	Eigenschaften der eingesetzten Träger für die Enzymimmobilisierung. Die Träger wurden nach der LbL-Methode mit PEI 25000 oder PEI 2000 beschichtet.....	111
Tabelle 5-2:	Ergebnisse der Messung verschiedener Substratkonzentrationen bei einer Flussrate von 0,3 mL min ⁻¹ mit Immobilisat PEI 100 µm (ADH-´A` kovalent auf Fällungskieselsäure immobilisiert).	112
Tabelle 5-3:	Ergebnisse der Messung verschiedener Substratkonzentrationen bei einer Flussrate von 0,1 mL min ⁻¹ mit Immobilisat PBS 100 (ADH-´A` kovalent auf Fällungskieselsäure immobilisiert).	112
Tabelle 5-4:	Umsatz und Zeit zur Berechnung der Deaktivierungskonstante, es ergibt sich: k _{deakt} = 1,09·10 ⁻⁵ min ⁻¹	117
Tabelle 5-5:	Kosten für Chemikalien (Recherche 24.10.2011 Sigmaaldrich.com), Standardversuchsbedingungen, Substratkonzentration 60 mM.	125

Tabelle 9-1:	Zusammensetzung der Färbereagenz nach Seebach....	147
Tabelle 9-2:	Verwendete Methoden der GC-Analytik.....	150

Literaturverzeichnis

Antranikian, Garabed (2006): *Angewandte Mikrobiologie*. [New York]: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Bahulekar, R.; Ayyangar, N. R.; Ponrathnam, S. (1991): Polyethylenimine in immobilization of biocatalysts. *Enzyme Microb Technol* 13 (11), pp. 858–868.

Balard, H.; Sidqi, M.; Papirer, E.; Donnet, J. B.; Tuel, A.; Hommel, H.; Legrand, A. P. (1988): Study of modified silicas by inverse gas chromatography part II. Influence of chain length on surface properties of silicas grafted with α - ω diols. *Chromatographia*, Vol 25, No. 8, pp. 712-716.

Ballinger, Todd H.; Yates, John T. (1991): IR spectroscopic detection of Lewis acid sites on alumina using adsorbed carbon monoxide. Correlation with aluminum-hydroxyl group removal. In: *Langmuir* 7 (12), pp. 3041–3045.

Bart, H. J., Gemmingen, U., (2005): Adsorption, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Weinheim: Wiley-VCH..

Baerns, M., Hofmann, H., Renken, A., (1999): *Chemische Reaktionstechnik*, 3. Auflage. [S.l.], Weinheim: Wiley-VCH.

Bechthold, M., Panke, S. (2009): "In situ Product Recovery Integrated with Biotransformations", *Chimia* 63, No. 6

Beuzekom, B., Arundel, A., (2009): OECD Biotechnology Statistics 2009, Internetadresse: <http://www.oecd.org/dataoecd/4/23/42833898.pdf> (abgerufen am 19.01.2012)

Biotechnologie.de, "Die deutsche Biotechnologie-Branche 2011", 21.04.2011 (im Auftrag des BMBF)

Bornscheuer, U., T.; Kazlauskas, R., J., (2006) *Hydrolases in organic synthesis*, 2. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH.

Bommarius, A. S.; Riebel, B. R. (2004): *Biocatalysis. Fundamentals and applications*. Weinheim: Wiley-VCH.

Bradford, M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1-2), pp. 248–254.

Bradshaw, Curt W.; Fu, Hong; Shen, Gwo Jenn; Wong, Chi Huey (1992): A *Pseudomonas* sp. alcohol dehydrogenase with broad substrate specificity and unusual stereospecificity for organic synthesis. *J. Org. Chem* 57 (5), pp. 1526–1532.

Briechele S, Howaldt M, Röthig T, Liese A (2006): *Enzymatische Prozesse, Bioprozesstechnik, 2. Auflage*. Elsevier GmbH: München.

Brockmann H., (1947), *Angew. Chem.* 59, p. 199

- Brunauer, Stephen; Emmett, P. H.; Teller, Edward (1938): *J. Am. Chem. Soc.* 60 (2), pp. 309–319.
- Buchholz, Klaus; Kasche, Volker; Bornscheuer, Uwe Theo (2005): *Biocatalysts and enzyme technology*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag.
- Burk, M. J. (1991): C₂-symmetric bis(phospholanes) and their use in highly enantioselective hydrogenation reactions. *Journal of the American Chemical Society* 113: pp. 8518-8519.
- Burk, M. J.; Gross M. F.; Martinez J. P. (1995) Asymmetric catalytic synthesis of β -branched amino acids via highly enantioselective hydrogenation reactions. *Journal of the American Chemical Society* 117: pp. 9375-9376.
- Carrea G., Riva S., (2008): *Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Media*, Weinheim: Wiley-VCH.
- Cao, Linqiu (2005): *Carrier-bound immobilized enzymes. Principles, applications and design*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Cheng Y. X.; Zhou J.; Deng S. M.; Tan N. H. (2002): New norsesquiterpenoides from *Cucubalus baccifer*. *Planta Medica* 68: pp. 91-94.
- Chin, Jennifer T.; Wheeler, Sarah L.; Klibanov, Alexander M. (1994): On protein solubility in organic solvent. *Biotechnol. Bioeng* 44 (1), pp. 140–145.
- Chmiel, H. (2006): *Bioprozesstechnik. Einführung in die Bioverfahrenstechnik*. 2., neu bearbeitete Auflage München: Elsevier Spektrum Akademischer Verlag
- Crittenden, T. W. J.; B. D. (1998): *Adsorption technology and design*. Oxford, Boston: Butterworth-Heinemann.
- Dähne, L., Baude (2005) Method for Producing CS Particles and Microcapsules using porous templates, Patent WO2005089727, International Publication Date 16/03/2005.
- Daniell, W.; Schubert, U.; Glöckler, R.; Meyer, A.; Noweck, K.; Knözinger, H. (2000): Enhanced surface acidity in mixed alumina–silicas: a low-temperature FTIR study. *Applied Catalysis A: General* 196 (2), pp. 247–260.
- Decher, Gero; Schlenoff, Joseph B. (2003): *Multilayer thin films. Sequential assembly of nanocomposite materials*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Deetz, J.S; Rozzell, J.David (1988): Enzyme-catalysed reactions in non-aqueous media. *Trends in Biotechnology* 6 (1), pp. 15–19.
- Edegger, K.; Gruber, C.; Faber, K.; Hafner, A. & Kroutil, W. (2006): 'Optimization of Reaction Parameters and Cultivation Conditions for Biocatalytic Hydrogen Transfer Employing Overexpressed ADH-'A' from *Rhodococcus ruber* DSM 44541, *E. coli*', *Engineering in Life Sciences* 6 (2), pp. 149-154.
- Evonik-Industries (2009), Produktbroschüre "Specialty Silica" Sipernat[®], Sident[®], Abteilung: Inorganic Materials, Ausgabe Juni 2009

- Faber, Kurt (2011): Biotransformations in organic chemistry. A textbook. 6. Aufl. Berlin: Springer.
- Filho, M. V., Stillger, T., Müller, M., Liese, A., Wandrey, C. (2003): Is logP a convenient criterion to guide the choice of solvents for biphasic enzymatic reactions? *Angewandte Chemie* 115: pp. 3101-3104.
- Fischer, K., (1935): Neues Verfahren zur maßanalytischen Bestimmung des Wassergehaltes von Flüssigkeiten und festen Körpern. *Angewandte Chemie*, 48, S. 394–396
- Flaschel, E.; Ansorge-Schumacher, M. B.; Nieguth, R.; Wiemann, L. O.; Weißhaupt, P.; Thum, O.; Eckstein, M. (2010): Belastbare Enzympräparate für die technische Biokatalyse. *Chemie Ingenieur Technik* 82 (1-2), S. 35–42.
- Freundlich, H. (1907): Kolloidfällung und Adsorption. *Z. Angew. Chem* 20 (18), pp. 749–750.
- Goldberg, Katja (2010): Einsatz von Alkohol-Dehydrogenasen in der Biokatalyse. Entwicklung eines biokatalytischen Verfahrens zur asymmetrischen Produktion von Alkoholen. neue Ausg. Saarbrücken: Suedwestdeutscher Verlag fuer Hochschulschriften.
- Goldberg, Katja; Krueger, Anke; Meinhardt, Thomas; Kroutil, Wolfgang; Mautner, Barbara; Liese, Andreas (2008): Novel immobilization routes for the covalent binding of an alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus ruber* DSM 44541. *Tetrahedron: Asymmetry* 19 (10), pp. 1171–1173.
- Goldberg, Katja; Schroer, Kirsten; Lütz, Stephan; Liese, Andreas (2007): Biocatalytic ketone reduction—a powerful tool for the production of chiral alcohols—part I: processes with isolated enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol* 76 (2), pp. 237–248.
- Gonzalo, G. de; Lavandera, I.; Durchschein, K.; Wurm, D.; Faber, K.; Kroutil, W. (2007 a): Asymmetric biocatalytic reduction of ketones using hydroxy-functionalised water-miscible ionic liquids as solvents. *Tetrahedron: Asymmetry* 18 (21), pp. 2541–2546.
- Gonzalo, G. de; Lavandera, I.; Faber, K.; Kroutil, W. (2007 b): Enzymatic Reduction of Ketones in “Micro-aqueous” Media Catalyzed by ADH-A from *Rhodococcus ruber*. *Org. Lett* 9 (11), pp. 2163–2166.
- Gritter, R. J.; Bobbitt, M. J.; Schwarting, A. E. (1985): Introduction to Chromatography, second edition. Holden-Day, CA, USA
- Grünewald, Marcus; Pfennig, Andreas; Strube, Jochen; Grote, Florian; Josch, Jan Pablo; Ditz, Reinhard (2011): Process Development and Design of Downstream Processes. *Chemie Ingenieur Technik* 83 (7), pp. 1044–1065.
- Guisán, José M. (2010): Immobilization of enzymes and cells. 2nd ed., [Repr. 2010]. Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Haberland, Jürgen; Hummel, Werner; Dausmann, Thomas; Liese, Andreas (2002 a): New Continuous Production Process for Enantiopure (2R,5R)-Hexanediol. *Org. Process Res. Dev* 6 (4), pp. 458–462.

- Haberland J.; Kriegesmann A.; Wolfram E.; Hummel W.; Liese A. (2002 b): Diastereoselective synthesis of optically active (2R,5R)-hexanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58: pp. 595-599.
- Haberland, J. (2003), Verfahrensentwicklung zur Darstellung von (2R,5R)-Hexandiol mit *Lactobacillus kefir* DSM20587, Online-Publikationen an deutschen Hochschulen Bonn, Univ., Dissertation, URN: urn:nbn:de:hbz:5n-01511.
- Hanefeld, U.; Gardossi, L.; Magner, E. (2009): Understanding enzyme immobilisation. *Chem. Soc. Rev* 38 (2), pp. 453.
- Hart, L. D.; Lense, E. (1990): Alumina chemicals. Science and technology handbook. Westerville, Ohio: American Ceramic Society.
- Hummel, Werner; Kula, Maria-Regina (1989): Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Eur J Biochem* 184 (1), pp. 1–13.
- Karabec, M.; Łyskowski, A.; Tauber, K. C.; Steinkellner, G.; Kroutil, W.; Grogan, G.; Gruber, K. (2010): Structural insights into substrate specificity and solvent tolerance in alcohol dehydrogenase ADH-‘A’ from *Rhodococcus ruber* DSM 44541. *Chem. Commun* 46 (34), pp. 6314.
- Keinan, E.; Hafeli, E., K.; Seth, Kamal K.; Lamed, R. (1986): Thermostable enzymes in organic synthesis. 2. Asymmetric reduction of ketones with alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobium brockii*. *J. Am. Chem. Soc* 108 (1), pp. 162–169.
- Klibanov, Alexander M. (2001): Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* 409 (6817), pp. 241–246.
- Knözinger, H., Basssett, J. M., Gates B. C. (1988): Molecular Approaches to Surface Catalysis, *Surface Organometallic Chemistry, Kluwer*, Boston, p. 35
- Kosjek, Birgit; Stampfer, Wolfgang; Pogorevc, Mateja; Goessler, Walter; Faber, Kurt; Kroutil, Wolfgang (2004): Purification and characterization of a chemotolerant alcohol dehydrogenase applicable to coupled redox reactions. *Biotechnology and Bioengineering* 86, pp. 55-62.
- Köhler, Klaus; Schläpfer, Carl, W. (1993): Koordinationschemie an Oxidoberflächen, *Chemie in unserer Zeit*, Nr. 5, S. 248-255, VCH-Verlag
- Kragl, Udo; Vasic-Racki, Durda; Wandrey, Christian (1992): Kontinuierliche Reaktionsführung mit löslichen Enzymen. *Chemie Ingenieur Technik* 64 (6), S. 499–509.
- Kuhn, Hans; Moebius, Dietmar (1971): Systems of Monomolecular Layers Assembling and Physico-Chemical Behavior. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl* 10 (9), pp. 620–637.
- Laane, C., Boeren, S., Vos, K., Veeger, C. (1986) Rules for optimization of Biocatalysis in Organic Solvents, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. X, pp. 81-87, John Wiley & Sons
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259), pp. 680–685.

- Langmuir, Irving (1933): Surface Chemistry. *Chem. Rev* 13 (2), pp. 147–191.
- Liao, Min-Hung; Chen, Dong-Hwang (2001). *Biotechnology Letters* 23 (20), pp. 1723–1727.
- Liese, A.; Zelinski, T.; Kula, M.-R; Kierkels, H.; Karutz, M.; Kragl, U.; Wandrey, C. (1998): A novel reactor concept for the enzymatic reduction of poorly soluble ketones. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 4 (1-2), pp. 91–99.
- Liese, A.; Seelbach C.; Wandrey, C. (2006): Industrial biotransformations. 2. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH.
- Lutz, Stefan; Bornscheuer, U. T. (2009): Protein engineering handbook. Weinheim: Wiley-VCH.
- MacKerell, A. D. Jr.; Brooks, B.; Brooks, C. L., III; Nilsson, L.; Roux, B.; Won, Y.; Karplus, M. (1998). "CHARMM: The Energy Function and Its Parameterization with an Overview of the Program". Schleyer, P.v.R.; *et al.* The Encyclopedia of Computational Chemistry. 1. Chichester: John Wiley & Sons. pp. 271–277.
- Mateo, C.; Abian, O.; Fernández-Lafuente, R.; and Guisán, J. M. (2000) Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support Polyethylenimine supports. *Biotechnol. Bioeng.* 7, pp. 98–105.
- Müller, P. (2010), Enantioselective Enzymatic Reduction of Prochiral Ketones in One-Phase and Two-Phase Systems, Cuvillier Verlag, Göttingen.
- Nelson, J. M.; Griffin, Edward G. (1916). *J. Am. Chem. Soc* 38 (5), pp. 1109–1115.
- Sattler, Klaus (2001): Thermische trennverfahren. Grundlagen, Auslegung, Apparate. 3. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH.
- Schmidt-Traub, H. (2005): Preparative chromatography of fine chemicals and pharmaceutical agents. Weinheim: Wiley-VCH.
- Schroer, Kirsten; Lütz, Stephan (2009): A Continuously Operated Bimembrane Reactor Process for the Biocatalytic Production of (2R,5R)-Hexanediol. *Org. Process Res. Dev* 13 (6), pp. 1202–1205.
- Seidel-Morgenstern, Andreas (1995): Mathematische Modellierung der präparativen Flüssigchromatographie. Wiesbaden: DUV.
- Smirnova, I. (2002): Synthesis of silica aerogels and their application as a drug delivery system. *Dissertation, Technische Universität Berlin, Fakultät III - Prozesswissenschaften.*
- Stampfer, Wolfgang; Kosjek, Birgit; Moitzi, Christian and Kroutil Wolfgang; Faber, Kurt (2002): Biocatalytic asymmetric hydrogen transfer. *Angewandte Chemie, International Edition* 41, pp. 1014-1017.
- Stampfer, W.; Edegger, K.; Kosjek, B.; Faber, K.; Kroutil, W., (2004): Simple biocatalytic access to enantiopure (S)-1-heteroarylethanol employing a

- microbial hydrogen transfer reaction. *Advanced Synthesis & Catalysis* 346, pp. 57-62.
- Steinsiek, S., (2006): Charakterisierung und Optimierung gel-stabilsierter Zwei-Phasen-Systeme zur stereospezifischen Reduktion hydrophober Verbindungen mit der Carbonyl-Reduktase aus *Candida parapsilosis*. In: *PhD thesis, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen*.
- Stieß, Matthias (2009 [erschienen] 2008): Mechanische Verfahrenstechnik. 3. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Stillger T, Bönitz M, Villela Filho M, Liese A (2002): Überwindung von thermodynamischen Limitierungen in substratgekoppelten Cofaktorregenerierungsverfahren. *Chemie Ingenieur Technik* 74: pp. 1035-1039.
- Straathof, Adrie J.J; Panke, Sven; Schmid, Andreas (2002): The production of fine chemicals by biotransformations. *Current Opinion in Biotechnology* 13 (6), pp. 548–556.
- Temme, H.; Sohling, U.; Suck, K.; Ruf, F.; Niemeyer, B. (2011): Selective adsorption of aromatic ketones on kerolite clay for separation in biocatalytic applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 377 (1-3), pp. 290–296.
- Van den Wittenboer, Anne; Schmidt, Thomas; Müller, Pia; Ansorge-Schumacher, Marion B.; Greiner, Lasse (2009): Biphasic mini-reactor for characterization of biocatalyst performance. *Biotechnol. J.* 4 (1), pp. 44–50.
- Vicenzi, Jeffrey T.; Zmijewski, Milton J.; Reinhard, Matthew R.; Landen, Bryan E.; Muth, William L.; Marler, Paul G. (1997): Large-scale stereoselective enzymatic ketone reduction with in situ product removal via polymeric adsorbent resins. *Enzyme and Microbial Technology* 20 (7), pp. 494–499.
- Villela Filho, Murillo; Stillger, Thomas; Müller, Michael; Liese, Andreas; Wandrey, Christian (2003). *Angew. Chem* 115 (26), pp. 3101–3104.
- Volesky, B. (2003): Sorption and biosorption. St. Lambert, Québec: BV Sorbex.
- Walsh, Christopher (1980): Flavin coenzymes: at the crossroads of biological redox chemistry. *Acc. Chem. Res* 13 (5), pp. 148–155.
- Wichmann, Rolf; Wandrey, Christian; Boeckmann, Andreas F.; Kula, Maria-Regina (1981): Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD(H) regeneration. *Biotechnol. Bioeng.* 23 (12), pp. 2789–2802.
- Wishka, D. G; Graber D. R.; Seest E. P.; Dolak L. A.; Han F.; Watt W.; Morris J. (1998): Stereoselective synthesis of furo[2,3-c]pyridine pyrimidine thioethers, a new class of potent HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Journal of Organic Chemistry* 63: pp. 7851-7859.
- Wong C. H.; Daniels L.; Orme-Johnson W. H.; Whitesides G. M., (1981): Enzyme-catalyzed organic synthesis: NAD(P)H regeneration using dihydrogen

and the hydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Journal of the American Chemical Society* 103: pp. 6227-6238.

Yang, R. T. (2003): Adsorbents. Fundamentals and applications. Hoboken, N.J: Wiley-Interscience.

Zaki, M. I.; Vielhaber, B.; Knoezinger, H. (1986): Low-temperature carbon monoxide adsorption and state of molybdena supported on alumina, titania, ceria, and zirconia. An infrared spectroscopic investigation. *J. Phys. Chem.* 90 (14), pp. 3176–3183.

Lebenslauf:

Name	Bubenheim
Vorname	Paul Daniel
Geburtsdatum	01.10.1981
Geburtsort	Hamburg, Deutschland
1987-2001	Schulbildung: Rudolf-Steiner Schule Hamburg- Wandsbek, Abitur
2001-2002	Zivildienst: Amalie-Sieveking Krankenhaus, Hamburg
2002-2008	Studium der Biologie an der Universität Hamburg, Abschluss: Diplom
2008-2011	Doktorarbeit am Institut für Technische Biokatalyse, Technische Universität Hamburg-Harburg
11.2011-10.2012	Süd-Chemie AG (Übernahme durch Clariant AG, ab 01.07.2012 Clariant AG)