

Additiv gefertigte Strukturen als Enzymträger und Strömungsführer für Biokatalysen im Strömungsrohr

Vom Promotionsausschuss der
Technischen Universität Hamburg

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)

genehmigte Dissertation

von
Niclas Büscher

aus
Salzgitter

2020

Lizenz: Das Werk einschließlich aller seiner Teile ist urheberrechtlich geschützt. Das Werk steht unter der Creative-Commons-Lizenz Namensnennung 4.0 Internat. (CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.de>). Ausgenommen von der oben genannten Lizenz sind Teile, Abbildungen und sonstiges Drittmaterial, wenn anders gekennzeichnet.

DOI: <https://doi.org/10.15480/882.3035>

ORCID: Niclas Büscher
<https://orcid.org/0000-0002-1905-7299>

Vorsitzende des Prüfungsausschusses:	Prof. Dr.-Ing. Kerstin Kuchta
1. Gutachter:	Prof. Dr. rer. nat. Andreas Liese
2. Gutachter:	Prof. Dr.-Ing. Michael Schlüter
Tag der mündlichen Prüfung:	23.10.2020

Danksagung

Innerhalb der Arbeit an meiner Dissertation waren viele Menschen direkt und indirekt beteiligt. Durch sie habe ich viel gelernt, unzählige Erfahrungen gesammelt und eine schöne Zeit verbracht. Hierfür möchte ich mich von ganzem Herzen bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Andreas Liese dafür, dass er mir die Möglichkeit gab an seinem Institut in einem solch spannenden Forschungsprojekt zu arbeiten. Ich bin dankbar für sein Vertrauen, positive Art und unentwegte Hilfsbereitschaft. Seine Förderung von Teamarbeit und interdisziplinären Austausch ist beeindruckend und war mir stets ein Vorbild.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Michael Schlüter für eine gute Zusammenarbeit innerhalb des Projektes, die Hilfe bei der gemeinsamen Publikation und die Erstellung des Gutachtens zu meiner Dissertation.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Schwaneberg für die unkomplizierte Ermöglichung eines Forschungsaufenthaltes an seinem Lehrstuhl an der RWTH bedanken. Damit verbunden danke ich auch Dr. Kristin Rübsam und Dr. Felix Jakob für die tiefen Einblicke in die Thematik von Ankerpeptiden und für die gute Zusammenarbeit.

Ich danke meinen Gruppenleitern der Gruppe „Reaction Sequences“ Asc. Prof. Dr. Selin Kara und Dr. Ayad Dawood für ihren Einsatz, elaborierten Austausch und ihre Hilfe. Auch für die fachliche Korrekturlesung meiner Dissertation bedanke ich mich herzlich.

Danke an Claas Spille für die gemeinsame Planung von additiv gefertigten Strukturen zur Nutzung in der Biokatalyse. Danke auch an Maria-Isabelle Maiwald und Marcel Fassbender für die additive Fertigung von Prototypen und regen Gedankenaustausch.

Ich danke meinen Bachelor- und Masterstudenten Victoria Büschler, Reza Faghihi, John K. Kracht und Giovanni Sayoga für engagierte Diskussionen, intensive Laborarbeit und gute Stimmung.

Ich danke Stefan Boersting, Malte Büscher, Brita Falzewski und Christiane Picht-Bücher für die sprachliche Korrekturlesung meiner Dissertation.

Ein fettes Dankeschön geht raus an das gesamte ITB Kollegium! Ihr seid der Grund für gute Laune, Motivation, und Spaß während meiner Promotion gewesen. Danke auch für eure Hilfe!

Ich danke den Goldzähnen und den Eilemeilern für ihre Freundschaft seit 9 bzw. 16 Jahren! Ich danke meiner Familie für ihren immerwährenden Rückhalt.

Abstract

The development of continuous flow reactors for heterogeneous biochemical reactions raises the question of efficient mixing and catalyst immobilization. Additively manufactured enzyme carriers as reactor internals offering promising advantages compared to conventional bead carriers in packed bed reactors. Additive manufacturing comes with the opportunity to design and prototype tailor-made structures, which induce directed and homogeneous flows, enable homogeneous enzyme utilization and an improved mass transport in a high reproducible manner.

To make use of these advantages, enzyme immobilization techniques need to be developed or adopted to additively manufactured materials for the universal application of enzymes, reaction systems and additively manufactured carrier materials, since they require distinct immobilization methods. Especially, in those cases where hybrid reactor concepts are aimed at, combining reaction and extraction in one apparatus requires a solution for reaction and extraction phase distribution as well as immobilization concepts. Precisely designed structures inserted as reactor internals can be used to control the multiphase hydrodynamics and to act as catalyst carriers simultaneously.

In this work, three reaction systems have been chosen as models to demonstrate immobilization techniques on additively manufacturable materials: this was the industrial relevant *Candida antarctica* Lipase B (hydrolysis of lauric acid ethyl ester), a purified tyrosinase from *Agaricus bisporus* available for purchase (oxidation of L-tyrosine), and the recombinant produced phenolic acid decarboxylase from *Mycobacterium colombiense* (decarboxylation of ferulic acid). The latter has further been used to exemplarily present the development of a hybrid reactor system, in which additively manufactured internals act as flow distributor for a second extraction phase and a enzyme carrier at once.

The material-independent polydopamine coating of polyethylene terephthalate (PET) changed the PET surface properties (water contact angle reduction from 73 ° to 30 °) and enabled the immobilization of *Candida antarctica* lipase B (CALB) on PET powder. When using 0.0702 g mL⁻¹ Immobilisate in water saturated ethyl dodecanoate solution, 80% of the dissolved water could be converted to dodecanonic acid and ethanol. Repetitive use of immobilizates led to identical conversions.

The immobilization of tyrosinase on additively manufacturable polyamide 12 (PA12) powder was realized by surface functionalization with glutaraldehyde. Immobilizates (500 mg mL⁻¹) catalyzed the full conversion of 1 mM L-tyrosine after less than 30 min with a starting activity of 0.323 ± 0.143 U m⁻².

In the case of ferulic acid (FA) decarboxylation and *in situ* extraction of the reaction product 4-vinylguaiacol (4-VG) with *n*-heptane, PET, polyamide 12 (PA12), metall alloys AlSi10Mg, Ti6Al4V, and stainless steel (1.4404) meet the required properties needed in the two-phasic system. However, the production of structure elements using selective laser sintering made of PA12, has proven to be favorable due to its high manufacturing resolution, chemical resistance and a high roughness advantageous for enzyme immobilization. The genetic supplementation of phenolic acid decarboxylase (PAD) with different spacer and anchor peptides by means of

the phosphorothioate-based ligase-independent gene cloning, enabled the adhesive, directed immobilisation to hydrophobic materials such as PET and PA12. The characterization of one enzyme-spacer-anchorpeptide fusion protein and its immobilizates was carried out with regard to their kinetic parameters. While fusion proteins have a K_m value of 3.4 ± 0.1 mM and a V_{max} of 64.4 ± 0.5 U mg^{-1} , a K_m value of 2.8 ± 0.7 mM and a V_{max} of 8.9 ± 0.7 U mg^{-1} (related to carrier mass) was determined for immobilizates. By screening combinations of different spacers and anchors, the surface-specific activity on PET powder could be increased from 0.39 ± 0.19 to 1.80 ± 0.41 U m^{-2} , as well as the conversion after 120 min from $19.2 \pm 3.7\%$ to $59.9 \pm 3.9\%$. The change in the hydrophobicity of the PET supports by immobilization of anchor peptide constructs enabled their use in an aqueous-organic system. Compared to the reaction without *n*-heptane, *in situ* extraction 88.0 ± 3.8 instead of $59.9 \pm 3.9\%$ FA could be converted in a batch with 0.5 g mL^{-1} immobilizates after 120 min (47% increased conversion).

The immobilization approach for PAD and the change in surface hydrophobicity were the basis for the development of a hybrid flow reactor concept for an efficient 4-VG synthesis. The selection of a suitable structure for the improvement of mass transport processes of a two-phasic system in a counter currently operated flow reactor was developed with the help of rapid prototyping and iterative evaluation of manufactured structures. Periodic open-cell structures (POCS) were designed and iteratively adjusted until fine dispersion of the extraction phase, small droplet diameters and an increased residence time of *n*-heptane volume elements for increased extraction efficiencies were reached.

Within a hybrid reactor, a POCS manufactured out of PA12 acts as enzyme carrier with immobilized PAD and as flow guiding structure for the countercurrent *in situ* product extraction with *n*-heptane. With implemented solvent recycling, 80% conversion of FA within 1 h was observed, while enzyme inhibition could be reduced by an efficient extraction of the product.

Kurzzusammenfassung

Strömungsrohre für chemische Synthesen bieten Vorteile wie hohe Durchsätze, geringen Materialeinsatz, niedrige Instandhaltungskosten, oder hohe Energieeffizienz, im Vergleich zu anderen Reaktorkonzepten. Die Entwicklung von Strömungsrohren für heterogene (bio)chemische Reaktionen wirft die Frage nach der Durchmischung von Reaktanden für einen effizienten Stofftransport und einer Immobilisierungsstrategie für den Katalysator auf. In dieser Hinsicht versprechen Reaktoren mit eingesetzten additiv gefertigten Enzymträgern gegenüber herkömmlichen, zufällig gepackten Festbettreaktoren einige Vorteile.

Die additive Fertigung bietet die Möglichkeit, innerhalb des sog. *Rapid Prototyping* maßgeschneiderte Strukturen zu entwerfen und schnell als Prototyp zu fertigen. Diese können Flüssigkeitsströme gezielt leiten und die Durchmischung und die Verteilung von Reaktanden induzieren. Hierdurch wird eine homogene Enzymnutzung und verbesserter Stofftransport auf reproduzierbare Weise ermöglicht.

Zur Nutzung dieser Vorteile wurden in dieser Arbeit drei Enzymimmobilisierungstechniken entwickelt oder adaptiert und auf additiv gefertigte Materialien übertragen. Anhand verschiedener Enzyme und Beispielreaktionen konnten so spezifische und universelle Techniken gezeigt werden, die sich für den Einsatz in Flussreaktoren mit additiv gefertigter Trägerstruktur eignen. Insbesondere die adhäsive Immobilisierung über materialspezifische Ankerpeptide, die flexibel für verschiedene Oberflächen und Enzyme angepasst werden kann, stellte hierbei eine universell einsetzbare, einfache Methode dar, die ohne Verwendung umweltschädlicher Chemikalien auskommt.

Für hybride Reaktoren, in denen Reaktion und Extraktion in einer Apparatur kombiniert werden, wurde ein Konzept entwickelt, in dem additiv gefertigte Strukturen als Reaktions- und Extraktionsphasenverteiler und gleichzeitig als Enzymträger fungieren. Hierzu diente die Decarboxylierung der Ferulasäure zu dem Wertstoff 4-Vinylphenol, welche durch das Enzym Phenolsäure Decarboxylase aus *Mycobacterium colombiense* katalysiert wird, als Modellreaktion. Präzise entworfene Strukturen, die als Verteilereinheit in einem im Gegenstrom betriebenen Strömungsrohr eingesetzt wurden, erlaubten die gezielte Steuerung der Mehrphasenhydrodynamik und zugleich die Immobilisierung von Enzymen für die Biokatalyse. Das *Rapid Prototyping* wurde hierbei für eine effiziente Entwicklung strömungsoptimierter Strukturen in einem Mehrphasenreaktionssystem eingesetzt, indem Strukturen schnell gefertigt, experimentell evaluiert und iterativ für ein gewünschtes Verhalten in einer *in situ* Extraktion angepasst wurden.

Zusammenfassend wurden für die Verwendung additiv gefertigter Strömungsführer und Enzymträger in biokatalytischen Flussreaktoren, Immobilisierungstechniken identifiziert und entwickelt. Weiterhin wurden Strukturen für einen im Gegenstrom betriebenen hybriden Bioreaktor mit *in situ* Produktextraktion mittels *Rapid Prototyping* entworfen und für die Dispersion einer organischen Extraktionsphase und als Enzymträger eingesetzt. Die gerichtete und spezifische Immobilisierung über Ankerpeptide an additiv gefertigte Materialien und die Entwicklung von Träger- und Strömungsführerstrukturen wurden gezeigt und bilden einen wesentlichen Entwicklungsschritt für intelligente Prozesslösungen für kontinuierlich betriebene Bioreaktoren.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Additive Fertigung.....	1
1.1.1	Vorteile und Prinzipien	1
1.1.2	Additive Fertigung in der Verfahrenstechnik.....	2
1.2	Enzymimmobilisierung	4
1.2.1	Immobilisierungsmethoden.....	5
1.3	Flüssig-Flüssig-Extraktion.....	9
1.4	Prozessintensivierung	14
1.5	Reaktionssysteme	15
1.5.1	Decarboxylierung der Ferulasäure	16
1.5.2	Hydrolyse von Laurinsäureethylester zu Laurinsäure.....	18
1.5.3	Oxidation von Tyrosin zu L-DOPA	19
1.6	Motivation und Zielsetzung.....	20
2	Materialien und Methoden.....	22
2.1	Mikrobiologische und biochemische Methoden.....	24
2.1.1	Herstellung von Fusionsproteinen.....	24
2.1.2	Proteinuntersuchung mit SDS-PAGE	26
2.2	Immobilisierungen.....	27
2.2.1	Herstellung von PET-PD-CALB-Immobilisaten	27
2.2.2	Herstellung von PA12-Tyr-Immobilisaten.....	27
2.2.3	Herstellung von PET-Anker-Spacer-PAD-Immobilisaten.....	28
2.2.4	Herstellung von PA12-DSI-GS-PAD-Immobilisaten	28
2.3	Verteilungsgleichgewichte	28
2.4	Additive Fertigung.....	28
2.5	Assays zur Reaktionsverfolgung	29
2.5.1	Aktivitätstests für freie Enzyme	29
2.5.2	Aktivitätstests für Immobilisate	29
2.6	Analytik	30
2.6.1	Proteinkonzentrationsbestimmung mit Plattenleser	30
2.6.2	Konzentrationsbestimmungen mit HPLC	30
2.6.3	4-VG-Konzentrationsbestimmung mit GC	33
2.6.4	4-VG-Konzentrationsbestimmung mit Photometer	34
2.7	Fehlerabschätzung	34
3	Immobilisierung an additiv fertigbare Materialien	36

3.1	Materialüberblick.....	37
3.2	Charakterisierung verwendeter Materialien	38
3.3	Immobilisierungsmethoden für additiv fertiggbare Materialien	42
3.4	Immobilisierung an einer Polydopaminbeschichtung	44
3.5	Kovalente Immobilisierung von Tyrosinase an Polyamid 12	48
3.6	Adhäsive Phenolsäure-Decarboxylase Immobilisierung mittels Ankerpeptiden	51
3.6.1	Immobilisierungskonzept	51
3.6.2	Design of Experiments zur Optimierung von Immobilisierungsparametern	54
3.6.3	Sequenzvariation zur Optimierung der Immobilisatperformance	56
3.6.4	Charakterisierung optimierter Fusionsproteine und Immobilisate.....	60
4	Flüssig-Flüssig-Extraktion von 4-Vinylguaiacol.....	64
4.1	Verteilungsgleichgewichte und Eigenschaften von Reaktanden.....	64
4.1.1	Ferulasäure	64
4.1.2	4-Vinylguaiacol	65
4.2	<i>In situ</i> Extraktion von 4-Vinylguaiacol	67
4.3	<i>In situ</i> Extraktion bei Einsatz von Immobilisaten	68
4.4	Gegenstromextraktion mit additiv gefertigten Strukturen.....	71
5	Gegenstrom-Reaktivextraktor mit additiv gefertigter Enzymträgerstruktur.....	80
5.1	Additive Fertigung von Enzymträger- und Strömungsführerstrukturen	80
5.2	Immobilisierung an additiv gefertigten Trägerstrukturen.....	82
5.3	Strömungsreaktor mit additiv gefertigter Enzymträgerstruktur im Vergleich	84
5.4	Additiv gefertigter Bioreaktor mit integriertem ISPR im Gegenstrom	87
6	Diskussion und Ausblick	90
6.1	Additiv gefertigte Enzymträger- und Strömungsführerstrukturen	90
6.2	Potentiale: Ankerpeptidimmobilisierungen und additiv gefertigte Enzymträger.....	93
7	Zusammenfassung.....	96
8	Anhänge	99
	Literatur.....	103

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

3D	dreidimensional
4-VG	4-Vinylguaiacol
17X	Spacer mit Aminosäuresequenz: AEAAAKEAAAKEAAKA
ABS	Acrylnitril-Butadien-Styrol-Copolymer
AF	additive Fertigung
AP	Ankerpeptide
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
AS	Aminosäure
BET	Stephen Brunauer, Paul Hugh Emmett und Edward Teller
CAD	engl. <i>computer-aided design</i> (computergestütztes Konstruieren)
CALB	<i>Candida antarctica</i> Lipase B
CBM	Spacer mit Aminosäuresequenz: PPGGNRGTTTTTRRPATTTGSSSPGP
CFD	engl. <i>computational fluid dynamics</i> (numerische Strömungsmechanik)
CFE	eng. <i>cell free extract</i> (zellfreies Extrakt)
CLEAs	engl. <i>cross-linked enzyme aggregates</i> (Quervernetzte Enzymaggregate)
DOE	engl. <i>design of experiments</i> (Statistische Versuchsplanung)
DSI	Ankerpeptid: Dermaseptin SI
EGFP	engl. <i>enhanced green fluorescent protein</i> (verstärkt grün fluoresz. Protein)
ESD	engl. <i>equivalent spherical diameter</i> (kugeläquivalenter Durchmesser)
FA	trans-Ferulasäure
FC	engl. <i>flow chemistry</i> (Fließchemie)
GA	Glutaraldehyd
GOx	Glucose-Oxidase
GS	Spacer mit Aminosäuresequenz: (GGGGS) ₃
HRP	engl. <i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
KP _i	Kaliumphosphat Puffer
IMS	Institut für Mehrphasenströmung
ISPR	lat. <i>in situ</i> engl. <i>product removal</i> (Produktentfernung unmittelbar am Ort)
LAS	lineare Alkylbenzolsulfonate
LCI	Ankerpeptid: Liquid Chromatography Peak I
LCVD	engl. <i>laser chemical vapor deposition</i> (chemische Gasphasenabscheidung)
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
LOC	engl. <i>lab-on-a-chip</i> (Chiplabor)
LOx	Laktat-Oxidase
L-TYR	L-Tyrosin
PA12	Polyamid 12
PAD	Phenolsäure-Decarboxylase
PBR	engl. <i>packed bed reactor</i> (gepackter Bettreaktor)
PD	Polydopamin
PET	Polyethylenterephthalat
PLA	engl. <i>polylactic acid</i> (Polymilchsäure)
PLICing	Phosphorothioat-basierten Ligase unabhängigen Klonierung

REM	Rasterelektronenmikroskopie
RM	engl. <i>rapid manufacturing</i> (schnelle Fertigung)
POCS	engl. <i>periodic open-cell structure</i> (periodisch offenzellige Struktur)
RP	engl. <i>rapid prototyping</i> (schneller Modellbau)
RSM	engl. <i>response surface model</i> (Wirkungsflächendesign)
RT	engl. <i>rapid tooling</i> (schneller Werkzeugbau)
RWTH	Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen
SLA	Stereolithographie
SLS	selektives Lasersintern
TA2	Ankerpeptid: Tachystatin A2
TON	engl. <i>turnover number</i> (Zykluszahl)
TS	Temperaturstabilität
TUHH	Technische Universität Hamburg
Tyr	Tyrosinase

Symbole

A	m^2	Phasengrenzfläche
a_m	$\text{m}^2 \text{g}^{-1}$	trägermassenspezifische Oberfläche
a_{V_R}	m^{-1}	reaktionsvolumenspezifische Trägeroberfläche
c	mol m^3	Konzentration
$c_{0,s}$	mM	Anfangssubstratkonzentration
c_{CFE}	mg mL^{-1}	Proteinkonzentration im CFE
C_{M_i}	mol m^3	Bulkkonzentration in der Phase i
C_{P_i}	mol m^3	Konzentration an der Phasengrenzfläche in der Phase i
D	$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$	Diffusionskoeffizient
J	$\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Molenstromdichte
K_i	mM	Inhibierungskonstante
K_M	mM	Michaelis-Menten Konstante
K_N	-	Gleichgewicht eines Solutes in zwei Flüssigphasen nach Nernst
m_T	g	Trägermasse
\dot{n}_i	mol s^{-1}	diffusiver Stofffluss der Komponente i
V	mL	Volumen
V_{\max}	U mg^{-1}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
V_R	mL	Reaktionsvolumen
x	m	Länge einer Diffusionsstrecke
$X_{t=120 \text{ min}}$	%	erreichter Umsatz nach 120 min
β_i	m s^{-1}	Stoffübergangskoeffizient des Stoffes i
δ	m	Grenzschichtdicke
v_{0,a_i}	U m^{-2}	immobilisatoberflächenspezifische Anfangsaktivität
v_{0,m_i}	U mg^{-1}	immobilisatmassenspezifische Anfangsaktivität
v_{0,m_P}	U mg^{-1}	proteinmassenspezifische Anfangsaktivität
v_{0,V_R}	U mL^{-1}	reaktionsvolumenspezifische Anfangsenzymaktivität

1 Einleitung

Die Thematik der vorliegenden Dissertation gliedert sich in die Themenschwerpunkte der additiven Fertigung (1.1), der Immobilisierungskonzepte (1.2), der Flüssig-Flüssig-Extraktion (1.3), der Prozessintensivierung (1.4) und untersuchter Reaktionssysteme (1.5). In der folgenden Einleitung werden Grundlagen und aktuelle Forschungen über das jeweilige Themengebiet vorgestellt, aus welchen die Motivation und Zielsetzung der Arbeit (1.6) hervorgeht.

1.1 Additive Fertigung

Die Grundlagen additiver Fertigung, mit Fokus auf ihre Vorteile und Prinzipien werden in Abschnitt 1.1.1 erläutert. Anschließend wird der Bezug zu ihrer Anwendung in der Verfahrenstechnik (1.1.2) hergestellt.

1.1.1 Vorteile und Prinzipien

Der Begriff „Additive Fertigung“ (AF) umfasst Methoden der Materialverarbeitung, bei denen das Material selber additiv, also schichtweise, auf ein Supportmaterial aufgetragen wird. Als Grundlage hierfür dienen digitale, dreidimensionale (3D) Modelle, die mittels physikalischer Prinzipien in materielle Geometrien transferiert werden¹. Damit unterscheidet sich die AF grundsätzlich von konventionellen Fertigungsverfahren wie zum Beispiel Sägen, Feilen, Drehen oder Fräsen, denen die Abtragung von Material aus einem Block zugrunde liegt. Mit diesen Unterschieden gehen verschiedene Vorteile einher. Dadurch, dass in der AF im Gegensatz zu subtraktiven Methoden kein Material entfernt wird, entsteht kein Verschnitt, welcher zur Wiederverwendung recycelt werden müsste. Der Materialeinsatz in der AF ist also geringer. Dieser Materialeinsatz kann weiter reduziert werden, indem nur so viel Material verwendet wird, wie für bestimmte Eigenschaften des zu fertigenden Teils benötigt wird. Durch die Zugänglichkeit des zu entfernenden Materials im zu bearbeitenden Block wäre die Einsparung des Materials mit konventionellen Fertigungsmethoden limitiert. Mittels schichtweiser Auftragung können jedoch gezielt Bereiche der 3D-Struktur zum Beispiel durch Erzeugen von Hohlräumen ausgespart werden. Aufgrund der schichtweisen Auftragung der AF können somit auch Strukturen realisiert werden, die mit herkömmlichen Methoden nicht oder nur unter hohem Aufwand zu realisieren sind. Ein weiterer Vorteil der AF ist die enge Verknüpfung mit computergestütztem Design (CAD) von zu fertigenden Teilen. Die direkte Übersetzung des generierten 3D-Modells in den Code für die jeweilige Maschine, welche die AF durchführt, erlaubt die schnelle und einfache Verwirklichung eines geplanten 3D-Designs in ein materielles Bauteil.

Die Entwicklung der AF startete 1986 mit der Erfindung eines Apparates für die Produktion von dreidimensionalen Strukturen durch Stereolithographie (SLA) von Charles W. Hull². Aus diesem Patent wurde der erste kommerziell erwerbbar 3D-Drucker, der SLA-250, entwickelt³. Bis heute wurden verschiedene additive Fertigungsverfahren entwickelt, die auf unterschiedlichen Prinzipien beruhen. Abhängig vom Aggregatzustand des Ausgangsmaterials

und des Fertigungsprinzips können additive Fertigungsverfahren klassifiziert und nach Gebhardt (2012)¹ in sieben Methoden eingeteilt werden. (Abbildung 1.1)

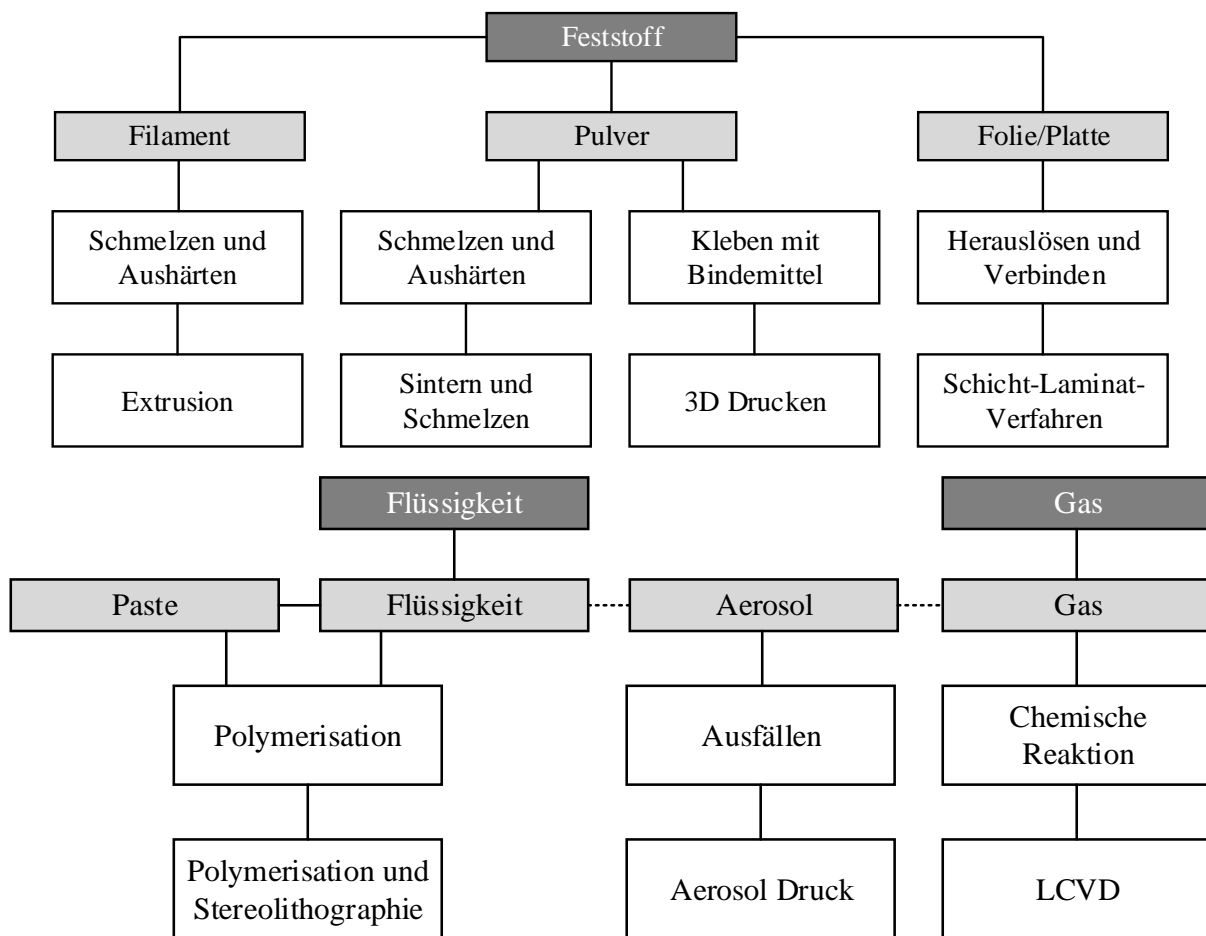


Abbildung 1.1: Klassifizierung von additiven Fertigungsverfahren in Abhängigkeit des Aggregatzustandes des Ausgangsmaterials und des Fertigungsprinzips nach Gebhardt¹; LCVD = Laser Chemical Vapor Deposition, chemische Gasphasenabscheidung mittels Laser

Die Vielfältigkeit der AF, die aus Abbildung 1.1 hervorgeht, sowie deren o.g. Vorteile, begründen den Einsatz der Technologie in unterschiedlichen Bereichen. Neben der Nutzung im Hobbybereich und in Branchen wie des Flugzeugbaus, des Bauwesens, oder der Chemieindustrie findet die AF auch vermehrt Anwendung im Bereich der Forschung. Hierbei spielt insbesondere die schnelle Erzeugung von 3D-Strukturen zu Testzwecken mittels AF, dem sog. „Rapid Prototyping“ (RP), eine wichtige Rolle. Neben dem RP wird die AF jedoch auch genutzt, um schnell Werkzeuge und Werkzeugteile, Lehren oder Formen zu erzeugen. Dieser Bereich wird mit dem Term „Rapid Tooling“ (RT) beschrieben. Das Produzieren von Endprodukten durch Produktionsdrucker wird als „Rapid Manufacturing“ (RM) bezeichnet.¹

1.1.2 Additive Fertigung in der Verfahrenstechnik

Beim Einsatz von Strömungsreaktoren in der Verfahrenstechnik ist die gezielte Führung aller an der Reaktion beteiligten Komponenten von großer Bedeutung. Diese wird dadurch beeinflusst, wie schnell ein Medium durch den Reaktor geführt wird und wie die Geometrie des

Reaktors beschaffen ist. Sowohl in Extraktions- oder Destillationsprozessen, als auch in homogenen und heterogenen Katalysen werden Reaktoreinbauten in Strömungsrohren eingesetzt, um die Durchmischung verschiedener Phasen oder Komponenten in einer Phase zu intensivieren oder die Kontaktzeit der Phasen zu erhöhen. Die Raum-Zeit-Ausbeute vieler Strömungsreaktoren hängt von der Effizienz des Stofftransports in dem Reaktor ab. Insbesondere bei heterogenen Katalysen ist die Erreichbarkeit des Katalysators durch Substrate und seine homogene Ausnutzung elementar, um eine hohe Katalysatoreffizienz zu erreichen.

Die Optimierung der gezielten Führung von Reaktionskomponenten und das Erreichen spezifischer Strömungsprofile sind Hintergründe für die Anwendung der AF in der Verfahrenstechnik. Hierbei bieten die schnelle Fertigung, geringe Materialkosten und die generierbare Auflösung von 3D-Strukturen wesentliche Vorteile gegenüber vieler subtraktiver Verfahren. So sind additiv gefertigte Mikromischer mit einer Produktionszeit unter 12 Minuten und Materialkosten von 1 \$ pro Mischer⁴, oder Chip labore (LOC) mit integrierten Mikromischern und Entwicklungskosten von 0,57 US\$ pro Gerät⁵, entwickelt worden. Auch die selektive Feststoffextraktion von Spurenelementen aus Meerwasser zum Zweck ihrer Analyse wurde durch additive Fertigung realisiert und stellt nicht nur ein Beispiel für die Vereinfachung der Herstellung experimenteller Geräte mittels AF dar, sondern auch für die Möglichkeit der Vereinfachung der Kombinationen verschiedener Materialien in einem Gerät⁶. Dass feine, geometrische Strukturen auf Basis von CAD Modellen reproduzierbar additiv gefertigt werden können und somit mit geringen Investitionskosten strukturierte Packungen für Säulen in weiten Anwendungsfeldern der Filtration, Adsorption und der Katalyse generiert werden können, haben Fee *et al.* (2014) gezeigt⁷. Sie fertigten geordnete Betten mit verschiedenen Geometrien und analysierten die Verweilzeitverteilung bei ihrer Durchströmung mit Markern, sowie deren radiale und fraktionelle Verteilung im Bett. Im Mikromaßstab wurden bereits Flussreaktoren aus Acrylnitril-Butadien-Styrol-Copolymer (ABS) additiv gefertigt und zur Entwicklung eines Gerätes genutzt, welches mittels der kovalent immobilisierten Enzyme Glucose-Oxidase (GOx) und Laktat-Oxidase (LOx) die dynamische *in vivo* Onlineverfolgung extrazellulärer Glucose und Laktose in Rattenhirnen ermöglichte⁸. Hierbei wurde sich zu Nutze gemacht, dass Glucose bzw. Lactose in den jeweiligen Reaktoren zur kontinuierlichen Wasserstoffperoxid-Produktion führt, welches ein Reagenz mittels freier Meerrettich-Peroxidase (HRP) in ein fluoreszierendes Produkt umwandelt. Über die Intensität der Fluoreszenz wurde so die Bestimmung der Konzentration an Glucose/Lactose und somit die unmittelbare Nachverfolgung der Reaktion des Rattenhirns auf die Perfusion des Hirns mit Kaliumionen über eine Mikrodialyse möglich.

Die hier erwähnten Beispiele sind nach in Abschnitt 1.1.1 gegebener Definition dem RP und dem RT zuzuordnen. Sie zeigen, wie durch die additive Fertigung kostengünstig und in kurzer Zeit Geräte oder 3D-Modelle zum Untersuchen verschiedener Phänomene in der Verfahrenstechnik bereitgestellt werden. Weiterhin bilden sie die Basis für die Entwicklung von additiv gefertigten Strukturen zur industriellen Anwendung in der Verfahrenstechnik im Bereich des RM. Wie eine solche Anwendung zukünftig aussehen könnte, haben Kazenwadel und Biegert *et al.* (2016) gezeigt, indem sie ein additiv gefertigtes modulares Reaktorkonzept vorstellten, mit dem sie eine enzymatische Kaskadenreaktion in separaten Reaktoren und implementierter Temperatur- und pH Steuerung vorstellten⁹. Dieses ist zwar dem RP

zuzuordnen, zeigt jedoch die potentielle Anwendbarkeit als Reaktortechnologie und deren Produktion im RM.

Eine Zusammenfassung und einen Ausblick darüber, wie additive Fertigung in der „Flowchemistry“ (FC) eingesetzt wird und welche Potentiale sie birgt, ist in einem umfangreichen Review von Parra-Cabrera *et al.* (2018) nachzulesen. In diesem wird insbesondere deutlich, dass additive Fertigung in der Lage dazu ist, die Lücke zwischen Stofftransporttheorien und experimentellen Aufbauten zu schließen, da mit ihr hochaufgelöste Strukturen reproduzierbar und kostengünstig gefertigt werden können, die zuvor in „computational fluid dynamic“ (CFD) Modulationen theoretisch untersucht wurden. Ein Ziel sei es, dadurch optimierte Reaktorgeometrien zur Kontrollierung der Fluidynamik und Temperaturgradienten zu generieren. Hierbei liege ein Hauptaugenmerk auf der Intensivierung von heterogen katalysierten Reaktionen, da diese heutzutage bei Stoff-, Moment- oder Energietransport limitiert seien. Auch die Intensivierung von komplexen Reaktoren, wie solche mit mehrphasigen Systemen, sei ein potentielles Anwendungsfeld für die AF. Werde die AF in der FC eingesetzt, spiele die Wahl des Materials und der Fertigungstechnik eine elementare Rolle, da hiervon die Temperaturstabilität, chemische Beständigkeit und die Auflösung der Reaktorstrukturen abhängen. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte, sei es zum Beispiel möglich durch ideale Flussführung einen hohen Grad an Mikromischung zu realisieren und somit Reaktionen zu beschleunigen, was von Grande *et al.* (2015) gezeigt worden sei^{10,11}

Die vorliegende Arbeit knüpft an die postulierte Option der Prozessintensivierung von ein- und mehrphasigen heterogenen Katalysen in der FC durch AF an. Es sollen die Möglichkeiten dargestellt werden die AF gewinnbringend sowohl in Bezug auf das RP, als auch das RM in der heterogenen, enzymatischen Biokatalyse einzubringen. Hierzu wurden verschiedene Modellreaktionssysteme ausgewählt, welche im Abschnitt 1.5 beschrieben werden. Um heterogene, enzymatische Reaktionen durchführen zu können, bedarf es Immobilisierungstechniken, die an das genutzte Enzym und das verwendete Material angepasst sind. Auf diese wird im folgenden Abschnitt 1.2 eingegangen.

1.2 Enzymimmobilisierung

Immobilisierungen werden durchgeführt, um höhere operative Stabilitäten und eine einfachere Wiederverwendung der Enzyme zu erzielen und eine Verunreinigung von Produktströmen zu vermeiden¹²⁻¹⁴. In der Industrie werden Enzyme meistens auf porösen Feststoffen, wie zum Beispiel Glucose-Isomerase auf porenkontrolliertem Aluminium¹⁵, Lipase auf Polymeren wie Lewatit VP OC 1600¹⁶ oder Accurell MP 1000¹⁷ immobilisiert. Zwar weisen poröse Träger hohe spezifische Oberflächen (z.B. $100 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$)¹⁵ auf, ihre Nutzung kann jedoch Diffusionslimitierungen mit sich bringen¹³. In der FC kann der Einsatz von konventionellen Trägern in Festbettreaktoren (PBR) zusätzlich zu hohen Druckverlusten¹⁸, inhomogenen Flüssigkeitsströmen¹⁹ und ungewollten Wandeffekten^{20,21} führen. Diese negativen Effekte gilt es durch den gezielten Einsatz additiv gefertigter Träger zu minimieren. Im Weiteren werden die Möglichkeiten zur Immobilisierung aufgeführt und die in dieser Arbeit verwendeten Methoden kategorisiert und erläutert.

1.2.1 Immobilisierungsmethoden

Grundsätzlich lassen sich Immobilisierungen von Enzymen nach Buchholz, Kasche und Bornscheuer in drei Techniken klassifizieren²². Nach diesen können Enzyme entweder untereinander vernetzt, auf Trägern gebunden oder in einem anderen Material eingeschlossen werden (Abbildung 1.2).

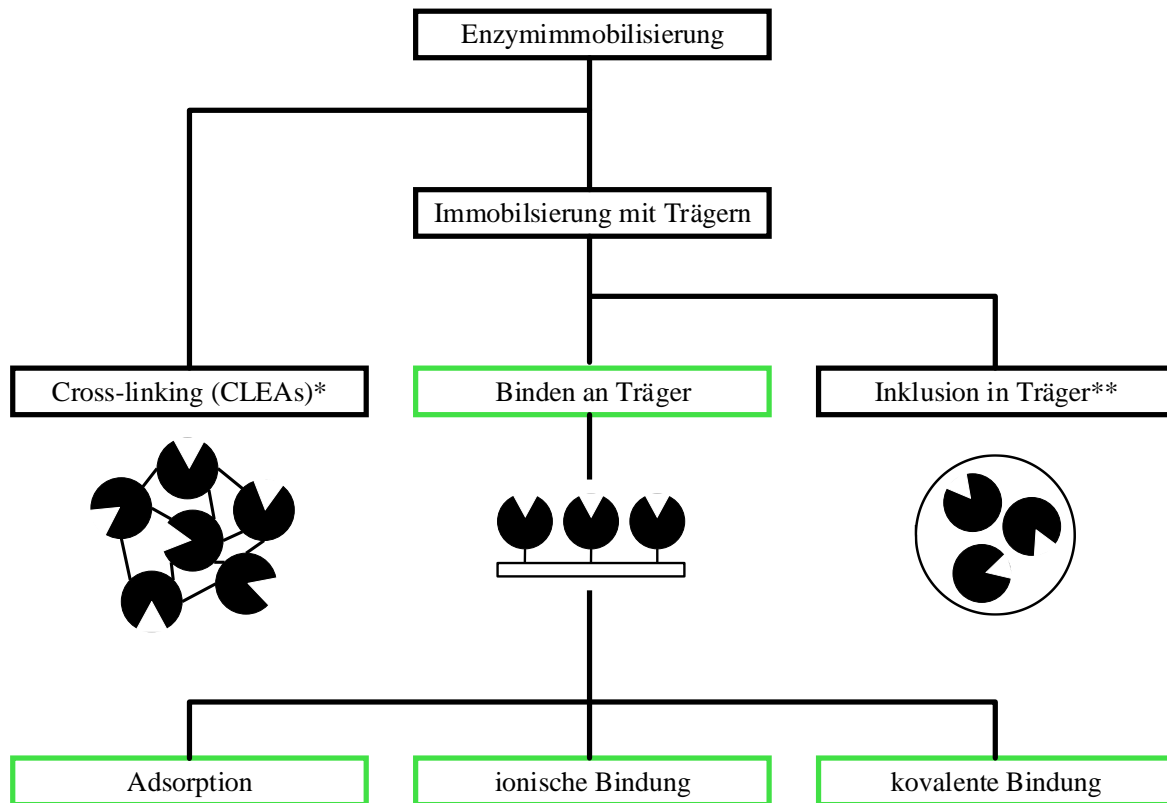


Abbildung 1.2: Prinzipien der Enzymimmobilisierung nach Buchholz, Kasche und Bornscheuer²². Hervorgehobene Prinzipien werden in der vorliegenden Arbeit betrachtet. *Cross linked enzyme aggregates (CLEAs) **oder in Mikroorganismen

Diese Arbeit behandelt die Bindung an additiv gefertigte Strukturen als Immobilisierungsmatrix. Es könnten auch die Inklusionstechnik oder die Produktion von CLEAs in Zusammenhang mit der additiven Fertigung Anwendung finden. Allerdings sind diese Techniken durch die Materialauswahl (Hydrogele/Agarosegele können zum Beispiel für die Einbettung von Enzymen genutzt werden) und oftmals durch die benötigte Temperaturstabilität (Drucktemperatur von 60 °C für Hydrogele) von Enzymen begrenzt²³. Für eine umfangreich anwendbare Technologie in der Biokatalyse bedarf es Träger, die auch für temperaturinstabile Enzyme und in Gegenwart von unterschiedlichen Lösungsmitteln einsetzbar sind. Weiterhin sollten diese eine mechanische Stabilität aufweisen, sowie in hoch aufgelöste Strukturen gefertigt werden können, um definierte Flüssigkeitsströme zu generieren. Daher werden weder CLEAS, noch Enzyminklusion in dieser Arbeit weiter betrachtet.

Der Abbildung 1.2 ist zu entnehmen, dass sich die Immobilisierung an Trägern in drei Prinzipien aufteilt: der Adsorption, der ionischen Bindung und der kovalenten Bindung. In dieser Arbeit werden die Adsorption und die kovalente Bindung an verschiedenen additiv gefertigten Materialien untersucht und deren Prinzipien im Folgenden erläutert. Der Begriff der

Adsorption bezeichnet die Anbindung an einen Feststoff über physikalische Wechselwirkungen, wie zum Beispiel Van-der-Waals-Kräfte. Allerdings bilden sich bei der als adsorptiv bezeichneten Enzymimmobilisierung oftmals auch hydrophobe Wasserstoffbrückenbindungen und heteropolare (ionische, vgl. Abbildung 1.2) Bindungen aus. In dieser Arbeit wird daher auch der allgemeinere Begriff der Adhäsion (lat. *adhaerere* = anhaften) als Beschreibung der Anbindung durch mehrere, verschiedene Wechselwirkungen verwendet.

1.2.1.1 Adsorption

Immobilisierungsmethoden sind meistens nicht auf jede Kombination von Material und Enzym übertragbar^{24,25}. Während kovalent immobilisierte Enzyme nur durch chemische Reaktionen gelöst werden können, bietet die adsorptive Immobilisierung die schnelle Enzymerneuerung nach der Deaktivierung. Sie basiert auf ausschließlich physikalischen Wechselwirkungen zwischen Oberfläche und Enzym. Adsorptive Immobilisierungstechniken können auf ein weites Spektrum an Materialien angewendet werden²⁶. Ein Beispiel für gezielte adsorptive Immobilisierung ist die Nutzung von oberflächenspezifisch bindenden Ankerpeptiden (AP), die kovalent an Enzyme gebunden werden können oder genetisch mit ihnen fusioniert werden. Gerichtete nicht-kovalente Immobilisierungen von Proteinen und Enzymen mittels AP wurden für verschiedene Oberflächen wie beispielsweise Polypropylen^{27,28}, Kohlenstoff²⁹, Gold^{30,31} und Chlor-dotiertes Polypyrrol³² gezeigt. Für den Abbau von Mikroplastik zum Beispiel wurde Cutinase an Polyurethane immobilisiert, indem sie zuvor mit einem an Polyurethane bindenden Ankerpeptid fusioniert wurde. Hierdurch konnte Polyurethan um das 6,6 fache schneller abgebaut werden, als durch den Wildtyp der Cutinase ohne Ankerpeptid³³. Die Immobilisierung von der Monooxygenase Cytochrome P450 BM3 (CYP102A1) aus *Bacillus megaterium* auf glatter Goldoberfläche wurde durch die Fusion von Gold-bindenden AP (HighSP-AP und Cys-AP) realisiert.³⁴ Für ein kationisches antimikrobielles Peptid aus *Bacillus subtilis*, welches LCI³⁵ genannt wird, wurden adhäsionsvermittelnde Eigenschaften an Polypropylen nachgewiesen und ermöglichten daher die Immobilisierung von Laccase CueO an Mikrotiterplatten³⁶. Die Bindungsstärke von Ankerpeptiden kann durch gerichtete Evolution von Ankerpeptiden in Lösungsmitteln wie Alkylbenzolsulfonate (LAS) und Triton X-100 erhöht werden. Dies wurde für die Ankerpeptide Tachystatin A2⁴⁶ (TA2) and LCI^{28,37} gezeigt. Die Nutzung von verschiedenen Aminosäuresequenzen als Abstandshalter zwischen AP und Enzym kann die Aktivität des Enzyms beeinflussen, indem seine Flexibilität und Ausrichtung erhöht bzw. angepasst wird³⁸. Die Bindung von Enzymen über AP werden oftmals als „adhäsiv“ und die verwendeten AP als „Adhäsionsvermittler“ bezeichnet²⁷.

1.2.1.2 Kovalente Bindung

Die kovalente Anbindung von Enzymen an einen Träger ist gleichzusetzen mit einer chemischen Bindung zwischen funktionalen Gruppen des Trägers und des Enzyms. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie nicht durch physikalische Kräfte gelöst werden können. Daraus folgt, dass nach (natürlicher) Deaktivierung des gebundenen Enzyms entweder der Träger ausgetauscht, die Oberfläche vom deaktivierten Enzym chemisch bereinigt und neu beladen, oder aktives Enzym auf die deaktivierten Enzyme aufgebracht werden muss, um eine

Reaktion weiter zu katalysieren. Für die additive Fertigung stellt Polyamid 12 (PA12) ein Material dar, welches in hoher Auflösung³ über das selektive Lasersintern (SLS) gefertigt werden kann. Trotzdem entstehen hierbei raue Oberflächen, die für viele Anwendungen ungewollt sind. Diese bieten für die Verwendung als Enzymträgermaterial jedoch das Potential einer erhöhten Oberfläche³. Pahujani *et al.* konnten über die Hydrolisierung von Partikeln aus Polyamid 6 mit 6 N Chlorwasserstoff und der anschließenden Funktionalisierung mit Glutaraldehyd die kovalente Immobilisierung einer Lipase aus *Bacillus coagulans* realisieren. Hierbei konnten Immobilisierungsausbeuten von 70 % und Aktivitäten der immobilisierten Lipase von 1,2 U g⁻¹ erzielt werden³⁹. Die Übertragung des Anbindungsprinzips auf additiv fertigbares PA12 soll in dieser Arbeit untersucht werden und die Möglichkeiten der konventionellen Methodik zur kovalenten Enzymanbindung an Polymerträgern für additiv gefertigte Materialien zeigen. Eine kovalente Anbindung kann auch an beschichtetem Material erfolgen, wenn die Beschichtung die benötigten chemischen Bindungsstellen aufweist. Nachfolgend wird die in dieser Arbeit untersuchte Anbindung an einer Polydopaminbeschichtung erläutert.

1.2.1.3 Anbindung an mit Polydopamin beschichteten Trägern

Die Funktionalisierung von Oberflächen durch die Beschichtung mit Polydopamin (PD) ist vielfach in der Literatur beschrieben⁴⁰⁻⁴². Der Vorteil in Bezug auf die Anwendung auf additiv gefertigten Strukturen liegt darin, dass dünne PD Schichten auf nahezu allen Oberflächen^{43,44} ohne großen Aufwand erzeugt werden können⁴⁵. So kann diese Methodik für ein breites Spektrum additiv fertiger Materialien verwendet werden, um eine funktionale Oberfläche zu erzeugen. Das Prinzip der Beschichtung beruht dabei auf einer Polymerisierung von Dopamin, die durch eine Erhöhung des pH-Wertes in der Dopaminlösung initiiert werden kann. Die Polymerisation findet dann in der Lösung und an der Oberfläche von eingetauchten Feststoffen statt (Abbildung 1.3).

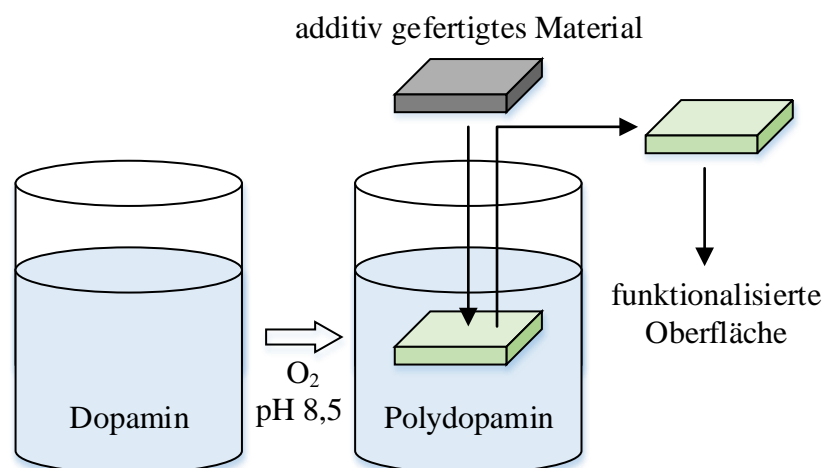


Abbildung 1.3: Prinzip der Beschichtung von Oberflächen mit Polydopamin nach Waite⁴⁰

Auf molekularer Ebene läuft die Polymerisation nach der Ausbildung von Chinongruppen am Dopamin nach der Schiff'schen Base Substitution, der Michael-Addition, der intramolekularen Zyklisierung, oder der Bildung von Aryl-Aryl Bindungen ab⁴⁶ (Anhang, Abbildung 8.2). Bis

zur Polymerisierung durchläuft das Dopamin chemische Reaktionsschritte bis zum 5,6-Dihydroxyindol (Abbildung 1.4).

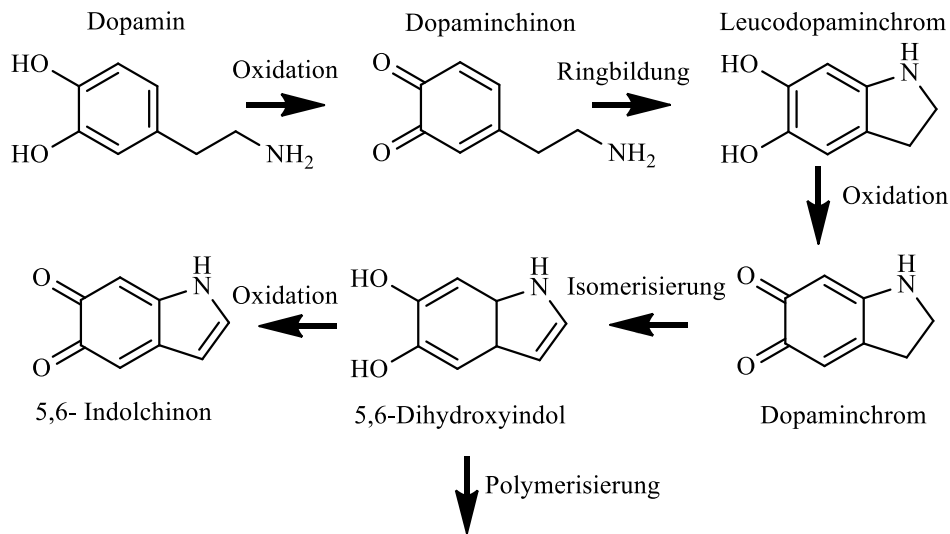


Abbildung 1.4: Chemische Reaktionsschritte zur Bildung von Polydopamin nach dem Eumelanin Modell aus Salazar *et al.*⁴⁷ und Hong *et al.*⁴⁸

Die Polymerisierung ausgehend vom 5,6-Dihydroxyindol (postulierte Reaktionswege im Anhang zu finden, Abbildung 8.1) unter basischem pH geschieht zeitgleich in der Lösung und an der Oberfläche des sich in der Lösung befindenden Materials, an der das PD adhäsiv bindet⁴⁹. Das Polydopamin exponiert einen hohen Anteil an Catechol- und Amingruppen⁴³ auf der beschichteten Oberfläche und weist dadurch einen hydrophilen Charakter auf^{41,50}, was zum Beispiel über die Messung verringerter Wasserkontaktwinkel nachzuweisen ist^{41,43}. Dies zeigten Wang *et al.* mittels der Beschichtung von Fasern aus Polyethylenterephthalat (PET) mit PD. Bereits gering konzentrierte Dopaminlösungen reichten hier aus, um eine Polydopaminschicht mit hoher Hydrophilität zu erzielen⁴¹. Nach einer Beschichtung von Materialien mit PD kann die Oberfläche für verschiedenste Anwendungen genutzt werden. Die für die Biokatalyse relevante Anbindung von Proteinen ist vielfach in der Literatur beschrieben. Erfolgreiche Beispiele stellen hierbei die Anbindung des Bovines Serumalbumin⁵¹, Lipase⁵², Lysostaphin⁵³, oder der Alpha-Amylase⁵⁴ dar. Die Prinzipien der Anbindung der Enzyme sind beschrieben als nukleophile Addition der SH- und NH₂- Aminosäureresten und Chinongruppen des Polydopamins⁵⁴, als adhäsive Wechselwirkungen⁵² und kovalente Bindungen über die Michael-Addition und die Schiff'sche Base Substitution (Abbildung 1.5)^{45,55}.

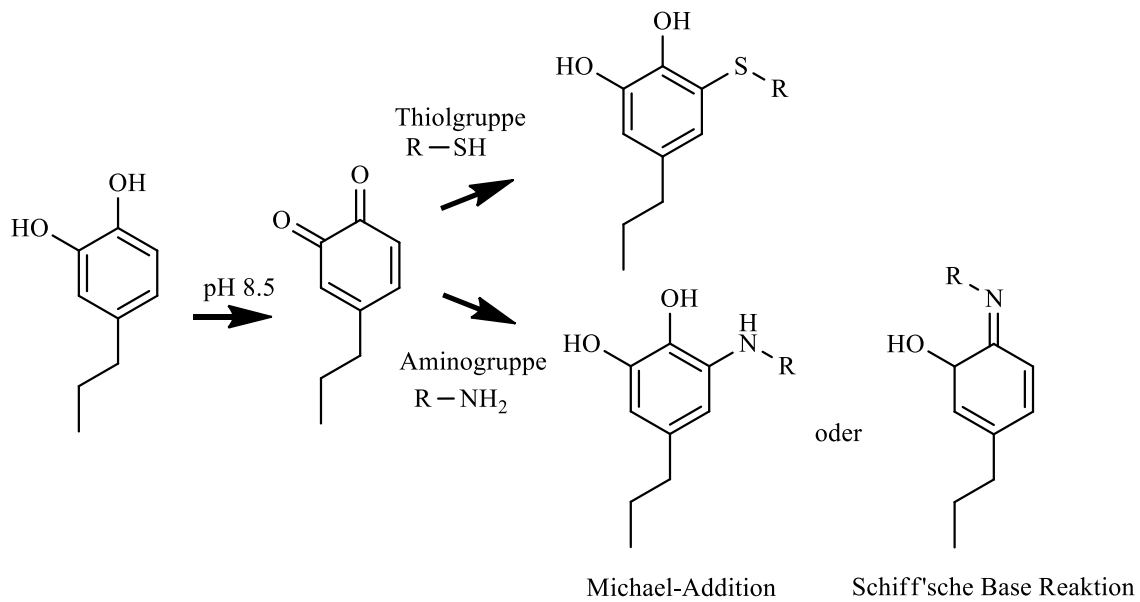


Abbildung 1.5: Kovalente Anbindung von Thiol und Aminogruppen von Enzymen an Polydopamin über Michael Addition und Schiff'sche Base Reaktion nach Salazar *et al.*⁴⁷

Neben der Übertragung der hier vorgestellten Immobilisierungskonzepte auf additiv fertigmache Materialien, ist die in 1.1.2 erwähnte Prozessintensivierung biokatalytischer Reaktoren (Abschnitt 1.4) ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Der Fokus wird hierbei auf die Kombination von Reaktion und Extraktion in einem Apparat gelegt, bei dem die *in situ* Extraktion eines Reaktionsproduktes durch Einsatz der AF optimiert wird. Die Grundlagen der Extraktion, die für die Entwicklung von AF Strukturen zur Optimierung von Extraktionen in Strömungsrohren benötigt werden, sind im folgenden Abschnitt 1.3 erläutert.

1.3 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Das Trennen mindestens einer Komponente aus einer Trägerstoffphase mit einem Lösungsmittel oder Extraktionsmittel wird als Extraktion (lat. *Extrahere* = herausziehen) bezeichnet. Die Trägerstoffphase kann hierbei gasförmig, flüssig, oder fest sein, während die Extraktionsphase flüssig oder fest ist. Der jeweilige Aggregatzustand ist namensgebend für den Extraktionstyp. So ergeben sich vier verschiedene Extraktionsarten: Gasförmig-Flüssig-, Gasförmig-Fest-, Flüssig-Flüssig- und Fest-Flüssig-Extraktion. Die Flüssig-Flüssig-Extraktion ist eine häufig verwendete Extraktionsmethode innerhalb thermischer Trenntechniken und stellt eine Alternative zur Rektifikation dar. Besonders zur Trennung von temperaturempfindlichen Komponenten, Naturstoffen und Metallionen, oder zur Trennung von Azeotropen wird die Flüssig-Flüssig-Extraktion verwendet. Ihr Prinzip ist auf den Polaritätsunterschied zweier nicht oder nur partiell ineinander mischbaren Phasen, die in Kontakt gebracht werden, gestützt. Die treibende Kraft der Extraktion stellt die Differenz des chemischen Potentials des zu extrahierenden Stoffes (Solvat) zwischen der Trägerstoffphase und dem Lösungsmittel dar.⁵⁶⁻⁵⁹

Ein Solvat geht so lange aus der Trägerstoffphase über die Phasengrenzfläche in das Lösungsmittel über, bis die Konzentrationen in den jeweiligen Flüssigphasen im Sinne des thermodynamischen Gleichgewichtes unter konstanten äußeren Bedingungen eingestellt sind.

Die Zeit, die vergeht, bis dieses Gleichgewicht eingestellt ist, wird von der Phasengrenzfläche bestimmt, während die initiale Geschwindigkeit des Stofftransportes vom Konzentrationsgradienten abhängt. Eine Theorie zur Beschreibung dieses Stofftransportes zwischen Phasengrenzflächen ist die Filmtheorie. Schon 1905 postulierte Walther Nernst, dass zwischen zwei Phasen ein Film bestünde, in dem kein konvektiver Stofftransport stattfindet, sondern die molekulare Bewegung einzig durch die Diffusion beschrieben werden könne⁶⁰. Nach Adolf Ficks Beitrag über Diffusion (1855) kann diese vereinfacht durch Formel 1.1 beschrieben werden⁶¹:

$$J = D \frac{\partial c}{\partial x} \quad (1.1)$$

Hierbei ist J [$\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] die Molenstromdichte, c [mol m^{-3}] die Konzentration des Solvates an der differentiell betrachteten Stelle des Films, und x [m] die Länge der Diffusionsstrecke in Richtung des Gradienten. Die Molenstromdichte innerhalb eines Grenzfilms ist also proportional zum Konzentrationsgradienten zwischen Trägerstoffphase und Lösungsmittel und wird mit dem Diffusionskoeffizienten D [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$] beschrieben. Der Konzentrationsgradient über den gesamten Film ($\partial c / \partial x$) lässt sich durch das Verhältnis der Konzentrationsdifferenz in den jeweiligen Bulkphasen und der Filmdicke ausdrücken. In Zusammenhang mit der Diffusion zwischen zwei flüssigen Phasen und der Ausbildung eines Films werden die vorauszusetzenden Annahmen deutlich, unter denen diese Gesetzmäßigkeit gilt. Zunächst wird das Problem als stationär betrachtet; es wird also keine zeitliche Änderung des Konzentrationsprofils berücksichtigt, sondern nur die Molenstromdichte zu einem Zeitpunkt beschrieben. Weiterhin wird eine scharfe Grenze zwischen der Bulkphase und dem unbewegten Flüssigkeitsfilm angenommen, welche zur Beschreibung des Stofftransportes aus einer Phase in die andere dient. Die Konzentration der Trägerstoffphase nimmt also erst in der Grenzschicht ab. Ergänzend beschreibt Formel 1.1 nur die Diffusion in eine Raumrichtung. Dreidimensionale Konzentrationsprofile in der Grenzschicht werden nicht beschrieben. So kann beispielsweise der diffusive Stofftransport über die Grenzschicht von sphärischen Tropfen nicht exakt mit Formel 1.1 beschrieben werden.

Der Stofftransport durch eine Grenzschicht wird mit dem Fick'schen Gesetz beschrieben. Bezogen auf die Flüssig-Flüssig-Extraktion wird jedoch die Theorie verwendet, dass der Stofftransport über zwei flüssige Grenzschichten entlang des Gradienten des chemischen Potentials einer Komponente erfolgt. Diese sog. Zweifilmtheorie beinhaltet den Stoffübergang aus der ersten Bulkphase zur Grenzschicht, den Phasentransfer von der einen Flüssigphase in die zweite und den Stoffübergang von der Phasengrenzfläche in die zweite Flüssigphase.⁶² Sie ist keine Beschreibung der Realität, sondern eine Möglichkeit, den Stoffdurchgang zwischen zwei Phasen bestimmen zu können. Ihr liegen die Annahmen eines sehr schnellen Stoffdurchgangs im Vergleich zum diffusiven Stofftransport in den Grenzschichten und eines stofflichen Gleichgewichtes in der Phasengrenzschicht zugrunde. Mit dieser Theorie lässt sich der Stofftransport aus der Phase 1 zur Phasengrenzschicht analog zum Fick'schen Gesetz (1.1) über Formel 1.2 und der Stofftransport von der Grenzschicht zur Phase 2 mit Formel 1.3 beschreiben.

$$\dot{n}_1 = -\beta_1 \cdot A \cdot (c_{P1} - c_{M1}) \quad (1.2)$$

$$\dot{n}_2 = -\beta_2 \cdot A \cdot (c_{M2} - c_{P2}) \quad (1.3)$$

Hierbei ist \dot{n}_i [mol s⁻¹] der diffusive Stofffluss in der Phase i, β_i [m s⁻¹] der Stoffübergangskoeffizient, A [m²] die Phasengrenzfläche, c_{Mi} [mol m³] die Bulkkonzentration in der Phase i und c_{Pi} [mol m³] die Konzentration an der Phasengrenzfläche in der Phase i. Das Verhältnis der Konzentrationen der jeweiligen Phasen an der Grenzschicht wird durch den Nernst'schen Verteilungskoeffizienten ausgedrückt.

$$K_N = \frac{c_{P1}}{c_{P2}} \quad (1.4)$$

Da die Konzentrationen c_{Pi} weder bekannt noch messbar sind, kann mittels 1.2 und 1.3 der Stofffluss noch nicht berechnet werden. Für den stationären Fall ist $\dot{n}_1 = \dot{n}_2$, sodass die Beziehung nach 1.5 gilt.

$$-\frac{\beta_2}{\beta_1} = \frac{c_{M1} - c_{P1}}{c_{M2} - c_{P2}} = \frac{\Delta C_1}{\Delta C_2} \quad (1.5)$$

Werden diese Konzentrationsverhältnisse in beiden Phasen als Funktion der Konzentration in der jeweiligen Bulkphase aufgetragen (Abbildung 1.6), kann mittels der Nernst'schen Verteilungsgerade der Steigung $\beta_2 \beta_1^{-1}$, der Gleichgewichtspunkt an der Phasengrenzfläche graphisch ermittelt werden.

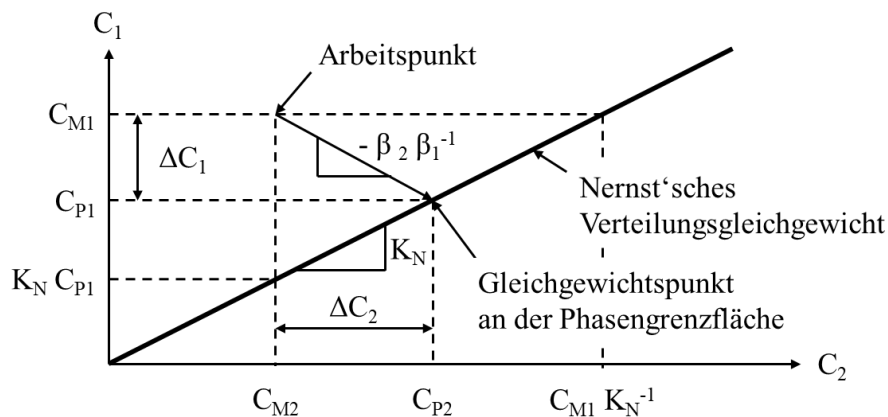


Abbildung 1.6: Konzentrationsdifferenzen beim Stoffdurchgang zweier flüssiger Phasen nach „Praxiswissen der chemischen Verfahrenstechnik“ von Daniel S. Christen (2005)⁶²

Somit kann der Stoffübergang durch die Phasengrenzfläche nach Gleichung 1.6 bestimmt werden.

$$\dot{n} = \frac{A \cdot (C_{M1} - K_N \cdot C_{M2})}{1/\beta_1 + 1/\beta_2} \quad (1.6)$$

Hierbei können die einzelnen Stoffübergangskoeffizienten mittels Beziehung (1.7) zu dem Stoffdurchgangskoeffizienten, der dem Gesamtwiderstand des Stoffdurchgangs entspricht, bezogen auf Phase 1 zusammengefasst werden.

$$1/k_{C1} = 1/\beta_1 + K_N/\beta_2 \quad (1.7)$$

So kann der Stoffdurchgang über Gleichung 1.8 ausgedrückt werden.

$$\dot{n} = k_{C1} \cdot A \cdot (C_{M1} - K_N \cdot C_{M2}) \quad (1.8)$$

Weiterhin kann der Stoffübergang mittels der Beziehungen von 1.9 und 1.10 auf die zweite Phase bezogen werden.

$$\dot{n} = k_{C2} \cdot A \cdot (C_{M1}/K_N - C_{M2}) \quad (1.9)$$

$$1/k_{C2} = 1/\beta_2 + 1/(K_N \cdot \beta_1) \quad (1.10)$$

Neben der Zweifilmtheorie gibt es noch weitere Möglichkeiten, den Stoffübergang bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion zum Beispiel über die Penetrationstheorie oder die Oberflächenerneuerungstheorie zu beschreiben. Diese lassen sich in gängiger Fachliteratur zur chemischen Verfahrenstechnik finden⁶².

Die hier aufgeführte Beschreibung des Stoffübergangs nach der Zweifilmtheorie soll dazu dienen, die Einflussfaktoren auf eine effiziente Extraktion deutlich zu machen. Aus der gezeigten Theorie geht hervor, dass die Geschwindigkeit des Stoffübergangs \dot{n}_i [mol s⁻¹] im Wesentlichen von folgenden Parametern abhängt: der Phasengrenzfläche A [m²], der Lage des Gleichgewichtes des Solute in den Flüssigphasen nach Nernst K_N [-], dem stoffspezifischen Stoffübergangskoeffizienten β_i [m s⁻¹], den Konzentrationen in den Bulkphasen der Flüssigkeiten C_{Mi} [mol m⁻³] und der Grenzschichtdicke δ [m] zwischen den Phasen. Die aufgezählten Größen können durch den apparativen Aufbau bei einer Flüssig-Flüssig-Extraktion teilweise beeinflusst werden. Die Phasengrenzfläche A [m²] wird beispielsweise durch die Dispergierung des Lösungsmittels über Siebböden⁶³, Dual-flow-Böden⁶³ oder Energieeintrag durch Rührorgane⁶⁴ realisiert, wie es in Abbildung 1.7 dargestellt ist.

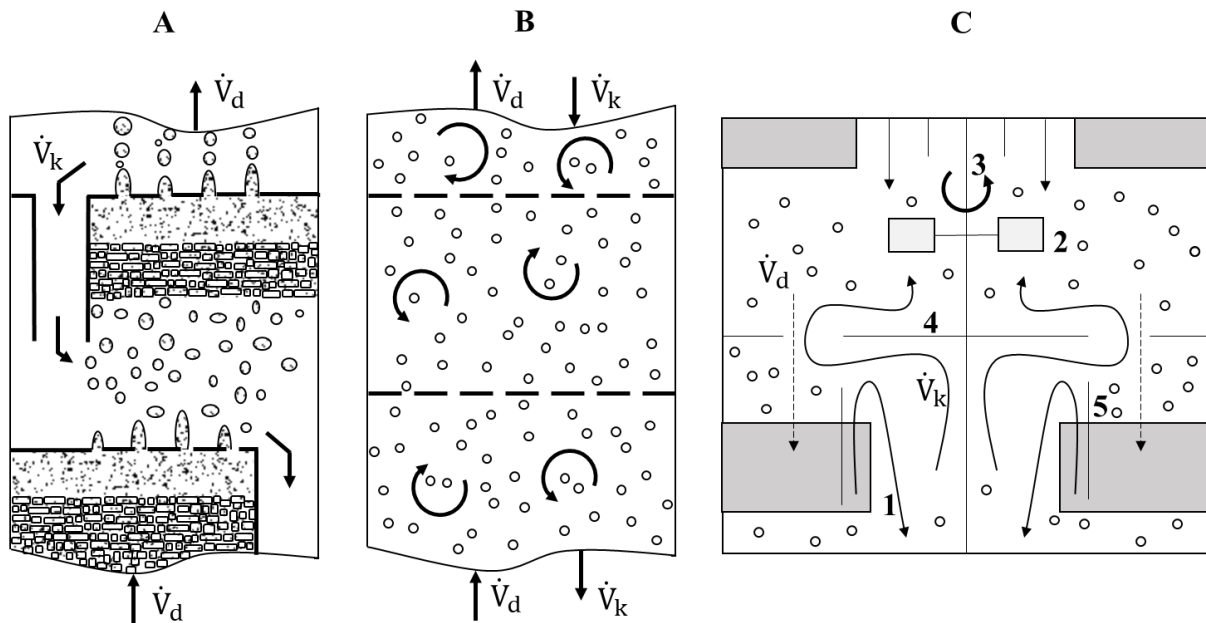


Abbildung 1.7: Technische Dispergierung eines Lösungsmittels für die Extraktion: A: Über Siebböden mit Ablauf⁶³, B: Über Dual-flow-Böden ohne Ablauf⁶³ C: Über Rührorgan in einem Mischabsetzer⁶⁴ (1- koaleszierte Phase aus dem Absetzer, 2- Rührer, 3- Rührerschaft, 4- Lochplatte, 5- Zylinder. \dot{V}_d = Volumenstrom der diskontinuierlichen Phase, \dot{V}_k = Volumenstrom der kontinuierlichen Phase

Bei der Dispergierung mittels Siebböden hängt der Sauterdurchmesser der Tropfen und damit die erzeugte Phasengrenzfläche von der Lochgeschwindigkeit ab, mit der das Fluid durch das Sieb gefördert wird, während er bei durch Rührorgane erzeugter Dispergierung von der Drehzahl des Rührers, seiner Geometrie und dem damit einhergehenden Energieeintrag in das zweiphasige System bestimmt wird. Auch der Einsatz von Reaktoreinbauten führt zu einer Erhöhung der Phasenkontaktfläche⁶⁵. Die Lage des Gleichgewichts K_N [-] und der stoffspezifische Stoffübergangskoeffizient β_i [m s^{-1}] sind durch die eingesetzten Lösungsmittel und Solute vorgegeben und werden durch das Design der Extraktionsapparatur nicht beeinflusst. Die Konzentration in den Bulkphasen der Flüssigkeiten C_{Mi} [mol m^{-3}] hingegen können gezielt beeinflusst werden. So liegt beispielsweise bei der Extraktion im Gegenstrom in einer Extraktionskolonne am Lösungsmittelseingang eine geringe Solutkonzentration in der Bulkphase des Lösungsmittels und der Trägerstoffphase vor, während am Lösungsmittelausgang eine hohe Konzentration des Soluten in beiden Bulkphasen vorliegt. Dem gegenüber stehen Extraktionsapparaturen im Gleichstrom, bei welchen am Reaktoreingang eine hohe Konzentration in der Bulkphase der Trägerstoffphase vorliegt und eine geringe Konzentration am Ausgang. Da hier am Ausgang jedoch ebenso eine hohe Solutkonzentration in der Extraktionsphase vorliegt, wird so kein hoher Gradient über die Extraktionsapparatur aufrechterhalten. Die Grenzschichtdicke δ [m] wird von dem Strömungsregime der beiden flüssigen Phasen und ihrer Relativgeschwindigkeit zueinander beeinflusst. Diese wird zum Beispiel durch Pumpraten eingestellt, aber auch durch gezielte Strömungsführungen durch Einbauten, die durch Querschnittsänderungen die Beschleunigung oder Abbremsung von Fluidelementen induzieren. Nicht nur die makroskopischen Strömungsprofile spielen hierbei eine Rolle, auch Zirkulation innerhalb einer dispergierten Extraktionsphase⁶⁶ beeinflussen die Dicke der Phasengrenzschicht. Ein weiterer Parameter, welcher die Geschwindigkeit des Stoffübergangs \dot{n}_i [mol s^{-1}] nicht direkt beeinflusst, aber

direkt auf die Konzentrationen innerhalb einer Extraktionsapparatur Einfluss nimmt, ist die Verweilzeit beider flüssigen Phasen. Sie bestimmt wesentlich, wie viele Gleichgewichtszustände innerhalb eines zweiphasigen Systems erreicht werden, bzw. bis zu welchem Grad dies geschieht. Zur Beschreibung von Gleichgewichtszuständen innerhalb einer Extraktionsapparatur wird zum Beispiel das Stufenmodell nach McCabe-Thiele^{67,68} oder nach Ponchon-Savarit⁶⁹ genutzt. Die Verweilzeit beider Phasen lässt sich durch den Volumenstrom, das Reaktorvolumen und das Ändern des Holdups durch Reaktoreinbauten⁷⁰ beeinflussen.

Die hier dargelegten Prinzipien der Flüssig-Flüssig-Extraktion werden für die Entwicklung eines intensivierten Prozesses benötigt, bei dem additiv gefertigte Strukturen als Enzymträger und als Strömungsführer von Trägerstoff- und Extraktionsphase fungieren. Im folgenden Abschnitt wird der Hintergrund für Prozessintensivierungen in Bezug auf diese Arbeit erläutert (1.4).

1.4 Prozessintensivierung

„Any chemical engineering development that leads to a substantially smaller, cleaner, and more energy efficient technology is process intensification!“⁷¹ Diese Definition gaben Stankiewicz und Moulijn im Jahr 2000 und machten damit die weite Fassung des Begriffs „Prozessintensivierung“ deutlich. Die Verkleinerung eines Prozesses kann hierbei zum Beispiel über die Integration mehrerer Verfahrensschritte in einem Reaktor oder die Erhöhung der Effizienz im Sinne der Raum-Zeit-Ausbeute ermöglicht werden. Ein sauberer Prozess beinhaltet die Vermeidung von Abfallströmen und ihre ganzheitliche Verwendung. Hierdurch kann eine Kreislaufwirtschaft realisiert werden, die ein regeneratives System darstellt, in welchem aus Materialien und Ressourcen der maximale Nutzen gezogen wird⁷². Damit geht auch einher, dass verwendete Edukte vollständig umgesetzt werden und nicht im Lösungsmittel zurückbleiben. Auch die Vermeidung oder Wiederverwendung von Lösungsmitteln führt zu einer saubereren Technologie. Die Einsparung von Energie und damit die Steigerung der Energieeffizienz kann zum Beispiel durch die Nutzung von Abwärme eines chemischen Prozesses oder die Verbesserung von Wärmeübertragungen realisiert werden. Kurzum gibt es zur Intensivierung von (bio-)chemischen Prozessen viele Möglichkeiten, die von Stankiewicz (2003) zusammengestellt wurden (Abbildung 1.8).⁷³ Demnach teilen sich diese auf in die Intensivierung über das Equipment, wie den Reaktoren oder Equipment für nicht-reaktive Operationen, und in Methoden, wie zum Beispiel der Kombination von Reaktion und Verfahrensschritte des Downstreams.

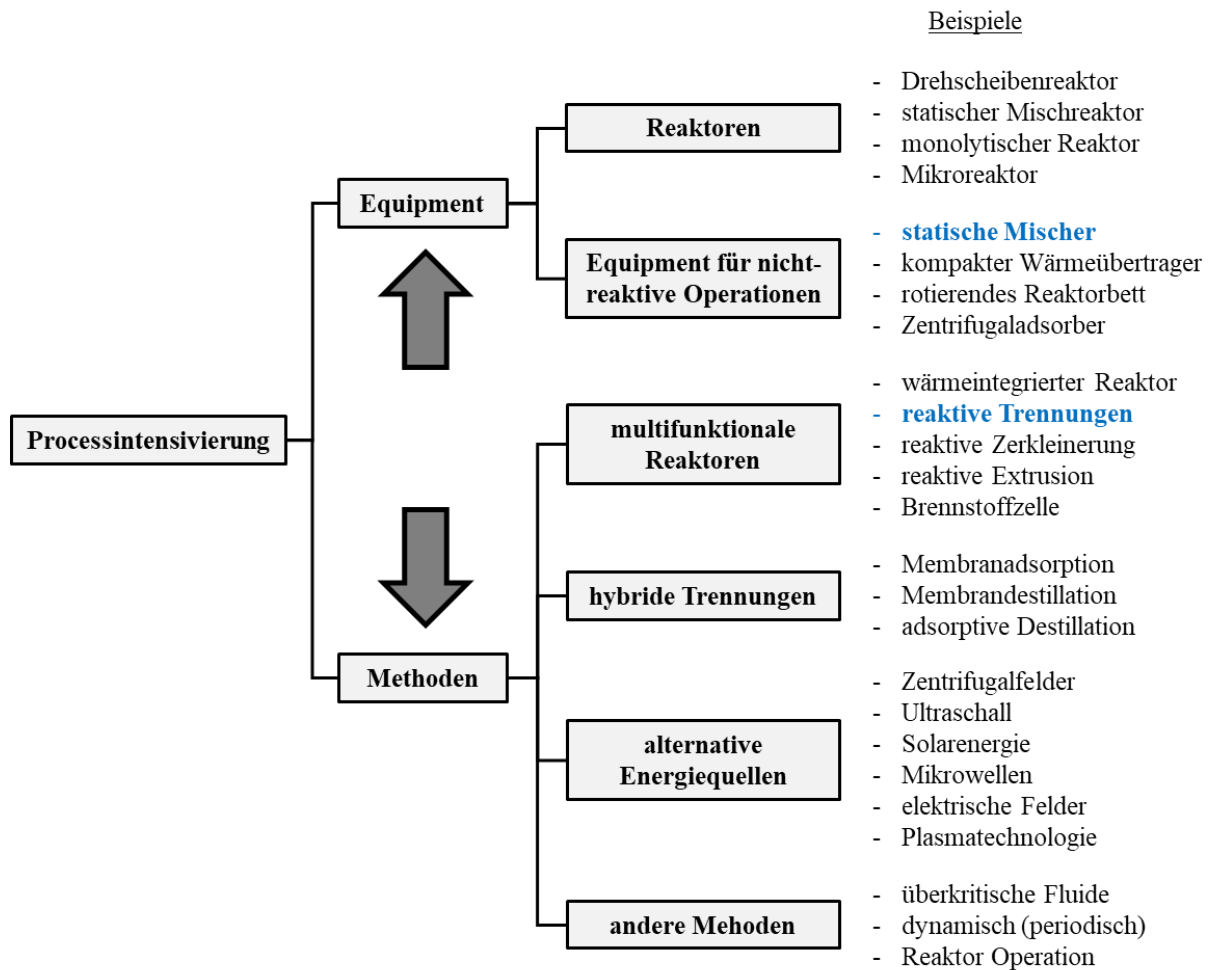


Abbildung 1.8: Möglichkeiten der Prozessintensivierung nach Stankiewicz⁷³. Die in dieser Arbeit untersuchten Beispiele sind blau hervorgehoben.

In der vorliegenden Arbeit wird eine Prozessintensivierung am Beispiel der Decarboxylierung der Ferulasäure präsentiert. Hierzu wird eine Reaktortechnologie entwickelt, die die Immobilisierung von PAD an additiv gefertigtes Material zur Stofftransportoptimierung und die *in situ* Extraktion des Reaktionsproduktes 4-VG in einem Gegenstromreaktivextraktor kombiniert. Dieses Konzept beinhaltet somit eine Prozessintensivierung durch den Einsatz statischer Mischer im Reaktor (Equipment - statische Mischer) und die Intensivierung durch die Kombination von Reaktion und Extraktion in einem Reaktor (Methoden – reaktive Trennungen).

Um sowohl Immobilisierungskonzepte von Enzymen an additiv gefertigte Strukturen (1.2), als auch die Prozessintensivierung durch *in situ* Extraktion 1.4 mit additiv gefertigten Strömungsführern zu zeigen, wurden verschiedenen Beispielreaktionen gewählt, die im folgenden (1.5) vorgestellt werden.

1.5 Reaktionssysteme

Innerhalb der Arbeit wurden verschiedene Reaktionssysteme verwendet, um sowohl Immobilisierungskonzepte für Enzyme an additiv gefertigten Materialien zu untersuchen, als auch Einflüsse von Stofftransportverbesserungen durch Einsatz von additiv gefertigten

werden konnte. Außerdem wurde durch die Präsenz des Lösungsmittels Hexan eine Stabilisierung der PAD erzielt, die sich durch eine gesteigerte Halbwertszeit von 53 h ausdrückt. Es konnte somit ein Prozess realisiert werden, der eine Produktivität von $0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei Einsatz von 100 mM FA erreichte. Jedoch wurde auch gezeigt, dass sich trotz einer kontinuierlichen Produktabtrennung mittels Hexan mehr als 10 mM Produkt in der wässrigen Phase akkumulierten und die Reaktion dadurch stark verlangsamt wird. Die Verbesserung des Stofftransportes des Produktes aus der wässrigen Phase in die organische Extraktionsphase stellt somit die Möglichkeit dar mittels AF Stofftransport beeinflussende Parameter zu optimieren und die Produktivität und somit Effektivität des Prozesses durch eine geringere Produktkonzentration in der wässrigen Phase zu steigern.

Die Geschwindigkeit von Flüssig-Flüssig-Extraktionen hängt im Wesentlichen von der Phasengrenzfläche, dem Konzentrationsgradienten zwischen den Phasen sowie der Phasengrenzschichtdicke ab. In einer Extraktionskolonne ohne Energieeintrag werden diese heutzutage mit Füllkörpern, Packungen oder Siebböden beeinflusst⁸². Durch das RP mittels AF ergibt sich die Chance, solche Füllkörper oder Packungen strukturiert und präzise definiert zu generieren, um theoretisch simulierte Strömungsbedingungen exakt im Experiment und folgend in der industriellen Anwendung zu reproduzieren. Weiterhin gelten hier auch die in Abschnitt 1.1.1 und 1.1.2 genannten Vorteile der AF, wie der Möglichkeit der Generierung von zuvor unmöglich zu fertigen Strukturen, die optimiert auf die jeweilige Problemstellung angepasst werden können. In dem hier erläuterten Reaktionssystem muss eine Struktur entwickelt werden, die eine Phasengrenzfläche zwischen den Phasen und eine hohe Mischgüte erzeugt und somit eine Erhöhung der Extraktionsgeschwindigkeit für eine geringere Produktakkumulierung in der wässrigen Phase sorgt.

Für kontinuierliche, katalytische Prozesse in der Verfahrenstechnik ist die Zurückhaltung des Katalysators aus dem Reaktionsmedium von großem Vorteil, da so die nachträgliche, aufwendige Abtrennung obsolet wird und zusätzlich zu einem reinen Produktstrom, ohne Katalysatorverunreinigungen, die Rezyklierbarkeit vereinfacht wird. In der enzymatischen Katalyse kann eine Immobilisierung zusätzlich die Katalysatorstabilität erhöhen und in zweiphasigen Systemen ungewollte Effekte von gelösten Enzymen wie Emulsionsbildung durch die Grenzflächenaktivität von Enzymen verhindert werden.

In Bezug auf die Stabilität von Enzymen spielt neben der Halbwertszeit die Zykluszahl (TON) eine wichtige Rolle. Sie gibt an, wie viel Mol Produkt pro Mol Katalysator in einem Prozess produziert werden können^{13,83}. In dem hier betrachteten Reaktionssystem haben Pesci *et al.* eine TON von $11734 \text{ mol mol}^{-1}$ ermittelt. Nach Jansen *et al.* gäbe es für die generelle Betrachtung der TON zwei kritische Fälle. Hat ein Katalysator eine zu geringe TON auf Grund einer kurzen Lebenszeit oder geringen Aktivität sei eine Immobilisierung nicht lohnend, da die Kosten hierfür nicht durch die Vorteile der Immobilisierung kompensiert werden könnten. Ist die Lebensdauer und Aktivität des Katalysators jedoch sehr hoch, was mit einer großen TON einhergeht, und die Katalysatorkosten machen weniger als 0,05 % des Prozesses aus, gäbe es ebenso keinen ökonomischen Grund für eine Katalysatorimmobilisierung. Liegt die TON indes zwischen diesen Größen, könne eine Immobilisierung eine sinnvolle Methode zur Steigerung der Prozesseffizienz sein.⁸⁴ Die TON, die in einem Prozess zum Beispiel durch die Immobilisierung des Katalysators erreicht werden sollte, sind $\text{TON} > 1000$ für preisintensive

Produkte, die in kleinem Maßstab produziert werden und > 50.000 für Produkte, die preisgünstig sind oder im großen Maßstab produziert werden^{85,86}. Die Vereinfachung der Downstreamprozesse durch die Immobilisierung wird bei dieser Betrachtung jedoch nicht mit beachtet und sollte ein zusätzliches Kriterium für die Entscheidung sein, ob eine Immobilisierung durchgeführt wird. Im hier betrachteten Modellsystem, für welches die Optimierung durch AF gezeigt werden soll, kann eine Immobilisierung unabhängig von der TON sinnvoll sein. Dies liegt darin begründet, dass Enzyme oberflächenaktiv sind und in einem zweiphasigen System zu ungewünschter Emulsions- oder Schaumbildung führen können. Gerade durch einen erhöhten Energieeintrag zur Erhöhung von Phasengrenzflächen in der FC können gelöste Enzyme für eine Stabilisierung der Dispersion sorgen, was die kontinuierliche Abtrennung der produktenthaltenden Extraktionsphase aufwendiger oder unmöglich macht. Daher wird anhand dieses Modellsystems insbesondere gezeigt werden, dass eine Immobilisierung von PAD an additiv gefertigte Strukturen realisierbar ist.

1.5.2 Hydrolyse von Laurinsäureethylester zu Laurinsäure

Aus Fettaldehyden bestehende Aroma- und Duftstoffe werden konventionell aus fossilen Ausgangsstoffen unter rauen Reaktionsbedingungen produziert. Die Synthese von Fettaldehyden über Dehydratation zur Produktion von langkettigen Aldehyden oder die Hydroformulierung aus Rohöl für die Synthese von kurzkettigen Aldehyden geht einher mit der Verwendung von gefährlichen Chemikalien und hohem Energieaufwand durch gesteigerte Drücke und Temperaturen bis 500 °C⁸⁷. Alternative Wege zur Gewinnung von Fettaldehyden wie der Extraktion aus Pflanzen, erreichten bisher nur geringe Ausbeuten^{88,89}.

Die Produktion von Fettaldehyden kann auch aus erneuerbaren Rohstoffen, unter milden Reaktionsbedingungen und Verzicht auf giftige Chemikalien mit hohen Selektivitäten realisiert werden. Als Beispiel hierfür dient die Hydrolyse von Laurinsäureethylester zu Laurinsäure, die darauffolgende Separation und anschließende Reduktion zu Dodecanal⁹⁰. Hierbei wird die Hydrolyse durch eine Lipase katalysiert. In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, in wieweit die Immobilisierung einer Lipase an additiv fertigmachbarem Material realisierbar ist. Die Hydrolyse von Laurinsäureethylester (Abbildung 1.10) dient hierbei als Modellreaktion, um die Aktivität von Immobilisaten mit einer großtechnisch konventionell eingesetzten Lipase (CALB) zu bestimmen.

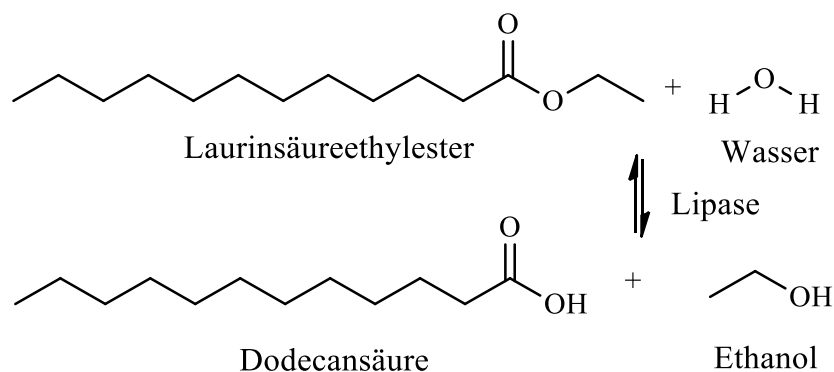


Abbildung 1.10: Hydrolyse von Laurinsäureethylester mit immobilisierter Lipase

Methodik wird eine kovalente Immobilisierung der Tyrosinase ermöglicht. Das SLS von PA12 führt zu rauen Oberflächen, die für viele Anwendungen ungewollt sind, für die Verwendung als Enzymträgermaterial allerdings den Vorteil einer größeren Oberfläche bietet.

1.6 Motivation und Zielsetzung

Enzymatische Katalysen spielen eine bedeutende Rolle innerhalb der industriellen Produktion und Verarbeitung von Pharmazeutika, Lebens- und Futtermitteln, Detergenzien, Biotreibstoffen, Papier und Zellstoffen.⁹⁸ Sie stellen eine umweltfreundliche Alternative zu chemischen Synthesewegen in Bezug auf die Abfallerzeugung dar und weisen häufig eine höhere Chemo-, Regio- und Stereoselektivität auf⁹⁹. Die Kommerzialisierung der Biokatalyse wird in den nächsten Jahren weiter voranschreiten, da diese wettbewerbsfähige und vorteilhafte Prozesse gegenüber chemischen Katalysen ermöglicht¹⁰⁰. Dies gilt insbesondere unter Berücksichtigung von aktuellen Fragestellungen des Einsatzes nachwachsender Rohstoffe und dem Ziel geringer Umweltbelastungen. Die Eigenschaft von Enzymen, Reaktionen mit weniger toxischen Chemikalien unter milden Reaktionsbedingungen katalysieren zu können, macht sie zu idealen Katalysatoren für nachhaltige Prozesse, welche die Prinzipien der grünen Chemie wie der Abfallvermeidung und Nutzung weniger gefährlicher Substanzen, erfüllen¹⁰¹. Für den industriellen Einsatz müssen ungewünschte Effekte wie die Produktinhibierung von Enzymen und die Effizienz von biokatalytischen Reaktoren verstanden und beurteilt werden⁷⁷. Um Enzyme möglichst effizient nutzen zu können, ist eine mehrmalige Verwendung, welche über die Rückhaltung im Reaktor durch deren Immobilisierung realisiert werden kann, sinnvoll. Hierdurch wird die Verweilzeit des Katalysators und der Reaktanden entkoppelt und es werden höhere Zykluszahlen erreicht. Dies erlaubt es pro Enzym mehr Produkt zu bilden und vereinfacht kontinuierliche Reaktorkonzepte. Zur Fixierung von Enzymen in einem Reaktor, der Immobilisierung, gibt es viele Methoden, die auch zu ihrer Stabilisierung auf molekularer und quaternärer Ebene beitragen. Der Stofftransport von Edukten und Produkten zu und von immobilisierten Katalysatoren spielt eine entscheidende Rolle für die Geschwindigkeit einer chemischen Reaktion.

Mittels AF können aus unterschiedlichen Materialien in hoher Präzision und Reproduzierbarkeit Strukturen für den Einsatz in reaktiven Strömungsrohren erzeugt werden. Verglichen mit konventionellen Fertigungsmethoden werden neue Strukturen schnell, mit geringen Kosten und wenig Materialverbrauch fertigbar. Der Einsatz solcher Strukturen in durchströmten Reaktoren beeinflusst das Strömungsverhalten der verwendeten Lösungsmittel und somit den Stofftransport von Reaktanden. Strukturen, die beispielsweise mittels CFD in Bezug auf Stofftransport beeinflussende Parameter optimiert worden sind, können über die AF direkt in ein haptisches Modell oder in Bauteile für Strömungsrohre transferiert werden.

Für die Nutzung von additiv gefertigten Strukturen, die in der Biokatalyse als statischer Mischer und als Enzymträger gleichermaßen eingesetzt werden können, ist das vorangestellte Ziel dieser Arbeit, Materialien auszuwählen, die sowohl für die additive Fertigung als auch für deren Einsatz bei Verwendung reaktionsspezifischer Lösungsmittel und Temperaturen geeignet sind. Anhand der Bestimmung benötigter Materialeigenschaften und Evaluieren der verfügbaren Materialien und Fertigungsprozesse, sollen so geeignete Materialien für spezifische Beispielreaktionssysteme ermittelt werden. Diese Auswahl wird nicht losgelöst von

Immobilisierungstechniken getroffen, die auf die jeweiligen Materialien übertragbar sein müssen.

Um eine möglichst breite Anwendbarkeit von additiv gefertigten Materialien als Träger zeigen zu können, werden in dieser Arbeit drei unterschiedliche Immobilisierungstechniken für verschiedene Beispielreaktionen und Materialien exemplarisch untersucht. Die Hydrolyse von Laurinsäureethylester und die Oxidation von Tyrosin wird hierbei als Beispiel für die Realisierung einer heterogenen, enzymatischen Katalyse für einphasige Reaktionssysteme gewählt, während mittels der Decarboxylierung der Ferulasäure zusätzlich die *in situ* Extraktion in einem zweiphasigen System implementiert werden soll.

Die Decarboxylierung der Ferulasäure (FA) zu 2-Methoxy-4-vinylphenol (4-VG) wird durch das Enzym Phenolsäuredecarboxylase (PAD) aus *Mycobacterium colombiense* katalysiert und zeigt schon bei niedrigen Produktkonzentrationen eine starke kompetitive Enzyminhibierung. Mehrere Prozesslösungen zur Begrenzung von Produktinhibierungen über den Ansatz der *in situ* Produktentfernung (ISPR) sind bereits beschrieben. Neben Verdampfung, Membrandialyse, reversibler Komplexbildung, Produktimmobilisierung oder Produktstripping ist die *in situ* Extraktion von inhibierenden Produkten wie 4-VG eine Methode zur Steigerung der Prozesseffizienz^{102,103}. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Implementierung von *in situ* Extraktionen mit organischen Lösungsmitteln bei der Decarboxylierung der Ferulasäure zu höheren Umsätzen und schnelleren Reaktionen führt.^{77,104–107,107} Diese Extraktionen wurden jedoch selten im Hinblick auf den Massentransport zwischen der Reaktions- und Extraktionsphase optimiert. Für die Untersuchung und Optimierung des Massentransports soll gezeigt werden, wie additive Fertigung genutzt werden kann, um Verbesserungen im Stofftransport innerhalb der *in situ* Extraktion von 4-VG zu erzielen.

Für hybride Reaktoren, in denen Reaktion und Extraktion in einer Apparatur kombiniert werden, soll ein Konzept entwickelt werden, in dem additiv gefertigte Strukturen als Reaktions- und Extraktionsphasenverteiler und gleichzeitig als Enzymträger fungieren. Der Entwurf von Strukturen, die als Verteilereinheit in einem im Gegenstrom betriebenen Strömungsrohr eingesetzt werden, soll die gezielte Steuerung der Mehrphasenhydrodynamik und zugleich die Immobilisierung von Enzymen erlauben. Das Rapid Prototyping kann hierbei für eine effiziente Entwicklung strömungsoptimierter Strukturen in einem Mehrphasenreaktionssystem eingesetzt werden. Es erlaubt das einfache computergestützte Entwickeln, die schnelle Fertigung, direkte experimentelle Evaluierung und Anpassung von Strukturen, die für ein gewünschtes Verhalten in einer *in situ* Extraktion eingesetzt werden sollen. Dies soll in dieser Arbeit anhand des o.g. zweiphasigen Systems als Beispiel gezeigt werden.

Die Kombination von *in situ* Extraktion und immobilisierten Enzymen an additiv gefertigtem Material birgt das Potential zur Prozessintensivierung und soll in einem hybriden Reaktor gezeigt werden. Hierzu entwickelt diese Arbeit ein Konzept, welches eine additiv gefertigte Struktur als Enzymträger und als strömungsführende Einheit beinhaltet.

2 Materialien und Methoden

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden so verwendet, wie sie vom jeweiligen Zulieferer erhalten wurden. Nachfolgend sind diese alphabetisiert in Tabelle 2.1 gelistet.

Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien und ihre Hersteller

Chemikalie	Hersteller	Stadt	Land
Aceton, $\geq 99,9\%$	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe	D
Acetonitril, HPLC Gradient Grade	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe	D
APTES, $> 98,0\%$	Tokio Chemical Industry Co., LTD.	Tokio	JPN
di-Kaliumhydrogenphosphat, $\geq 99\%$	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe	D
Dopamin-HCL, 98%	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe	D
Ferulasäure, $\geq 99\%$	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe	D
Kaliumdihydrogenphosphat, $\geq 99\%$	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe	D
Millipore® - Wasser	Merck KGaA	Darmstadt	D
<i>n</i> -Heptan, ROTISOLV® $\geq 99\%$	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe	D
Natriumhydroxid, $\geq 99\%$	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe	D
Salzsäure, 6 N	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe	D
Sudanrot 7B, Farbstoffgehalt 95%	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe	D
TRIS-HCL, $\geq 99\%$	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe	D
Trifluoressigsäure, $\geq 99,9\%$	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe	D

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme, Organismen und Reagenzien für mikrobiologische und biochemische Methoden, sind in Tabelle 2.2 zu finden.

Tabelle 2.2: Verwendete Enzyme, Organismen und Reagenzien für mikrobiologische und biochemische Methoden

Enzym/Organismus/Reagenz	Hersteller	Stadt	Land
Ampicillin, Natriumsalz 99%	Carl Roth GmbH	Karlsruhe	D
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich Inc.	Steinheim	D
<i>Candida antarctica</i> Lipase B	C-LEcta	Leipzig	D
<i>E. coli</i> , DH5 α , BL21-Gold (DE)	Agilent Technologies Inc.	Santa Clara	USA
InstantBlue™ protein stain	Expedeon	Cambridge	UK
IPTG	Glentham life science	Corsham	UK
LB-Medium (Lennox), granuliert	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe	D
LDS run blue Probenpuffer, 4x	Expedeon	Cambridge	UK
Lipase (CALB)	Amano Enzyme Inc.	Shirley	USA
Oligonukleotide	Eurofins Scientific	Ebersberg	D
Plasmid extraction kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	Düren	D
PCR purification kits	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	Düren	D
PCR cleanup kit	QIAGEN GmbH	Hilden	D
Plasmid pET21a(+)	Novagen	Darmstadt	D
Protein Reagenz, Pierce™ 660 nm	Thermo Fisher Scientific GmbH	Rockford	USA
Restriktionsenzyme	New England Biolabs GmbH	Frankfurt	D
Roti-mark- tricolor	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe	D
Run blue running buffer, 10x	Expedeon	Cambridge	UK
Synthetische Gene	GeneArt AG	Regensburg	D
Tyrosinase, lyophilisiertes Pulver	Sigma Aldrich Inc.	Steinheim	D

Materialien, die als Träger getestet wurden und als Ausgangsmaterial für die additive Fertigung von Prototypen genutzt wurden, sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Tabelle 2.3: Als Enzymträger und für die additive Fertigung genutzte Materialien

Material	Hersteller	Stadt	Land
Harz für SLA Druck, V4	Formlabs Inc.	Somerville	USA
PA12-Pulver, $d \sim 56 \mu\text{m}$	EOS GmbH	Krailling	D
PET-Pulver, $d \leq 300 \mu\text{m}$	Goodfellow Cambridge Limited	Huntingdon	UK

Die in dieser Arbeit genutzten Geräte sind in Tabelle 2.4 gelistet.

Tabelle 2.4: Verwendete Geräte und ihre Hersteller

Gerät	Hersteller	Stadt	Land
3D-Drucker, <i>Form 2</i>	Formlabs Inc.	Somerville	USA
Autoklav, VARIOKLAV Classic 500 EP-Z	HP Medizintechnik GmbH	Oberschleißheim	D
Cleanbench, Msc Advantage	Thermo fisher scientific	Illinois	USA
Behälter für SDS PAGE Gele, BIO RAD mini protein core	Expedeon	Cambridge	UK
Elektrophorese Stromeinheit, PHERO-Stab 500	Biotech-Fischer	Reiskirchen	D
FDM Drucker, Ultimaker 2 pro extend	Ultimaker	Geldermalsen	NL
Gas Chromatographie, 7890 A GC System	Agilent Technologies Inc.	Santa Clara	USA
GC Kapillare, MN OptiMA [®] 5 MS 30 m x 0.25 mm 0.25 μm	Macherey-Nagel	Surrey	UK
Inkubator, Incucenter IC 240	Renggli AG, SalvisLab	Rotkreuz	CHE
HPLC, Agilent 1200 Infinity Series	Agilent Technologies Inc.	Santa Clara	USA
HPLC Säule, LiChrospher [®] 100 RP-18, (5 μm) 250x4 mm	Merck KGaA	Darmstadt	D
Kamera, DSC-HX400V	Sony Corporation	Minato	JPN
Laborwaage, MC1 Laboratory LC 2200 P	Sartorius AG	Göttingen	D
LED Panel, 300x300x13,5 mm, 450 mA, 32 V	Print-Klex GmbH & Co.KG	Reinbek	D
Magnetrührer, RCT basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG	Staufen	D
Mikrotiterplatte, 96x	CORNING	Massachusetts	USA
pH Meter, 766 calimatic	Knick	Berlin	D
pH Sonde, InLab Micro	Mettler-Toledo GmbH	Gießen	D
Pipetten, Research [®] , Reference [®] 10, 20, 200, 1000, 5000 μL	Eppendorf AG	Hamburg	D
Plattenleser, Infinite [®] M200 pro	TECAN	Männedorf	CHE
Pumpe, IPC 8 high precision multichannel dispenser	ISMATEC	Wertheim	D
Pumpenschäuche, d_i : 1.52 mm, d_{wall} : 0.91 mm	ISMATEC	Wertheim	D
Reaktor, leere Säule, 26 x 200 mm, 26 x 700 mm	GE Healthcare GmbH	Illinois	USA
SLS Maschine, EOS P 396	EOS GmbH	Krailling	D
Spektrometer UV-1280	Shimadzu Europa GmbH	Kyōto	JPN

Thermoschüttler, TS 1 Thermo shaker	Biometra GmbH	Göttingen	D
Thermoschüttler, MHR 11, DITABIS	Digital Biomedical Imaging Systems AG	Pforzheim	D
Titratort, C30-All-round Coulometer	Metler Toledo	Columbus	USA
Ultraschallgerät, Bandelin HD 2070	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG	Berlin	D
Vakuumofen, VTR 5022	Heraeus	Hannau	D
Waagen, A 120 S, CP224S, LC2200P	Sartorius AG	Göttingen	D
Wasserbad DC 10	Thermo fisher scientific	Illinois	USA
Wasserbad, Lauda Ecoline RE 106	LAUDA	Lauda-Königshofen	D
Zellulosefilter, MN 640 d, 125 mm	MACHEREYNAGEL GmbH & Co. KG	Düren	D
Zentrifuge, Avanti J-25	Beckmann coulter	Kalifornien	USA
Zentrifuge, Mikro 200 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG	Tuttlingen	D
Zentrifuge, 15 und 50 mL	SARSTEDT AG & Co. KG	Nümbrecht	D

Für das Verfassen dieser Arbeit und deren enthaltenen Abbildungen wurde die nachfolgend gelistete Software genutzt.

Tabelle 2.5: Verwendete Programme

Software	Funktion
Design-Expert	Experimentplanung
Microsoft Office 2013 - Word	Schreiben der Dissertation
Microsoft Office 2013 - Powerpoint	Erstellen von Grafiken
Microsoft Office 2013 - Excel	Berechnung von Aktivitäten
Microsoft Visio 2013	Erstellen von Fließbildern
Origin 2020 (Teaching)	Erstellen von Grafiken und Kurvenanpassungen
Fiji (ImageJ) 2.0.0	Bestimmen von Tropfengrößen
Adobe Premiere Pro CC 2019	Erstellen von Bildern aus Videodateien
Autodesk® Inventor 2017	Erstellen von CAD Dateien für die additive Fertigung
Chemdraw Ultra 12.0.2	Zeichnen von chemischen Strukturen

2.1 Mikrobiologische und biochemische Methoden

Die mikrobiologischen und biochemischen Methoden, die in dieser Arbeit verwendet wurden beinhalten die Herstellung von Fusionsproteinen (2.1.1) und die Proteinexpressionsuntersuchung mit SDS-PAGE (2.1.2).

2.1.1 Herstellung von Fusionsproteinen

Die Fusion von Gensequenzen von PAD (Aminosäuresequenz in Wuensch et al.¹⁰⁸) und den Ankerpeptiden (AP) Dermaseptin SI (DSI), Liquid Chromatography Peak I (LCI) und Tachystatin A2 (TA2) wurde mit der Phosphorothioat-basierten Ligase unabhängigen Klonierung (PLICing) durchgeführt¹⁰⁹. Das dsi-Gen wurde an das 5'-Ende der pad-Sequenz fusioniert. Hierfür wurde pET28 :: DSI unter Verwendung der Primer F-insert-N und R-insert-N (vgl. Tabelle 2.6) amplifiziert. pET21 :: PAD wurde unter Verwendung von F-vektor-N und R-vektor-N amplifiziert. Die ta2- und lci-Gene wurden an das 3'-Ende des pad fusioniert. Dafür wurden pET28 :: TA2 und pET :: LCI unter Verwendung der Primer F-insert-C und R-insert-

C amplifiziert und pET21 :: PAD unter Verwendung von F-vektor-C und R-vektor-C. PCR-Produkte wurden mit DpnI (20 U, 16 h, 37 ° C) inkubiert und anschließend mit einem PCR-Reinigungskit aufgereinigt. Jodspaltung, Hybridisierung, und Transformation wurden wie in der Literatur beschrieben durchgeführt¹⁰⁹. Die genutzten Primersequenzen für die Herstellung von PAD-Ankerpeptid-Fusionsproteinen sind in Büscher *et al.*³⁸ zu finden und nachfolgend in Tabelle 2.6 aufgeführt.

Tabelle 2.6: Primersequenzen für die Herstellung von Fusionsproteinen^a

Name	Sequenz
F-insert-N	atg acc agc gtt acC AAT CCG ATT C
R-insert-N	gag atc tcg atc CTC TAC GCC GGA C
F-vektor-N	gat cga gat ctc GAT CCC GCG A
R-vektor-N	gta acg ctg gtc atT GCT TTC GCT GC
F-insert-C	caa tcg tac caa tgC AGA AGC AGC AG
R-insert-C	gtt agc agc cgg ATC TCA GTG
F-vektor-C	ccg gct gct aac AAA GCC CGA AAG
R-vektor-C	cat tgg tac gat tgC TCC AAC CCT G
F-GGGGS-N	GTG GTG GCG GTG GTT CAG GCG GTG GTG GTT CAA TGA CCA GCG TTA C
R-GGGGS-N	CAC CGC CAC CAC TAC CAC CAC CAC CCA GTG CAC CCA G
F-CBM-N	CAC ACG TCG TCC GGC AAC CAC CAC CGG TAG CAG TCC GGG TCC GAT GAC CAG CGT TAC
R-CBM-N	GGA CGA CGT GTG GTG GTG GTG CCA CGA TTA CCA CCA GGC GGC AGT GCA CCC AG
F-GGGGS-C	GCG GTG GTT CAG GCG GTG GTG GTT CAG AAA ATC TGT ATT TTC AGG GT
R-GGGGS-C	CTG AAC CAC CGC CAC CAC TAC CAC CAC CAC CAT TGG TAC GAT TGC TC
F-CBM-C	CAC CAC ACG TCG TCC GGC AAC CAC CAC CGG TAG CAG TCC GGG TCC GGA AAA TCT GTA TTT TCA GGG T
R-CBM-C	CGA CGT GTG GTG GTG GTG CCA CGA TTA CCA CCA GGC GGA TTG GTA CGA TTG CTC

^aKleinbuchstaben bezeichnen Phosphorothioat-Nukleotide

Neben der Verwendung des Spacers 17X, wurden Fusionsproteine mit den Spacern GS und CBM konstruiert. Hierzu wurden die jeweiligen Gensequenzen in dsi-pad mittels „overlap extension PCR cloning“ eingeführt¹¹⁰. Das Plasmid pET21-DSI-PAD wurde unter Verwendung eines der beiden Primer Paare F-GGGGS-N / R-GGGGS-N (zur Einführung vom GS-Spacer) oder F-CBM-N / R-CBM-N (zur Einführung von CBM-Spacer) amplifiziert. PCR Produkte wurden mit DpnI (20 U, 16 h, 37 ° C) inkubiert, mit einem PCR-Reinigungskit aufgereinigt und in *E. coli* BI21 (DE3) transformiert. Die Aminosäuresequenzen der verwendeten Anker und Spacer sind in nachfolgender Tabelle 2.7 zusammengefasst.

Tabelle 2.7: Aminosäuresesequenzen genutzter Anker (oben) und Spacer (unten)³⁸

Abkürzung	Aminosäuresequenz
DSI	GLWSTIKQKGKEAAIAAAKAAGQAALGAL
LCI	AIKLVQSPNGNFAASFVLDGTKWIFKSKYYDSSKGYWVGIYEVWDRK
TA2	YSRCQLQGFNCVVRYSYGLPTIPCCRGLTCRSYFPGSTYGRQCQRY
17X	AEEAAKEAAAKEAAAKA
CBM	PPGGNRGTTTTTRRPATTTGSSPGP
GS	(GGGS) ₃

Für die Vorkultur wurde eine *E. coli* BL21 enthaltende Perle aus dem Kryostock mit jeweiligen Plasmiden in 25 ml autoklaviertes Luria-Bertani (LB) Medium in einen 100 mL Erlenmeyerkolben gegeben und mit 100 µg mL⁻¹ Ampicillin ergänzt. Die Vorkultur wurde bei 37 °C und 120 U min⁻¹ über Nacht inkubiert.

Die Hauptkultur wurde in einem 2 L Erlenmeyerkolben mit 400 mL LB-Medium bei 37 °C und 120 U min⁻¹ durch Inokulation mit der Vorkultur bei OD₆₀₀ von 0,02 gestartet. Sobald eine OD von 0,6 erreicht wurde, wurde die Überexpression der PAD bzw. des jeweiligen Fusionsproteines durch die Zugabe von IPTG zu einer Konzentration von 0,5 mM und Inkubation bei Raumtemperatur bei 120 U min⁻¹ über Nacht initiiert. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation (Beckmann-Coulter-Avanti, JA-10-Aufsatz, 9000 U min⁻¹, 15 min, 4 °C) und Waschen mit 0,5 M KP_i-Puffer (pH 7). Für die Herstellung der zellfreien Extrakte (CFE) wurden die feuchten Zellpellets in 0,5 M KP_i-Puffer (pH 7) suspendiert und auf Eis mittels Ultraschallhomogenisator und Sonotrode aufgeschlossen (70% Leistung, 5 mm Ultraschallspitze, 50% Arbeitszyklus, 3 ×, jeweils 3 min, 30 s Abkühlung zwischen den Zyklen). Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt (Beckmann-Coulter-Avanti, j-25.50 Aufsatz, 24 000 U min⁻¹, 20-30 min, 4 °C) und der Überstand wurde in Mikro-Reaktionsgefäße aliquotiert (jeweils 1000 µL). Das CFE wurde bis zu seiner Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.1.2 Proteinuntersuchung mit SDS-PAGE

CFE wurde mit KP_i-Puffer (0,5 M, pH 7) auf Konzentrationen von 0,3; 0,5 und 1 mg mL⁻¹ (bzw. auf 5,8 U) verdünnt und mit SDS-Probenpuffer und destilliertem Wasser (2:1:1; v/v/v) in einem Gesamtvolumen von 20 µL gemischt. Nach einer Zentrifugation über 30 s bei 4 °C und 14000 U min⁻¹, wurde die Denaturierung durch Inkubation bei 90 °C für 10 Minuten auf einem Thermoschüttler durchgeführt. Anschließend wurden 15 µL Proben in ein SDS-PAGE Gel injiziert und der Trennvorgang für 40 min bei 180 V durchgeführt.

2.2 Immobilisierungen

Die Lipase CALB wurde an PET-Pulver (2.2.1), Tyrosinase an PA12- Pulver (2.2.2), PAD an PET- (2.2.3) und PA12- Pulver sowie einer gefertigten PA12- Struktur (2.2.4) immobilisiert.

2.2.1 Herstellung von PET-PD-CALB-Immobilisaten

PET wurde zunächst mit Polydopamin (PD) beschichtet. Dabei wurde einer Methodik von Wang *et al.*, die PET Fasern beschichteten, weitestgehend gefolgt⁴¹. Es wurden 15 mL einer Dopaminlösung (10 g L^{-1}) und 15 mL eines 10 mM Tris-Puffers mit 5 g PET-Pulver in ein 100 mL Becherglas gegeben. Der pH wurde mit 0,1 N NaOH auf pH 8,5 eingestellt. Die Suspension wurde bei 250 rpm und Raumtemperatur für 24 h gerührt. Die beschichteten PET-PD-Partikel wurden dann über einen Filter mit 20 mL dest. Wasser gewaschen und bei 37 °C für 24 h getrocknet.

Die Immobilisierung von CALB wurde aus einem Protokoll von Ren *et al.*, die Lipase an magnetischen PD-beschichteten Eisenoxid-Nanopartikeln immobilisierten, adaptiert¹¹¹. Hierzu wurden 2 g von PET-PD-Partikeln in 4 mL Lipaselösung (Konzentration im Überschuss) gegeben und bei 4 °C für 20 h auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Erhaltene PET-PD-CALB-Immobilisate wurden vierfach mit 4 mL KP_i -Puffer (10 mM, pH 7) über einen Filter gespült und vor Verwendung bei 4 °C über Nacht in einem Kühlraum mit Kondensator getrocknet.

2.2.2 Herstellung von PA12-Tyr-Immobilisaten

Die Funktionalisierung und Immobilisierung folgte in weiten Teilen einem Protokoll von Pahujani *et al.*, die Lipase an Glutaraldehyd aktivierten Nylon-6 immobilisierten³⁹. Es wurden 0,4 g PA12-Pulver in 2 mL Mikroreaktionsgefäß gegeben und mit 1,4 mL 6 N HCL versetzt und bei Raumtemperatur für 30 min am Überkopfschüttler inkubiert. Das hydrolysierte Pulver wurde dann über einen Filter mit über 5 mL destilliertem Wasser gespült, bevor es mit 1,2 mL einer 2,5 %igen Glutaraldehydlösung (GA) (mit 0,1 M KP_i -Puffer, pH7 verdünnt) in einem frischen 2 mL Mikroreaktionsgefäß versetzt wurde. Bei manchen Immobilisierungen wurde vorher die Funktionalisierung um den Spacer APTES ergänzt. Auf Basis der von Wörmeyer durchgeführten Funktionalisierung von Silica-Aerogelen¹¹², wurde dies vor der Inkubation mit GA durchgeführt, indem auf das Pulver APTES im Verhältnis von 1:10 (w/w) zugegeben und nach 48 h Inkubation bei 50 °C inkubiert wurde. Anschließend wurde mit über 5 mL 0,1 M KP_i - Puffer gespült. Nach der Inkubation mit Glutaraldehyd bei Raumtemperatur für 1 h, wurden die Träger mit über 5 mL KP_i -Puffer (0,1 M, pH 7) über einen Filter gespült.

Zur Immobilisierung von Tyrosinase (Tyr) wurden 1,4 mL Tyrosinaselösung (in 0,1 M KP_i -Puffer, pH 7) unterschiedlicher Konzentrationen auf 0,4 g funktionalisiertes PA12-Pulver in ein Mikroreaktionsgefäß gegeben und für 20 h bei 4 °C an einem Überkopfschüttler inkubiert. Erhaltene PA12-Tyr-Immobilisate wurden mit mindestens 5 mL KP_i -Puffer (0,1 M, pH 7) über einen Filter gespült und vor Verwendung für 2 h bei Raumtemperatur im Vakuumofen getrocknet.

2.2.3 Herstellung von PET-Anker-Spacer-PAD-Immobilisaten

Immobilisate aus PET-Pulver und verschiedenen PAD-Spacer-Anker-Fusionsproteinen wurden, wie nachfolgend beschrieben hergestellt. 500 mg PET-Pulver wurde in ein 2 ml Mikroreaktionsgefäß eingewogen. Anschließend wurden 1,5 mL CFE Lösung (auf 785,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ oder 1613,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ mit 0,5 M KP_i-Puffer, pH 7 verdünnt) dazugegeben. Durch das leichte Klopfen an die Gefäßwand wurden Agglomerationen aufgelöst und eine Suspension erzeugt. Diese wurde bei 4 °C an einem Rotationsschüttler für 10 min inkubiert. Die Immobilisate wurden über einen Zellulosefilter mit $5 \times 1,5$ ml Puffer (KP_i; 0,5 M; pH 7) gespült. Das Trocknen der Immobilisate wurde bei Raumtemperatur für maximal 2 h unter Vakuum durchgeführt. Immobilisate wurden immer frisch vorbereitet verwendet.

2.2.4 Herstellung von PA12-DSI-GS-PAD-Immobilisaten

Die Herstellung von PA12-DSI-GS-PAD-Immobilisaten als Pulver unterscheidet sich nur durch das PA12-Pulver von der in 2.2.3 beschriebenen Herstellung von PET-Anker-Spacer-PAD-Immobilisaten. Die Immobilisierung an einer additiv gefertigten Struktur hingegen, wurde technisch anders durchgeführt und ist an entsprechender Stelle beschrieben.

2.3 Verteilungsgleichgewichte

4-VG wurde mit PAD synthetisiert und mit *n*-Heptan extrahiert. Die erhaltene *n*-Heptan Stammlösung mit 40 mM 4-VG wurde filtriert und in verschiedenen Verhältnissen und Konzentrationen mit einer Pufferlösung bei 37 °C und 700 rpm für eine Stunde inkubiert. Die anschließende Probenentnahme der wässrigen Phase erfolgte über eine Kanüle, während Proben der wässrigen Phase *via* Pipette genommen wurden. Die Bestimmung der Verteilung von FA erfolgte analog mit unterschiedlichen Startkonzentrationen in der wässrigen Phase.

2.4 Additive Fertigung

Transparente Strukturen wurden mit dem SLA Drucker *Form 2* mit klarem V4-Harz und einer Schichtdicke von 50 μm von Claas Spille aus dem Institut für Mehrphasenströmungen der TUHH gefertigt.

Die, durch selektives Lasersintern (SLS) hergestellten POCS, wurden mit der EOS Eosint P396-Maschine und dem Standardpolymerpulver PA12 durch Organisation von Maria Isabelle Maiwald aus dem Institut für Laser- und Anlagensystemtechnik, hergestellt. Dabei wurde eine Schichtdicke von 120 μm gewählt.

Strukturen, die mittels FDM aus PET gefertigt wurden, wurden von Marcel Fassbender aus dem Institut für Technische und Makromolekulare Chemie der Universität Hamburg mit dem Ultimaker 2 pro extend gefertigt.

2.5 Assays zur Reaktionsverfolgung

Die Analyse von Enzymaktivitäten freier Enzyme (2.5.1) und Aktivitätstests für Immobilisate (2.5.2) sind im Folgenden beschrieben.

2.5.1 Aktivitätstests für freie Enzyme

Für die Bestimmung der CFE-Aktivität von PAD und PAD-Spacer-Anker-Fusionsproteinen, wurde CFE (Volumen variierte abhängig von Aktivität; finale Aktivität im Ansatz unter $0,1 \text{ U mL}^{-1}$) in 5 mM Ferulasäure in KP_i -Puffer (0,5 M; pH 7, auf $37 \text{ }^\circ\text{C}$ vorgewärmt) zu einem Gesamtvolumen von 1 mL in ein 1,5 mL Glasfläschchen pipettiert und in einem Thermoschüttler (1250 U min^{-1} und $37 \text{ }^\circ\text{C}$) inkubiert. Während 3 min der Reaktion wurden alle 30 s 50 μL Proben entnommen und direkt in eine 150 μL Quenchlösung (Acetonitril-Wasser 20:80 + 3% [v/v] Trifluoressigsäure) gegeben.

Für die Aktivitätsbestimmung von freier Tyrosinase wurde eine Stammlösung angesetzt. Ansonsten wurde analog zum oben beschriebenen Vorgehen verfahren. Die Aktivität freier Enzyme wurde über die Substratabnahme bei einem Umsatz bis 5 % bestimmt. Konnte kein linearer Zusammenhang zwischen Substratkonzentration im Assay und der Reaktionszeit festgestellt werden, wurden die erhaltenen Datenpunkte mathematisch beschrieben und aus erhaltener Funktion die Steigung im Ursprung für die initiale Aktivität freier Enzyme genutzt.

2.5.2 Aktivitätstests für Immobilisate

Getrocknete Immobilisate des Typs PET-Spacer-Anker-PAD oder PA12-DSI-GS-PAD wurden über einen Trichter in Glasfläschchen (1,5 ml) gefüllt. 1 mL Ferulasäurelösung (5 mM in KP_i -Puffer 0,5 M; pH 7) wurde auf $37 \text{ }^\circ\text{C}$ vorgewärmt und auf die Immobilisate gegeben. Die Homogenisierung der Suspension wurde auf einem Thermoschüttler ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 1250 U min^{-1}) realisiert. Proben wurden (analog zu Abschnitt 2.5.1) in eine Quenchlösung gegeben.

Für Experimente mit *in situ* Extraktion wurden 333 μL FA-Lösung (5 mM in KP_i -Puffer 0,5 M; pH 7) auf 0,1667 g Immobilisat, gefolgt von 666 μL *n*-Heptan gegeben. Proben für die Konzentrationsbestimmung wurden aus der wässrigen Phase entnommen.

Die Aktivität von Immobilisaten des Typs PA12-Tyr wurde analog bestimmt. Unterschiedlich war jedoch das Reaktionsgefäß: Hier wurde ein Mikroreaktionsgefäß (1,5 mL) anstelle eines HPLC-Fläschchens verwendet. Weiterhin wurden 100 μL Probe in 100 μL Quenchlösung gegeben.

Die Aktivität von Immobilisaten des Typs PET-PD-CALB und von N435 wurde über die Umsetzung von Wasser in einer gesättigten Laurinsäureethylester-Lösung bestimmt. Hierzu wurden 0,00033 g N435 bzw. 0,29113 g PET-PD-CALB Immobilisat in 4 mL Substratlösung in einem Glasfläschchen gegeben. Die Reaktion wurde auf einem Thermoschüttler bei 1000 rpm und $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Zur Bestimmung des Wassergehalts wurden 0,1 – 0,2 mL mit einer 120 mm Nadel gezogen und in einem Titrator nach Standardprotokoll des Herstellers vermessen.

2.6 Analytik

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen (2.6.1), sowie die Messung von Reaktandenkonzentrationen mittels HPLC (2.6.2), GC (2.6.3), und dem Photometer (2.6.4), werden in diesem Abschnitt erläutert.

2.6.1 Proteinkonzentrationsbestimmung mit Plattenleser

Die Bestimmung der Proteinkonzentration im CFE wurde mittels Pierce Protein Assay durchgeführt. Hierzu wurden 10 μL einer Probe in 150 μL Reagenz in Mikrotiterplatten pipettiert und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Absorptionen der Proben in einem Plattenleser bei 660 nm und 25 °C gemessen. Zur Kalibrierung wurde das Standardprotein Rinderserumalbumin (BSA) verwendet. Ein Beispiel einer hiermit erzeugten Kalibriergerade ist in Abbildung 2.1 gezeigt. CFE-Proben wurden vor der Messung 1:10 und 1:20 mit KPi -Puffer (pH 7; 0,5 M) verdünnt, um eine Absorption im kalibrierten Bereich zu erhalten.

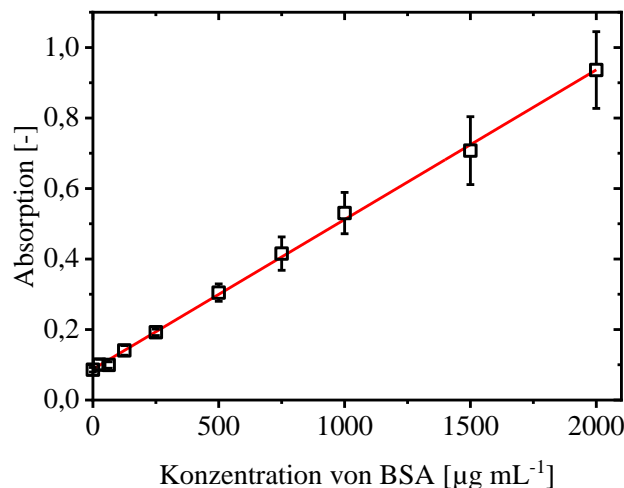


Abbildung 2.1: Kalibrierung der Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels Spektrometer: BSA als Standardprotein. $Y = 0,00042 X + 0,084755$; $R^2 = 0,9986$; Replikate ($n = 10$)

2.6.2 Konzentrationsbestimmungen mit HPLC

Gequentschte Proben wurden zentrifugiert (4 °C, 5 min, 1400 U min^{-1} , Mikro 200R) und durch Pipettieren des Überstands in HPLC-Glasfläschchen mit Mikroeinlässen für die HPLC-Messung vorbereitet. Proben aus Versuchen mit pulverförmigen Immobilisat wurden zuvor filtriert (0,45 μm). Die Konzentrationen von FA und 4-VG in wässriger Phase wurde mit einer Agilent LC-1100 HPLC mit einem Dioden-Array-Detektor und der in Tabelle 2.8 aufgelisteten Parametern bestimmt. Exemplarische Kalibrierungen für FA und 4-VG sind in Abbildung 2.2 abgebildet.

Tabelle 2.8: Konzentrationsbestimmung von FA und 4-VG: Methodeigenschaften der HPLC-Messungen.

Parameter	Einstellung
Säule	LiChrospher® 100 RP-18 (5 μm)
Eluenten (isokratisch)	40% H ₂ O + 0.1% TFA 60% ACN + 0.1% TFA
Resultierter Druck	80-90 bar
Temperatur	30 °C
Wellenlänge	280 nm für FA 254 nm für 4-VG
Flussrate	0,8 mL min ⁻¹
Injektionsvolumen	10 μL
Retentionszeit FA	3,3 min
Retentionszeit 4-VG	4,6 min

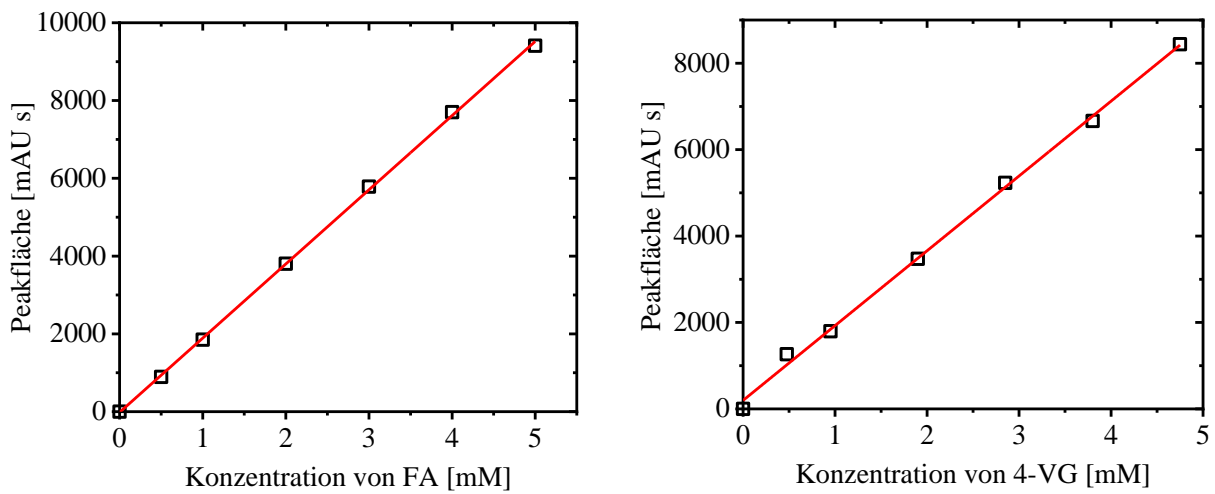


Abbildung 2.2: Kalibriergerade für die Konzentrationsbestimmung von FA bei 280 nm (links: $Y = 1907,03 X - 16,5$; $R^2 = 0,9996$) und 4-VG bei 254 nm (rechts: $Y = 1731,3 X + 196,7$; $R^2 = 0,998$)

Ein exemplarisches Chromatogramm für die Detektion von FA und 4-VG ist in Abbildung 2.3 aufgeführt.

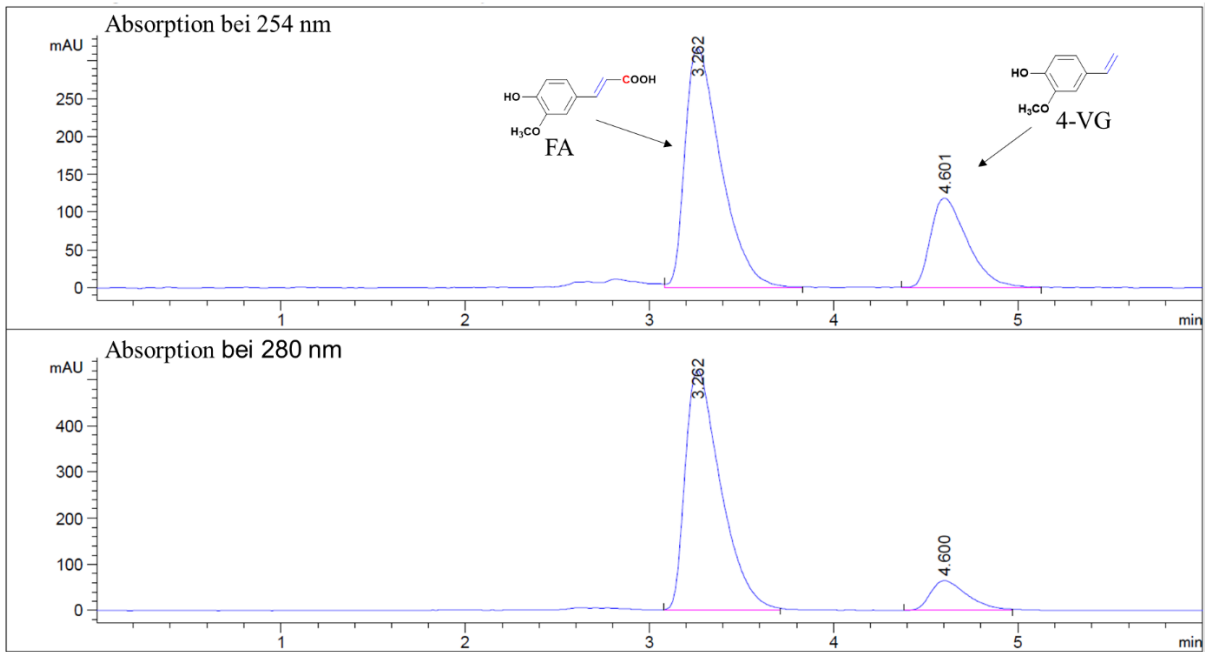


Abbildung 2.3: Exemplarisches Chromatogramm der HPLC zur Bestimmung von FA und 4-VG-Konzentrationen.

Für die Konzentrationsbestimmung von L-Tyrosin und L-DOPA wurde eine andere Methode verwendet, die in Tabelle 2.9 abgebildet ist. Exaemplarische Kalibriergeraden sind in Abbildung 2.2 dargestellt.

Tabelle 2.9: Methodeigenschaften aller HPLC-Messungen für die Bestimmung von L-Tyrosin und L-DOPA Konzentrationen

Parameter	Einstellung
Säule	LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm)
Eluent	97,522 % H ₂ O, 2,4 % ACN, 0,078 % TFA
Temperatur	30 °C
Wellenlänge	224 nm
Flussrate	0,8 mL min ⁻¹
Injektionsvolumen	10 µL
Retentionszeit L-Dopa	13,3 min
Retentionszeit L-Tyrosin	8,7 min

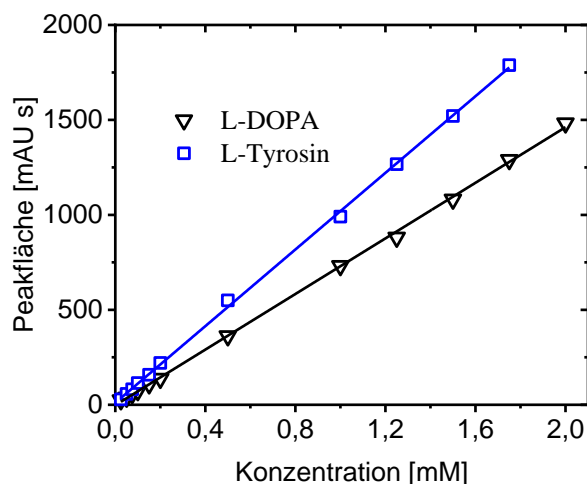


Abbildung 2.4: Kalibriergerade für die Konzentrationsbestimmung von L-Tyrosin ($Y = 1008,8 X + 10,7$; $R^2 = 0,9997$) und L-DOPA ($Y = 732,0 X - 5,7$; $R^2 = 0,9994$)

2.6.3 4-VG-Konzentrationsbestimmung mit GC

Probenvolumina der organischen Phase von 150 μL wurden aus dem Reaktionssystem entnommen, in ein Mikroreaktionsgefäß (1,5 ml) überführt und für 5 min bei 14000 U min^{-1} und 4 $^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert (Mikro 200 R). Vom Überstand wurden 120 μl in ein GC-Fläschchen mit Mikroinsert überführt und mit einem Gaschromatographiesystem analysiert. Methodenparameter und Einstellungen sind in Tabelle 2.10 und das Heizprogramm des Säulenofens in Tabelle 2.11 zusammengefasst. Eine exemplarische Kalibriergerade ist in Abbildung 2.5 dargestellt.

Tabelle 2.10: GC-Einstellungen für die Bestimmung der Konzentration von 4-VG in *n*-Heptan

Parameter	Einstellung
Säulenflussrate	1,5 mL min^{-1}
Gesamtflussrate	54,5 mL min^{-1}
Temperatur (Inlet)	280 $^{\circ}\text{C}$
Temperatur (Detector)	300 $^{\circ}\text{C}$
H ₂ Durchfluss	30 ml min^{-1}
Druck	1,4 bar
Detektor	FID
Säule	MN OptiMA [®] 5 MS 30 m x 0,25 mm, 0,25 μm
Retentionszeit 4-VG	5 min

Tabelle 2.11: Heizprogramm des Säulenofens der GC bei der Detektion von 4-VG in *n*-Heptan

Rate [$^{\circ}\text{C min}^{-1}$]	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Halten [min]
-	120	2
15	180	2
50	280	3

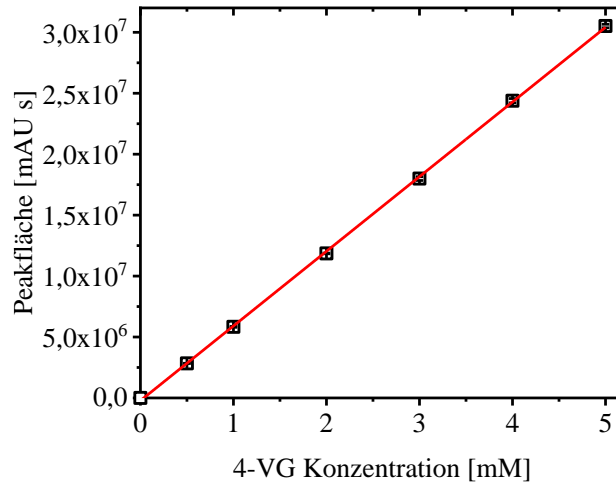


Abbildung 2.5: Kalibrierung der GC für die Bestimmung von 4-VG in *n*-Heptan; $Y = 6,4 \cdot 10^6 X - 2,2 \cdot 10^5$; $R^2 = 0,99992$. Fehlerbalken indizieren Abweichungen von Duplikaten.

2.6.4 4-VG-Konzentrationsbestimmung mit Photometer

Proben der organischen Heptanphase wurden mit *n*-Heptan verdünnt, in eine Quarzküvette überführt und im Spektrometer gemessen. Zur Kalibrierung des Geräts wurden zuvor definierte 4-VG-Verdünnungen verwendet (Abbildung 2.6).

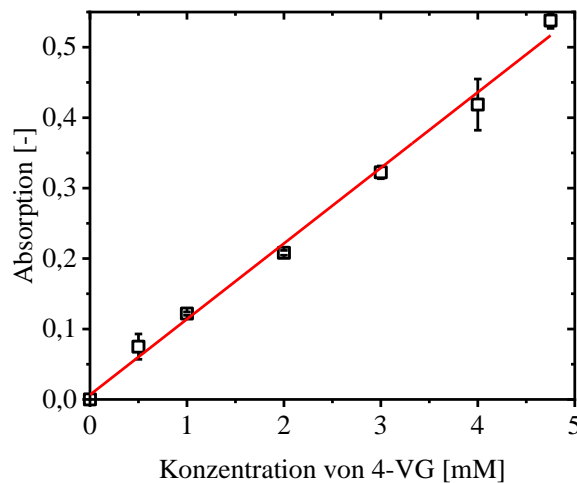


Abbildung 2.6: Kalibrierung für die Bestimmung von 4-VG-Konzentrationen in *n*-Heptan: $Y = 0,10738 + 0,00659 X$, $R^2 = 0,994$. Fehlerbalken indizieren Abweichungen von Duplikaten.

2.7 Fehlerabschätzung

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse sind unterschiedlich oft reproduziert worden. Die Reproduktion wurde immer so durchgeführt, dass der jeweilige Versuch unter identischen Bedingungen wiederholt wurde. Unter den entsprechenden Abbildungen wurde jeweils die Anzahl dieser Wiederholung angegeben. Gezeigte Fehlerbalken entsprechen der Abweichung dieser Replikate vom Mittelwert und wurden über Formel 7.1 bestimmt.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{(n-1)}} \quad (2.1)$$

Hierbei ist x der Messwert, \bar{x} der Mittelwert aller gemessenen Proben und n die Anzahl der Versuchswiederholungen.

Um den Trend von Datenpunkten abzubilden wurden diese oftmals mit mathematischer Funktion beschrieben. Hierbei wurde in Umsatzverläufen die Kurvenanpassung „Michaelis Menten“ von Origin[®] verwendet. Die zugrundeliegende Funktion ist im Folgenden (7.2) gezeigt.

$$y(x) = \frac{\alpha x}{\beta + x} \quad (2.2)$$

Hierbei stellt x die Variable und α und β Konstanten dar, die automatisch angepasst werden.

3 Immobilisierung an additiv fertigmare Materialien

Die additive Fertigung birgt das Potential die Effizienz enzymatisch katalysierter Reaktionen in Strömungsrohren zu erhöhen. Um dieses Potential ausschöpfen zu können, bedarf es Immobilisierungsmethoden für Materialien, die additiv fertigmare sind. Für unterschiedliche Enzyme und damit einhergehende Reaktionssysteme bedarf es u.U. unterschiedliche Immobilisierungskonzepte und Materialien. Um die universelle Anwendbarkeit additiv gefertigter Trägerstrukturen in der Biokatalyse zu zeigen, werden daher unterschiedliche Immobilisierungskonzepte und Materialien untersucht, die jeweils auf Basis der Voraussetzungen des Reaktionssystems gewählt wurden. Die untersuchten Enzyme, deren Immobilisierung an additiv fertigmare Materialien gezeigt werden soll, katalysieren Reaktionen, deren Produkte relevant im Sinne einer Wertschöpfung sind.

Die Immobilisierung einer Tyrosinase wird über die kovalente Anbindung an PA12 gezeigt und dient als ein Beispiel für die Immobilisierung mit Hilfe einer Materialfunktionalisierung. CALB hingegen wurde gewählt, um die Immobilisierung über eine Materialbeschichtung eines konventionell für viele Produktionen verwendeten Enzyms an additiv gefertigtes Material zu zeigen. Die Immobilisierung von PAD über Ankerpeptide dient als Beispiel für die Immobilisierung eines nicht aufgereinigten Enzyms direkt aus dem zellfreien Extrakt. Ferner wurde dieses Enzym gewählt, um das Konzept der Enzymfunktionalisierung und der Anbindung über Ankerpeptide an verschiedenen Materialien zu zeigen. Mit Hilfe dieser Immobilisierungstechnik wird auch die Implementierung und Optimierung einer *in situ* Extraktion des Reaktionsproduktes mit additiv gefertigten Strukturen in einem hybriden Reaktor ermöglicht. Nachfolgend sind die untersuchten Enzyme, Materialien und Immobilisierungstechniken in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1: In dieser Arbeit untersuchte Enzyme zur Immobilisierung an additiv fertigmare Materialien und gewählte Immobilisierungstechniken; EC = Enzymklasse; PA12 = Polyamid 12, PET = Polyethylenterephthalat

Enzym	EC	Kürzel	Ursprung	Material	Immobilisierung
Phenolsäure-Decarboxylase	4.1.1	PAD	<i>Mycobacterium colombiense</i>	PA12, PET	Ankerpeptide
<i>Candida antarctica</i> Lipase B	3.1.1.3	CALB	<i>Candida antarctica</i>	PET	Beschichtung
Tyrosinase	1.14.18.1	Tyr	<i>Agaricus bisporus</i>	PA12	Funktionalisierung

In diesem Kapitel wird der Weg dargestellt, der zur Auswahl der Materialien führte, die im Hinblick auf die Nutzung als Enzymträger und Strömungsführer in der Biokatalyse untersucht wurden (3.1). Anschließend wird eine Charakterisierung der Materialien in ungefertigter Pulverform und additiv gefertigter Oberflächen präsentiert (3.2). Auf Basis der Materialien und des jeweiligen Reaktionssystems wurden Immobilisierungsmethoden gewählt (Ankerpeptide, Beschichtung, Funktionalisierung; vgl. Tabelle 3.1) und in Abschnitt 3.3 gegenübergestellt. In 3.4, 3.5, und 3.6 wird auf diese im speziellen eingegangen.

3.1 Materialüberblick

Durch die rasante Entwicklung der additiven Fertigung gibt es eine Vielzahl von Materialklassen wie zum Beispiel Polymere¹¹³ Keramiken¹¹⁴, Metalle¹¹⁵, Beton¹¹⁶, Gele²³, oder sogar Lebensmittel¹¹⁷, die durch unterschiedliche Technologien additiv gefertigt werden können. Genauso vielfältig wie die Materialien sind auch deren Eigenschaften. Wie in Abschnitt 1.2.1 angerissen, ist in dieser Arbeit nicht die Verwendung von Gelen berücksichtigt worden, da diese oftmals erhebliche Nachteile in ihrer Stabilität aufwiesen. Für den Einsatz in der Biokatalyse entsprechen viele Polymere und Metalle den Voraussetzungen physikalischer und chemischer Widerstandsfähigkeit und der Möglichkeit zur Autoklavierung. Da diese Materialklassen in Bioreaktoren etabliert sind, haben sie eine hohe Relevanz in Bezug auf deren Nutzung als additiv gefertigte Träger- und Verteilerstruktur. Das Materialscreening wurde daher auf diese Stoffgruppen beschränkt.

In Tabelle 3.2 ist ein Auszug relevanter Polymere und Metalle für die additive Fertigung dargestellt. In ihr sind die Materialien im Hinblick auf ihre Beständigkeit gegenüber Heptan und gegenüber Temperatur klassifiziert. Hierbei wurde bei widersprüchlichen Literaturangaben zur Heptanbeständigkeit die Klassifizierung „m“ für moderat gewählt. Für Angaben mindestens weitgehender Beständigkeit „b“ und Angaben, die die unmittelbaren Beschädigungen des Materials oder Änderungen dessen Eigenschaften beschreiben, „u“ gewählt. Die Informationen zur Materialbeständigkeit wurden aus „Chemical Resistance Charts“ extrahiert und verglichen. Weiterhin sind Literaturbeispiele gezeigt, wie an den Materialien bereits immobilisiert wurde. Als Temperatur bis zu der das jeweilige Material stabil ist (Temperaturstabilität TS), wurde für Polymere die sog. „glass transition temperature“ gewählt, ab der diese ihre physikalischen Eigenschaften stark verändern.

Tabelle 3.2: Screening additiv fertigmarer Materialien für die Biokatalyse (im speziellen der Decarboxylierung von Ferulasäure inklusive *in situ* Extraktion mit *n*-Heptan). GOx = Glucose-Oxidase, LOx = Lactat-Oxidase, GA = Glutaraldehyd, AS = Acrylsäure, HRP = Meerrettich-Peroxidase, TS = Temperaturstabilität (aus: CROW © 2019 polymerdatabase.com), HB = Heptanbeständigkeit (m = moderat, b = beständig, u = unbeständig). Hervorgehoben sind ausgewählte Materialien für diese Arbeit.

Name	Kürzel	HB	TS [°C]	Immobilisierungsbeispiel
Acrylnitril-Butadien-Styrol	ABS	m	90	GOx und LOx über GA als Linker ⁸
High Impact Polystyrene	HIPS	u	100	HRP mit Streptavidinbeschichtung ¹¹⁸
Polymilchsäure	PLA	b	53	Makromoleküle mittels GA ¹¹⁹
Polyamid 12	PA12	b	54 ¹²⁰	Lysozym über Aminverbindung ¹²¹
Polycarbonat	PC	u	150	HRP via Photolinker ¹²²
Polyetheretherketon	PEEK	b	148	BSA über AS- Funktionalisierung ¹²³
Polyethylenterephthalat	PET	b	65	Lipase durch GA Aktivierung ¹²⁴
Polymethylmethacrylat	PMMA	b	85	GOx an Aldehydgruppen ¹²⁵
Polyoxymethylen	POM	b	-30	-
Polypropylen	PP	u	-27	Lipase an porösen Polypropylen ¹²⁶
Polyvinylalkohol	PVA	b	34	Oxydase über PVA-GA Netzwerk ¹²⁷
Thermoplast. Elastomere	TPE	b	low	-
Aluminiumlegierung	AlSi10Mg	b	> 300	HRP an Aluminiumstruktur ¹²⁸
Edelstahl	1.4404	b	> 300	Lysozym über Aminosilanisierung ¹²⁹
Titanlegierung	Ti6Al4V	b	> 300	Selektiv über Adhäsionsvermittler ¹³⁰

Tabelle 3.2 zeigt, dass die primäre Frage zur Wahl des Materials als Enzymträger nicht diejenige ist, ob an diesem immobilisiert werden kann, sondern welches Material am besten für die verwendeten Reaktionsbedingungen geeignet ist. Innerhalb der Literatur lassen sich Beschreibungen von Immobilisierungsmethoden für die meisten additiv fertigmaren Materialien finden. Ein größerer Anteil an Publikationen über die Immobilisierung an PET im Vergleich zu Immobilisierungen an den anderen aufgeführten Materialien war jedoch ausfindig zu machen. Nicht nur Standardmethoden wie die Anbindung über GA (Tabelle 3.2), sondern auch Einschlussmethoden¹³¹ oder alternative Funktionalisierungen¹³² wurden für dieses Material bereits beschrieben. Als Temperatur, bis zu der die potentiell nutzbaren Materialien ihre physikalischen Eigenschaften nicht ändern sollten, wurde 50 °C gewählt. Durch die Kriterien der Temperatur- und Lösungsmittelbeständigkeit konnten die nutzbaren Materialien auf Metalle, PMMA, PEEK, PA12, PET und PLA eingegrenzt werden. Einige Polymere schwellen bei Kontakt mit Wasser. Während für Metalle, PA12 und PET kein Schwellen des Materials zu erwarten ist, nimmt PLA bis zu $0,7 \pm 0,1$ % (w/w) Wasser auf, wenn es mit diesem in Kontakt steht¹³³ [$0,27 \pm 0,11$ % (w/w) in Heptan¹³³] auf. Der Fertigungsprozess des Materials und Erfahrung mit seiner Fertigung beeinflussen wesentlich die erzeugbaren Strukturen. PET ist ein Standardmaterial der Additiven Fertigung, welches im FDM eingesetzt wird, während PA12 ein häufig verwendetes und optimiertes Polymer innerhalb des SLS Prozesses ist. Diese Faktoren führten zu der Wahl und näheren Untersuchung von Metallen, PET und PA12. Im folgenden Abschnitt werden diese Materialien im Hinblick auf ihre Oberfläche, die für die Immobilisierung von Enzymen entscheidend ist, charakterisiert.

3.2 Charakterisierung verwendeter Materialien

Wie in 3.1 beschrieben, wurde die Untersuchung der Materialien PET, PA12, sowie von drei Metallen in Bezug auf deren Anwendbarkeit als statischer Mischer und Enzymträger in der Biokatalyse forciert. Im Folgenden werden die Materialien hinsichtlich ihrer Morphologie in additiv gefertigter und ungefertigter Form klassifiziert. Als ungefertigte Form wurde jeweils ein Pulver des Materials gewählt. Für Metalle und PA12 sind diese gleichzeitig das Ausgangsmaterial für die AF mittels SLS, während PET über FDM aus einem Strang gefertigt wurde. Die Korngrößen und makroskopischen Oberflächen der jeweiligen Pulver unterscheiden sich und sind mit ihrer Oberfläche nach deren additiven Fertigung in Abbildung 3.1 gezeigt.

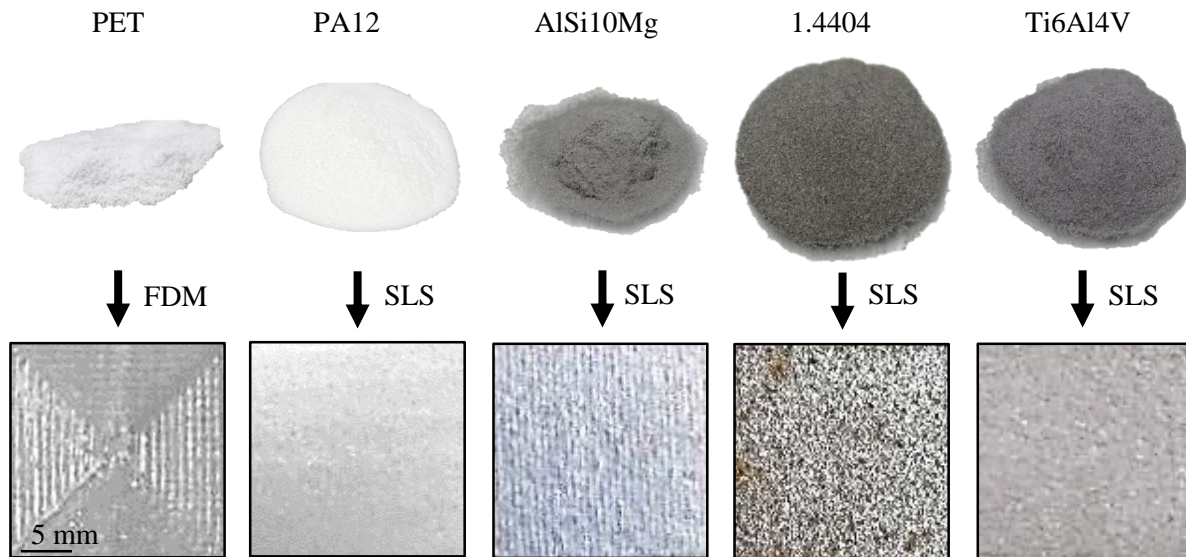


Abbildung 3.1: Ausgangsmaterialien für die additive Fertigung in Pulverform (oben) und korrespondierende, über Schmelzschiichtung (FDM) und Selektives Lasersintern (SLS) gefertigte Oberflächen

Bereits im makroskopischen Bereich sind deutliche Unterschiede der Oberflächenstruktur auszumachen, die sowohl vom Material selber als auch von der Fertigungsmethode abhängen. Das mittels FDM gefertigte Material PET weist eine rillenförmige, reflektierende Oberfläche auf, die auf Grund der Fertigung aus einem PET Strang entsteht. Dieser wird im FDM in der Düse erhitzt und geschmolzen und härtet bei Auftragung und Abkühlung auf einer Oberfläche wieder aus. Hierdurch entstehen zwangsläufig Oberflächen, die regelmäßig uneben sind und durch Berge und Täler charakterisiert sind. Dem gegenüber steht die Fertigung mittels SLS, bei welcher Strukturen aus einem Pulver heraus (PA12 und Metalle) gefertigt werden. Auch diese Fertigungstechnik lässt sich bereits auf der Oberfläche ablesen. Durch den Sinterprozess entstehen aus dem Ausgangsmaterial des Pulvers lokale Berge, die durch Verdichtung mittels punktueller Laserbestrahlung entstehen. Makroskopisch sind von SLS gefertigte Oberflächen wesentlich ebener, als Oberflächen, die durch FDM gefertigt sind. Sowohl durch das SLS als auch durch das FDM entstehen jedoch keine perfekt glatten Oberflächen, wie es bei anderen Fertigungstechniken wie dem Feilen, Sägen oder Drehen üblich ist. Diese Rauheit der Materialoberflächen bietet eine größere Oberfläche für Enzymimmobilisierungen als Material, welches nach der Fertigung glatt ist. In Bezug auf Strömungen in Reaktoren haben raue Oberflächen Effekte auf den Druckverlust und das Strömungsregime durch die Induzierung von Sekundärströmungen. Für einen geringen Druckverlust sollten diese Oberflächen möglichst glatt sein.

Zur Immobilisierung von Enzymen auf Oberflächen additiv gefertigter Materialien ist auf Grund ihrer geringen Größe die mikroskopische Morphologie der Materialien von Bedeutung. Konventionelle Träger für Enzyme bieten oftmals Materialstrukturen, die eine innere Porosität durch Makro-, Mikro- und Mesoporen und damit einhergehend eine hohe spezifische Oberfläche aufweisen. Zwar wurden solche Eigenschaften für additiv gefertigte Materialien nicht erwartet, dennoch wurde die mikroskopische Morphologie der Oberflächen mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) an der „Betriebseinheit Elektronenmikroskopie“ der Technischen Universität Hamburg (TUHH) untersucht, um Abschätzungen über die spezifische

Oberfläche und mögliche mikroskopische Eigenschaften zu treffen. In Abbildung 3.2 ist die Vergrößerung von PET-Pulver mit einem Durchmesser unter 300 µm gezeigt.

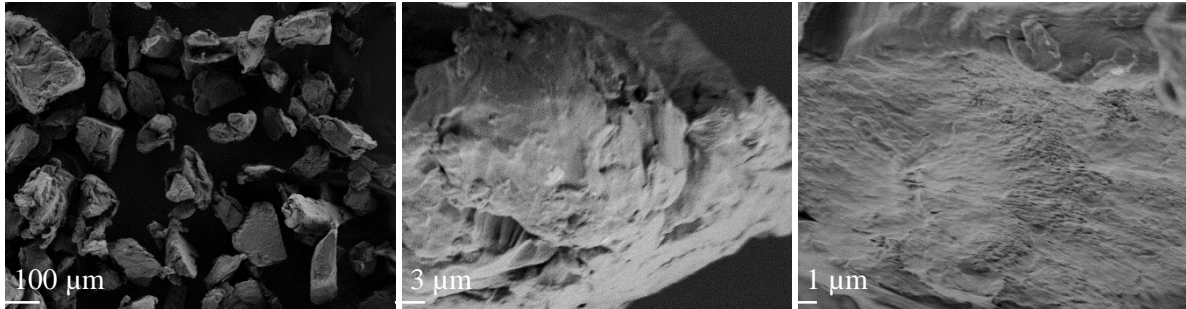


Abbildung 3.2: Vergrößerung von Polyethylenterephthalatpulver mit $d < 300 \mu\text{m}$ mittels Rasterelektronenmikroskopie angefertigt an der *Betriebseinheit Elektronenmikroskopie* der Technischen Universität Hamburg

Die Abbildung 3.2 (links) zeigt sowohl, dass die Angaben des Herstellers von Durchmessern unter 300 µm korrekt sind, als auch eine Inhomogenität der PET-Partikel. Diese äußert sich sowohl in Unterschieden in ihrer Größe als auch ihrer Form. Verschieden große und glatte Abbruchkanten der Partikel sind auszumachen. Die weitere Vergrößerung eines Partikels zeigt exemplarisch die Unebenheiten auf der Partikeloberfläche. Weiterhin sind keine Kanäle zu erkennen, die das Material an sich porös machen. Es ist also nicht von einer inneren Oberfläche des Materials auszugehen. Die Durchmesser der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind $< 5 \text{ nm}$. Daher können einzelne Enzyme mit den erreichten Vergrößerungen mittels REM nicht sichtbar gemacht werden. Die geringe Enzymgröße bedingt, dass Eigenschaften mikroskopischer Oberflächen eine Rolle bei deren Anbindung spielen. Die Vergrößerung des PET-Pulvers zeigt, dass deren Oberflächenrauigkeiten aufweisen, die zu einer vergrößerten spezifischen Oberfläche führen, gleichzeitig jedoch keine innere Oberfläche besitzen, was diese wiederum limitiert.

Die weiteren Ausgangspulver für die AF wurden nicht mittels REM vermessen. Stattdessen wurden alle Pulver hinsichtlich ihrer massenspezifischen Oberfläche untersucht. Hierzu wurden Proben mittels einer Methode von Stephen Brunauer, Paul Hugh Emmett und Edward Teller (BET) am Institut für Thermische Verfahrenstechnik der Technischen Universität Hamburg (TUHH) analysiert. Die gemessenen massenspezifischen Oberflächen a_s und die zugehörigen Materialdichten δ sind in Tabelle 3.3 aufgelistet.

Tabelle 3.3: Über BET gemessene massenspezifische Oberflächen verschiedener, additiv fertigmarer Materialien in Pulverform und ihre Dichten

Material	$a_s [\text{m}^2 \text{g}^{-1}]$	$\delta [\text{g cm}^{-3}]$	$a_s \delta 10^{-6} [\text{m}^{-1}]$
Ti6Al4	1,413	4,43 ¹³⁴	6,26
14.404	0,356	7,95 ¹³⁵	2,83
AlSi10Mg	2,499	2,67 ¹³⁶	6,67
PET	0,344	1,38 ¹³⁷	0,47
PA12	3,816	0,95 ¹³⁸	3,63

Die Oberflächenrauheit, viel mehr jedoch der jeweilige Partikeldurchmesser des Pulvers sind Ursachen für große Unterschiede in den spezifischen Oberflächen (Tabelle 3.3). Dies wird bei

der Beschreibung der Partikel über sphärische Formen deutlich, bei denen der Durchmesser quadriert in die Berechnung der Oberfläche eingeht. Die Bezugsgröße der Materialmasse bedingt, dass auch die Dichte für die Bewertung von einsetzbaren Oberflächen herangezogen werden muss. Auch wenn Partikel verschiedener Pulver identische Durchmesser und Oberflächen hätten, kann sich ihre massenspezifische Oberfläche auf Grund ihrer Dichte drastisch unterscheiden. Ein Pulver hat also hohe massenspezifische Oberflächen, wenn seine Partikel eine hohe Oberflächenrauheit, geringe Dichte und kleine Partikeldurchmesser aufweisen.

Werden die Materialien als Enzymträger in Pulverform in Satzreaktoren eingesetzt, ist die maximal einsetzbare Trägermasse dadurch begrenzt, ob eine homogene Suspension in der Reaktionsphase erzeugt werden kann. Hierfür ist weniger die Dichte der Partikel entscheidend als die Dichte des Pulvers bzw. die Partikelgröße. Das Produkt aus der Materialdichte und der massenspezifischen Oberfläche ist ein Indikator für die einbringbare Oberfläche in eine Reaktionslösung. Unter Annahme einer gleichen Packungsdichte, also gleicher Raumausnutzung von Pulverpartikeln, kann mehr Oberfläche in ein Reaktionsvolumen eingebracht werden, je höher dieser Faktor ist. Am Beispiel der Polymere PA12 und PET ist in dieser Beziehung deutlich, dass durch wesentlich kleine Partikeldurchmesser des PA12 (~50 µm ggü. < 300 µm) mehr Oberfläche pro Reaktionsvolumen einsetzbar ist.

Nicht nur die Pulverform der verwendeten Materialien wurde mikroskopisch analysiert; auch die Oberflächenstrukturen additiv gefertigter Metallproben konnten mit Hilfe des REM charakterisiert werden. In Abbildung 3.3 bis Abbildung 3.5 sind die Vergrößerungen der über SLS gefertigten Materialien AlSi10Mg, Edelstahl 1.4404 und Ti6Al4V zu sehen.

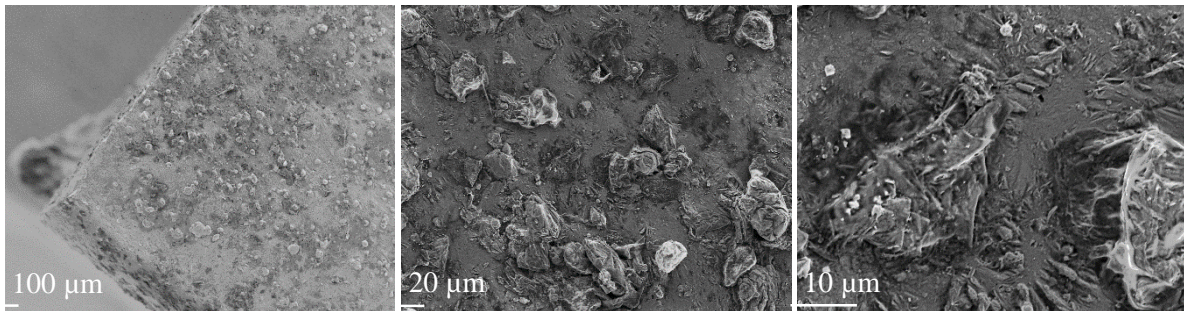


Abbildung 3.3: Vergrößerung von additiv gefertigten AlSi10Mg mittels Rasterelektronenmikroskop, angefertigt an der *Betriebseinheit Elektronenmikroskopie* der Technischen Universität Hamburg

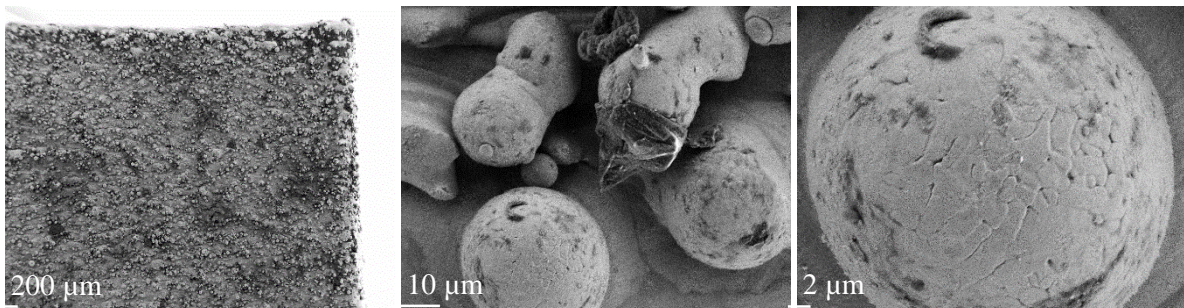


Abbildung 3.4: Vergrößerung von additiv gefertigten Edelstahl 1.4404 mittels Rasterelektronenmikroskop, angefertigt an der *Betriebseinheit Elektronenmikroskopie* der Technischen Universität Hamburg

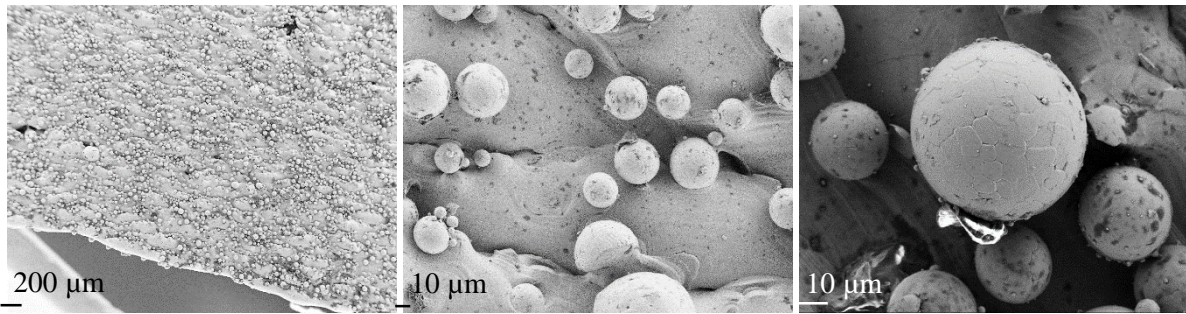


Abbildung 3.5: Vergrößerung von additiv gefertigtem Ti6Al4V mittels Rasterelektronenmikroskop, angefertigt an der *Betriebseinheit Elektronenmikroskopie* der Technischen Universität Hamburg

Trotz des gleichen Fertigungsprozesses (SLS), unterscheiden sich die additiv gefertigten Metalloberflächen in ihrer Morphologie abhängig vom Ausgangsmaterial. Während Oberflächen des gefertigten AlSi10Mg unförmige Materialerhebungen unterschiedlicher Größe aufweisen, sind für den Edelstahl 1.4404 und Ti6Al4V neben unebenen Oberflächen deutlich kugelförmige Materialausstülpungen zu beobachten. An diesen scheinen Materialrückstände der Schmelze anzuhafte. Wie bei Pulvern als Trägermaterial, bietet auch das gefertigte Material durch Unebenheiten in der Mikroskala größere Oberflächen als wenn sie ausschließlich glatt wären. Jedoch sind auch bei den gefertigten Metallen maximal kleine Kanäle in das Material zu vermuten, die durch Risse in den Kugelausstülpungen sichtbar wären. Dies führt zu der Annahme, dass nach der Fertigung nicht von einer inneren Oberfläche des Materials auszugehen ist, wie sie bei konventionellen Enzymträgern die Regel ist.

Die Charakterisierung der vorgestellten Materialien gab Aufschluss über zu beachtende Parameter wie der Oberflächenrauheit oder der spezifischen Oberfläche bei der Nutzung als Enzymträger und in additiv gefertigter Form als Verteilerorgan in Strömungsrohren. Mit den chemischen Eigenschaften, die in Kapitel 3.1 dargelegt wurden, bilden sie die Basis zur Wahl von Immobilisierungsmethoden an den vorgestellten Materialien.

3.3 Immobilisierungsmethoden für additiv fertigmare Materialien

In dieser Arbeit wurde die spezifische und gerichtete Immobilisierung von PAD mittels Ankerpeptiden, die Immobilisierung von *Candida antarctica* Lipase B (CALB) über eine Polydopaminbeschichtung und die Immobilisierung von Tyrosinase mittels Polymerfunktionalisierung untersucht. Neben der adsorptiven Bindung stellt die Immobilisierung von Enzymen mittels Polymerfunktionalisierung die am häufigsten verwendete Methode dar. Bei Polymerfunktionalisierungen werden oftmals viele Schritte und toxische Chemikalien benötigt, um die kovalente Fixierung von Enzymen zu realisieren. Dies zeigt sich am Beispiel der Immobilisierung von Lipase an PET Fasern nach Yiğitoğlu *et al.*, bei der nach einem Schwellschritt mit Dichlorethan eine Polymerisierung mit Acrylamid und eine Funktionalisierung mit Glutaraldehyd nötig war, bevor die Lipase immobilisiert werden konnte¹²⁴. Auch die in dieser Arbeit durchgeführte Immobilisierung von Tyrosinase an PA12 benötigt viele Schritte und toxische Substanzen. Demgegenüber steht die Immobilisierung mittels Ankerpeptiden, die ohne Chemikalien und mit nur einem Inkubationsschritt zur Immobilisierung auskommt. Auch die Beschichtung von Materialien kann eine schnellere Alternative zur chemischen Funktionalisierung darstellen. Die in dieser Arbeit untersuchte

Immobilisierung an PET mittels Beschichtung mit PD benötigt lediglich eine Polymerisation von Dopamin an der Zieloberfläche und bietet anschließend funktionelle Gruppen zur Enzymimmobilisierung. Die Unterschiede der Schritte der drei Immobilisierungsmethoden sind in Abbildung 3.6 dargestellt.

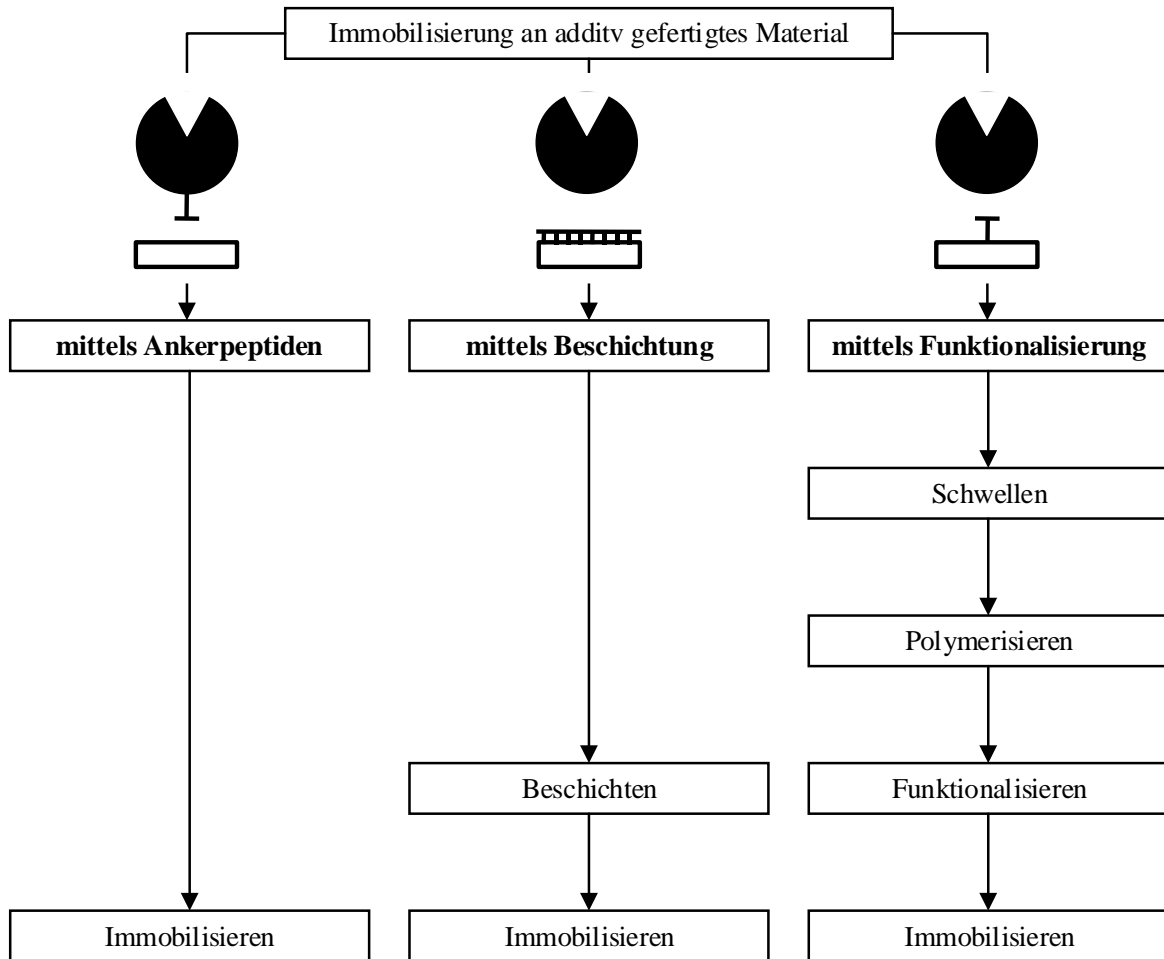


Abbildung 3.6: Schritte zur Immobilisierung an additiv fertigmaren Polymeren mittels Ankerpeptiden, Beschichtung und Funktionalisierung


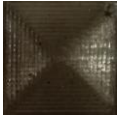




Als ein Ergebnis der in den nachfolgenden Kapiteln dargestellten Untersuchungen kann vorweggenommen werden, dass die Beschichtung und die Nutzung von Ankerpeptiden zur Immobilisierung weitgehend materialunabhängig sind und dies somit einen weiteren Vorteil gegenüber der materialspezifischen Funktionalisierung darstellt.

Bereits vor der näheren Untersuchung dreier Immobilisierungstechniken für additiv fertigmare Materialien konnten Vorteile der Immobilisierung mittels Ankerpeptiden und PD-Beschichtung ausgemacht werden. Demgegenüber steht der Vorteil stabilerer Bindungen mittels chemischer Funktionalisierung. Im folgenden Abschnitt 3.4 werden Ergebnisse der Untersuchung der Immobilisierung über eine PD-Beschichtung dargestellt. Anschließend folgt in 3.5 die Darstellung von Ergebnissen zur Immobilisierung mittels Funktionalisierung additiv fertigmaren PA12. In 3.6 wird dann ausführlich auf die Nutzung von Ankerpeptiden zur Immobilisierung eingegangen.

3.4 Immobilisierung an einer Polydopaminbeschichtung

Die in Abschnitt 1.2.1.3 erläuterte Beschichtung von Materialien mit PD, wurde am Beispiel von PET durchgeführt. Zunächst wurde hierzu ein Quader aus PET über FDM additiv gefertigt. Die Beschichtung von PET mit PD wurde anfangs mit einer Dopaminlösung von 2 g mL^{-1} durchgeführt, deren pH mittels Tris-Puffer auf 8,5 eingestellt wurde durchgeführt. Hierdurch wurde die Polymerisation des Dopamins in der Lösung und auf der PET-Oberfläche initiiert. Nach einer Inkubationszeit von 20 h, wurde die Probe gewaschen und es wurden Wasserkontaktwinkelmessungen der nun verfärbten Probe durchgeführt und mit Messungen auf unbeschichtetem, additiv gefertigtem PET verglichen. Die Kontaktwinkel, die aufgebene Wassertropfen auf den jeweiligen Oberflächen jeweils direkt nach Aufgabe und nach 16 s ausbildeten, sind in Tabelle 3.4 dargestellt. Zur Bestimmung der Kontaktwinkel wurden hintereinander vier Wassertropfen auf das Material gegeben und deren Kontaktwinkel dreifach, grafisch-händisch mittels der Software Image J bestimmt. Dies wurde sowohl für den linken, als auch den rechten Kontaktwinkel eines Tropfens durchgeführt. Dementsprechend sind die angegebenen Kontaktwinkel Mittelwerte aus 24 Werten mit deren Standardabweichung. Die Messungen wurden am Institut für Feststoffverfahrenstechnik und Partikeltechnologie der TUHH durchgeführt.

Tabelle 3.4: Kontaktwinkelmessung mit Wasser auf einer additiv gefertigten PET Probe (links) im Vergleich zur mit Polydopamin beschichteten PET Probe (rechts)

Zeit [s]	unbeschichtet	beschichtet
		
0	$72,8 \pm 7,9^\circ$	$62,0 \pm 4,6^\circ$
		
16	$69,1 \pm 9,0^\circ$	$50,0 \pm 13,9^\circ$
		

Aus Tabelle 3.4 ist abzulesen, dass die PD-Beschichtung von additiv gefertigten PET erfolgreich war. Sowohl eine deutliche Verdunklung der PET-Oberfläche, als auch die Reduzierung des ausgebildeten Kontaktwinkels um 20° belegen dies. Weiterhin wurde beobachtet, dass sich nach dem Spülvorgang die dunkle Färbung des Materials auch nach Inkubation in wässrigen Lösungen nicht änderte oder sich Inkubationslösungen verfärbten. Dies ist ein Indiz für eine stabile Beschichtung auf dem PET. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Lee *et al.*, die die Oberflächenfunktionalisierung durch die Selbstpolymerisierung von Dopamin für ein großes Spektrum von Materialien und somit eine weitgehende Materialunabhängigkeit der Methodik gezeigt haben⁴⁵. Wang *et al.* haben demonstriert, dass die erreichbare Schichtdicke von PD-Beschichtungen sowohl von der Dopaminkonzentration in der Lösung, als auch von der Inkubationszeit abhängen⁴¹. Diese Einflüsse wurden auch für additiv gefertigtes PET untersucht. Durch die Inkubation von PET

in höheren Dopaminkonzentrationen (bis 4 g mL^{-1}), wurden dunklere Oberflächen und noch geringere Kontaktwinkel (38°) gemessen, was für eine dickere Beschichtung mit PD spricht. Um möglichst viele funktionelle Gruppen für die Anbindung von Enzymen zu schaffen, wurden weitere Beschichtungen bei 4 g mL^{-1} und 24 h durchgeführt.

Um zu zeigen, dass die nun bereitgestellten funktionellen Gruppen von PET-Oberflächen für die Enzymimmobilisierung verwendet werden können, wurde nicht mit additiv gefertigten PET gearbeitet, sondern mit dem in Abschnitt 3.2 charakterisierten PET-Pulver. Dies hat den Hintergrund, dass so leichter größere Oberflächen zur potentiellen Enzymanbindung bereitgestellt werden können und mehr Enzym pro Reaktionsvolumen eingesetzt werden kann. Somit können Reaktionsverläufe schneller verfolgt, oder überhaupt erst sichtbar gemacht werden. Um das Konzept der Immobilisierung an additiv fertigmateriale mittels PD-Beschichtung zu belegen, wurde die *Candida antarctica* Lipase B (CALB) und deren Hydrolyse von Laurinsäureethylester als Modellsystem gewählt. Nach der Beschichtung des PET-Pulvers mit PD (0.16 g mL^{-1}), wurde dieses in einer Lipaselösung mit Lipase im Überschuss für 20 h bei 4°C inkubiert. Die auf diesem Wege hergestellten Immobilisate werden im Folgenden mit PET-PD-CALB benannt. Der Einsatz von PET-PD-CALB in einer wassergesättigten Laurinsäureethylesterlösung ($70,2 \text{ mg mL}^{-1}$) katalysierte dessen Hydrolyse zu Dodecansäure und Ethanol. Nach dem Einsatz in einem Batch wurden die Immobilisate jeweils gewaschen und erneut in einer Hydrolyse unter gleichen Bedingungen eingesetzt, sodass drei Zyklen realisiert wurden. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurde jeder Versuch wiederholt durchgeführt. Zur Bestimmung des Wassergehalts zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Katalyse, wurden Proben gezogen und deren Wassergehalt zur Reaktionsverfolgung mittels Titrator bestimmt. Exemplarisch sei der prozentuale Wasserumsatz eines dritten Zyklus in Abbildung 3.7 gezeigt.

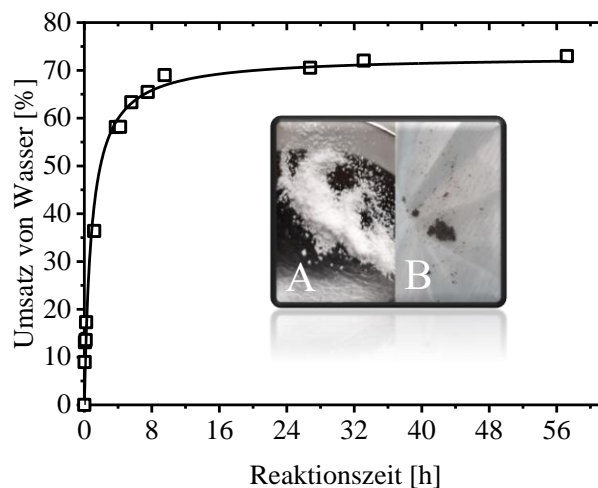


Abbildung 3.7: Wasserumsatz in 4 mL wassergesättigter Laurinsäureethylesterlösung bei Einsatz von $70,2 \text{ mg mL}^{-1}$ PET-PD-CALB-Immobilisaten im dritten Zyklus; A: unbeschichtetes PET; B: feuchtes PET-PD-CALB-Immobilisat

Während in einer Negativkontrolle mit funktionalisierten Trägern ohne immobilisierter CALB keine Änderung des Wassergehalts zu beobachten war, ist der Abbildung 3.7 zu entnehmen, dass die produzierten Immobilisate dazu geeignet sind, Laurinsäureethylester zu hydrolysieren. Somit muss eine Anbindung der CALB an den beschichteten Trägern erfolgreich gewesen sein.

Neben möglichen adsorptiven Wechselwirkungen ist die kovalente Anbindung der CALB über Thiolgruppen mittels Michael Addition und über Aminogruppen durch die Michael Addition und Schiff Base Reaktion mit Chinongruppen des Polydopamins wahrscheinlich⁴⁷. Aus der Approximation der Datenpunkte im Umsatz wurde mittels der Steigung zum Start der Reaktion die initiale Aktivität der Immobilisate bestimmt und auf die eingesetzte Oberfläche bezogen. Außerdem wurde zum Vergleich der Immobilisatperformance ein Standardimmobilisat der CALB, dem Novozyme 435 (N-435) in derselben Reaktion eingesetzt. Die jeweils ermittelten Anfangsaktivitäten und der Wasserumsatz nach einer Reaktionszeit von 17 h wurden verglichen und sind in Abbildung 3.8 dargestellt.

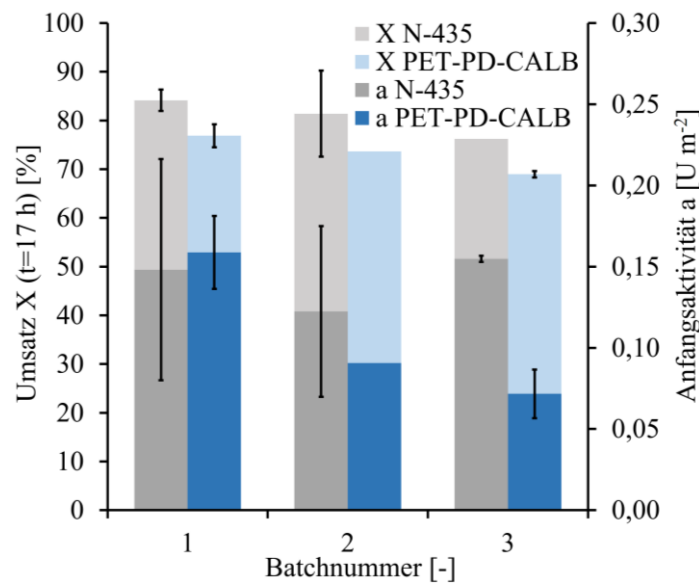


Abbildung 3.8: Katalysatorperformance von PET-PD-CALB ($70,230 \text{ mg mL}^{-1}$) im Vergleich zu Novozyme 435 ($0,075 \text{ mg mL}^{-1}$) bei der Hydrolyse von Laurinsäureethylester; trägeroberflächenspezifische Anfangsaktivitäten mit wiederholten Immobilisateinsatz „a“ und zugehöriger Wasserumsatz „X“ nach 17 h jedes Ansatzes. Fehlerbalken geben den Wertebereich wiederholter Versuche an.

Aus der Abbildung 3.8 geht hervor, dass PET-PD-CALB in drei aufeinanderfolgenden Batches aktiv ist. Die Anfangsaktivität nimmt jedoch zwischen erstem und drittem Batch stark ab (von $0,16 \pm 0,02 \text{ U m}^{-2}$ auf $0,072 \pm 0,015 \text{ U m}^{-2}$; - 55 %). Dies kann sowohl mit Immobilisatverlusten beim Spülvorgang (Teile des Immobilisats konnten nicht vom Filter gelöst werden) zwischen den Batches, als auch mit Enzymleaching adsorptiv gebundener CALB erklärt werden. Die hierdurch geringer werdenden Aktivitäten führen auch zu geringer werdenden Umsätzen nach 17 h Reaktionszeit mit den Batches ($76,9 \pm 2,4 \%$ auf $69,0 \pm 0,7 \%$; - 7,9 %). Dass die Abnahme der Aktivität zwischen dem zweiten und dritten Batch wesentlich geringer ausfällt, kann darauf zurückzuführen sein, dass keine adsorptiv angebundene Lipase vom Träger heruntergewaschen wurde, da diese bereits nach dem ersten Batch vollständig oder zu großen Teilen entfernt wurde. Die geringe Verringerung zwischen den Batches ist also vornehmlich auf den Verlust ganzer Immobilisatpartikel im Filter zurückzuführen. Das industrielle Immobilisatpräparat N-435 zeigt keine Aktivitätsabnahme innerhalb der drei Batches. Auch der erreichte Umsatz nach 17 h nimmt von Batch 1 ($84,1 \pm 2,1 \%$) nach Batch 2 ($81,4 \pm 8,8 \%$) nicht signifikant ab. Die einfache Messung des dritten Batches zeigt jedoch eine Abnahme auf 76,2 %. Ein Trend einer Abnahme des Umsatzes nach 17 h um 7,9 % ist also zu erkennen. Neben möglichen

Leachingverlusten, wie sie als ein Problem für die N-435 beschrieben sind¹³⁹, könnte dieser Trend auch durch die Deaktivierung der Lipase zu erklären sein. Allerdings ist der gemessene geringere Umsatz nicht signifikant; auch die unveränderte Anfangsaktivität der N-435 im dritten Batch zeigt eine unveränderte Performance des Immobilisats.

Der Vergleich beider Immobilisate zeigt, dass N-435 eine in den drei Batches durchschnittlich 24 % höhere oberflächenspezifische Anfangsaktivität als PET-PD-CALB aufweist. Ursächlich hierfür ist primär der erwähnte Aktivitätsverlust durch das Spülen der PET-PD-CALB-Immobilisate, gerade zwischen Batch 1 und 2. Auch der erzielte Umsatz nach 17 h ist über die Batches gemittelt für N-435 um 7,4 % höher (Batch 1: + 7,3; Batch 2: + 7,8 %; Batch 3: + 7,3 %) als für PET-PD-CALB. Für den dargestellten Einsatzfall mit pulverförmigen Immobilisaten muss also geschlussfolgert werden, dass N-435 dem Einsatz von PET-PD-CALB vorzuziehen ist. Dennoch wurde eine Alternative aufgezeigt, die eine nur gering abweichende Performance erreicht. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass sich auch die in eine Reaktionslösung einbringbare Aktivität bei beiden Trägern unterscheidet. Während von N-435 nur 0,075 mg mL⁻¹ für die erreichten Aktivitäten eingesetzt werden mussten, wurden von PET-PD-CALB 70,2 mg mL⁻¹ eingesetzt. Durch die hohe Porosität des N-435 (81,6 m² g⁻¹)¹³⁹, bedarf es wenig Katalysatormasse um dieselbe Aktivität in ein Reaktionsvolumen einzubringen im Vergleich zu den nicht porösen PET-PD-CALB-Immobilisaten (0,344 m² g⁻¹). Auch wenn die oberflächenspezifische Aktivität der PET-PD-CALB-Immobilisate vergleichbar zu N-435 ist, so ist ihre massenspezifische Aktivität im Mittel der Batches um 99,6 % (0,045 U g⁻¹ ggü. 11,569 U g⁻¹) geringer. Falls in einem Prozess also viel Aktivität pro Reaktionsvolumen benötigt würde, müsste die massenspezifische Oberfläche additiv fertigmarer Materialien zum Beispiel durch Bildung einer inneren Oberfläche erhöht werden. Unabhängig von der Limitierung in der spezifischen Oberfläche des PET-PD-CALB ist die Immobilisierungstechnik konkurrenzfähig zu konventionellen Anbindungen. Ein großer Vorteil in Bezug auf die Verwendung additiv gefertigter Materialien ist ihre Material- und Enzymunabhängigkeit. Wie in Abschnitt 3.4 beschrieben, haftet PD auf den meisten Materialien^{43,140} und neben Lipasen⁵² wurde die Anbindung anderer Proteine wie BSA^{51,141}, β -Amylase^{142,143}, Trypsin¹⁴⁰, Lysostaphin¹⁴⁴, Glucose-Oxidase⁴⁷ gezeigt. Somit stellt die vorgestellte Immobilisierungsmethode eine universell anwendbare Methode für die kovalente Enzymanbindung an additiv fertigmare Materialien dar. Das Immobilisierungskonzept ist nicht in Bezug auf die Anbindung des Enzyms an additiv gefertigte Material limitiert. Ein geringer möglicher Einsatz an Aktivität pro Reaktionsvolumen ist auf eine begrenzte Oberfläche des Materials zurückzuführen.

In diesem Abschnitt 3.4 wurde die Immobilisierung von CALB auf dem additiv fertigmaren Material PET gezeigt. Die unkomplizierte und stabile Beschichtung mit PD stellt eine universelle Methodik dar, beliebige Oberflächen für die Enzymimmobilisierung zu funktionalisieren. So wurden Immobilisate mit $0,16 \pm 0,02$ U m⁻² ($0,055 \pm 0,008$ U g⁻¹) bezogen auf die Umsetzung von Wasser in der Hydrolyse von Laurinsäureethylester hergestellt und getestet. Die erreichte oberflächenspezifische Aktivität ist vergleichbar mit der Aktivität konventioneller N-435 $0,15 \pm 0,07$ U m⁻², wohingegen die geringe Oberfläche (0,344 m² g⁻¹) eine geringere massenspezifische Aktivität von $0,055 \pm 0,008$ U g⁻¹ ggü. $12,1 \pm 5,6$ U g⁻¹ aufweist. Um die Anwendbarkeit der Methodik auf die additive Fertigung mit anderen

Immobilisierungen vergleichen zu können, wird im folgenden Abschnitt 3.5 zunächst die direkte kovalente Anbindung von Tyrosinase an PA12 vorgestellt.

3.5 Kovalente Immobilisierung von Tyrosinase an Polyamid 12

Als eine Alternative zur Immobilisierung an beschichtetem Material, wurde die direkte Anbindung von Tyrosinase an funktionalisiertem PA12-Pulver untersucht. Im Wesentlichen beruht die verwendete Funktionalisierungs- und Immobilisierungsmethodik auf der bereits zur Immobilisierung einer Lipase an Polyamid 6 beschriebenen Technik von Pahujani *et al.* ³⁹. Jedoch wurde in der vorliegenden Arbeit PA12 als Pulver verwendet.

Zur Vorbereitung der Oberfläche für die Immobilisierung wurde PA12 mit 6 N Salzsäure oberflächlich hydrolysiert um Amino- und Carboxylgruppen zu exponieren. An diesen wurde durch Inkubation der Spacer Glutaraldehyd angebunden. Die anschließende Inkubation in einer Tyrosinaselösung sollte die Immobilisierung über chemische Aktivierung und Adsorption an der exponierten Oberfläche ermöglichen. Bei Immobilisierungen beeinflusst die Enzymkonzentration maßgeblich, wie viel Aktivität pro Trägeroberfläche aufgebracht werden kann. Pahujani *et al.* ermittelten für eine Lipase aus *Bacillus coagulans* BTS eine maximale Aktivität pro Trägermasse ab einem Enzym zu Träger Verhältnis von $0,228 \mu\text{g}_{\text{Lipase}}^{-1} \text{mg}_{\text{Träger}}^{-1}$. Im Unterschied zu Pahujani *et al.*, die mit Nylonnetzen arbeiteten, wurde in dieser Arbeit mit PA12-Pulver gearbeitet, welches aufgrund seiner kleinen Partikelgröße eine wesentlich höhere massenspezifische Oberfläche ($3,816 \text{ m g}^{-1}$) aufweist. Daher wurde zunächst auch ein höheres Verhältnis von Enzym zu Trägermasse von $1,85 \mu\text{g}_{\text{Tyrosinase}}^{-1} \text{mg}_{\text{Träger}}^{-1}$ (Entsprechend $740 \mu\text{g mL}^{-1}$ in der Immobilisierungslösung) bei der Immobilisierung gewählt. Um zu testen, ob auch geringere Enzymkonzentrationen in der Immobilisierung ausreichen, wurde parallel auch eine Immobilisierung mit $370 \mu\text{g mL}^{-1}$ unter ansonsten identischen Bedingungen durchgeführt. Nach einem Spülschritt wurden die Immobilisate (im Folgenden PA12-T genannt) in eine L-Tyrosinlösung gegeben und die somit ermöglichte Katalyse verfolgt. Die Umsetzung des Substrates durch den Einsatz zweier Immobilisate, die mit verschiedenen Tyrosinasekonzentrationen hergestellt wurden, ist in Abbildung 3.9 dargestellt.

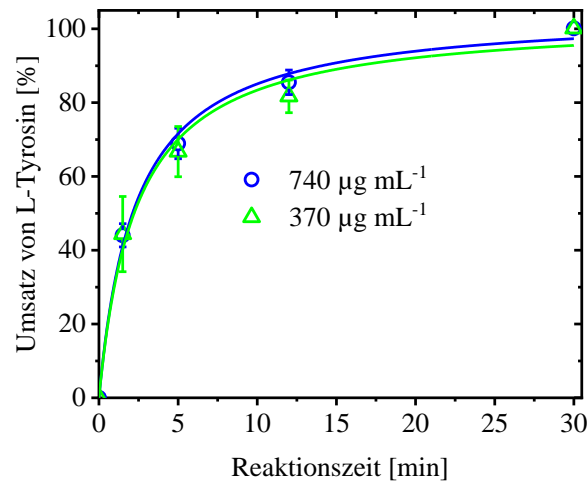


Abbildung 3.9: Mit Glutaraldehyd funktionalisierte Immobilisat; Umsatzkurve der durch PA12-T-Immobilisat (400 mg mL^{-1}) katalysierten Oxidation von L-Tyrosin (1 mM); Immobilisat Herstellung bei Tyrosinasekonzentrationen von 370 µg mL^{-1} (grüne Dreiecke) und 740 µg mL^{-1} (blaue Kreise). Fehlerbalken indizieren die Abweichung vom Mittelwert duplizierter Veruche.

Aus der Abbildung 3.9 geht hervor, dass produzierte und gespülte PA12-T-Immobilisate die Oxidation von L-Tyrosin katalysieren. Nach 30 min Reaktionszeit wurden mit beiden Immobilisaten 100 % des L-Tyrosins umgesetzt. Außerdem liegen die Umsatzkurven übereinander. Es macht also für die Immobilisatleistung keinen Unterschied, ob Tyrosinase mit einer Konzentration von 740 µg mL^{-1} oder 370 µg mL^{-1} an funktionalisiertem PA12-Pulver angebonden wird. Jedoch ist die Immobilisierungsausbeute, unter Annahme keiner Diffusionslimitierung bei Einsatz von 370 µg mL^{-1} doppelt so groß, wie bei dem Einsatz von 740 µg mL^{-1} . Die Anfangsaktivitäten der unterschiedlich produzierten Immobilisate betragen $0,315 \pm 0,007 \text{ U m}^{-2}$ (für 740 µg mL^{-1}) und $0,322 \pm 0,143 \text{ U m}^{-2}$. In der Literatur ist die Enzymbindung an Polyamid als eine Kombination aus adsorptiven und kovalenten Wechselwirkungen beschrieben. Diese sind ursächlich für die erfolgreiche Immobilisierung von Tyrosinase an PA12-Pulver.

Ob die Anfangsaktivität durch die Zugabe eines weiteren Spacers erhöht werden kann, wurde nachfolgend untersucht. In vielen Immobilisierungstechniken wird 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) als erste Bindungsstelle für die Funktionalisierung von Oberflächen verwendet^{145,146}. Ob die zusätzliche Verwendung von APTES zu mehr Bindungsstellen für GA und anschließend für Tyrosinase führt, wurde über einen direkten Vergleich zu nur mit GA funktionalisierten Trägern überprüft. Vor der Funktionalisierung mit GA, wurden die Träger bei 60 °C in eine APTES Lösung in Ethanol gegeben. Der Vergleich von Immobilisaten mit und ohne zusätzlichen Spacer APTES ist in Abbildung 3.10 dargestellt.

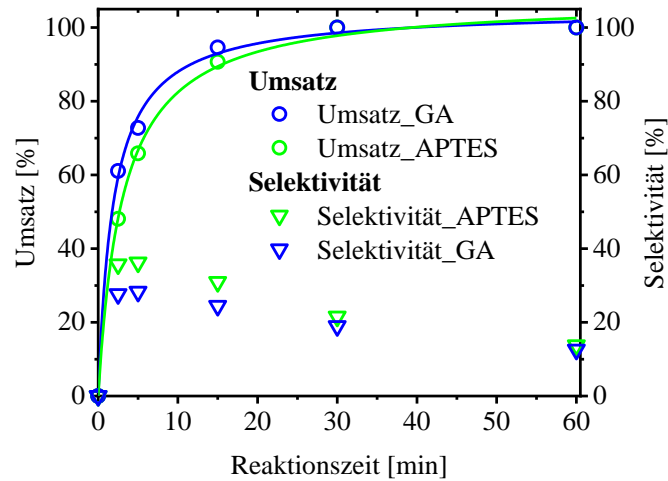


Abbildung 3.10: Umsatz von 1 mM L-Tyrosin bei Einsatz von 400 mg Immobilisaten (PA12-T mit 300 µg mL⁻¹ Tyrosinase immobilisiert) ohne (blau) und mit (grün) APTES als zusätzlichen Spacer in 1 mL Reaktionslösung

Mit dem Einsatz von APTES und Immobilisierung bei 300 µg mL⁻¹, wurde eine oberflächenspezifische Aktivität von 0,189 U m⁻² erreicht, während die Aktivität für Immobilisate ohne zusätzliches APTES eine Aktivität von 0,234 U m⁻² aufwiesen. Dieser Unterschied spiegelt sich auch im Umsatzverlauf in Abbildung 3.10. Der Einsatz von APTES führt also nicht zu einer erhöhten Aktivität auf der Trägeroberfläche. Möglich ist, dass durch den Einsatz von APTES, weniger Tyrosinase adsorptiv an dem Träger bindet, als bei der ausschließlichen Funktionalisierung mit GA. Für den längeren Einsatz der Immobilisate mit potentieller Desorption, könnte der zusätzliche APTES Spacer also dennoch für stabilere Enzyme sorgen.

In Abbildung 3.10 ist außerdem die Selektivität der Oxidation von L-Tyrosin zu L-DOPA aufgetragen. Diese steigt für PA12-T-Immobilisate mit APTES mit der Zeit zunächst auf 35 % nach 5 min, bevor sie bis Minute 60 auf 12 % abnimmt. Grund hierfür ist, dass die Tyrosinase nicht nur die Oxidation des L-Tyrosins katalysiert, sondern auch die weitere Oxidation des L-DOPA zu L-Dopachinon (Abschnitt 1.5.3, Abbildung 1.11). Dass diese unter den gegebenen Reaktionsbedingungen schneller als die Oxidation des L-Tyrosins katalysiert wird, zeigt sich in den geringen Selektivitäten. Bei fortschreitendem Umsatz des L-Tyrosins nimmt die Selektivität weiter ab, da das gebildete L-DOPA weiter umgesetzt wird, ohne, dass im selben Maß L-Tyrosin oxidiert wird. Um hohe Selektivitäten zu erreichen, muss die weitere Oxidation von L-DOPA verhindert werden, was über die Zugabe von Ascorbat in einem geeigneten Verhältnis zum Enzym realisiert werden kann. Dies soll jedoch nicht in der vorliegenden Arbeit thematisiert werden.

Die hier dargelegten Versuche haben gezeigt, dass eine Immobilisierung von L-Tyrosin an dem additiv fertigmaren PA12-Pulver möglich ist. Es konnten in Batchversuchen $0,322 \pm 0,143$ U m⁻² oberflächenspezifische Aktivitäten erreicht werden. Wie in 3.3 erläutert, können Immobilisierungen jedoch auch unter weniger Zeit- und Chemikalienaufwand und umweltverträglicher durchgeführt werden. Das nachfolgende Beispiel zeigt, wie erfolgreiche Immobilisierungen an additiv fertigmaren Materialien ohne die Funktionalisierung von Oberflächen durchgeführt werden können.

3.6 Adhäsive Phenolsäure-Decarboxylase Immobilisierung mittels Ankerpeptiden

Diese Methode Enzyme an additiv fertigmare Materialien zu binden, unterscheidet sich grundlegend von den bisher vorgestellten Funktionalisierungen der additiv fertigmaren Materialien in 3.4 und 3.5. Anstelle der Oberfläche wird in dieser das Enzym selber funktionalisiert. Das Konzept dieser Technologie wird in 3.6.1 erläutert. Mittels der Methodik des „Design of Experiments“ wurden die Einflussfaktoren in der Immobilisierung auf die Performance der Immobilisate untersucht (3.6.1). Weitere Optimierungen wurden mittels der Variation der Enzymfunktionalisierung erzielt und in 3.6.3 vorgestellt. Die Charakterisierung optimierter Immobilisate wird in Abschnitt 3.6.4 erläutert.

3.6.1 Immobilisierungskonzept

Zur Funktionalisierung eines Enzyms, wurde PAD auf genetischem Weg mit Peptiden, die als Abstandhalter zwischen Oberfläche und Enzym fungieren (Spacer) und einer weiteren Aminosäuresequenz, die spezifisch an Oberflächen bindet (Ankerpeptid), ausgestattet. Die Decarboxilierung von Ferulasäure kann so über immobilisierte PAD katalysiert werden. Das Immobilisierungskonzept ist in Abbildung 3.11 dargestellt.

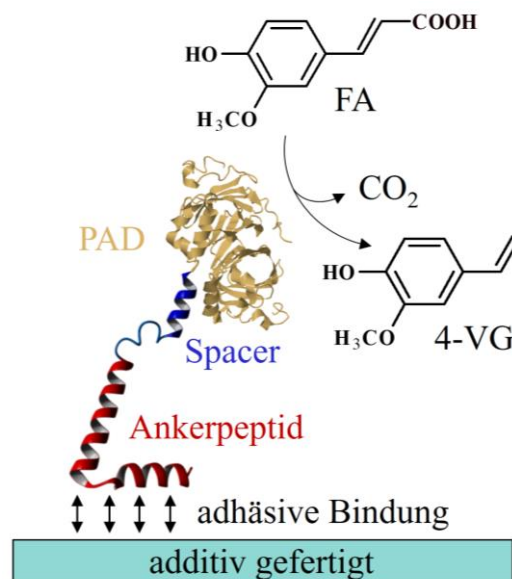


Abbildung 3.11: Prinzip einer adhäsiven Immobilisierungsstrategie: Das Zielprotein Phenolsäuredecarboxylase (PAD) wird mit einem Spacer fusioniert, der an ein oberflächenspezifisches Ankerpeptid gebunden ist.

Als Beispiele additiv fertigmaren Materialien, welche auch gegenüber Lösungsmitteln wie Heptan, welches später für die Extraktion des 4-VG benötigt wird, stabil sind, wurden Materialproben von PET, AlSi10Mg, 1.4404 und Ti6Al4V über FDM und SLS additiv gefertigt. Für die Auswahl von Peptiden, die mit der PAD fusioniert werden und die Bindung an spezifischen Oberflächen ermöglichen sollen, wurde auf Erkenntnisse von Studien zurückgegriffen, die nachfolgend erläutert sind.

3.6.1.1 Auswahl von Adhäsionsvermittlern für spezifische Materialien

Im Unterschied zu konventionellen Immobilisierungstechniken über schwache Wechselwirkungen oder kovalente Bindungen, ermöglichen Adhäsionsvermittler die direkte und gerichtete Anbindung von Biomolekülen, ohne dass diese ihre Aktivität verlieren. Sie sind Peptide mit spezifischen Sequenzen, die im wässrigen Milieu bestimmte Materialien orten und über nicht-kovalente Wechselwirkungen (elektrostatisch, polar, hydrophob, Wasserstoffbrückenbindungen) mit ihnen binden. Hierbei erreichen sie Gleichgewichtsbindungskonstanten im Bereich von nM bis μ M. Abhängig von der Peptidsequenz weisen sie eine hohe Variabilität von Konformationen, Strukturen, Polaritäten, elektrostatischen Ladungen und Bindungsaffinitäten auf und ihre Bindungsmechanismen sind bisher wenig verstanden. Gebundene Peptide haben ein dynamisches Verhalten, sind in konstanter Bewegung, diffundieren und orientieren sich neu und streben damit zum niedrigsten Energiezustand. Es sind jedoch Trends auszumachen, die für die Auswahl von Peptiden für bestimmte Materialien hilfreich sind.¹⁴⁷

Die chemischen Gruppen in den Aminosäuresequenzen sind verantwortlich für die Anbindung an Feststoffen. Daher haben Peptide mit ähnlichen Aminosäuresequenzen, oft ähnliche Affinitäten zur Anbindung an Materialien einer Stoffklasse. Während beispielsweise Peptide mit einem hohen Anteil an hydrophoben und hydroxyl enthaltenen polaren Gruppen an Edelmetallen binden¹⁴⁸, binden Peptide mit einem hohen Anteil an aromatischen Verbindungen an kohlenstoffbasierten Materialien²⁹. Jedoch spielt die exakte Zusammensetzung der Aminosäuresequenz eine größere Rolle als die Trends, die bei ähnlichen chemischen Gruppen auszumachen sind¹⁴⁹.

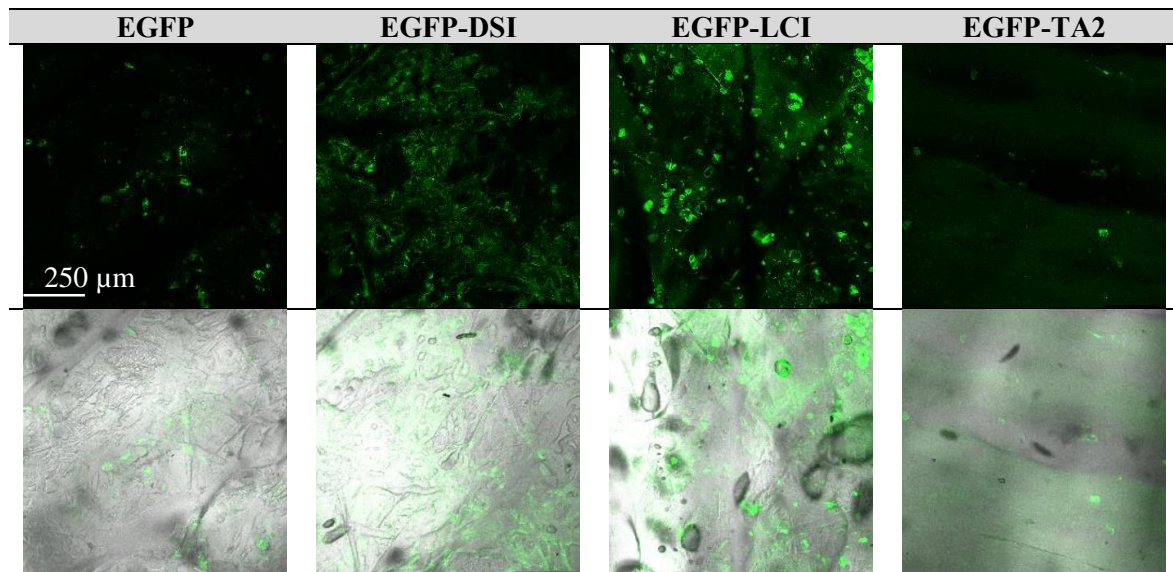
Die Struktur von Adhäsionsvermittlern kann die Bindung ebenso stark beeinflussen. Während Peptide mit ähnlich linearen und zyklischen Sekundärstruktur ähnliche Bindungsaffinitäten aufweisen, so variieren die Affinitäten stark, sobald die Sekundärstruktur sich ändert^{150,151}. Auch die Flexibilität der Peptidstruktur kann die Bindung an bestimmten Materialien ermöglichen oder verhindern¹⁵². Sie bestimmt mit, ob sich ein maximal möglicher Kontakt zwischen Oberfläche und Peptid ausbilden kann.¹⁴⁷

Auf Basis der beschriebenen Trends und Materialklassen wurden verschiedene Ankerpeptide ausgewählt, deren Bindungen für gleiche Materialklassen, wie die hier verwendeten Metalle und PET, gezeigt wurden (Abschnitt 1.2.1.1). Studien des Lehrstuhls für Biotechnologie der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen (RWTH) zeigten, dass eine zusätzlich eingefügte Peptidsequenz zwischen Enzym und Adhäsionsvermittler einen Einfluss auf die Aktivität des angebotenen Enzyms haben kann. Hierbei kann der Spacer entweder eine Struktur aufweisen, die eine flexible Bewegung ermöglicht, oder eine starre Struktur, wie die einer α -Helix. Ob diese Einflüsse auch für die PAD gelten, wird an späterer Stelle gezeigt.

Um die Bindungsaffinität von verschiedenen Ankerpeptiden (DSI, LCI, TA2) auf diesen gefertigten Oberflächen zu untersuchen, wurden sie zunächst mit dem verstärkt grün fluoreszierenden Protein (EGFP) fusioniert. Anschließend wurden die Materialproben in der jeweiligen Proteinlösung inkubiert und nach einem Waschschrift, der unspezifisch gebundene Proteine entfernen sollte, unter einem Konfokalmikroskop untersucht. Die Peptide LCI und

TA2 wurden ausgewählt, da für sie eine starke Bindung an hydrophobe Polymere wie Polypropylen (PP) beschrieben wurden²⁷. Diese Auswahl wurde durch das Ankerpeptid DSI ergänzt, das aufgrund seiner hohen Anzahl an hydrophoben Resten (50%) zur Bindung an PET geeignet schien¹⁵³. Weiterhin wurde EGFP ohne zusätzlichen Anker als Negativkontrolle überprüft. Die beobachteten Fluoreszenzen durch an PET-Oberflächen unterschiedlicher angebondenen EGFP-Anker-Fusionsproteine sind in Tabelle 3.5 dargestellt.

Tabelle 3.5: Visualisierung von Adhäsionsvermittlern: Additiv gefertigte PET-Oberflächen nach Inkubation mit verschiedenen rekombinanten GFP-Fusionsproteinen unter dem Konfokal Mikroskop (Fluoreszenz oben; Fluoreszenz + Transmission unten). Abbildungen stammen von der Abteilung „Biohybrid Systeme“ des Lehrstuhls Biologie und Biotechnologie der RWTH Aachen³⁸.



Der Tabelle 3.5 ist zu entnehmen, dass nur ein schwaches Fluoreszenzsignal auf der mit EGFP behandelten Probe zu erkennen ist. Das Waschen der Probe hat nicht alle unspezifisch gebundenen Proteine entfernt. Offensichtlich ist hingegen die intensivere Fluoreszenz bei Proben, die mit Fusionsproteinen aus EGFP und Ankerpeptid inkubiert wurden. Dies zeigt, dass die ausgewählten Ankerpeptide DSI, LCI und TA2 für die spezifische Bindung an PET nutzbar sind. Anzumerken ist, dass die Oberflächenbeschaffenheit der Proben einen weiteren Einfluss auf die Fluoreszenzsignale hat. EGFP-TA2 wurde auf der Unterseite einer additiv gefertigten PET Probe untersucht. Beim FDM ist die Oberfläche, die bei der Fertigung auf dem Supportmaterial entsteht, glatter als die Oberfläche am Ende einer Fertigung. Durch die glatte Oberfläche konnten sich die EGFP-TA2-Fusionsproteine gleichmäßiger verteilen und lokale Intensitätsmaxi- und -minima bleiben im Unterschied zu inhomogeneren Flächen aus.

Nachdem gezeigt wurde, dass die gewählten Ankerpeptide an der PET-Oberfläche binden, wurden diese mit der katalytisch aktiven PAD Domäne fusioniert und durch eine steife Spacersequenz (17X), bestehend aus 17 Aminosäuren (AEAAAKEAAAKEAAKA¹⁵⁴) ergänzt. Hierdurch entstanden die Fusionsproteine DSI-17X-PAD, TA2-17X-PAD und LCI-17X-PAD, welche auf PET-Pulver (vgl. Abschnitt 3.2) immobilisiert wurden. Erhaltene Immobilisate werden im folgenden PET-Anker-Spacer-PAD bezeichnet. Um die Bedingungen zu ermitteln, die für die Immobilisierung solcher Fusionsproteine zur maximalen Aktivität pro Oberfläche führen, wurden die Parameter pH-Wert, Pufferstärke, Temperatur,

Immobilisierungszeit und Proteinkonzentration im zellfreien Extrakt (CFE) innerhalb eines sog. „Design of Experiments“ (DOE) untersucht.

3.6.2 Design of Experiments zur Optimierung von Immobilisierungsparametern

Die Methodik des „Design of Experiments“ bietet die Chance, optimale Immobilisierungsparameter durch eine begrenzte Anzahl an Experimenten zu ermitteln. Hierzu wird statistisch ermittelt, ob variierte Immobilisierungsparameter die Zielgröße der massen- bzw. oberflächenspezifischen Aktivität der Immobilisate beeinflussen. Weiterhin kann auf Basis der experimentell bestimmten Aktivitäten ein Modell erstellt werden, welches das Optimum bezüglich der gewünschten Zielgröße offenbart. Für die Untersuchungen wurde beispielhaft das Fusionsprotein TA2-17X-PAD verwendet.

Zunächst wurden innerhalb einer Vorauswahl mit Hilfe des Programms Design-Expert (Version 11, Unternehmen: Stat-Ease, USA) und einem faktoriellen Design, welches ein einfaches statistisches Modell beinhaltet und sich für Screenings eignet, 16 unabhängige Experimente durchgeführt. Innerhalb dieser Sensitivitätsstudie zeigte die statistische Auswertung, dass in den untersuchten Bereichen weder die Pufferstärke, noch der pH-Wert während der Immobilisierung einen signifikanten Einfluss auf die oberflächenspezifische Aktivität der Immobilisate haben. Für weitergehende Studien wurde der pH-Wert von 7 und die Pufferstärke von 500 mM gewählt, da sie im zweiphasigen Reaktionssystem nach Pesci *et al.*⁷⁷ optimale Bedingungen darstellen. Für die Immobilisierungstemperatur, die Proteinkonzentration in der Immobilisierungslösung, und die Immobilisierungszeit, zeigten sich Einflüsse auf die spezifische Aktivität der erhaltenen Immobilisate. So wurde beispielsweise eine signifikant höhere Aktivität für Immobilisate die bei 4 °C, als solche, die bei 25 °C hergestellt wurden, beobachtet. Eine feine Auflösung der Temperaturabhängigkeit wurde nicht ermittelt. Stattdessen wurde die Temperatur von 4 °C für weitere Immobilisierungen gewählt. Dies gewährleistete, dass während der Immobilisierung keine temperaturabhängige Deaktivierung der PAD auftrat. Weiterhin sind viele Wechselwirkungen zwischen Ankerpeptid und Oberfläche exothermer Natur, wodurch bei geringeren Temperaturen die Anbindung begünstigt wird.

In der Hauptstudie, der Optimierung der Immobilisierung, wurden 8 unabhängige Experimente durchgeführt, die über ein Wirkungsflächendesign (RSM) mit Hilfe von Design-Expert geplant wurden. Dieses detaillierte Modell ist geeignet für Optimierungen und zeichnet sich dadurch aus, dass auch Versuche außerhalb der gewählten Grenzbereiche und Mehrfachbestimmungen des Mittelpunktes im Modell durchgeführt werden. Innerhalb der Versuche wurden die Konzentration der Proteine in der Immobilisierung und die Immobilisierungszeit variiert.

Die gewählten Grenzbereiche der Sensitivitätsstudie und der Optimierung, sowie die resultierenden, gewählten Optima sind in Tabelle 3.6 dargestellt.

Tabelle 3.6: Mittels DOE untersuchte Grenzbereiche von Immobilisierungsparametern und gewählte Werte, die zur maximalen oberflächenspezifischen Aktivität von PET-TA2-17X-PAD-Immobilisaten führen

Parameter	Untersuchter Bereich	Ausgewählt	Einheit
Puffer pH	5,7-8,0	7	-
Pufferstärke	50-500	500	mM
Temperatur	4-25	4	°C
Immobilisierungszeit	10-780	10	min
Enzymkonzentration	16-1571	785,5	$\mu\text{g ml}^{-1}$

Mit Hilfe des Programms Design-Expert, wurde auf Basis von Aktivitätsmessungen nach Immobilisierungsversuchen eine Funktion der immobilisatmassenspezifischen Aktivität in Abhängigkeit der Parameter Zeit und Enzymkonzentration gebildet. Hierzu wurde ein quadratisches Modell gewählt, welches die gemessenen Datenpunkte am besten abbildete und daher von Design-Expert empfohlen wurde. Ein Vergleich der Genauigkeit des Modells zu anderen im Programm implementierten Modellen, ist in Tabelle 8.1 im Anhang zu finden. Die Funktion, welche sich aus dem quadratischen Modell ergibt, sowie der FA-Umsatzverlauf einer Reaktion mit optimiert immobilisierter PAD, sind in Abbildung 3.12 dargestellt.

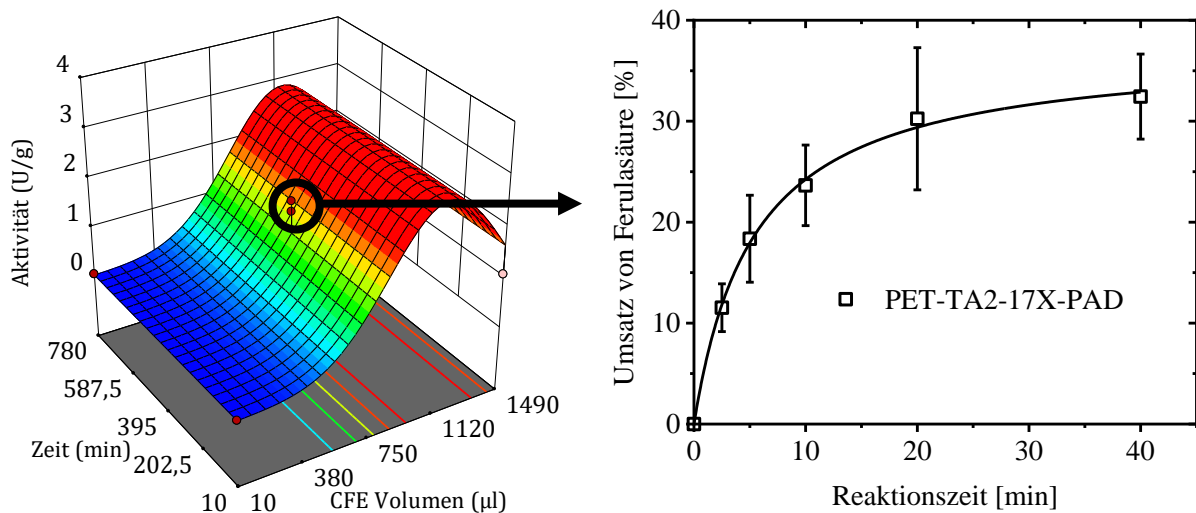


Abbildung 3.12: Optimierung von Immobilisierungen mit Ankerpeptiden. Links: 3D-Oberflächendiagramm eines reduzierten quadratischen Modells durch Design-Expert zur Aktivitätsabhängigkeit von PET-TA2-17X-PAD-Immobilisaten von Immobilisierungsvolumen und Immobilisierungszeit. Rechts: Umsatzkurve bei Einsatz von Immobilisaten ($n = 6$), die unter optimierten Bedingungen hergestellt wurden. [Immobilisierungszeit: 10 min, CFE Volumen: 750 mL (entsprechend $771 \mu\text{g mL}^{-1}$ bzw. $2,2 \text{ U mL}^{-1}$ in Immobilisierungslösung), 0,5 g getrocknetes Immobilisat in 1 mL Reaktionslösung (5 mM FA in 0,5 mM KP_i -Puffer pH 7 bei 37°C und 1250 rpm)].

Mit Hilfe des Fusionsproteins TA2-17X-PAD, konnten optimale Immobilisierungsbedingungen (Tabelle 3.6) ermittelt werden, die zu bedingt reproduzierbaren Umsatzverläufen bei Einsatz in einer FA Lösung führten (Abbildung 3.12, rechts). Immobilisate des Typs PET-TA2-17X-PAD die mit einer Stammenzymlösung ($771 \mu\text{g mL}^{-1}$ bzw. $2,2 \text{ U mL}^{-1}$) produziert werden, haben eine Anfangsaktivität von $1,8 \pm 0,6 \text{ U m}^{-2}$ und erreichen Umsätze nach 40 min von $32 \pm 4 \%$. Das Modell für die Abhängigkeit der Immobilisataktivität von der Immobilisierungszeit und der CFE Konzentration, offenbarte die Unabhängigkeit der Aktivität von der Immobilisierungszeit im Bereich von 10 - 780 min (Abbildung 3.12, links). Das prognostizierte Maximum des Modells entspricht jedoch nicht den

Erwartungen. Vielmehr ist ein Grenzwert der Aktivität, also ein Plateau, ab einem bestimmten Einsatz an CFE realistisch. Dieser wurde für $771 \mu\text{g mL}^{-1}$ angenommen. In späteren Versuchen wurde jedoch auch die doppelte Konzentration in Immobilisierungen verwendet um sicherzustellen, die maximal mögliche Immobilisataktivität zu erhalten.

In diesem Abschnitt 3.6.2 wurde gezeigt, welche Immobilisierungsbedingungen vorteilhaft bei der Verwendung von Fusionsproteinen mit Adhäsionsvermittlern sind. Diese wurden im Folgenden als Standardbedingungen verwendet. Ob weitere Verbesserungen von PET-Immobilisaten über die unterschiedliche Kombination von Anker und Spacer möglich sind, ist im nachfolgenden Abschnitt 3.6.3 erläutert.

3.6.3 Sequenzvariation zur Optimierung der Immobilisatperformance

Um den Einfluss von unterschiedlichen Ankerpeptiden auf die oberflächenspezifische Aktivität zu überprüfen, wurden die Immobilisate PET-DSI-17X-PAD, PET-TA2-17X-PAD, PET-LCI-PAD und PET-PAD verglichen. Der Umsatz der Ferulasäure in Abhängigkeit der Zeit, der durch den Einsatz jeweiliger Immobilisate erreicht wurde, ist in Abbildung 3.13 dargestellt.

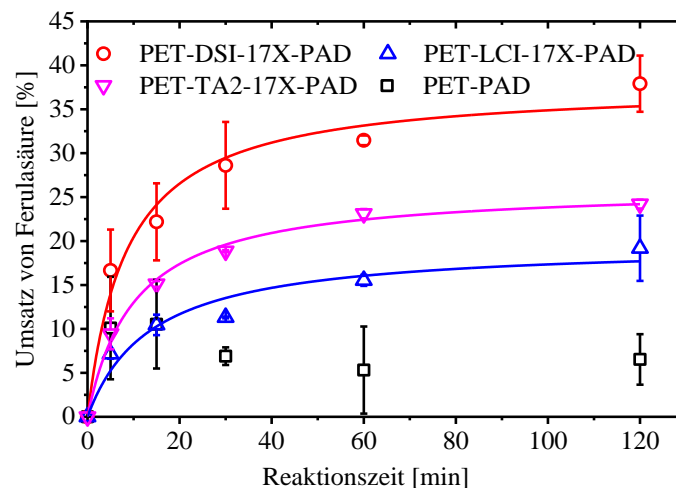


Abbildung 3.13: Vergleich von Immobilisaten mit verschiedenen Ankerpeptiden. Gemittelter Ferulasäureumsatz von Duplikaten durch den Einsatz von PET-Anker-17X-PAD-Immobilisaten. Reaktionsbedingungen: 5 mM FA Lösung in 0,5 mM KPi -Puffer (pH 7), 500 mg PAD-Anker-PET Präparation, 37°C , 1 mL Reaktionsvolumen bei 1250 rpm in Glasreaktionsgefäß.

Eingesetzte Aktivitäten in der Immobilisierung $\mathbf{v_0}$, resultierende oberflächenspezifische Immobilisataktivitäten $\mathbf{v_{0,a_i}}$ und der erreichte Umsatz nach 2 h Reaktionszeit $\mathbf{X_{t=120 \text{ min}}}$, sind in Tabelle 3.7 (Ankervergleich) aufgeführt.

Tabelle 3.7: Aktivität und Umsatz bei Einsatz von PET-PAD-Immobilisatennach 2 h Reaktionszeit, sowie zugehöriger Aktivitätseinsatz in jeweiliger Immobilisierung

Versuch	Immobilisat	Eingesetzte Aktivität v_0 [U ml ⁻¹]	Immobilisat Aktivität $v_{0,a1}$ [U m ⁻²]	Umsatz $X_{t=120 \text{ min}}$ [%]
Negativkontrolle	PET-PAD	8.9 ± 1.1	0.00 ± 0.00	0
Ankervergleich	PET-PAD-17X-LCI	1.7 ± 0.1	0.39 ± 0.19	19.2 ± 3.7
	PET-PAD-17X-TA2	1.4 ± 0.2	0.71 ± 0.09	24.2 ± 0.5
	PET-DSI-17X-PAD	5.5 ± 0.9	1.24 ± 0.75	37.9 ± 3.2
Spacervergleich	PET-DSI-CBM-PAD	17.6 ± 4.7	0.62 ± 0.07	29.7 ± 0.8
	PET-DSI-GS-PAD	55.3 ± 5.6	1.80 ± 0.41	59.9 ± 3.9

Spacer: GS, 17X, CBM; Anker: LCI, TA2, DSI
 CFE Lösung in Immobilisierung: 17X, PAD: 785.5 µg mL⁻¹, CBM and GS: 1613.5 µg mL⁻¹

Während für Immobilisate der Negativkontrolle (PAD ohne Anker) keine Aktivität zu beobachten war, wurden mit allen drei anderen Fusionsproteinen aktive Immobilisate produziert. Es wurde zwar auch ein Umsatz bei PAD-PET Immobilisaten von 5 % gemessen; dieser ist aber mit der Adsorption des Substrates FA zu erklären. In einer Adsorptionsanalyse mit deaktivierten Immobilisaten konnte eine Adsorption von 0,29 mM FA (5,8%) (0,5 g Immobilisat in 1 ml 5 mM FA-Lösung) entsprechend 1,7 µmol m⁻² nachgewiesen werden. Dies beweist, dass fusionierte Ankerpeptide verantwortlich für die Fixierung von aktiven PAD an der PET-Oberfläche sind. Über verschiedene Interaktionen mit der PET-Oberfläche binden die Ankerpeptide das PAD und fungieren somit als Adhäsionsvermittler. Verantwortlich hierfür sind elektrostatische, polare, hydrophile und Wasserstoffwechselwirkungen, die beispielsweise in Reviews von Seker *et al.*³² und Care *et al.*¹⁴⁷ beschrieben sind.

In jeder der verglichenen Immobilisierungen wurde die identische Enzymmasse (Stammlösung des zellfreien Extraktes (CFE): 785,5 µg mL⁻¹) und PET Trägermasse bzw. Oberfläche (0,5 g entsprechend 0,172 m²) eingesetzt. Die in der Immobilisierung eingesetzten massenspezifischen Aktivitäten [U mg⁻¹] unterschieden sich hingegen und führten zu verschiedenen eingesetzten Aktivitäten v_0 [U ml⁻¹]. Diese unterschiedlichen Aktivitäten bei gleicher Konzentration sind durch unterschiedliche Expressionslevel der Fusionsproteine oder verschiedene fusionsproteinspezifische Aktivitäten zu begründen. Dies wird in Abschnitt 3.6.4 näher erläutert. Obwohl die eingesetzte Aktivität von PAD-17X-LCI höher war als für PAD-17X-TA2, konnten mit ihnen Anfangsaktivitäten auf der PET-Oberfläche von 0,71 ± 0,09 U m⁻² gegenüber 0,39 ± 0,19 U m⁻² erreicht werden. Eine höhere Oberflächenbedeckung des PET-Materials mit TA2 als mit LCI ist ein plausibler Grund dafür. Die höhere Aktivität des PET-DSI-17X-PAD (1,24 ± 0,75 U m⁻²) im Vergleich zu PET-PAD-17X-TA2 (0,71 ± 0,09 U m⁻²) könnte jedoch auch durch eine höhere fusionsproteinspezifische Aktivität erklärt werden. Der hohe Anteil an hydrophoben unpolaren Aminosäuren im DSI-Anker von 63% (TA2: 36%) und ein Anteil an polaren ungeladenen Aminosäuren von nur 20 % (TA2: 50%) führt zu einer stärkeren Bindung am hydrophoben Material PET und stellt die Begründung für eine höhere Aktivität der Immobilisate nach dem Spülvorgang dar¹²⁴. Ein

weiterer Effekt könnte der gewählte Endpunkt für die Verbindung der jeweiligen Ankersequenz sein. Das Fusionsprotein mit N-terminal gebundener DSI-Sequenz führte so zu einer höheren Zugänglichkeit des Substrates zum aktiven Zentrum der PAD.

Nicht nur die Anfangsaktivitäten der unterschiedlichen Immobilisate unterscheiden sich, sondern auch der erreichte Umsatz nach zwei Stunden. Der Hauptgrund für eine Abnahme der Aktivität der Immobilisate während der Reaktion ist die starke Produktinhibierung des Enzyms im Reaktionssystem (K_i , Produkt / K_m , Substrat = 0,06)⁷⁷. Die relativ geringe Menge an PAD, die aufgrund einer begrenzten Oberfläche von PET-Pulver ($0,344 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) im Reaktionsgemisch als Suspension eingesetzt werden konnte, ist für diesen starken Einfluss der Hemmung verantwortlich. Pesci *et al.* zeigten, dass eine spezifische minimale Menge an verwendetem PAD basierend auf der Substratmenge in der Decarboxylierungsreaktion erforderlich ist (PAD [$\mu\text{g mL}^{-1}$] / FA [mM]-Verhältnis ≈ 6)⁷⁷, um eine entscheidende zusätzlich auftretende irreversible Deaktivierung des Enzyms zu verhindern und FA Umsätze von 100 % zu ermöglichen. Da dieses Verhältnis hier nicht gegeben war, wurden in den Versuchen nicht die thermodynamisch möglichen vollen Umsätze erreicht, sondern abhängig von der absoluten Enzymmenge in der Reaktionslösung und von der Stabilität der verschiedenen Immobilisate, unterschiedlich hohe Umsatz-Niveaus ermittelt. Insgesamt zeigte der Vergleich aller Immobilisierungen, dass die Verwendung von DSI-17X-PAD zur Immobilisierung auf PET gegenüber der Verwendung von PAD-17X-LCI oder PAD-17X-TA2 vorzuziehen ist.

Spacer zwischen Ankerpeptid und PAD erlauben die Beweglichkeit der PAD und realisieren einen Abstand zum Ankerpeptid bzw. der Trägeroberfläche. Dadurch wird die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums des Enzyms beeinflusst, sowie Wechselwirkungen zwischen Oberfläche und PAD verhindert. Arai *et al.* zeigten, dass der bisher verwendete 17X-Spacer eine α -Helix-Struktur bildet¹⁵⁴. Dadurch ist dieser starr und führt zu einer begrenzten Flexibilität der angebundenen PAD. Um zu ermitteln, welchen Einfluss verschiedene Spacer auf die oberflächenspezifische Aktivität von PET-DSI-Spacer-PAD Immobilisaten hat, wurde die Supplementierung des PAD-DSI Fusionsproteins mit flexiblen Spacern durchgeführt. Der zuvor verwendete, steife 17X-Spacer wurde durch Spacer ohne stabile Sekundärstruktur supplementiert: Die Aminosäuresequenzen PPGGNRGTTTTRRPATTTGSSPGP (CBM) und (GGGS)₃ (GS) wurden zwischen die katalytisch aktive PAD Domäne und den DSI Anker fusioniert, um anschließend die Immobilisate PET-DSI-CBM-PAD und PET-DSI-GS-PAD unter identischen Immobilisierungsbedingungen zu produzieren. Abbildung 3.14 zeigt den Umsatz von Ferulasäure durch Zugabe der Immobilisate PET-DSI-GS-PAD, PET-DSI-CBM-PAD und PET-DSI-17X-PAD.

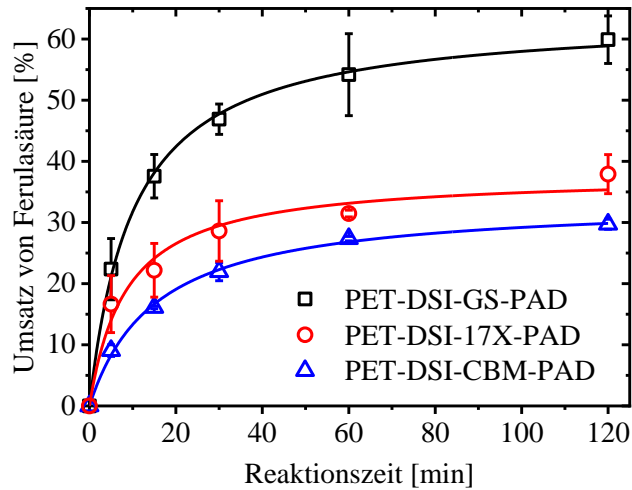


Abbildung 3.14: Vergleich von Immobilisaten mit verschiedenen Spacern: Gemittelter Ferulasäureumsatz von Duplikaten bei Einsatz verschiedener PET-DSI-Spacer-PAD-Immobilisate. Reaktionsbedingungen: 5 mM FA Lösung in 0,5 mM KP_i -Puffer (pH 7), 0,5 g PAD-Anker-PET Präparation, 37 °C, 1 mL Reaktionsvolumen bei 1250 rpm in Glasreaktionsgefäß.

Die Auswirkung der verschiedenen Spacer auf die Anfangsaktivitäten der resultierenden Immobilisate können direkt in Tabelle 3.7 unterschieden werden. So ist die Anfangsaktivität des Immobilisats mit dem flexiblen Spacer GS ($1,80 \pm 0,41 \text{ U m}^{-2}$) um 50 % höher als die Aktivität des Immobilisats PET-DSI-17X-PAD. Der Austausch des starren Spacers 17X mit dem CBM Spacer, führte jedoch zu der Verringerung der oberflächenspezifischen Aktivität, obwohl eine höhere Aktivität (jedoch identische Konzentration) in der Immobilisierung eingesetzt wurde. Dementsprechend kann der Austausch von starren mit flexiblen Spacersequenzen, sowohl die Erhöhung als auch die Verringerung der Immobilisataktivität bewirken. Die Verwendung des flexiblen GS Spacers ist jedoch vorteilhaft gegenüber der Verwendung von 17X oder CBM Spacern. In der Literatur ist beschrieben, dass verschiedene Spacer zwischen Domänen des Fusionsproteins und des Ankerpeptids Einfluss auf die Flexibilität des Proteins haben¹⁵⁴. Demnach begrenzt der starre Spacer 17X die Flexibilität der angebotenen PAD und das Immobilisat weist entsprechend eine geringere Aktivität auf. Die vergleichbar hohe Aktivität von Immobilisaten mit GS-Spacern (vgl. Tabelle 3.7) könnte daher auf eine hohe Flexibilität zurückgeführt werden, da der GS Spacer keine α -Helix-Struktur ausbildet.

Der CBM Spacer ist zusammengesetzt aus mehr Aminosäuren (AS) (Anzahl: 24) als die kürzeren Spacer 17X (17 AS) und GS (15 AS). Eine plausible Erklärung für eine geringe Aktivität mit diesem langen Spacer kann die zufällig gewickelte Konformation des Spacers sein. Bei zu langen, flexiblen Spacern, kann es zu unerwünschten Effekten auf die Orientierung und Steifheit des Enzyms führen und die Aktivität verringern. Der GS Spacer scheint kurz genug zu sein, um diese Effekte zu verhindern, jedoch lang genug, um einen ausreichenden Abstand zwischen PAD und PET-Oberfläche zu gewährleisten. Weiterhin bietet er genügend Flexibilität für die freie Bewegung von PAD. Diese Vermutung wird durch Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Spacerlängen auf die Aktivität kovalent gebundener Enzyme von De Maio *et al.* gestützt. In ihren Studien wurde gezeigt, dass der Spacer Hexamethyldiamin lang genug sei, um starke durch elektrische Ladungen induzierte Enzymstrukturmodifikationen durch Wechselwirkungen von Trägermaterial und

Oberflächenladungen des Enzyms zu verhindern¹⁵⁵. Der hier genutzte Spacer GS besteht aus 24 Stickstoff-Kohlenstoff-Bindungen und 15 Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen, die eine Kette bilden, die länger ist, als die von Hexamethyldiamin mit 5 Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen.

In diesem Kapitel 3.6.3 wurde gezeigt, dass die Wahl von Ankerpeptid und Spacer zur Fusion mit PAD erheblichen Einfluss auf die Aktivität von Immobilisaten mit Adhäsionsvermittlern hat. Durch das Screening von Spacer und Ankerpeptidkombinationen, konnte die oberflächenspezifische Aktivität von $0,39 \pm 0,19 \text{ U m}^{-2}$ auf $1,80 \pm 0,41 \text{ U m}^{-2}$ (+ 362 %) erhöht werden. Die kinetische Charakterisierung der optimierten PET-DSI-GS-Fusionsproteine und dessen Immobilisate wird im folgenden Abschnitt 3.6.4 behandelt.

3.6.4 Charakterisierung optimierter Fusionsproteine und Immobilisate

Eine Fragestellung zur Charakterisierung von PET-DSI-GS-PAD-Immobilisaten ist die Stabilität der Bindung zwischen Oberfläche und Ankerpeptid. Die Stabilität dieser Bindung wurde ermittelt, indem Immobilisate unterschiedlich oft gespült und anschließend als Katalysator in der FA-Decarboxylierung eingesetzt wurden. Die hierbei gemessenen Unterschiede des FA-Umsatzes sind in Abbildung 3.15 dargestellt.

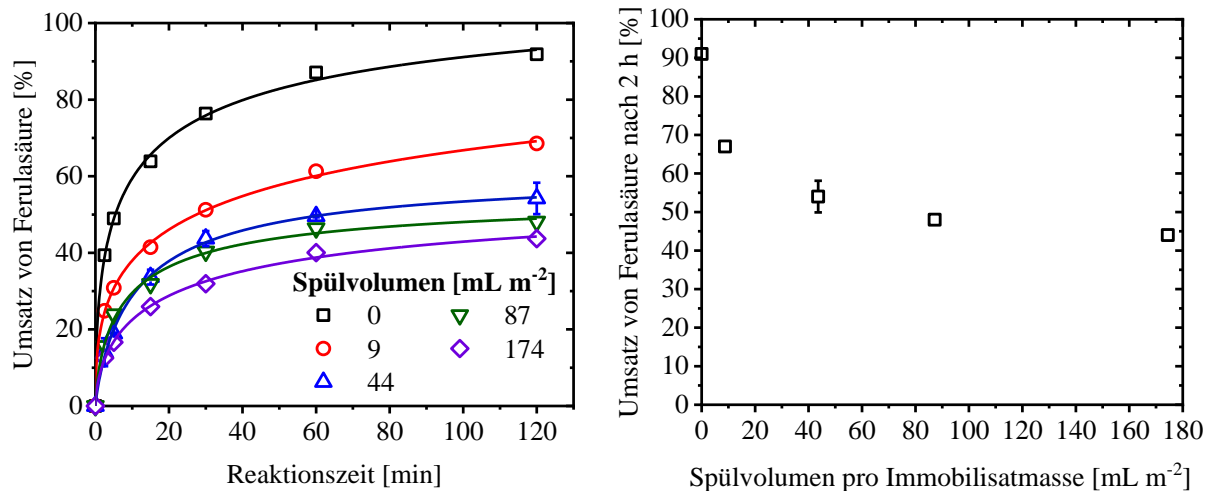


Abbildung 3.15: Einfluss von Spülvolumen auf Immobilisate. Links: Umsatz von Ferulasäure bei Einsatz von 0,5 g (0,172 m² PET-Oberfläche) unterschiedlich oft gespülten (bei 4 °C) und getrockneten PET-DSI-GS-PAD-Immobilisaten in 1 mL 5 mM FA Lösung in 0,5 mM KP_i-Puffer (pH 7), 37 °C, 1 mL Reaktionsvolumen bei 1250 rpm in Glasreaktionsgefäß. Rechts: Umsätze nach 2 h Reaktionszeit bei Einsatz dieser Immobilisate. Fehlerbalken basieren auf Ergebnissen dreifacher Versuchsdurchführung.

Abhängig vom Spülvolumen unterscheiden sich die erreichten Umsätze nach 2 h Reaktionszeit (Abbildung 3.15). Werden Immobilisate nicht gespült, wird ein Umsatz von 92 % erreicht. Im Gegensatz dazu wird ein Umsatz von 44 % erreicht, wenn Immobilisate eingesetzt werden, dessen Oberfläche mit 174 mL m⁻² Spülpuffer in Kontakt kam. Dieser ist jedoch nur 4 % geringer als bei Immobilisaten die mit der Hälfte des Volumens gespült wurden. Ein Großteil unspezifisch und schwach gebundener Fusionsproteine wird bereits durch fünf Waschfraktionen (44 mL m⁻²) abgespült (erzielter Umsatz: $54 \pm 4,5 \%$). Hierdurch nimmt auch die oberflächenspezifische Aktivität von $25,11 \text{ U m}^{-2}$ auf $2,76 \text{ U m}^{-2}$ um 89 % ab (Aktivität über

die Anfangssteigung der Anpassungsfunktion und der Anfangssubstratkonzentration bestimmbar). Die Anzahl an gebundenen und aktiven Fusionsproteinen auf der PET-Oberfläche nimmt also insbesondere bei den ersten Spülvolumen ab. Weitere Fusionsproteine sind so fest an der Oberfläche gebunden, dass sie nicht weiter abgelöst werden. Mehrere Hypothesen als Ursache für unterschiedlich stark gebundenen Ankerpeptide können aufgestellt werden. Zum einen werden bei ungespülten Immobilisaten (0 mL m^{-2}) nicht gebundene Enzyme auf der Oberfläche des PET zurückbleiben, nachdem diese getrocknet wurden. Diese werden durch einfaches Spülen (9 mL m^{-2}) größtenteils entfernt. Allerdings wurde das Immobilisat zwischen den Spülvorgängen nicht getrocknet, sodass Enzyme in Volumenelementen am feuchten Immobilisat durch den ersten Spülschritt nur teilweise vom Träger entfernt werden. Ein anderer Teil wird verdünnt, was auch bei einfacher Spülung ungebundene Fusionsproteine auf der Oberfläche nach der Trocknung zurücklässt. Erst nach mehrmaligem Spülen können diese Effekte ausgeschlossen werden. Die Oberfläche, an der die Ankerpeptide binden, ist nicht homogen (vgl. Abbildung 3.2), sodass die Fusionsproteine unterschiedlich stark mit dieser interagieren, was zu unterschiedlichen Bindungsstärken führt. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich Fusionsproteine überlagern bzw. zusammenlagern, was zu unterschiedlich starken Bindungen an der Oberfläche und untereinander führt. Im Hinblick zur Anwendung der Immobilisierungsmethode an einer additiv gefertigten Trägerstruktur sollte sichergestellt werden, dass ein Spülen mit mindestens 44 mL m^{-2} etabliert wird, um ungebundene, sowie schwach und unspezifisch gebundene Fusionsproteine zu entfernen.

Die Übertragung des Immobilisierungskonzeptes der Adhäsionsvermittler von Pulver auf additiv gefertigte Strukturen verlangt die Entscheidung über das Material und die damit einhergehende additive Fertigungsmethode. Auf die Relevanz der Fertigungsmethode und des Materials bei der Entwicklung eines hybriden Reaktorkonzeptes wird in Abschnitt 5.1 detaillierter eingegangen. An dieser Stelle sei jedoch vorgegriffen, dass die Wahl auf das Material PA12 fiel, auf die auch das in 3.6 untersuchte Immobilisierungsprinzip angewendet wurde. Daher ist die kinetische Charakterisierung von PA12-DSI-GS-PAD-Immobilisaten in Pulverform und von freien DSI-GS-PAD-Fusionsproteinen im CFE durchgeführt und mit der von PAD in CFE verglichen worden. Hierzu wurde in Aktivitätstests der freien Enzyme CFE eingesetzt, dessen Konzentration c_{CFE} , dessen volumenspezifische v_0 und proteinmassenspezifische Aktivität $v_{0,\text{mp}}$ mit den ermittelten maximalen Aktivitäten und Michaelis-Menten Konstanten in Tabelle 3.8 aufgeführt sind.

Tabelle 3.8: Kinetische Daten für freie Enzyme und PA12-DSI-GS-PAD Immobilisat. V_{max} und K_m wurden experimentell mit dem Einsatz von CFE (entsprechend $1,1 \text{ U}$) bzw. $0,1 \text{ g mL}^{-1}$ Immobilisat in 1 mL Reaktionslösung, $0,5 \text{ M KP}_i$, $\text{pH } 7$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 750 rpm unterschiedlicher Substratkonzentrationen ermittelt.

Enzym	V_{max} [U mg^{-1}]	K_m [mM]	c_{CFE} [mg mL^{-1}]	v_0 [U mL^{-1}]	$v_{0,\text{mp}}$ [U mg^{-1}]
PAD	$14,6 \pm 0,4$	$3,3 \pm 0,3$	2,2	18,6	8,5
DSI-GS-PAD	$64,4 \pm 0,5$	$3,4 \pm 0,1$	5,5	217,6	40,6
PA12-DSI-GS-PAD	$8,9 \pm 0,7$	$2,8 \pm 0,7$	-	-	-

Aus Tabelle 3.8 ist zu lesen, dass sowohl die Proteinkonzentration, als auch die proteinmassenspezifische Aktivität im CFE des DSI-GS-PAD Fusionsproteins höher ist, als im CFE der PAD (Faktor 4,8). Dies ist darauf zurückzuführen, dass das Fusionsprotein zu höheren

Konzentrationen exprimiert wird als die PAD. Eine Ursache hierfür ist der unterschiedliche Vektor der jeweils in den BL21-Stamm transformiert wurde. Während PAD mittels pET-21 a (+) exprimiert wird, wurde für DSI-GS-PAD der Vektor pET-28 a (+) verwendet. Die höhere Überexpression wurde mittels SDS-PAGE sichtbar gemacht (Abbildung 3.16, rechts).

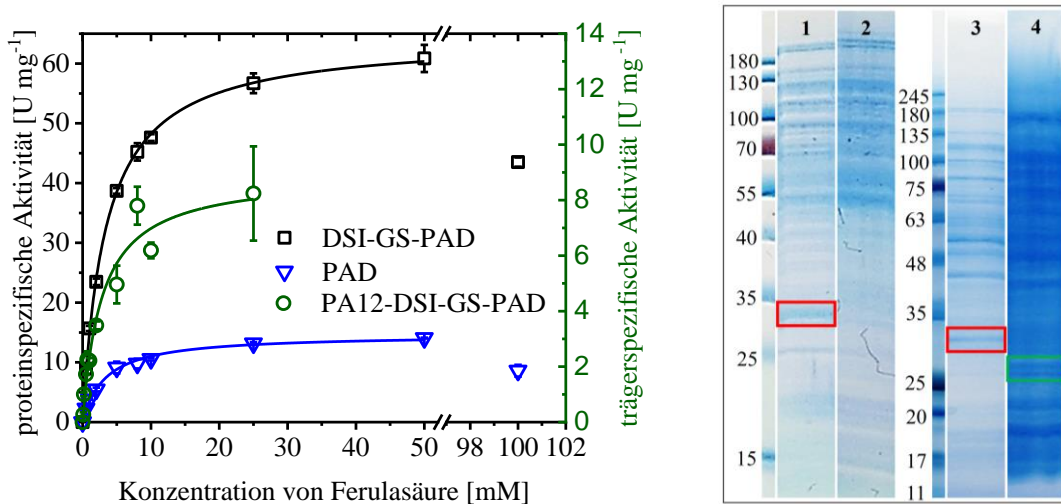


Abbildung 3.16: Enzymkinetik und Expressionslevel. Links: Massenspezifische Enzym- (Einsatz von 1,1 U) bzw. Immobilisataktivitäten (bei Einsatz von 0,1 g mL⁻¹) unter identischen Bedingungen (1 mL Reaktionslösung, 0,5 M KPi, pH 7, 37 °C, 750 rpm, Duplikate) abhängig von der Ferulasäurekonzentration. Messwerte basieren auf Duplikaten rechts: SDS-PAGE von 1) 0,5 mg mL⁻¹ CFE von DSI-GS-PAD 2) 0,5 mg mL⁻¹ CFE von PAD 3) CFE mit 5,8 U von DSI-GS-PAD 4) CFE mit 5,8 U von PAD. Markiert sind Banden des DSI-GS-PAD (rot) und des PAD (grün).

Die Abbildung 3.16 (rechts) zeigt, dass weder eine hohe Überexpression der PAD, noch des DSI-GS-PAD erreicht wird. Jedoch ist eine deutliche Bande bei ~32 kDa in der Linie des CFE von DSI-GS-PAD (1) zu erkennen, während diese beim CFE des PAD fehlt (2). Nach den Aminosäuresequenzen des Fusionsproteins hat dieses eine Masse von 23,7 kDa (PAD: 19,9 kDa; GS: 1,0 kDa; DSI: 2,8 kDa). Die genaue Zuordnung der Bande zu der passenden Proteinmasse kann mit Hilfe der Leiter also nicht erfolgen. Dies ist nicht unüblich und kann auf eine hohe positive Ladung des Enzyms zurückzuführen sein. Da SDS-PAGE eine rein qualitative Methode zur Proteinbestimmung darstellt, kann sie nicht zur quantitativen Bestimmung von Proteinkonzentrationen in den Extrakten genutzt werden¹⁵⁶. Allerdings können Trends in Bezug auf die Expressionslevel der Zielproteine ausgemacht werden. In Linie 1 (CFE des DSI-GS-PAD) und 2 (CFE der PAD) wurden die gleichen Gesamtproteinkonzentrationen eingesetzt, wohingegen in 3 und 4 dieselbe Aktivität (5,8 U) eingesetzt wurde. Dies führt zu einer Überladung der Linie 4 durch eine hohe Proteinkonzentration, zeigt aber auch, dass das Fusionsprotein erheblich stärker exprimiert wird als die PAD. Auf Grund des geringen Expressionslevels der PAD, kann in Linie 2 keine Bande ausgemacht werden, die eindeutig der PAD zuzuordnen ist. In Linie 4 kann eine Bande bei ~26 kDa der PAD zugeordnet werden. In der korrespondierenden Linie des PAD-GS-DSI fehlt diese Bande. Dies, und die Beobachtung, dass in vorherigen Arbeiten die Bande der gereinigten PAD bei ~25 kDa ausgemacht wurde, spricht dafür, dass diese Bande zur PAD gehört.

Der unterschiedliche Expressionslevel drückt sich auch in der Michaelis-Menten Kinetik (Abbildung 3.16, links) aus, in der die substratkonzentrationsabhängigen Aktivitäten auf die

Gesamtproteinmasse des CFE bezogen wurden. Durch die Bezugsgröße ergeben sich höhere Aktivitäten des Fusionsproteins. So ist jede gemessene, spezifische Aktivität des Fusionsproteins zwischen 3,9 und 4,6-mal größer, als die der PAD. Der in der Größenordnung gleiche K_m -Wert (vgl. Tabelle 3.8) für die Fusionsproteine, die PAD und die Immobilisate als Maß für die Bindungsstärke zwischen Enzym und Substrat zeigt, dass sich die Substrataffinität weder durch die Supplementierung von Aminosäuresequenzen am N-terminalen Ende der PAD, noch durch die Anbindung an der Trägeroberflächen verändert.

Neben der Substratkonzentration von 50 mM, bei der die maximale Enzymaktivität erreicht wird, wurde in den kinetischen Messungen auch eine Substratüberschussinhibierung bei höheren Konzentrationen festgestellt. So entspricht beispielsweise die Aktivität der Fusionsproteine bei 100 mM FA nur noch 71 % der Aktivität die bei 50 mM gemessen wurde (bei PAD 61 %). Diese Beobachtungen decken sich mit Ergebnissen von Li *et al.*, die eine Substratinhibierung für eine Phenolsäuredecarboxylase aus *Bacillus atrophaeus* ab Konzentrationen von 50 mM zeigten. Auch hier lag die relative Aktivität bei 100 mM FA nur noch bei 75 % der Aktivität die bei 50 mM FA gemessen wurde. Konzentrationen von 500 mM führten sogar zu einer Aktivität unter 40 % der Aktivität bei 50 mM.¹⁵⁷

Im Abschnitt 3.6.4 wurde gezeigt, dass das Spülen von PET-DSI-GS-PAD-Immobilisaten einen Einfluss auf die Anzahl an gebundenen Enzymen hat. Nach dem Spülen mit 44 mL m⁻², werden jedoch nur noch wenige Fusionsproteine abgespült und bleiben am Träger gebunden. Die Immobilisierungsmethode wurde von PET auf PA12-Pulver übertragen. Ein Unterschied im Expressionslevel der Fusionsproteine verglichen zur PAD wurde festgestellt, der zu einer 4,8-mal höheren proteinmassenspezifischen Aktivität im CFE führt. Eine gleiche Substrataffinität von PA12-DSI-GS-PAD, DSI-GS-PAD und PAD (mittlerer K_m -Wert von 3,2 mM) wurde festgestellt. In bisher gezeigten Ergebnissen wurde die Decarboxylierung von FA durch Enzyme oder Immobilisate im wässrigen Medium dargestellt. Im folgenden Abschnitt 4 wird die *in situ* Extraktion des Reaktionsproduktes 4-VG untersucht.

4 Flüssig-Flüssig-Extraktion von 4-Vinylguaiaicol

Aus der Theorie in Abschnitt 1.5.1 geht hervor, dass die Effizienz der Synthese von 4-VG mittels PAD durch seine direkte Extraktion erhöht werden kann. In Tabelle 3.7, sowie Abbildung 3.13 und Abbildung 3.14, ist der Einfluss der starken Produktinhibierung auf die Enzymaktivität erkennbar. Eine kleine Inhibierungskonstante $K_{i,4-VG}$ von $0,14 \text{ mM}^{77}$ und eine niedrige Enzymkonzentration verhindert die vollständige Substratumwandlung in kurzer Zeit. Bereits in vorherigen Studien zum Reaktionssystem wurde die Inhibierung und irreversible Inaktivierung durch 4-VG beobachtet und die Extraktion mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln wie Hexan¹⁵⁸, Toluol¹⁰⁴ oder Octan⁷⁹ empfohlen. In einem Screening von Pesci *et al.* hat sich *n*-Hexan als vorteilhaft in Bezug auf das Verteilungsgleichgewicht von 4-VG, auf die Extraktionsraten und auf die Enzymstabilität herausgestellt⁷⁷. Dieses ist jedoch als Luftschadstoff und toxischer als *n*-Heptan mit ähnlichen Eigenschaften eingestuft¹⁵⁹. In dieser Arbeit wurde daher Letzteres als Extraktionsmittel untersucht. In den folgenden Abschnitten wird diesbezüglich auf Verteilungsgleichgewichte der Reaktanden (4.1), den Einfluss der *in situ* Extraktion auf die Reaktionseffizienz (4.2), die *in situ* Extraktion bei Einsatz von Immobilisaten (4.3) und auf die Gegenstromextraktion mit additiv gefertigten Verteilerstruktur als Dispergierer eingegangen (4.4).

4.1 Verteilungsgleichgewichte und Eigenschaften von Reaktanden

Für die Reaktanden Ferulasäure (4.1.1) und 4-VG (4.1.2) wurden die Löslichkeiten, und ihre Verteilung im Gleichgewicht in einem Heptan-Puffer System untersucht. Weiterhin wurde die Stabilität von 4-VG in Puffer (4.1.2) untersucht.

4.1.1 Ferulasäure

Die Löslichkeit von Feststoffen kann auch von ihrer Kristallstruktur abhängen. So ist dies auch für FA beschrieben¹⁶⁰. Lee *et al.* bestimmten eine Löslichkeit für FA bei 25 °C von 51 mM in $0,1 \text{ M KPi-Puffer (pH 7)}$ ¹⁰⁶. Die in dieser Arbeit verwendete Ferulasäure lässt sich bei Raumtemperatur bis zu 25 mM in $0,5 \text{ M KPi-Puffer (pH 7)}$ nach maximal 30 min lösen. Bei höheren Konzentrationen sinkt der pH-Wert und die Löslichkeit ist limitiert. Wie von Pesci *et al.* empfohlen, wurde durch die Zugabe von Kaliumhydroxid (KOH) der pH-Wert auf $\text{pH } 7$ angehoben und die Löslichkeit von Ferulasäure erhöht. So können Konzentrationen von 100 mM erreicht werden. Ferulasäure ist sehr hydrophil, was zum Beispiel durch den von Garcia-Conesa *et al.* bestimmten pH abhängigen, logarithmierten Verteilungskoeffizient in Octanol-Wasser deutlich wird. Sie bestimmten diesen zu $1,71 \pm 0,14$ ($\text{pH } 2,14$), $1,17 \pm 0,02$ ($\text{pH } 5$) und $0,25 \pm 0,10$ ($\text{pH } 7$)¹⁶¹. Die Ermittlung dieser Werte ist jedoch oftmals ungenau, wenn sie nur über die Bestimmung der Konzentrationen in der wässrigen Phase geschieht. Dies zeigt sich zum Beispiel dadurch, dass andere Studien von Sohn *et al.* logarithmierte Verteilungskoeffizienten von $-0,4256$ ($\text{pH } 3$) oder $-0,3107$ ($\text{pH } 10$) angeben¹⁶⁰. Auch hier wurde nur die Konzentration in der wässrigen Phase bestimmt. Ihre Ergebnisse zeigen eine gegenläufige pH Abhängigkeit zu den Studien von Garcia-Conesa *et al.*. Jedoch lässt sich festhalten, dass die chemische Struktur der FA und deren geringe Verteilungskoeffizienten im Octanol-Puffer-Gemisch für eine starke Hydrophilität sprechen. Für die Verteilung in einem

Heptan-Puffer Gemisch (0,1 M KP_i , pH 6,8) bestimmten Lee *et al.* einen Verteilungskoeffizient unter $0,01^{106}$.

In dieser Arbeit wurden Verteilungskoeffizienten mit Lösungen verschiedener FA-Konzentrationen im zweiphasigen Puffer-Heptan-System ermittelt. In keiner dieser Untersuchungen konnte FA in *n*-Heptan nachgewiesen werden. Jedoch sinkt die FA-Konzentration in der wässrigen Phase nach der Inkubation mit *n*-Heptan abhängig von der eingesetzten FA-Konzentration und dem Volumenverhältnis der Phasen um bis zu 10 %. Als Ursache hierfür wurde eine Adsorption der Säure (des dissoziierten Anions) an der Phasengrenzfläche der beiden Phasen vermutet. Ein grenzflächenaktives Verhalten der Säure, ähnlich zu anionischen Tensiden, wie es zum Beispiel für Carboxylsäuren¹⁶² beschrieben ist, könnte die Adsorption an der Grenzfläche erklären¹⁶³. Da diese Adsorption reversibel ist und nicht zu einem Austrag von Substrat aus einem Reaktor führen muss, ist hinsichtlich der Decarboxylierungsreaktion weder der Umsatz, noch die Ausbeute beeinträchtigt.

FA mit einem pK_a Wert von 4,3¹⁶⁴ und einem $\log P_{\text{Octanol-Wasser}}$ von $0,25 \pm 0,10^{161}$ (bzw. einem Verteilungskoeffizienten unter $0,01^{106}$ für Heptan-Puffer) wird nicht messbar von Heptan extrahiert. Auch in anderen Arbeiten wurde mit einem Verteilungskoeffizienten von $0,009 \pm 0,005$ in Heptan-Wasser eine sehr geringe Löslichkeit von FA in Heptan nachgewiesen¹⁰⁷. Da Heptan zusätzlich einen geringen Siedepunkt besitzt und somit einfach rezykliert werden kann, eignet es sich als Extraktionsmittel für 4-VG, sobald es dieses effizient extrahieren kann. Diese Eignung für 4-VG wird im folgenden Abschnitt erläutert.

4.1.2 4-Vinylguaiacol

Für die Extraktion des Reaktionsproduktes 4-VG ist es Voraussetzung, dass sich dieses in dem Extraktionsmittel löst und im Gleichgewicht eine hohe Konzentration im Vergleich zur Konzentration in der wässrigen Reaktionsphase aufweist⁵⁶. Der Unterschied zwischen einem vorliegenden Konzentrationsverhältnis zu dem Verhältnis der Konzentrationen im thermodynamischen Gleichgewicht stellt die treibende Kraft für die Extraktion dar.

Um das Konzentrationsverhältnis im Gleichgewicht zu ermitteln wurden verschiedene Konzentrationen und Phasenvolumina angesetzt und bei 700 rpm und 37 °C inkubiert. Hierbei zeigte sich, dass der Verteilungskoeffizient für ein Phasenverhältnis von 1:1 (Heptan zu Puffer, 0,5 M KP_i , pH 7) und einer Produktkonzentration von 22 mM bei 37 °C bei $K_P = 16,8 \pm 2,2$ liegt. Auch in der Literatur lässt sich ein ähnlicher Wert von $13,92 \pm 0,06$ für ein vergleichbares System von Heptan-Puffer (Na_2HPO_4 -Zitronensäure-Puffer, 200 mM, pH 6,0, 15 mM 4-VG) bei 30 °C finden¹⁰⁷. Abweichende Verteilungskoeffizienten zum Beispiel von 6 (Heptan-Puffer-Verhältnis von 1:1 (v/v), 25 °C, 0,1 M KP_i , pH 6,8; 5 mg [\cong 5,15 mM] 4-VG)¹⁰⁶ sind ebenso veröffentlicht. An den hohen Verteilungskoeffizienten wird deutlich, dass 4-VG eine starke Affinität zur organischen Phase hat. Es sei jedoch angemerkt, dass auch im Gleichgewicht 4-VG anteilig in der wässrigen Phase zurückbleibt. Zum Beispiel würden bei einem Verteilungskoeffizienten von 16,8 und einer 4-VG-Konzentration von 5 mM in der wässrigen Phase nach Inkubation mit demselben Heptanvolumen, 0,28 mM in der wässrigen Phase verbleiben (nach Nernstschem Verteilungssatz). Bei einer starken Produktinhibierung ($K_{i,4-VG}$ von 0,14 mM⁷⁷) führt dies schon zu erheblichen Reduzierungen in der PAD-Aktivität. Daher

muss gewährleistet sein, dass die Heptanphase innerhalb eines biokatalytischen Reaktors mit ISPR wenig beladen ist, um noch geringere Konzentrationen in der wässrigen Phase realisieren zu können.

Abgesehen von der Verteilung des Reaktionsproduktes 4-VG wurde die maximale Löslichkeit des Produktes in der Heptanphase ermittelt, die bei der Decarboxylierung mit PAD realisiert werden kann. In Abbildung 4.1 ist die 4-VG-Konzentration in *n*-Heptan nach 24 h DSI-GS-PAD katalysierter Decarboxylierung bei einem Puffer-Heptan-Verhältnis von 1:1 (v/v) gezeigt. Hierbei wurde so viel CFE eingesetzt, dass in der Reaktionslösung 0.08 mg mL^{-1} Gesamtprotein und 2.06 U mL^{-1} vorlagen.

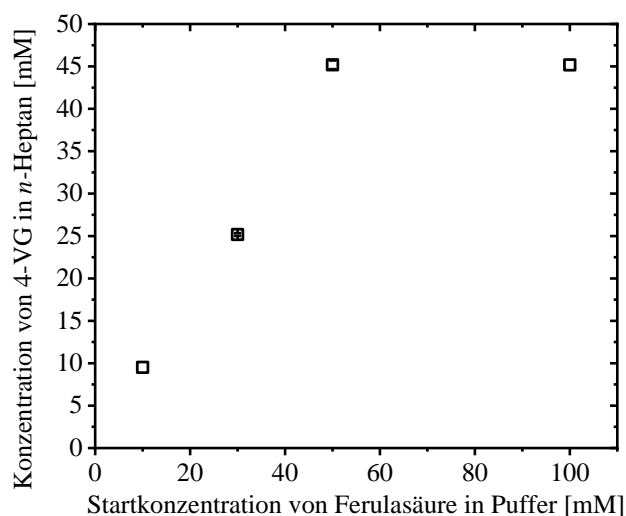


Abbildung 4.1: Löslichkeit von 4-VG in *n*-Heptan: Konzentration in *n*-Heptan nach 24 h einer DSI-GS-PAD katalysierten Decarboxylierung (0.08 mg mL^{-1} entsprechend 2.06 U mL^{-1} in wässriger Phase) von FA in Puffer und Heptan als Extraktionsmittel 1:1 (v/v). Fehlerbalken indizieren Abweichungen von Duplikaten.

Die Abbildung 4.1 zeigt, dass auch bei höherer Substratkonzentration, die Konzentration des 4-VG in der Heptanphase nicht über $45,2 \pm 0,4 \text{ mM}$ steigt. Wenn Heptan nicht mehr 4-VG aufnehmen kann, inhibiert das 4-VG die PAD in der wässrigen Phase.

Verweilt 4-VG länger in der wässrigen Phase, zeigt sich, dass es nicht stabil ist. Wird es in Puffer bei 37 °C bzw. 25 °C inkubiert, nimmt daher seine Konzentration, wie in Abbildung 4.2 zu sehen, ab.

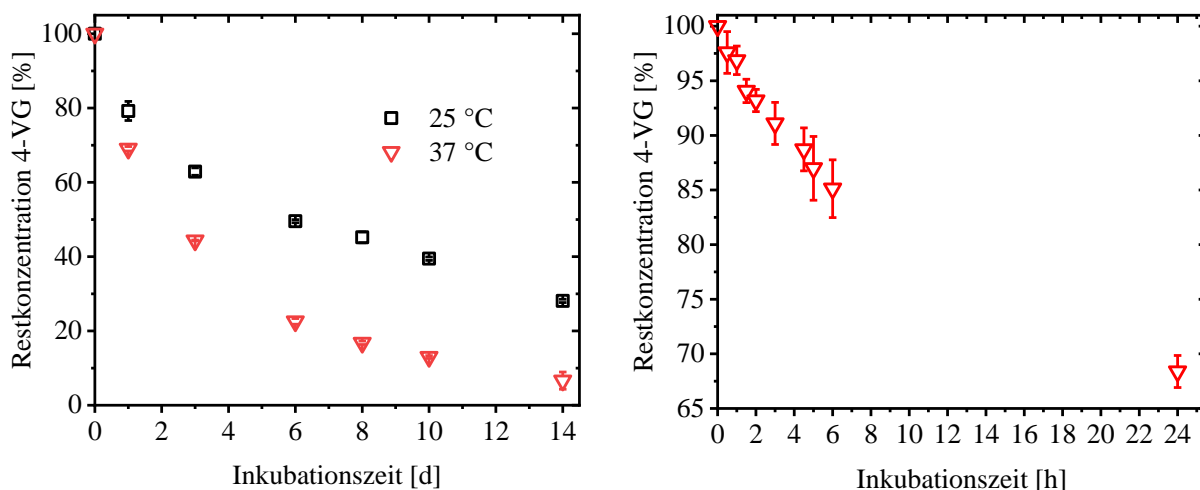


Abbildung 4.2: Temperaturstabilität von 4-VG; Restkonzentration in 0,5 M KP_i -Puffer (pH 7) bei 25 °C (3,5 mM Startkonzentration) und 37 °C (3,7 mM Startkonzentration). Rechts: Produktstabilität innerhalb von 24 h bei 37 °C. Fehlerbalken zeigen die Abweichung von Duplikaten. Konstanten und Halbwertszeiten des exponentiellen Zerfalls für 37 °C: $0,28 \text{ d}^{-1}$ und 2,5 d; für 25 °C: $0,12 \text{ d}^{-1}$ und 5,8 d.

Unter Reaktionsbedingungen bei 37 °C nimmt die 4-VG-Konzentration in einer wässrigen Pufferphase innerhalb von 24 h um 31 % ab (Abbildung 4.2). Bei geringerer Temperatur (25 °C) kann diese Abnahme auf 20 % reduziert werden. Die Konstanten des exponentiellen Zerfalls sind hierbei $0,28 \text{ d}^{-1}$ (37 °C) und $0,12 \text{ d}^{-1}$ (25 °C), wobei die jeweiligen Halbwertszeiten zu 2,5 d (37 °C) und 5,8 d (25 °C) bestimmt wurden. Für einen prozessintensivierten Reaktor mit ISPR, bei dem die Enzymaktivität bei 37 °C maximal ist, stellt die geringe Produktstabilität in der wässrigen Phase die zusätzliche Notwendigkeit einer schnellen Produktextraktion dar. Dies erlaubt neben der Stabilisierung des Produktes den positiven Einfluss auf die Reaktion, welcher in 4.2 gezeigt wird.

4.2 *In situ* Extraktion von 4-Vinylguaiacol

Werden in der Synthese von 4-VG, PET-Immobilisate eingesetzt, ist die einsetzbare Enzymmenge auf Grund einer begrenzten Trägeroberfläche von $0,172 \text{ m}^2$ (für 0,5 g einsetzbares Immobilisat pro mL Reaktionslösung) begrenzt. Auch mit dem optimierten Immobilisat PET-DSI-GS-PAD (Abschnitt 3.6.3), kann nur ein begrenzter Umsatz der FA von $59,9 \pm 3,9 \%$ erreicht werden (Abbildung 3.14). Neben der Realisierung höherer Enzymkonzentrationen kann auch die *in situ* Extraktion die Inhibierung verringern, die Reaktion beschleunigen, und erhöhte Umsätze erlauben. Der Einfluss einer *in situ* Extraktion mit *n*-Heptan auf die DSI-GS-PAD katalysierte Decarboxylierung von Ferulasäure im Batch ist in Abbildung 4.3 gezeigt. Die angegebene Aktivität des CFE ist als Anfangsaktivität des CFE zu verstehen, welche unter Standardbedingungen (5 mM FA; 0,5 M KP_i -Puffer; pH 7, 37 °C; einphasig) bestimmt wurde.

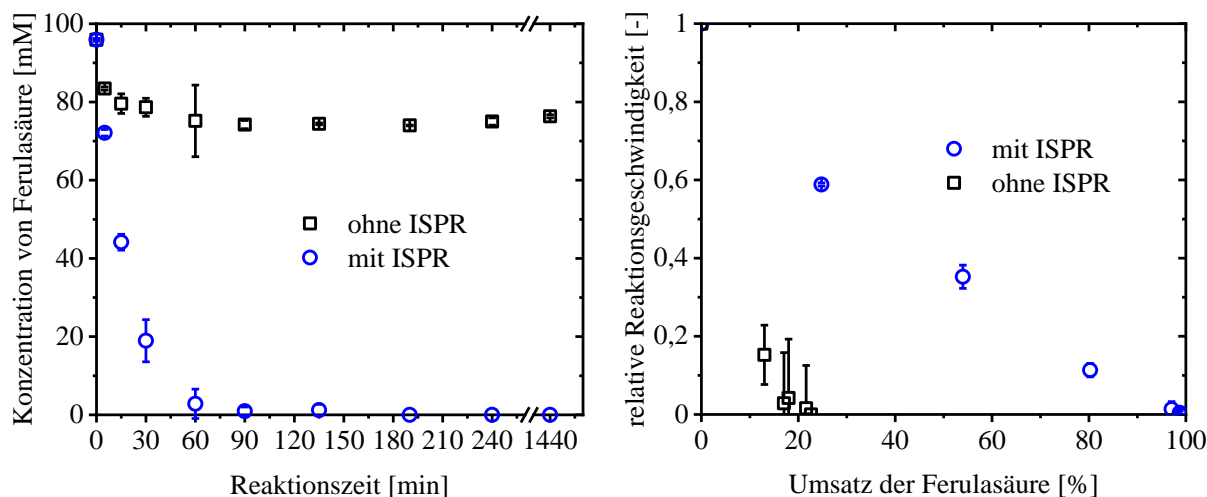


Abbildung 4.3: Einfluss von ISPR auf die 4-VG-Synthese. Links: Konzentrationsverlauf von Ferulasäure bei Einsatz von 100 μL DSI-GS-PAD enthaltenden CFE ($3,1 \text{ mg mL}^{-1}$; $36,6 \text{ U mL}^{-1}$) in 900 μL 0,5 M KP_i -Puffer, pH 7, 100 mM FA, 37°C , 750 rpm und 1 mL *n*-Heptan als Extraktionsphase (blaue Kreise). Messwerte basieren auf Duplikaten. Rechts: Alternative Darstellung der auf die Anfangsaktivität bezogenen Enzymaktivität in Abhängigkeit des Umsatzes mit (blau) und ohne (schwarz) *in situ* Extraktion im Batch.

Die Abbildung 4.3 zeigt die drastische Verbesserung der 4-VG-Synthese durch ISPR. Während die starke Produktinhibierung zu einer rapiden Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit führt und nur ein Umsatz von 20 % realisiert wird, sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit mit ISPR langsamer und nach 90 Minuten sind 100 % der eingesetzten FA decarboxyliert. Jedoch kann durch die ISPR die Produktinhibierung nur verringert, aber nicht verhindert werden. Dies wird insbesondere bei Betrachtung der Aktivität in Abhängigkeit des Umsatzes deutlich. Auch mit ISPR nimmt diese mit steigendem Umsatz immer weiter ab. Akkumuliertes 4-VG in der wässrigen Phase, welches nicht von *n*-Heptan extrahiert wird, führt zu dieser Inhibierung. Wie in 4.1 erläutert, kann das 4-VG im Batchbetrieb ohne Lösungsmittelrecycling nicht vollständig aus der wässrigen Phase extrahiert werden.

4.3 *In situ* Extraktion bei Einsatz von Immobilisaten

Ob das ISPR auch mit Immobilisaten gelingt und zur beschleunigten 4-VG-Synthese führt, wird im Folgenden gezeigt. Höhere bzw. vollständige Umsätze der FA können mit höheren Enzymmengen⁷⁷ (die in Bezug auf Immobilisate durch eine höhere Oberflächenbereitstellung realisiert werden können), höheren enzymspezifischen Aktivitäten der gebundenen Enzyme, oder mit einer kombinierten *in situ* Produktentfernung erreicht werden. Die Erhöhung der Immobilisataktivität durch Verbesserung der Immobilisierungsbedingungen und durch ein rationales Proteindesign von Fusionsproteinen wurde gezeigt. Weitere Verbesserungen sind theoretisch durch das Proteinengineering möglich, werden jedoch in dieser Arbeit nicht weiterverfolgt. Die begrenzte Oberfläche von genutzten, nicht porösen PET-Trägern limitiert, wie in 3.4 beschrieben, die Menge an immobilisierten Enzymen im Reaktionsmedium. Daher wird im Folgenden gezeigt, dass die direkte 4-VG-Abtrennung auch die Effizienz von PET-DSI-GS-PAD-Immobilisaten erhöhen kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verringerung der kompetitiven Produktinhibierung von immobilisierten PAD über ISPR unter Verwendung von *n*-Heptan als Extraktionsphase

realisiert. Zunächst wurde hierbei beobachtet, dass die Immobilisierung von PAD über Ankerpeptide zu einer Änderung der Oberflächeneigenschaften des PET führen. Unbehandelte PET-Partikel gehen in die Heptanphase über (Abbildung 4.4, links), während Immobilisate des Typs PET-DSI-GS-PAD nach Durchmischen des dreiphasigen Systems (flüssig-flüssig-fest) in der wässrigen Phase (Abbildung 4.4, rechts) akkumulieren, in der die Reaktion stattfindet.

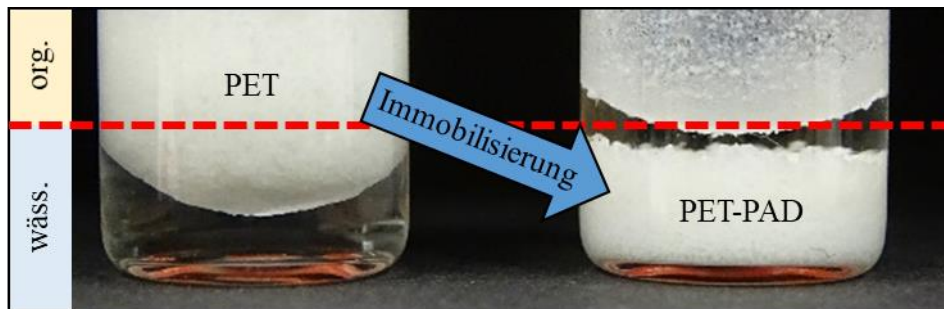


Abbildung 4.4: Veränderung der Hydrophobizität durch Immobilisierung: 167 mg PET (links) bzw. Immobilisat (rechts) in 333 μL 5 mM FA [in 0,5 mM KP_i -Puffer (pH 7)] und 666 μL *n*-Heptan [Puffer-*n*-Heptan 1:2 (v/v)].

Durch die Immobilisierung von Proteinen wird die Oberflächenpolarität von PET signifikant erhöht. Der Unterschied im Reaktionsfortschritt mit und ohne ISPR ist in Abbildung 4.5 gezeigt.

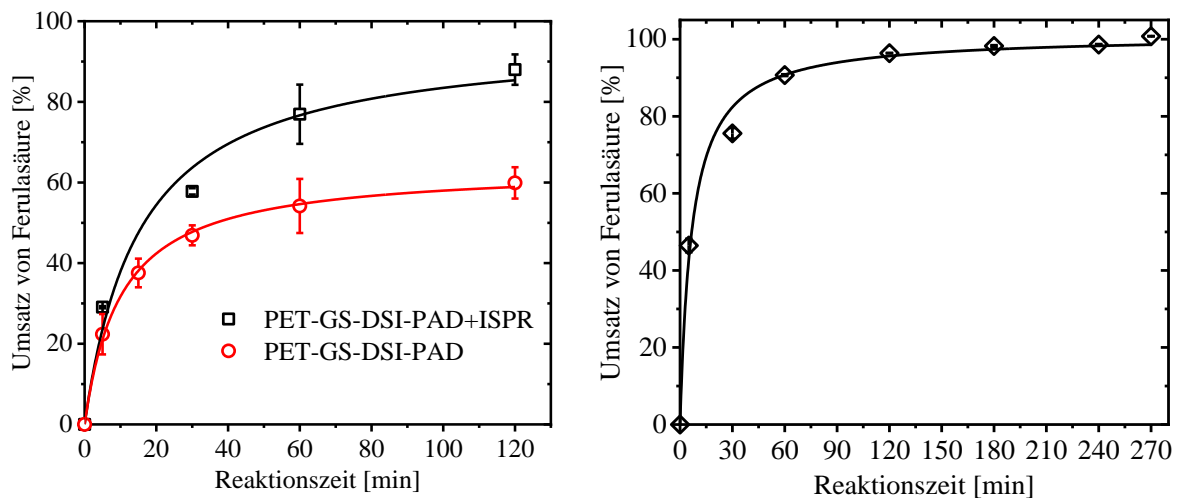


Abbildung 4.5: Einfluss von ISPR bei Einsatz von Immobilisat. Links: Gemittelter Ferulasäureumsatz bei Einsatz von PET-DSI-GS-PAD in Glasfläschchen bei 37 °C und 1250 rpm. Reaktionsgemisch ohne ISPR: 1 ml 5 mM FA in 0,5 mM KP_i -Puffer (pH 7), 0,5 g Immobilisat. Reaktionsgemisch mit ISPR: 333 μL 5 mM FA in 0,5 mM KP_i -Puffer (pH 7), 167 mg Immobilisat, 666 μL *n*-Heptan. Rechts: Umsatz bei verlängerter Versuchsdauer von 4,5 h und ISPR. Messwerte basieren auf Duplikaten.

Während der Umsatz von FA nach 2 h unter $59,9 \pm 3,9$ % bleibt, wenn PET-DSI-GS-PAD in einer Phase verwendet wird, konnte mittels der Extraktion von 4-VG ein Umsatz von $88,0 \pm 3,8$ % nach 2 h erreicht werden. Der höhere Umsatz mit ISPR ist das Resultat einer verringerten Produktkonzentration in der wässrigen Phase, wodurch der Effekt der Produktinhibierung verringert wird. Dass bei längerer Versuchszeit auch 100 % der FA mit den verwendeten Immobilisaten umsetzbar sind, ist in der Abbildung 4.5 rechts zu sehen. Für diesen Versuch wurden dieselben Reaktionsbedingungen wie im zweistündigen Versuch eingestellt.

Jedoch wurde eine andere Immobilisatpräparation eingesetzt. Da durch unerwünschte Unterschiede in der Herstellung des CFE mit den Fusionsproteinen und in der Immobilisierung abweichende Immobilisataktivitäten erreicht werden, unterscheidet sich der Umsatzverlauf des Langzeitversuches von dem des zweistündigen Versuches innerhalb der ersten zwei Stunden leicht. Das Präparat, welches im Langzeitversuch eingesetzt wurde, bewirkte schnellere Umsätze, was für eine höhere Enzymbeladung des PET-Trägers spricht. Auch Unterschiede in der Partikelgrößenverteilung der Immobilisate können die absolute Enzymmenge in der Reaktion beeinflussen und zu unterschiedlichen Umsatzverläufen führen, auch wenn die identische Masse an Träger eingesetzt wird.

Das Potential der Kombination des Immobilisierungsverfahrens und der *in situ* Produktextraktion in einem hybriden Reaktor kann aus den hier gezeigten Versuchen abgeleitet werden. Diese Ergebnisse sind die Grundlage für die Immobilisierung von PAD auf additiv hergestelltem Material mit definierten Strukturen in Strömungsreaktoren.

Für eine Etablierung einer solchen Technologie, ist die eingesetzte Substratkonzentration relevant. Die in Abbildung 4.5 dargestellten erreichten Umsätze wurden mit 5 mM FA erzielt. Mit Erhöhung der Substratkonzentration auf 25 mM zeigte sich, dass bei einem Phasenverhältnis von 1:2 (v/v) (wässrige Phase zu Heptanphase) keine vollen Umsätze mehr erzielt werden. Durch die Erhöhung des Heptananteils wurden jedoch auch für 25 mM Umsätze über 95 % erzielt. Durch eine erhöhtes Heptanvolumen, bleibt ein hoher Konzentrationsgradient während der Reaktion aufrechterhalten und die 4-VG-Konzentration kann in der wässrigen Phase gering gehalten werden, um die Produktinhibierung der Immobilisate zu minimieren (Abbildung 4.6, links). Anstelle einer Volumenerhöhung der Extraktionsphase bietet auch das schnelle Abtrennen des Produktes aus der Heptanphase die Möglichkeit, geringe 4-VG-Konzentrationen und somit größere Umsätze zu erzielen. Werden PET-DSI-GS-PAD-Immobilisate eingesetzt, so haben sie makroskopisch einen hydrophilen Charakter. Dennoch bleiben hydrophobe Oberflächenbereiche bestehen, die zur Adsorption des 4-VG führen. So nimmt im einphasigen Fall die 4-VG-Konzentration um 65 % ab, wenn deaktivierte Immobilisate hinzugegeben werden. (Abbildung 4.6, rechts). Es binden $6,1 \mu\text{mol g}^{-1}$ ($17,7 \mu\text{mol m}^{-2}$) an der Träeroberfläche bei Inkubation mit 0,5 g Immobilisat in 0,9 mL 4-VG-Lösung. Dies kann nicht nur durch die Bindung an freier hydrophober Oberfläche zu begründen sein, sondern auch durch die Bindung an der oberflächengebundenen PAD.

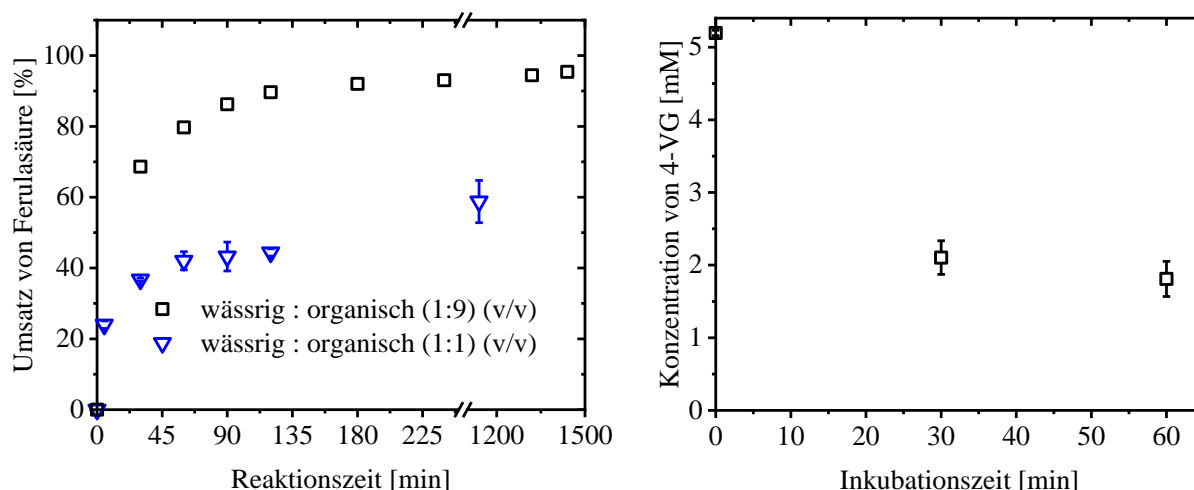


Abbildung 4.6: Einfluss vom Lösungsmittelverhältnis auf das ISPR. Links: Umsatz von 25 mM FA in 0,5 M KP_i -Puffer (pH 7). Schwarze Quadrate: 0.1667 g PET-DSI-GS-PAD in 333 μL 25 mM FA in 0,5 mM KP_i -Puffer (pH 7), 666 μL *n*-Heptan. Blaue Dreiecke: 0,5 g PET-DSI-GS-PAD in 1 mL 25 mM FA in 0,5 mM KP_i -Puffer (pH 7), 9 mL *n*-Heptan. Rechts: 4-VG-Konzentration im Überstand in 0,9 mL 0,5 mM KP_i -Puffer (pH 7) und 0,5 g deaktivierte PET-DSI-GS-PAD-Immobilisate. Fehlerbalken indizieren Abweichungen vom Mittelwert von Duplikaten.

Sowohl um Produktadsorption, als auch Produktinhibierung zu verhindern, kann die möglichst effiziente Extraktion mittels *n*-Heptan genutzt werden. Die Entwicklung einer solchen Extraktion im reaktiven Gegenstromextraktor wird in 4.4 erläutert.

4.4 Gegenstromextraktion mit additiv gefertigten Strukturen

In Abschnitt 1.3 wurde erläutert, dass die Geschwindigkeit und Effizienz einer Extraktion von der laminaren Grenzsichtdicke, dem Konzentrationsgradienten zwischen den Bulkphasen und der Phasengrenzfläche abhängt. Zur Beeinflussung dieser Parameter kann durch die gezielte Führung der Strömung von wässriger Reaktions- und organischer Extraktionsphase der Kontakt beider Phasen intensiviert werden. Mittels RP wurden Prototypen von Strömungsführern aus transparentem Acrylharz mittels SLA gefertigt. Durch den Einsatz in ein gläsernes Strömungsrohr, dem Einfärben von *n*-Heptan mit Sudanrot 7B und dem Fördern von wässriger und organischer Phase im Gegenstrom, konnte der Einfluss gefertigter Strukturen auf Strömungs- und Phasenverhältnisse beobachtet werden.

Die untersuchten Strukturen wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Mehrphasenströmungen (IMS) der TUHH so konzipiert, dass sie sich in Bezug auf radiale Verteilung, Verweilzeit und bereitgestellte spezifische Oberfläche unterscheiden. Da sie nicht nur zur Strömungsführung, sondern auch zu Enzymimmobilisierung verwendet werden sollen, war die absolute Oberfläche der Struktur ein Entwicklungskriterium, da sie die Menge an immobilisierbarem Enzym mitbestimmt. Weiterhin sollten Strukturen so konzipiert sein, dass sie das Aufbrechen von Tropfen der Extraktionsphase erzwingen, die Tropfenanzahl erhöhen, die Tropfengröße verkleinern und somit die Phasengrenzfläche zwischen Extraktions- und Reaktionsphase erhöhen. Alle untersuchten Strukturen bestehen aus einer Einheitszelle, die im CAD in alle drei Raumrichtungen skaliert und an die Reaktorgeometrie angepasst wurden. Die Strukturen werden als periodisch offenzellige Strukturen (POCS) bezeichnet. Sie sind durch die Einheitszellenform, die Zellgröße, den Stegdurchmesser und deren räumliche Orientierung

definiert. In Abbildung 4.7 sind drei verwendete Einheitszellen, sowie deren räumliche Anordnung in der Draufsicht dargestellt.

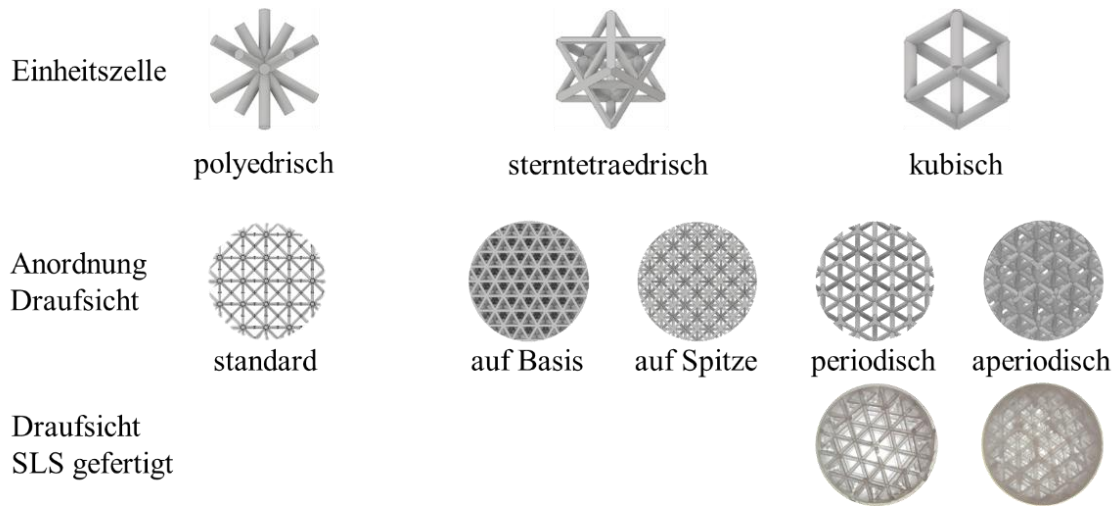


Abbildung 4.7: Additiv fertigmache Strömungsführer- und Enzymträgerstrukturen: Ansichten von Einheitszellen zur Entwicklung von periodisch offenzelligen Strukturen (POCS) mit ihrer dreidimensional skalierten Anordnung in der Draufsicht. Designs stammen vom Institut für Mehrphasenströmungen der Technischen Universität Hamburg und wurden in der Zusammenarbeit auf Anforderungen der *in situ* Extraktion von 4-VG angepasst und weiterentwickelt.

Um eine hohe Oberfläche für die Enzymimmobilisierung bereitzustellen, wurden zunächst Strukturen als Verteilerorgan konzipiert, die ein möglichst hohes Verhältnis von Strukturfläche zu Reaktionsvolumen im Reaktor bieten. Hierfür wurden die relativ dichten (wenig freies Volumen innerhalb der Zelle) polyedrischen und sterntetraedrischen Einheitszellen in verschiedenen Anordnungen (vgl. Abbildung 4.7) verwendet, die zu einer dichten Struktur mit hoher Oberfläche pro Leervolumen ($0,73 \text{ mm}^2 \text{ mm}^{-3}$) führten. Der Einsatz dieser Strukturen in einem Strömungsrohr führte nicht zu der erhofften Dispersion der Extraktionsphase unter den gewählten Volumenströmen von jeweils 32 mL min^{-1} . Vielmehr waren eine Kanalbildung des Heptans und eine stetige Akkumulation in der Struktur zu beobachten (Abbildung 4.8).



Abbildung 4.8: Gefärbtes Heptan in dichter Phasenverteilerstruktur (POCS, Einheitszelle: Stern tetraeder auf Spitze, Zellgröße 5 mm, Stegbreite: 0,6 mm) und 0.5 M KP_i -Puffer (pH 7) (32 mL min^{-1}). Kanalbildung und Beladung der Struktur nach 60 s.

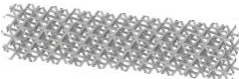
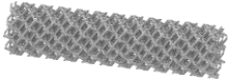




Infolgedessen wurden die größeren kubischen Einheitszellen entwickelt und gefertigt. Auch wurde ihr Stegdurchmesser von 0,6 mm auf 1 mm erhöht. Hierdurch sollte die Tropfenzerkleinerung und dadurch die Erhöhung der Phasengrenzfläche ermöglicht werden. Drei POCS wurden mit diesem Zelltyp entwickelt, die sich in ihrer Einheitszellengröße und in der Anordnung der kubischen Zelle unterscheiden. Auf Basis von Heuristiken des IMS der TUHH wurden für diese Strukturen die in Tabelle 4.1 genannten Eigenschaften vorausgesagt.


Tabelle 4.1: Eigenschaften und Wirkungen von periodisch offenzelligen Strukturdesigns auf eine Extraktionsphase

Struktur	Erwartete Eigenschaften
1	Bewirkt gute radiale Verteilung und große Tröpfchengrößen aufgrund großer Einheitszellen.
2	Induziert radiale Verteilung und kleinere Tröpfchengrößen aufgrund einer kleineren Einheitszellengröße. Bewirkt in der Summe eine größere Phasengrenzfläche und dadurch eine schnellere Extraktion. Das dichte Strukturdesign bietet außerdem eine größere Oberfläche für die Enzymimmobilisierung.
3	Gleiche Einheitszellengröße wie Struktur 2 und damit gleiche Leistung, jedoch höhere Verweilzeit aufgrund eines mäandrierenden Stromflusses. Dieser entsteht durch einen höheren Strömungswiderstand, der durch eine aperiodische offenzellige Struktur (APOCS) parallel zur Strömungsrichtung sichtbar ist. Infolgedessen bleiben Fluidmoleküle länger in der Struktur.

Die geometrische Beschreibung der drei untersuchten Strukturen mit kubischer Einheitszelle ist in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Tabelle 4.2: Charakteristika von periodisch offenzelligen Strukturen (POCS) für die Dispergierung von *n*-Heptan als Extraktionsphase in einem Strömungsrohr

Beschreibung	Struktur 1	Struktur 2	Struktur 3
CAD			
Querschnitts Draufsicht			
Einheitszellengröße s^* [mm]	6	5	5
Stegdicke [mm]	1,0	1,0	1,0
Porosität [-]	0,94	0,91	0,91
Oberfläche [mm ²]	10230	14032	14930
Feststoffvolumen [mm ³]	45239	45239	39761
Leervolumen [mm ³]	42660	41385	36169
spez. Oberfläche ^{*2} [mm ⁻¹]	0,24	0,36	0,39

*1  s *2 bezogen auf Leervolumen

Zur Verfolgung des Heptanflusses innerhalb einer additiv gefertigten Enzymträger- und Verteilerstruktur wurden transparente POCS in einen Glasrohrreaktor eingesetzt. Heptan wurde mit Sudanrot 7B ($67 \mu\text{g ml}^{-1}$, 0,18 mM) gefärbt und mit 32 ml min^{-1} im Gegenstrom zur wässrigen Phase (Kaliumphosphatpuffer 0,5 M; pH 7) gefördert. Die Temperatur des Heizmantels wurde auf $37 \text{ }^\circ\text{C}$ eingestellt. Hinter dem Reaktor wurde ein LED-Panel (Light Emitting Diodes) installiert. Eine Kamera wurde, wie in Abbildung 4.9 (links) dargestellt, zur Aufzeichnung der sich bewegenden Heptanphase an einem Stativ aufgestellt (ISO-Wert: 100,

Apertur 8,0; Verschlusszeit: 1/200 s, Auflösung 28 MP). Nach 2 min wurde eine Entfärbung durch Umschalten der Ventile 1 und 2 und Pumpen von ungefärbten Heptan durch den Reaktor in einen Abfallbehälter gestartet. Aufgezeichnete Videodateien wurden mittels Grauwertanalyse ausgewertet.

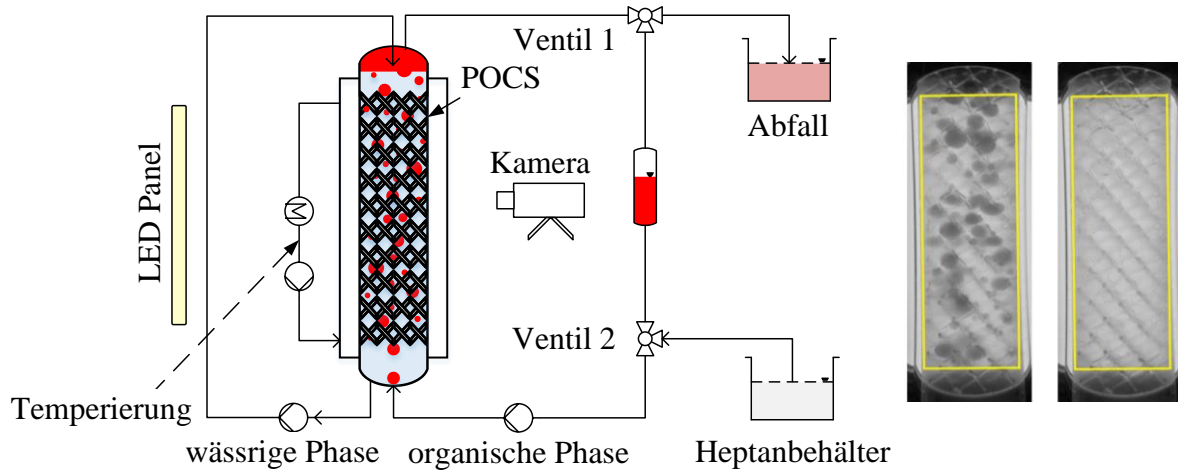


Abbildung 4.9: Aufbau zur Untersuchung von durch POCS induzierten Strömungen. Links: Schematische Darstellung eines Versuchsaufbaus zur Analyse einer Heptantropfenverteilung. Eingefärbtes Heptan wird gegenläufig zu einer wässrigen Phase gefördert (jeweils 32 mL min^{-1}), während die Strömung von einer Kamera aufgezeichnet wird. Zur Abschätzung der Verweilzeit wurde der Reaktor entfärbt, indem die Ventile 1 und 2 so geschaltet wurden, dass ungefärbtes Heptan durch den Reaktor strömt. Rechts: Auswahl eines Bereichs von Interesse (ROI) zur Analyse von Tropfengrößen und Verweilzeiten mittels der Entfärbung eines Strömungsrohrs (Rahmen entspricht $26 \times 100 \text{ mm}$, links vor Entfärbung, rechts nach Entfärbung).

Um die Verweilzeiten von Heptan innerhalb verschiedener Strukturen zu überprüfen, wurden aufgezeichnete Videodateien mit Adobe Premiere CC 2019 (San José, USA) in Einzelbilder (1 Bild pro Sekunde) aufgeteilt. Die Analyse dieser Bilder wurde mit Fiji (ImageJ) 2.0.0 durch Konvertierung in 8-Bit-Graustufen durchgeführt. Ein Bereich von Interesse (ROI) wurde definiert (Abbildung 4.9, rechts) und die mittlere Intensität jedes Bildes exportiert.

Für die Abschätzung der radialen Verteilung (ohne Heptanentfärbung), wurde ein kleinerer ROI ($26 \times 20 \text{ mm}$, Abbildung 4.10, links) gewählt. Exemplarisch ist die Auftragung der Farbintensität in Abhängigkeit der Zeit zur Analyse der radialen Verteilung in einem Konturdiagramm dargestellt (Abbildung 4.10).

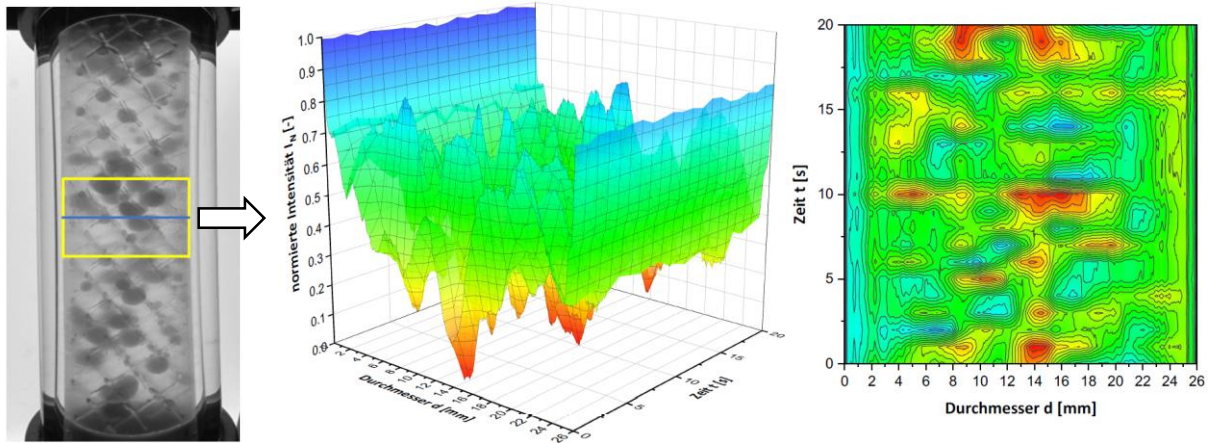


Abbildung 4.10: Exemplarisches Konturdiagramm, welches den Heptanfluss und die radiale Verteilung innerhalb einer additiv gefertigten Verteilerstruktur (Struktur 1) zeigt

Die Aufzeichnung des im Gegenstrom zum farblosen Puffer geführten *n*-Heptans durch die Strukturen 1-3 (Tabelle 4.2) ist in Abbildung 4.12, oben dargestellt. Die von den Strukturen induzierten kugelförmigen und elliptischen Tröpfchen wurden hinsichtlich ihrer Größenverteilung analysiert (Abbildung 4.12, unten). Hierfür wurde ihr Hauptdurchmesser *a* und Nebendurchmesser *b* (Abbildung 4.11) gemessen und ein kugeläquivalenter Durchmesser (ESD) gemäß Formel 4.1 berechnet.

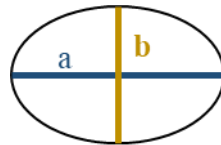


Abbildung 4.11: Geometrie eines Heptantropfens mit Hauptdurchmesser *a* und Nebendurchmesser *b*

$$\text{ESD} = \sqrt[3]{8 \cdot a^2 \cdot b} \quad (4.1)$$

Durch Analyse von drei Bildern zu unterschiedlichen Zeitpunkten pro Struktur wurden der Mittelwert und die Standardabweichung der Tropfengößenverteilung ermittelt.

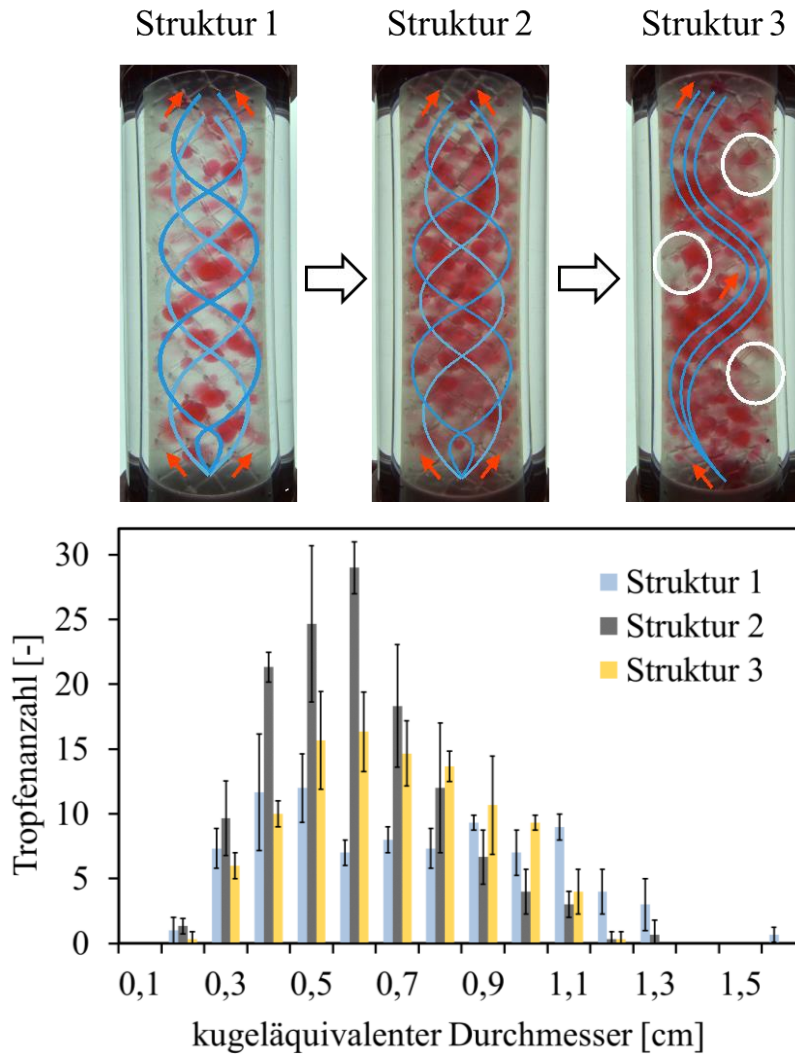


Abbildung 4.12: Strömungsverhalten in einem Extraktor; oben: Strömungsanalyse von gefärbtem *n*-Heptan in einem Gegenstromextraktor mit verschiedenen Strukturen (vgl. Tabelle 4.2) als statische Mischer. Volumenstrom der wässrigen (0,5 M KPi -Puffer, pH 7) und organischen Phase *n*-Heptan von jeweils 32 mL min^{-1} , Temperatur: $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Schwarze Pfeile indizieren iterative Designänderung. unten: Mittlere Tropfengrößenverteilung von gefärbtem Heptan in POCS. Es wurden jeweils drei Bilder pro Verteilung ausgewertet und die Standardabweichung gebildet, die mit Fehlerbalken dargestellt sind.

Das Volumen V aller Tröpfchen innerhalb eines Reaktors, ihre gebildete Grenzfläche A und das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen sind in Tabelle 4.3 dargestellt. Es sei erwähnt, dass Effekte von Lichtstreuung und Verformungen, die durch eine runde Reaktorform auftraten, nicht berücksichtigt wurden.

Tabelle 4.3: POCS induzierte Tropfendispersion: Summierte Tropfenanzahl, Heptanphasenvolumen, Phasengrenzfläche und Grenzflächen-volumen-Verhältnis aller Tropfen in drei unterschiedlichen POCS (vgl. Tabelle 4.2). Mittelwerte und Standardabweichung von der Bestimmung aus jeweils drei Bildaufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten.

Struktur	$\sum \text{Tropfen} [-]$	$V [\text{cm}^3]$	$A [\text{cm}^2]$	$A/V [\text{cm}^{-1}]$
1	87 ± 3	$20,4 \pm 6.2$	131 ± 35	$6,5 \pm 0,3$
2	131 ± 11	$13,9 \pm 4.3$	124 ± 34	$9,0 \pm 0,4$
3	101 ± 4	$15,7 \pm 3.3$	111 ± 12	$7,3 \pm 1,3$

Um die Verweilzeitverteilung der Heptanvolumina in den untersuchten Strömungsrohren mit Strukturen 1-3 abzuschätzen, wurde das eingefärbte *n*-Heptan mit ungefärbtem *n*-Heptan verdrängt. Die Lichtintensität der aufgezeichneten Bilder während dieses Versuchs änderte sich in Abhängigkeit von der Farbmenge im Reaktor. Je weniger Farbe vorhanden ist, desto weniger Licht wird absorbiert und desto höher ist die aufgezeichnete Intensität von Videobildern. Diese Intensität, abhängig von der Zeit der Entfärbung, ist in Abbildung 4.13 dargestellt.

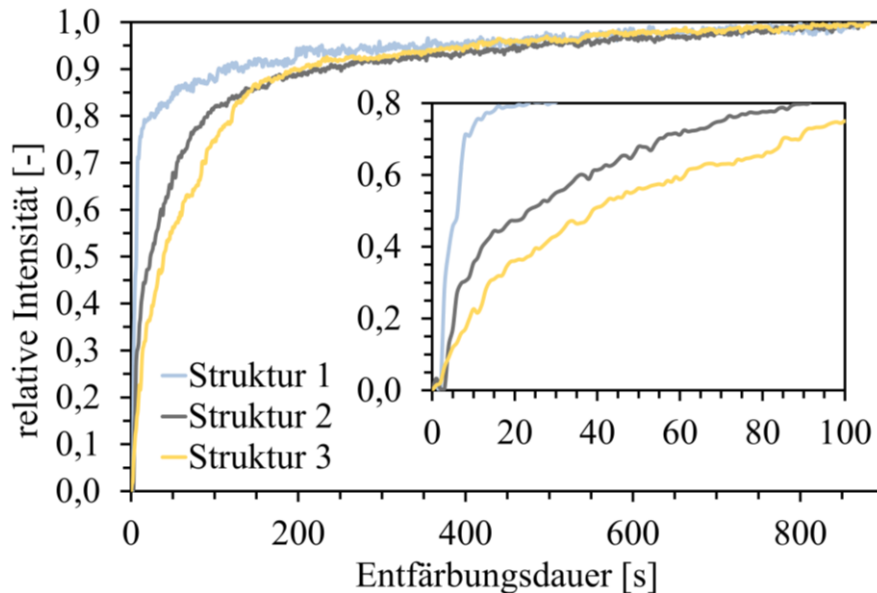


Abbildung 4.13: Relative Lichtintensität während einer Entfärbung: Visualisierung der Verweilzeit von eingefärbtem Heptan in einem Gegenstromextraktor mit eingesetzten Strömungsführern der Strukturen 1-3 (vgl. Tabelle 4.2). Eine vollständige Entfärbung wurde nach spätestens 15 min (900 s) für jede Struktur beobachtet.

Struktur 1, mit einem Zelldurchmesser von 6 mm, einem Verhältnis von Oberfläche zu Leervolumen von $0,24 \text{ mm}^{-1}$ und einer Porosität von 0,94 induzierte das Aufbrechen und Dispergieren von Heptantröpfchen (Abbildung 4.12, oben). Eine homogene Verteilung über den Durchmesser und sich schnell bewegende Tröpfchen wurden beobachtet. Diese schnelle Bewegung führte zu einer geringen Verweilzeit der Heptanvolumina (80 % Verfärbung nach 25 s, Abbildung 4.13). Dies ist durch einen hohen Anteil sich schneller bewegender großer Tröpfchen (Abbildung 4.12, unten) zu begründen, welcher auch zu einem niedrigen Verhältnis von Oberfläche zu Volumen von $6,5 \pm 0,3 \text{ cm}^{-1}$ führt.

Um kleinere Tropfchengrößen für eine höhere Grenzfläche zwischen wässriger Reaktions- und organischer Extraktionsphase zu ermöglichen, wurde die Einheitszellengröße auf 5 mm verringert. Die daraus resultierte Struktur 2 mit einem höheren Verhältnis von Oberfläche zu Volumen von $0,36 \text{ mm}^{-1}$ und einer verringerten Porosität von 0,91 (Tabelle 4.2), verursachte einen höheren Strömungswiderstand und die Erzeugung von mehr Tröpfchen pro Reaktorvolumen (131 ± 11 im Vergleich zu 87 ± 3 für Struktur 1) mit einem höheren Anteil an kleinen Tröpfchen (Abbildung 4.12). Dadurch wurde die Retentionszeit erhöht (80% Verfärbung nach 80 s, 4) und ein höheres Verhältnis von Phasengrenzfläche zu Heptanvolumen von $9,0 \pm 0,4 \text{ cm}^{-1}$ erreicht (Tabelle 4.3).

Mit Struktur 3 wurde untersucht, wie sich Aperiodizität in der Struktur auf die Heptanströmung auswirkt. Aperiodische Bereiche der Struktur mit einer Oberfläche pro Reaktionsvolumen von

0,39 mm⁻¹ und einer Porosität von 0,91 zielten darauf ab, Turbulenzen im Zweiphasensystem zu erhöhen. Innerhalb der Struktur 3 wurden ein Aufbrechen von Tröpfchen und eine schnelle Bewegung durch die Struktur beobachtet. Gleichzeitig zeigten sich Regionen in der Struktur in welche wenig Heptanvolumen strömt. Dieses Volumen ist weiterhin wenig im Austausch mit nachfließenden Heptanvolumina (Abbildung 4.12, oben). Der geringere Anteil kleiner Tröpfchen (im Vergleich zu Struktur 2) bewirkt ein kleineres Volumenverhältnis von Oberfläche zu Heptan von $7,3 \pm 1,3 \text{ cm}^{-1}$. Aufgrund der genannten Totzonen wurde eine lange Verweilzeit der Heptanvolumina beobachtet (80 % Verfärbung nach 120 s, Abbildung 4.13).

Um eine 4-VG-Akkumulation innerhalb der Heptanphase in einem hybriden Reaktor zu verhindern, wurden eine kürzere Retentionszeit, eine gleichmäßige radiale Verteilung und ein höheres Verhältnis von Grenzfläche zu Heptanvolumen angestrebt. Von den untersuchten Strukturen induziert Struktur 2 das höchste Verhältnis von Grenzfläche zu Extraktionsphasenvolumen ($9,0 \pm 0,4 \text{ cm}^{-1}$), sowie eine gleichmäßige Verteilung. Die weitere Verkleinerung der Zellgröße hat das Potential, zu noch feiner verteilten Tropfen zu führen. Zu enge Strukturen jedoch, bewirken eine Kanalbildung der Heptanströmung und die Strukturbeladung mit dem Lösungsmittel, wie es in Abbildung 4.8 gezeigt wurde. Die minimal mögliche Zellgröße zur Dispergierung von *n*-Heptan wurde nicht weiter untersucht, stellt jedoch ein Optimierungsproblem dar, welches zukünftig mittels CFD gelöst und im hier genutzten Versuchsaufbau (Abbildung 4.9) evaluiert werden kann. Die Struktur 2 eignet sich zur Dispersion der Extraktionsphase im Gegenstromreaktor und wurde für die Entwicklung eines hybriden Reaktorkonzeptes, in der Immobilisierung, enzymatische Katalyse und *in situ* Produktextraktion kombiniert werden, ausgewählt.

In Abschnitt 4 wurde gezeigt, wie die Voraussetzungen für eine effiziente *in situ* Flüssig-Flüssig-Extraktion von 4-VG mit *n*-Heptan geschaffen werden können:

- Die Extraktion von FA in *n*-Heptan (Verteilungskoeffizient unter 0,01) in einem Puffer-Heptan System wurde ausgeschlossen. Jedoch wird die Akkumulierung von Säuremolekülen an der Phasengrenzfläche vermutet. (4.1.1)
- Der Verteilungskoeffizient von 4-VG wurde für ein Phasenverhältnis von 1:1 (Heptan zu Puffer, 0,5 M KPi, pH 7) und einer initialen Produktkonzentration von 22 mM in der organischen Phase bei 37 °C zu $K_P = 16,8 \pm 2,2$ bestimmt. Dieser ist im Bereich zwischen 5 und 45 mM konzentrationsunabhängig. Die maximale 4-VG-Aufnahmekapazität des *n*-Heptans wurde zu $45,2 \pm 0,4 \text{ mM}$ bestimmt. (4.1.2)
- Die Stabilität von 4-VG in 0,5 M KPi-Puffer (pH 7) wurde bestimmt. So nimmt die 4-VG-Konzentration während der 24-stündigen Inkubation bei 37 °C um 31 % (Zefallskonstante von $0,28 \text{ d}^{-1}$, Halbwertszeit von 2,5 d) und bei 25 °C um 20 % (Zefallskonstante von $0,12 \text{ d}^{-1}$, Halbwertszeit von 5,8 d) ab. Die Instabilität des 4-VG in wässriger Phase ist ein weiterer Grund für die Notwendigkeit einer schnellen Produktextraktion. (4.1.2)
- Eine Effizienzsteigerung der enzymatischen FA-Decarboxylierung wird durch die *in situ* Extraktion mit *n*-Heptan im Vergleich zur einphasigen Reaktion erzielt. Während unter ansonsten identischen Bedingungen nach 90 min im Batchbetrieb nur 20 % von 100 mM FA mit freiem DSI-GS-PAD umgesetzt werden können, wird in derselben Zeit

100 % von 100 mM FA umgesetzt, wenn *n*-Heptan als Extraktionsmittel genutzt wird. (4.2)

- Bei dem Einsatz von PET-DSI-GS-PAD-Immobilisaten kann ebenso eine Effizienzsteigerung durch ISPR beobachtet werden. Die Oberfläche der Immobilisate ist durch die Enzymbeladung makroskopisch hydrophil. In einem zweiphasigen System werden nach 2 h $88,0 \pm 3,8$ % der FA umgesetzt, wohingegen ohne ISPR nur $59,9 \pm 3,9$ % umgesetzt werden. (4.3)
- Für den vollständigen Umsatz hoher FA Startkonzentrationen durch Immobilisate, bedarf es einer kontinuierlich geringen 4-VG-Konzentration in der organischen Phase. Diese kann durch die direkte Rückführung des Heptans oder der Verringerung des Puffer-Heptan-Verhältnisses realisiert werden. So wird bei einem Verhältnis von 9:1 (v/v) ein Umsatz von 95 % von 25 mM FA erzielt, wohingegen für ein Verhältnis von 2:1 in derselben Zeit nur 60 % erreicht werden. (4.3)
- Eine Produktadsorption auf PET-DSI-GS-PAD Immobilisaten von $6,1 \mu\text{mol g}^{-1}$ ($17,7 \mu\text{mol m}^2$) wurde nachgewiesen. Theoretisch kann diese mit einer effizienten Produktextraktion verringert werden. (4.3)
- Über RP konnten transparente Strukturen gefertigt werden und experimentell auf Einflüsse auf Strömungsverhalten in einem Gegenstromextraktor analysiert werden. Eine periodisch offenzellige Struktur (POCS) mit einer kubischen Einheitszelle, einer Stegbreite von 1 mm und einer Zellgröße von 5 mm wurde als vorteilhaft für die Dispergierung von Heptantropfen in einem reaktiven Gegenstromextraktor klassifiziert. Sie erzeugt bei 32 mL min^{-1} , 131 ± 11 Tropfen, wovon ein hoher Anteil (66 %) einen kleineren Kugeläquivalentdurchmesser als 0,6 cm aufweist. Es wird so ein Verhältnis von Phasengrenzfläche zu Volumen von $9,0 \pm 0,4 \text{ cm}^{-1}$ realisiert.

Das folgende Kapitel wird zeigen, wie die Immobilisierung (3.6) mit der *in situ* Extraktion (4) in einem hybriden Reaktorkonzept mit additiv gefertigter Träger- und Verteilerstruktur realisiert werden kann.

5 Gegenstrom-Reaktivextraktor mit additiv gefertigter Enzymträgerstruktur

In diesem Kapitel wird erläutert, wie die Immobilisierung und das ISPR mit Hilfe einer geeigneten additiv gefertigten Struktur als Enzymträger und Phasenverteiler in einer Reaktortechnologie zusammengebracht werden können. Hierbei wird zunächst auf die additive Fertigung von Enzymträger- und Strömungsführerstrukturen und deren Charakteristika eingegangen (5.1). Anschließend wird die Immobilisierung an additiv gefertigten Strukturen gezeigt (5.2). Die Performance von Bioreaktoren mit Enzymträgerstruktur im einphasigen Fall wird in Abschnitt 5.3 beleuchtet, bevor in Abschnitt 5.4 ein intensivierter Prozess zur 4-VG-Synthese vorgestellt wird, bei dem additiv gefertigte Strukturen als Enzymträger und als Phasenverteiler der organischen Extraktionsphase fungieren.

Die Bemessungen des verwendeten Reaktors sind in Abbildung 5.1 dargestellt. Eingefügte additiv hergestellte Enzymträger- und Strömungsführerstrukturen haben eine Außenwand, die genau an dem Glasrohr anliegt und keine Strömungen zwischen Glas und Strukturwand zulässt. Bereiche innerhalb des Reaktors wurden für die Phasentrennung (Settling-Zone) berücksichtigt. Für den Einsatz der aus PA12 gefertigten Struktur 2 wurde ein Leervolumen von $67,49 \pm 0,44$ mL (Reaktive Zone + Settling Zonen) bestimmt. Hiervon werden im zweiphasigen, kontinuierlichen Betrieb $11,75 \pm 0,35$ mL von Heptan eingenommen. Dementsprechend sind 55,74 mL im Reaktor von wässriger Phase okkupiert.

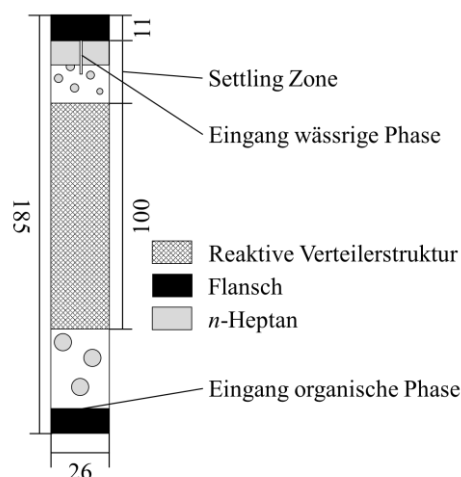


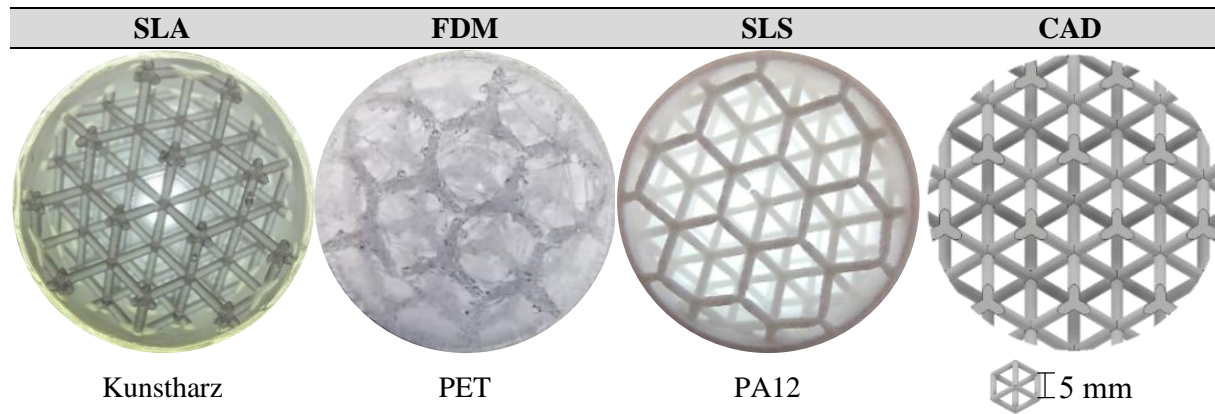
Abbildung 5.1: Maße und Bestandteile eines hybriden Reaktors zur Synthese von 4-VG mit additiv gefertigter, reaktiver Verteilerstruktur

5.1 Additive Fertigung von Enzymträger- und Strömungsführerstrukturen

Die Qualität von additiv gefertigten Strukturen, die als Dispergierorgan und Enzymträger in Strömungsrohren eingesetzt werden können, hängt im starken Maß von der Fertigungstechnologie des gewählten Materials ab. Wird eine Struktur basierend auf einem identischen CAD, aber mittels drei verschiedener Methoden gefertigt, entstehen signifikante Unterschiede in der Beschaffenheit dieser. In Abschnitt 4.4 wurde die Entwicklung einer POCS

mit einer kubischen Einheitszelle beschrieben. Diese wurde aus einem photoreaktiven Kunstharz (Methylmethacrylat und Photoinitiator) über Stereolithografie (SLA), aus Polyethylenterephthalat (PET) mittels Schmelzschichtung (FDM) und aus Polyamid 12 über selektives Lasersintern (SLS) gefertigt. In Tabelle 5.1 ist die Draufsicht auf diese Strukturen gezeigt.

Tabelle 5.1: Draufsicht auf offenzellige Struktur (Struktur 2, vgl. Tabelle 4.2) mittels unterschiedlicher Techniken aus verschiedenen Materialien additiv gefertigt



Die Immobilisierung von DSI-GS-PAD konnte auf additiv fertigmaren PET und PA12 gezeigt werden (Abschnitt 3.6). Die Fertigung von PET mit Fused Deposition Modeling (FDM) ist jedoch durch die Auflösung und Genauigkeit begrenzt¹ (Tabelle 5.1, mitte). Bei der Fertigung treten Effekte wie die Bildung von Fäden zwischen Einheitszellen auf. Dieses verhindert, dass *n*-Heptan von der gefertigten Struktur vergleichbar geführt wird, wie zuvor für Strukturen aus Kunstharz (Tabelle 5.1, links) untersucht (Abschnitt 4.4). Der Einsatz von PET Strukturen im zweiphasigen Gegenstromreaktivextraktor führt zu einer Heptanansammlung am Eingang der Struktur und keiner Dispergierung (Daten nicht gezeigt).

Ein alternativer Ansatz der additiven Fertigung ist das selektive Lasersintern (SLS), das höhere Auflösungen und reproduzierbare Strukturen bieten kann. Dies gilt nicht nur für die Herstellung von POCS mit Stegdicken von 1 mm (hier gezeigt), sondern bei spezifischen Fertigungsparametern (siehe Abschnitt 2.4) auch bis zu Stegbreiten von 0,6 mm¹. Ein weiterer Vorteil des SLS bietet das Vorheizen des PA12-Pulvers, das die Kontrolle von Wärmegradienten ermöglicht und somit die Notwendigkeit von Stützstrukturen beseitigt (vorgewärmtes, angesintertes Pulver fungiert selbst Stütze). Mit dem Vorheizen des Pulvers wird das Entfernen aus der Struktur nach der Fertigung für feine Strukturen jedoch herausfordernder, da das Pulver leicht miteinander verbunden ist. Aus diesem Grund muss beim Entwurf von POCS für SLS sichergestellt werden, dass die Gitterstruktur ausreichend steif und grob ist, um das restliche Pulver entfernen zu können. Bei der AF mittels SLS entstehen raue Oberflächen, die vorteilhaft für die Enzymimmobilisierung sein können. Dies liegt in der dadurch größeren verfügbaren spezifischen Oberfläche begründet. Das für SLS gebräuchlichste Polymer ist PA12. Da es wie PET hydrophobe Eigenschaften aufweist, wurde erwartet, dass die für PET eingesetzten DSI-GS-PAD-Fusionsproteine ebenso an dieses Material binden. Die Peptide wurden hier nicht für PA12 gescreent. Daher ist das gewählte Fusionsprotein nicht zwingend die optimale Lösung für die Immobilisierung an PA12. Die universelle

Anwendbarkeit eines Ankers auf ähnliche Materialien wurde jedoch von Dedisch *et al.* gezeigt¹⁶⁵. Für das hybride Reaktorkonzept wurde DSI-GS-PAD als Fusionsprotein für die Immobilisierung an Struktur 2 (vgl. Tabelle 4.2) verwendet, welche aus PA12 gefertigt wurde.

5.2 Immobilisierung an additiv gefertigten Trägerstrukturen

Zur Immobilisierung von PAD-GS-DSI auf PA12 Strukturen, wurde der Reaktor auf 4 °C abgekühlt und 100 mL einer Immobilisierungslösung (CFE in KPi -Puffer [pH 7; 0,5 M]) für 10 min mit einer Flussrate von 8 mL min^{-1} im Kreis gefördert. Das Spülen des Reaktors sollte sicherstellen, dass alle ungebundenen Enzyme aus dem Reaktor entfernt werden. Hierbei wurde der Reaktor nach der Immobilisierung vollständig geleert und zweimal mit Spülpuffer gefüllt, bevor die Substratlösung gefördert wurde.

Eine Abschätzung darüber, wie viele DSI-GS-PAD-Fusionsproteine an einer SLS gefertigten Struktur aus PA12 binden können, gibt die Immobilisierungsausbeute. Über die Aktivität im Überstand vor und nach einer Immobilisierung, konnte ermittelt werden, wie viel Prozent der eingesetzten Fusionsproteine an der Oberfläche binden (ohne Berücksichtigung von Ablösungen durch Spülvorgänge). Abhängig von der eingesetzten Enzymaktivität, ergibt sich eine Immobilisierungsausbeute, die in Abbildung 5.2 dargestellt ist. Weiterhin ist für eine Immobilisierung mit 201 U (924 μL CFE mit $217,6 \text{ U mL}^{-1}$ und $5,4 \text{ mg mL}^{-1}$ Gesamtprotein wurden in 999 mL Immobilisierungslösung gegeben) die Aktivitätsausbeute bestimmt worden. Hierzu wurde die Trägerstruktur von einer FA Lösung durchspült und über die Produktbildungsrate (Abbildung 5.2, rechts) die Aktivität auf der Trägerstruktur bestimmt.

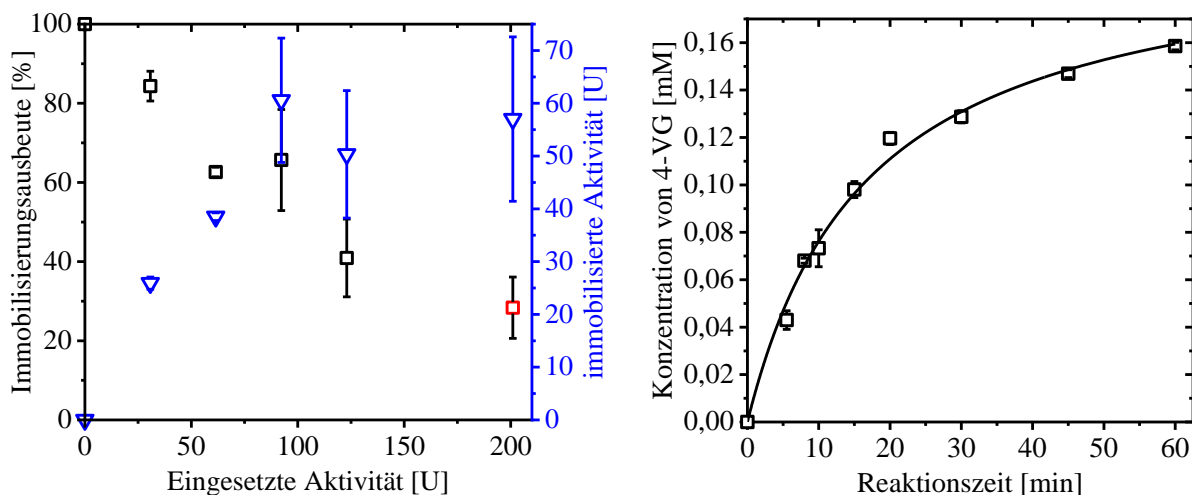


Abbildung 5.2: Immobilisierung an additiv gefertigter Enzymträgerstruktur. Links Abhängigkeit der Immobilisierungsausbeute an additiv gefertigter Struktur von der eingesetzten Enzymaktivität. Rechts: Resultierende Produktkonzentrationsentwicklung bei Einsatz einer Struktur in einem Strömungsrohr, an der mit 201 U (links rot markiert) immobilisiert wurde. Fehlerbalken zeigen die Abweichung vom Mittelwert von Duplikaten.

Wie zu erwarten, nimmt die Immobilisierungsausbeute ab, je mehr Aktivität für die Immobilisierung eingesetzt wird. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Bindungsplätze auf dem PA12 limitiert sind. Über die CAD-Datei lässt sich eine Oberfläche der Struktur von 14032 mm^2 ($140,32 \text{ cm}^2$) ausgeben (vgl. Tabelle 4.2). Abhängig von der Oberflächenrauigkeit

kann die Oberfläche, die für die Bindung von DSI-GS-PAD-Fusionsproteinen benötigt wird, wesentlich höher sein (stark vereinfachtes Rechenbeispiel in Abbildung 5.3). Jedoch wird dieser Effekt begrenzt sein.

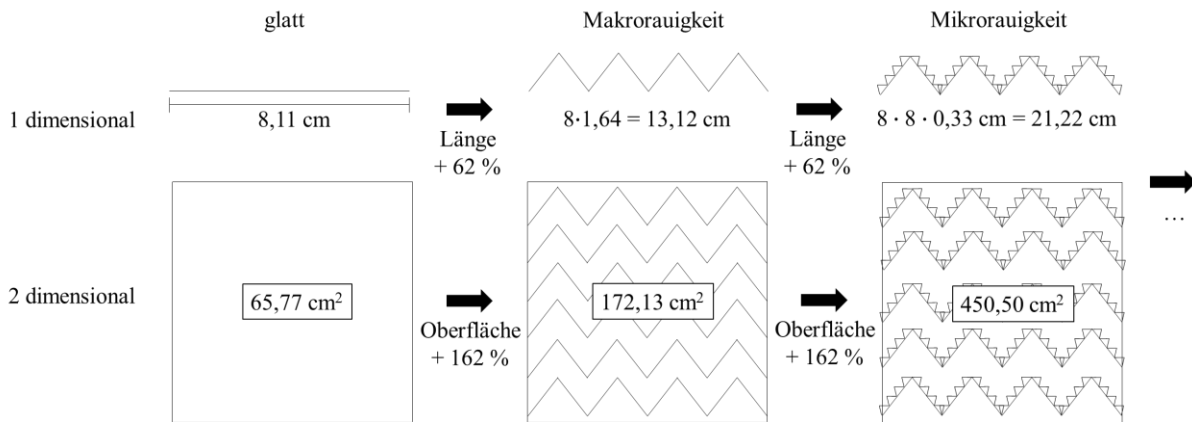


Abbildung 5.3: Einflusses von Rauigkeit auf eine Oberfläche. Das Rechenbeispiel zeigt die Vergrößerung von materialspezifischen Oberflächen durch die Rauigkeiten verschiedener Größenbereiche.

Für die gefertigte Struktur war die exakte Bestimmung der Oberfläche nicht möglich. Daher kann keine Aussage über spezifische Beladungsdichten getroffen werden. Jedoch ist in Abbildung 5.2, links zu erkennen, dass die immobilisierbare Aktivität, auch bei Einsatz von größeren Fusionsproteinmengen, nicht über 60 U ansteigt. Ab einem Einsatz von 92 U scheint also die maximal mögliche Anbindung an der PA12-Oberfläche erreicht zu sein. Bei dieser eingesetzten Menge wird eine Immobilisierungsausbeute von 66 ± 13 % erreicht. Um sicherzustellen, die maximal mögliche Aktivität auf der Oberfläche zu realisieren, wurde bei weiteren Untersuchungen die Aktivität von 201 U als Standard bei der Immobilisierung gewählt. Hierfür wurde eine geringere Immobilisierungsausbeute von 28 ± 7 % akzeptiert. Die Aktivität einer Struktur, welche mit 201 U immobilisiert worden ist, wurde zu $1,09 \pm 0,02$ U (entsprechend $73,01$ U m⁻²) bestimmt, nachdem sie mit Puffer gespült wurde. Dies entspricht einer Aktivitätsausbeute von 0,54 %. An dieser Stelle sei auf die hohe Diskrepanz zwischen immobilisierter Aktivität von $57,01 \pm 15,57$ und tatsächlich beobachteter Aktivität von $1,09 \pm 0,02$ U hingewiesen. Die Immobilisierungseffizienz (beobachtete/immobilisierte Aktivität¹⁴) entspricht damit 1,9 %. Dieser Unterschied hat im Wesentlichen zwei Ursachen. Zum einen ist die immobilisierte Aktivität ohne Berücksichtigung von Verlusten im Spülschritt bestimmt worden. Aus Abschnitt 3.6.4 (Abbildung 3.15) geht hervor, dass durch ein Spülen von PET-DSI-GS-PAD-Immobilisaten mit 44 mL m⁻², 89 % der Aktivität verloren gehen. Ähnliche Verluste sind auch durch das Spülen der PA12-Struktur, an welcher hier immobilisiert wurde, plausibel. Die hier untersuchte Struktur wurde gespült, indem die Immobilisierungslösung aus dem Reaktor mit der Struktur nach der Immobilisierung mit Spülpuffer (0,5 M KP_i, pH 7) gefüllt und wieder entleert wurde. Für diesen Spülüberstand wurde jedoch nur eine Aktivität von $7,79 \pm 3,14$ U (31 % der immobilisierten Aktivität) bestimmt, die somit von der Oberfläche gespült wurde. In einem zweiten Spülschritt, konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. Zum anderen können beim Überprüfen der Aktivität auf der Struktur Effekte der Produktadsorption (Abbildung 4.6) und inhomogene Strömung im einphasig betriebenen Reaktor die beobachtete Aktivität beeinflussen. Somit spiegelt die



Aktivitätsausbeute wieder, wie viel Aktivität einer additiv gefertigten Enzymträgerstruktur in einem Strömungsrohr im einphasigen Fall, bezogen auf die in der Immobilisierung eingesetzten Aktivität, generiert werden kann. Eine geringe Ausbeute von 0,54 % ist Resultat einer geringen Oberfläche der gefertigten Struktur (Nach CAD 140,3 cm²), eines großen Einsatzes an Aktivität (201 U) in der Immobilisierung und eines Aktivitätsverlustes im Spülvolumen (~ 31 %). Durch die Anpassung einer der Parameter, kann die Aktivitätsausbeute erhöht werden.

Wird eine additiv gefertigte Struktur als Matrix für die Enzymimmobilisierung in einem Reaktor genutzt, unterscheidet sich der Reaktor in vielerlei Hinsicht von einem konventionell gepackten Festbettreaktor (PBR). Die unterschiedlichen Charakteristiken dieser Reaktoren sind im folgenden Abschnitt 5.3 erläutert.

5.3 Strömungsreaktor mit additiv gefertigter Enzymträgerstruktur im Vergleich

Ein wesentliches Charakteristikum aller Materialien, die für die additive Fertigung in dieser Arbeit untersucht worden sind ist, dass sie nicht porös sind. In Abschnitt 3.2 wurde dies für die Materialien PET und Metalle gezeigt. Mit dem Ausbleiben einer Materialporosität geht einher, dass die Oberfläche, die für die Enzymimmobilisierung bereitgestellt werden kann, wesentlich kleiner ist als bei der Verwendung von konventionellen Trägern in Festbettreaktoren (PBR). Auch in der additiven Fertigung gibt es Materialien, wie zum Beispiel Gele, die nach ihrer Fertigung eine hohe Enzymbeladung erlauben²³. Auf Grund von Limitierungen in ihrer Stabilität und Fertigungsauflösung waren sie jedoch kein Gegenstand von Untersuchungen in dieser Arbeit (vgl. Absatz 1.1.2). Bei einer kleinen Feststoffoberfläche in einem Reaktor ist auch die immobilisierbare Menge an Katalysator limitiert. Dem stehen allerdings die grundlegenden Vorteile von additiv gefertigten Enzymträgerstrukturen gegenüber, die in PBR nicht in gleichem Maße erreicht werden können. Diese Unterschiede sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst. Insgesamt basieren alle diese Vorteile darauf, dass reaktionseffizienzbeeinflussende Parameter durch die AF gezielt gesteuert werden können. Somit sind die Vorteile eines optimierten Stofftransports, minimierten Druckverlustes, hoher Reproduzierbarkeit und Enzymausnutzung durch die strukturierte und geplante Form des Trägers und damit Führung der Strömung in einem Flussreaktor zu realisieren. Dies mag auch in Ansätzen bei PBR möglich sein, ist jedoch begrenzt und mit erhöhtem Aufwand verbunden.

Tabelle 5.2: Vergleich von Reaktorkonzepten: Grundlegende Unterschiede zwischen gepackten Enzymträgern (PBR) und additiv gefertigten Enzymträgern (AFR) in einem Bioreaktor.

Charakteristik	PBR	AFR
Form	 zufällig	 strukturiert
Strömung	inhomogen	geführt
Enzymausnutzung	inhomogen	homogen
Reproduzierbarkeit	niedrig	hoch
Druckverlust	hoch	minimiert
Stofftransport	limitiert	optimiert
Trägeroberfläche	hoch	gering

Um den Unterschied aufzuzeigen, der durch verschiedene Trägeroberflächen entsteht, ist im Folgenden exemplarisch aufgeführt, wie sich in dieser Arbeit eingesetzten Immobilisate als

Pulver im Rührkessel (Glasfläschchen) und als gedruckte Struktur im Strömungsrohr (jeweils Batchbetrieb) im Vergleich zu einem gepackten Reaktor mit einem porösen Standardträger verhält. Hierfür wurde ein miniaturisierter, gepackter Reaktor mit Novozyme 435 zur Synthese von Alkylestern als Vergleich herangezogen¹⁶⁶. Für den Vergleich wurden ausschließlich die Dimensionen des PBR und seiner Träger aus der Literatur genutzt – die Enzymaktivität wurde unter Annahme einer gleichen oberflächenspezifischen Aktivität wie bei PET-Pulver angenommen. Die nachfolgende Tabelle 5.3 zeigt die jeweiligen Reaktionssysteme mit ihrer eingesetzten Trägermasse m_T , dem Reaktionsvolumen V_R , der trägermassenspezifischen Oberfläche a_m , der reaktionsvolumenspezifischen Oberfläche a_{V_R} , die massen- v_{0,m_i} , reaktionsvolumen- v_{0,V_R} und oberflächenspezifische v_{0,a_i} Aktivität. Für den PBR mit Novozyme 435 wurde für Berechnungen das eingenommene Feststoffvolumen des Enzymträgers vernachlässigt und das Gesamtvolumen innerhalb des Reaktors als Reaktionsvolumen V_R angenommen, wodurch hier die volumenspezifische Aktivität unterschätzt wurde.

Tabelle 5.3: Vergleich von Reaktorsystemen mit unterschiedlichen Enzymträgern; m_T = Trägermasse, V_R = Reaktionsvolumen, a_m = trägermassenspezifische Oberfläche, a_{V_R} = reaktionsvolumenspezifische Oberfläche, v_{0,m_i} = trägermassenspezifische Aktivität, v_{0,V_R} = reaktionsvolumenspezifische Aktivität, v_{0,a_i} = oberflächenspezifische Aktivität; orange – gemessener Wert, gelb- berechneter Wert, blau – Literaturwert, grün - Annahme

Parameter	AF Struktur	PET-Pulver	PA12-Pulver	PBR mit N435
m_T [g]	11,3	0,5	0,1	0,1
V_R [mL]	90	1	1	< 0,0064
a_m [m ² kg ⁻¹]	1,3	344,0	3.816,0	77.875
a_{V_R} [m ⁻¹]	166	172.000	348.577	121.400.097
v_{0,m_i} [U kg ⁻¹]	96,5	619	2600	140.175
v_{0,V_R} [U mL ⁻¹]	0,012	0,310	0,238	218
v_{0,a_i} [U m ⁻²]	73,0	1,8	0,7	1,8

In der Natur ist das Prinzip der Oberflächenvergrößerung zu beobachten. So haben beispielsweise Mitochondrien durch Einstülpungen ihrer Membran eine große Membranoberfläche. In der menschlichen Lunge bietet die kompakte Aneinanderreihung von Alveolen eine Stoffaustauschoberfläche von $256 \pm 24 \text{ cm}^2 \text{ mL}^{-1}$ ($25.600 \text{ m}^2 \text{ m}^{-3}$)¹⁶⁷. Im PBR wurde Lewatit OC 1600 eingesetzt, dessen spezifische Oberfläche von Wienemann *et al.* mittels BET-Messung zu $89 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ abweichend vom Datenblatt des Herstellers (ca. $130 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$)¹⁶⁸ bestimmt wurde¹⁶⁹. Von Mei *et al.* wurde die Penetrationstiefe dieses Trägers ermittelt (100 μm), woraus der Anteil an nutzbarer Oberfläche für die Enzymimmobilisierung (88 %) abgeleitet werden konnte¹⁷⁰. Dieser wurde für die Berechnung der spezifischen Aktivitäten verwendet.

Der Vergleich macht deutlich, dass die trägerspezifische Oberfläche a_m in erheblichen Maß beeinflusst, wie viel Aktivität pro Trägermasse in einem Reaktor eingebracht werden kann. So ist v_{0,m_i} in einem gepackten Reaktor um den Faktor 1.452 größer, als in einem Reaktor mit additiv gefertigter Struktur, da insbesondere a_m um den Faktor 59.904 größer ist. Der Einfluss der Oberfläche auf v_{0,m_i} wird auch bei den unterschiedlichen additiv fertigen Pulvern

deutlich. Da durch die kleinere mittlere Korngröße von PA12-Pulver von $56 \mu\text{m}^{138}$, eine erhöhte Oberfläche pro Trägermasse ($3816,0 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$) als bei PET-Pulver mit $< 300 \mu\text{m}^{171}$ Durchmesser und $344,0 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$ realisiert werden kann, ist die massenspezifische Aktivität um das Vierfache größer. Die reaktionsvolumenspezifische Aktivität jedoch ist kleiner, da in der Reaktion nur $0,1 \text{ g}$ des Immobilisats im Vergleich zu $0,5 \text{ g}$ eingesetzt wurde. Außerdem konnten weniger Enzyme an der Oberfläche immobilisiert werden, was durch die 60% geringere oberflächenspezifische Aktivität deutlich wird. Neben der spezifischen Oberfläche des Trägers spielt auch das Verhältnis von Oberfläche zu Reaktionsvolumen eine entscheidende Rolle dabei, wie viel Aktivität pro Reaktionsvolumen in ein System eingebracht werden kann.

Dieses Verhältnis ist insbesondere bei Mikroreaktoren groß^{172,173}. Durch kleine Arbeitsvolumen, werden hier hohe Raum-Zeit-Ausbeuten erreicht. Werden größere Mengen eines Produktes benötigt, bietet das „Numbering-up“ eine Alternative zum traditionellen Scale-up. Durch eng gepackte Strömungsrohre können diese hohen Verhältnisse von Oberfläche zu Reaktionsvolumen auch erreicht werden. In gepackten Säulen bilden sich Kanäle aus, in denen das Reaktionsmedium an der Katalysatoroberfläche vorbeiströmt. Letztendlich also wie bei Mikroreaktoren mit dem Unterschied, dass der Fluss in diesen durch das Design der Kanäle gezielt geformt werden kann, während bei gepackten Säulen diese Strömung mehr zufällig ist.

Eine additiv gefertigte Struktur als Enzymträger kann das Problem kleiner Arbeitsvolumen bei Mikroreaktoren lösen und die zufällige Strömung in PBR gerichtet machen. Wird zusätzlich eine Porosität des Materials realisiert, kann auch die Enzymmenge pro Reaktionsvolumen erhöht werden, um im Bezug auf Enzymaktivität pro Reaktionsvolumen konkurrenzfähig zu konventionellen PBR sein. Abhängig von den jeweiligen Bedarfen einer additiv gefertigten Enzymträgerstruktur, kann ebenso das „Numbering-up“ in einem Reaktor realisiert werden. Feine Fertigungsprozesse können parallele Kanäle innerhalb eines Reaktors realisieren, die strömungsoptimiert eine hohe Oberfläche pro Reaktionsvolumen bieten. Für das zweiphasige System in dieser Arbeit wurde jedoch die Möglichkeit der homogenen Heptandispergierung als primäres Ziel herausgestellt, was die Fertigung von kleinen Kanälen ausschloss. Außerdem sei angemerkt, dass die additive Fertigung von Mikrokanälen nicht mit den Fertigungsmethoden zu realisieren ist, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Weiterhin geht die Fertigung von extrem hoch aufgelösten Strukturen mit einem erhöhten Zeitaufwand einher, der das RP erschwert.

Die Wahl des Reaktors hängt immer von der Reaktion ab, die in ihr katalysiert werden kann. Der Bedarf an flexiblen Reaktoren und Prozessen steigt jedoch. Insbesondere auch im Hinblick auf die Entwicklung hin zu einer Industrie, die auf inhomogene nachwachsende Rohstoffe setzt. Hier kann die additive Fertigung einen Lösungsansatz bieten; mittels CFD, CAD und der anschließenden Fertigung kann ein Reaktor schnell so produziert werden, dass er den physikalischen Voraussetzungen eines optimierten Reaktionssystems entspricht. So entsteht eine hohe Flexibilität. Das Beispiel einer Prozessintensivierung durch das Kombinieren von Extraktion und Reaktion in einem Reaktivextraktor soll ein Beispiel zum Einsatz der AF zu Realisierung hybrider Reaktoren und schnelle reaktionsspezifische Anpassungen an ein System zur Effizienzsteigerung zeigen. Im folgenden Abschnitt 5.4 wird dies gezeigt.

5.4 Additiv gefertigter Bioreaktor mit integriertem ISPR im Gegenstrom

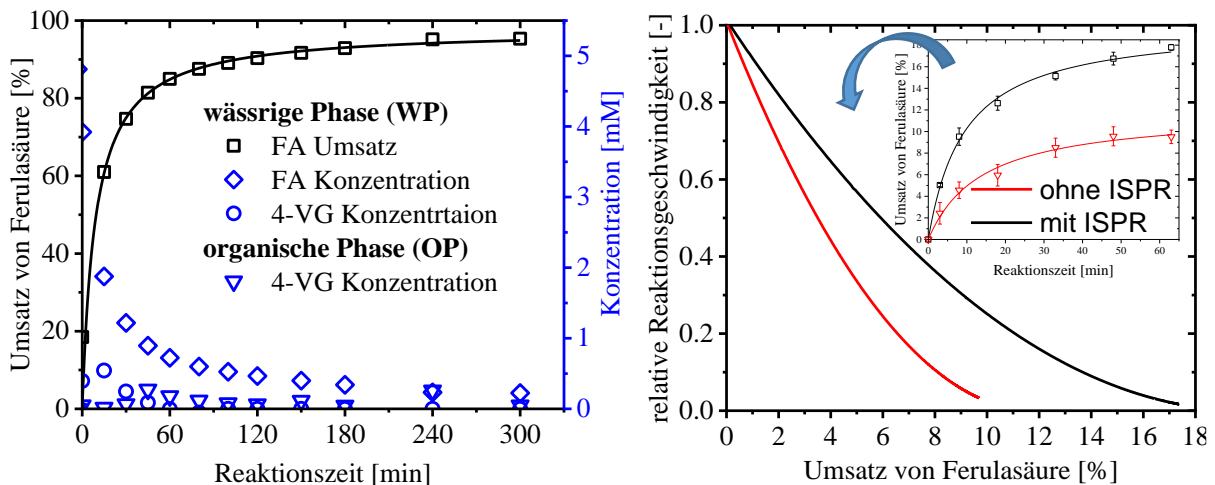
Als eine Limitierung in der gezeigten 4-VG-Synthese in einem Strömungsrohr mit additiv gefertigter Enzymträgerstruktur (5.3) wurde die Enzyminhibierung durch 4-VG ausgemacht. Der Einsatz einer zweiten organischen Extraktionsphase in dem Strömungsrohr soll diese Inhibierung minimieren. Hierzu wurden Strukturen entwickelt (4.4), die die Dispergierung von *n*-Heptan, welches im Gegenstrom zur wässrigen Phase geführt wird, erlauben. Für einen effizienten Prozess zur Synthese von 4-VG, muss die Immobilisierung und die Synthese von 4-VG an der entwickelten additiv gefertigten Struktur, und die *in situ* Extraktion in einem hybriden Reaktor kombiniert werden. In einem hierfür benötigten Konzept muss sichergestellt werden, dass *n*-Heptan kontinuierlich eine geringe 4-VG-Konzentration aufweist, um einen hohen Konzentrationsgradienten zwischen Reaktions- und Extraktionsphase zu realisieren. Um dies zu gewährleisten, wurde vor der Immobilisierung ein Destillationskolben mit 200 ml Heptan gefüllt und mittels Ölbad auf 140 °C erhitzt. Ein Kondensator wurde mit 10 °C Wasser gekühlt. Nach 30 min floss das erste kondensierte Heptan aus dem Kondensator und dieser wurde an das Heptanreservoir angeschlossen. Der Level des *n*-Heptans im Destillationskolben wurde durch die regelmäßige Umleitung aus dem Heptanreservoir konstant gehalten.

Parallel hierzu wurde das PAD-DSI-GS-Fusionsprotein an Struktur 2 aus PA12 immobilisiert. Der Reaktor wurde anschließend mit 280 mL Puffer- und Substratlösung gespült, um ungebundene Proteine zu entfernen. Zur Einstellung der Substratkonzentration wurden 140 ml FA-Lösung (5 mM FA in 0,5 M KP_i -Puffer, pH 7) durch den Reaktor gespült. Während anschließend die Reaktionslösung im Kreis gefördert wurde, wurde Heptan durch den Reaktor gefördert und in einem Abfallbehälter gesammelt. Sobald im Reaktorausgang nur klares Heptan ohne wässrige Phase beobachtet wurde, wurde der Heptankreislauf geschlossen und die Reaktion durch Erhitzen des Reaktors auf 37 °C beschleunigt. Während der Reaktion wurden wässrige Proben über eine Blasenfalle durch ein Septum und eine organische Phase am Auslass entnommen. Die Proben wurden für die HPLC- bzw. Photometeranalyse vorbereitet.

Die Konzentrations- und Umsatzverläufe der Decarboxylierung von Ferulasäure im Batchbetrieb mit kontinuierlicher Produktextraktion sind in Abbildung 5.4 dargestellt. Mittels der sich im Umlauf integrierten Destillation des 4-VG enthaltenen *n*-Heptans wurde sichergestellt, dass in den hybriden Reaktor nur *n*-Heptan mit geringer 4-VG-Konzentration zurückgeleitet wird. In dem Reaktor konnte eine 4-VG-Konzentration in der organischen Phase unter 0,3 mM, in der wässrigen Phase unter 0,5 mM und ein Umsatz von 95 % erreicht werden (Abbildung 5.5, links). Für den Spülvorgang dieses Versuchs wurde vermutet, dass dieser nicht ausreichte um alle ungebundenen Proteine aus dem Reaktor zu entfernen. Dies liegt darin begründet, dass die eingesetzte Struktur für eine zweiphasige Durchströmung ausgelegt wurde und sich bei geringen Volumenströmen ohne Turbulenzen während des Spülvorganges keine radiale Durchmischung einstellt. Daher könnte ein Austausch zwischen den Volumenelementen der Immobilisierungslösung und dem Spülpuffer trotz Spüldauer mehrerer Verweilzeiten nicht ausgereicht haben, um alle gelösten Enzyme zu entfernen. Um dies zu zeigen, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, bei dem der Reaktor nach der Immobilisierung entlehrt und zweimal mit Spülpuffer gefüllt wurde, bevor er gestartet wurde, um ungebundene Proteine vollständig zu entfernen. Außerdem wurde in diesen Versuchen parallel die Entwicklung der Aktivität mit dem Umsatz zwischen Reaktion mit und ohne ISPR (ohne Lösungsmitteldestillation und Kondensation) verglichen (Abbildung 5.5, rechts).



Abbildung 5.4: Hybrider Reaktor zur effizienten 4-VG-Synthese. Fließbild (links) und experimenteller Aufbau (rechts) für die 4-VG-Synthese aus FA (4,8 mM in 0,5 M KP_i -Puffer pH 7) in einem Flussreaktor mit additiv gefertigter Strömungs- und Enzymträgerstruktur mit direktem Lösungsmittelrecycling. Wässrige Phase: 70,5 mL; organische Phase: 235 mL⁻¹; Thermostat (37 °C), 2: Ölbad (140 °C), 3: Wasserkühlung (10 °C), 4: Ventil, 5 Heptanreservoir, 6: Reaktiver Strömungsführer, 7,8: Pumpe (32 mL min⁻¹)



In einem hybriden Reaktor, bei dem nach der Immobilisierung der Reaktor mit 280 mL Puffer gespült wurde und zusätzlich zu den immobilisierten Enzymen freie Enzyme durch geringe radiale Durchmischung im einphasigen Fluss zu vermuten sind, wurden innerhalb von 15 min 61 % der FA umgesetzt. Ohne ISPR würden in dieser Zeit 2,9 mM 4-VG in der wässrigen Phase akkumulieren. Jedoch wurden lediglich 0,5 mM nach diesen 15 min beobachtet. Also wurden in dem hybriden Reaktor in dieser Zeit 83 % des synthetisierten 4-VG *in situ* extrahiert. Die 4-VG Akkumulation in der wässrigen Phase hängt nicht nur von der Extraktionsgeschwindigkeit, sondern auch von der Produktbildungsrate, also der

Enzymaktivität ab. Die kontinuierlich geringe 4-VG-Konzentration in der wässrigen Phase spricht jedoch für einen effizienten Stofftransport zwischen beiden Phasen. Durch eine geringe Produktinhibierung konnte innerhalb der ersten Stunde der Reaktion eine schnelle Umsatzrate der FA beobachtet (85 % in 1 h) werden. Mit fortschreitendem Umsatz nimmt jedoch auch die Reaktionsgeschwindigkeit ab, da diese von der Substratkonzentration abhängt. Gleichzeitig können inhibierende Effekte durch eine nicht ausbleibende Produktadsorption, wie in 4.3 beschrieben, nicht ausgeschlossen werden.

Für die 4-VG-Synthese, die in Abbildung 5.5 (links) dargestellt ist, wurde vermutet, dass im Spülvorgang nicht alle ungebundenen Enzyme aus dem Reaktor gespült wurden. Die Umsatzkurve des Versuches, bei dem dies durch die geänderte Spülmethode ausgeschlossen wurde, verläuft wesentlich flacher und erreicht keine 100 % (Abbildung 5.5, rechts, schwarz). Dies zeigt, dass weniger Enzyme im System verblieben sein müssen, da sonst ein identischer Verlauf beobachtet worden wäre. So wurde sowohl gezeigt, dass die einphasige Durchströmung mit 32 mL min^{-1} nicht zu einer radialen Durchmischung führt, als auch, dass der Reaktor zwischen den Spülvorgängen geleert werden muss, wenn die anschließende Synthese ausschließlich von immobilisierten Enzymen katalysiert werden soll.

Um den Einfluss des ISPR quantifizieren zu können, wurde ein Versuch unter gleichen Bedingungen ohne das etablierte ISPR durchgeführt. Über die Steigung der Umsatzkurve konnten die relativen Aktivitäten im jeweiligen Reaktor ermittelt werden. Die Aktivität der Fusionsproteine nimmt demnach weniger mit Fortschreiten der Reaktion ab, wenn ein ISPR etabliert ist. Jedoch kann auch hier der Effekt der Produktinhibierung nicht vollständig verhindert werden. Die irreversible Inhibierung oder Deaktivierung der PAD durch die Anwesenheit von 4-VG zeigt sich durch einen begrenzten FA-Umsatz von 10 bzw. 18 %. Diese Deaktivierung wurde zuvor bereits von Pesci *et al.* beschrieben und empfohlen, ein Verhältnis von PAD [$\mu\text{g mL}^{-1}$] zu FA [mM] von über 6 einzustellen, um dennoch zu hohen Umsätzen zu gelangen. Ist nur oberflächengebundenes PAD an der Reaktion beteiligt, kann dieses Verhältnis nicht erreicht werden, wodurch es zu limitierten Umsätzen kommt. Für dieses Reaktionssystem muss dementsprechend eine größere Strukturfläche oder ein geringeres Reaktionsvolumen realisiert werden, um volle Umsätze erreichen zu können. Dennoch konnte gezeigt werden, dass mittels RP entwickelte Strukturen für die Verteilung von Extraktionsphasen in hybriden Reaktoren und gleichzeitig als Enzymträger eingesetzt werden können.

6 Diskussion und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Techniken zur Immobilisierung an additiv fertigmachen Materialien (Abschnitt 3), die Effizienzsteigerung der 4-VG-Synthese mittels ISPR (Abschnitt 4) und die Prozessintensivierung in einem hybriden Reaktor mit additiv gefertigter Enzymträgerstruktur (Abschnitt 5) vorgestellt. In diesem Abschnitt 6 werden die experimentellen Ergebnisse der Abschnitte miteinander in Beziehung gebracht (6.1). Weiterhin wird ein Ausblick darauf gegeben, welche Potentiale auf Basis dieser Arbeit für die industrielle Anwendung oder weitere Forschung genutzt werden können (Abschnitt 6.2).

6.1 Additiv gefertigte Enzymträger- und Strömungsführerstrukturen

Als Basis für die Realisierung von additiv gefertigten Enzymträgern wurde die Immobilisierung dreier Enzyme an verschiedenen additiv fertigmachen Materialien untersucht. Die Reaktionen, die mit den erhaltenen Immobilisaten katalysiert wurden, waren die Hydrolyse von Laurinsäureethylester (LEE) zu Laurinsäure (LA) mittels CALB, die Oxidation von L-Tyrosin zu L-DOPA mit einer Tyrosinase und die Decarboxylierung der Ferulasäure zu 4-VG mittels PAD. Für jede der Kombinationen aus additiv fertigmachen Trägern und Enzymen wurde eine erfolgreiche Immobilisierung durchgeführt. Die Immobilisierungsmethoden waren die chemische Funktionalisierung von PA12-Oberflächen, die Beschichtung von PET-Oberflächen und die Enzymfunktionalisierung mit Ankerpeptiden und deren Anbindung an PET und PA12-Pulver sowie an additiv gefertigten Strukturen dieser Materialien. Auch die Anbindung von Ankerpeptiden an die additiv gefertigten Metalle AlSi10Mg, 1.4404 und Ti6Al4V konnte gezeigt werden. Jedes in Biotransformationen eingesetzte Immobilisat wurde zuvor gespült, um auszuschließen, dass Aktivitäten von ungebundenen Enzymen die Messergebnisse beeinflussen. Für die Immobilisate PET-PD-CALB und PET-DSI-GS-PAD wurde gezeigt, dass sie über mehrere Spülvolumen stabil sind und somit wiederholt eingesetzt werden können. Alle vorgestellten Methoden stellen eine industriell umsetzbare Option dar, um für die Enzymimmobilisierung an additiv gefertigten Materialien genutzt zu werden.

Die Immobilisierungstechnik mittels PD-Beschichtung ist trägerunspezifisch und kann für andere Kombinationen von Enzym und Träger verwendet werden. (wie in Arbeiten von Ren *et al.*¹⁶³, Sureshkumar *et al.*¹³⁷ oder Yeroslavski *et al.*^{111,143,53} gezeigt). Ebenso ist die gerichtete Immobilisierung über oberflächenspezifische Ankerpeptide auf verschiedene Materialien anpassbar, indem die jeweils passenden Anker mit den Zielproteinen fusioniert werden. Die kovalente Immobilisierung an PA12 ist für Tyrosinase gezeigt worden. Die chemische Funktionalisierung von Polymeroberflächen mit Glutaraldehyd zur Enzymimmobilisierung ist eine gängige Methode, die mit Anpassungen auf verschiedene Enzyme und Materialien übertragbar sein kann¹⁷⁴. Die untersuchten Immobilisierungen unterscheiden sich sowohl in der Art des Bindungsmechanismus, als auch darin, wie dieser durch eine Funktionalisierung ermöglicht wird (Abbildung 6.1). Zur Beurteilung der Methoden, wurden diese nach ihrem Aufwand, der Flexibilität und der Umweltverträglichkeit miteinander verglichen.

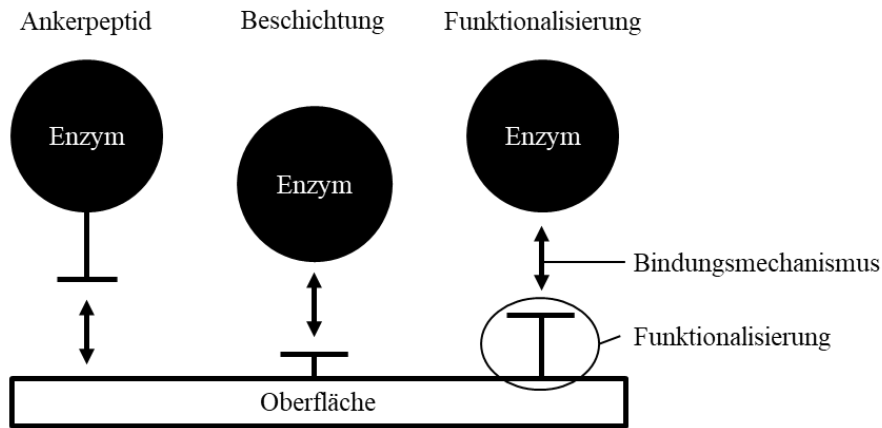


Abbildung 6.1: Prinzipien der Funktionalisierung für Immobilisierungen. Ein Bindungsmechanismus wird entweder durch die Funktionalisierung des Enzyms, oder durch die Funktionalisierung der Oberfläche über eine Beschichtung oder chemische Funktionalisierung ermöglicht.

Der Immobilisierungsaufwand ist für die adhäsive Anbindung von DSI-GS-PAD-Fusionsproteinen am geringsten. Es bedarf lediglich einer zehnminütigen Inkubation des Trägers mit einer CFE enthaltenden Pufferlösung. Eine vorherige Aufreinigung des Zielproteins ist auf Grund der Spezifität der Bindung von Fusionsproteinen, die zur Aufkonzentrierung an der Oberfläche führen, nicht zwingend nötig. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere Proteine aus dem CFE eine Affinität zum Trägermaterial aufweisen, unspezifisch binden und somit Bindungsplätze belegen. Da diese Bindungen jedoch dynamischer Natur sind werden Peptide mit der höheren Affinität, vermehrt binden. Weiterhin ist durch die Orientierung des Enzyms zum Anker eine gerichtete Immobilisierung möglich, was deaktivierende Effekte der Immobilisierung verhindert. Durch die Funktionalisierung des Enzyms bedarf es keiner Oberflächenfunktionalisierung. Wird PD zur Funktionalisierung von Oberflächen genutzt, bedarf es eines zeitintensiven Schrittes (bis zu 24 h) zur Beschichtung und einer anschließenden Inkubation mit Enzymlösung. Die Beschichtung kommt allerdings mit einem Schritt der Polymerisierung aus, wodurch der Aufwand zwar höher als bei der Verwendung von Ankerpeptiden ist, jedoch geringer als bei chemischen Oberflächenfunktionalisierungen. Hierbei bedarf es der Freilegung funktioneller Gruppen, der Anbindung von Glutaraldehyd als Spacer und der Inkubation mit dem Zielprotein. Jeweils muss zwischen den Schritten das Immobilisat gespült werden. Ein erheblicher Nachteil bei der Methodik der PD-Beschichtung und der vorgestellten kovalenten Anbindung ist, dass nicht mit CFE gearbeitet werden kann, da eingesetzte Proteine potentielle Bindungsplätze des Trägers einnehmen und der Anteil an Zielproteinen somit zu gering wäre. Außerdem ist bei diesen Methoden keine gezielte räumliche Orientierung möglich. Diese ist zufällig und kann zu inaktiven, jedoch angebundenen Enzymen führen.

Werden die Methoden auf ihre Flexibilität hin verglichen, wird konstatiert, dass für kovalente Enzymanbindung an ein Material meist die Funktionalisierung der Oberfläche nötig ist. Hierfür gibt es zwar insbesondere für Polymere viele Möglichkeiten; jedoch sind diese oft materialabhängig und müssen jeweils entwickelt werden. Die Beschichtung mit PD hingegen ist materialunabhängig. Daher ist diese Methode für alle additiv gefertigten Materialien einsetzbar. Fusionsproteine aus Anker, Spacer und Enzym können flexibel an gewünschte Oberflächen angepasst werden¹⁶⁵. Insbesondere, wenn durch Simulation der Moleküldynamik

die Interaktionen zwischen Protein, Spacer, Anker und Oberfläche vorhergesagt werden kann, ist im Vorfeld bestimmbar, welche Kombination für ein bestimmtes Material und Enzym am besten zur Immobilisierung geeignet ist. Weiterhin kann bei der Immobilisierung mittels Ankerpeptiden auf umweltschädliche Substanzen wie stark konzentrierter Salzsäure (6 N) und Glutaraldehyd verzichtet werden, welche bei der chemischen Funktionalisierung benötigt werden. Die Beschichtung mit PD hingegen kommt mit der Verwendung von Dopamin aus, welches für Wasserorganismen schädlich ist. Die Klassifizierung der drei unterschiedlichen Immobilisierungsmethoden ist in Tabelle 6.1 zusammengestellt.

Tabelle 6.1: Vergleich von Immobilisierungsmethoden für additiv gefertigte Materialien im Hinblick auf Einfachheit, Flexibilität, Umweltverträglichkeit und Orientierung der Enzyme. +: Vergleichsweise hoch; 0: Vergleichsweise moderat; - Vergleichsweise gering.

Kategorie	Funktionalisierung	Beschichtung	Ankerpeptide
Einfachheit	-	0	+
Flexibilität	-	+	+
Umweltverträglichkeit	-	0	+
Orientierung	-	-	+

Zusätzlich zu den vorgestellten Kategorien, ist die oberflächenspezifische Aktivität der jeweiligen Immobilisate eine wertvolle Größe zur Bewertung der Immobilisierungstechniken. Die jeweilige oberflächenspezifische Aktivität v_{0,a_i} der Immobilisate ist für verschiedene Kombinationen von Träger (mit ihrer spezifischen Oberfläche a_m) und Enzym, sowie des jeweiligen Substrates und seiner Konzentration $c_{i,s}$, in Tabelle 6.2 aufgelistet.

Tabelle 6.2: Oberflächenspezifische Aktivität für verschiedene Immobilisatpräparate; LEE = Laurinsäureethylester; LA = Laurinsäure

Substrat/e	$c_{i,s}$ [mM]	Produkt	Träger	a_m [m ² g ⁻¹]	Enzym	v_{0,a_i} [U m ⁻²]
Wasser, LEE	114	LA	PET-PD	0,3440	CALB	0,16
Wasser, LEE	117	LA	Lewatit OC 1600	86,0000	CALB	0,15
L-Tyrosin	1	L-DOPA	PA12-Pulver	3,8160	Tyrosinase	0,32
FA	5	4-VG	PET-Pulver	0,3440	DSI-GS-PAD	1,80
FA	5	4-VG	PA12-Pulver	3,8160	DSI-GS-PAD	1,30
FA	5	4-VG	AF PA12	0,0013	DSI-GS-PAD	73,0

Die höchste oberflächenspezifische Aktivität von 73,0 U m⁻² wurde für eine additiv gefertigte Struktur aus PA12 gemessen. Dabei wurde die Oberfläche 0,0013 m² g⁻¹ auf Basis des CAD angenommen. Durch die kleine Bezugsgröße wird eine hohe oberflächenspezifische Aktivität berechnet. Die reale Oberfläche dürfte deutlich größer und somit die spezifische Aktivität deutlich kleiner sein.

Ein genauer Vergleich zwischen zwei Trägeralternativen für die Immobilisierung von PAD kann mit PET und PA12-Pulver gezogen werden. Bei identischen äußeren Bedingungen wie einer Substratstartkonzentration $c_{i,s}$ von 5 mM und einer Reaktionstemperatur von 37 °C, haben PET-DSI-GS-PAD-Immobilisate eine höhere oberflächenspezifische Aktivität als PA12-DSI-GS-PAD-Immobilisate. Dies spricht für eine effizientere Ausnutzung der von PET-Pulver bereitgestellten Oberfläche. Da die Fusionsproteine DSI-GS-PAD eigens für die PET-Oberfläche optimiert wurden und dann für PA12 genutzt wurden, entspricht dies den

Erwartungen. Für die Fertigung von Strukturen wurde PA12 als Material gewählt, da es mit einer höheren Genauigkeit gefertigt werden kann. Eine spezifische Anpassung des DSI-GS-PAD Fusionsproteins zur Verbesserung der Anbindung auf PA12 ist durch ein Screening von Anker und Spacersequenzen möglich. Die Morphologie des Trägers und seiner Oberfläche kann die Ursache für geringere spezifische Aktivitäten auf PA12 sein.

Aufgrund der in Tabelle 6.1 dargestellten Vorteile der Immobilisierung mit Ankerpeptiden, wurde diese Technik in einem Konzept für einen hybriden Reaktor genutzt. Für diesen Reaktor konnte eine Struktur entwickelt werden, die sich als Enzymträger und zeitgleich als Strömungsführer für eine Extraktionsphase eignet. Über RP wurde hierzu eine Struktur so angepasst, dass sie als statischer Mischer Heptantropfen dispergiert. Dabei ist die Struktur für das spezifische System der FA-Decarboxylierung angepasst. Werden andere Temperaturen, Fließgeschwindigkeiten, Extraktionsmittel oder pH-Werte verwendet, kann die Struktur über RP schnell justiert und getestet werden, um weiterhin die gewünschten Strömungsverhältnisse realisieren zu können.

6.2 Potentiale: Ankerpeptidimmobilisierungen und additiv gefertigte Enzymträger

Drei Aspekte dieser Arbeit bieten Potentiale für industrielle Anwendungen und Grundlagen für weitere Forschung:

- Die Fusion von Enzymen mit Ankerpeptiden stellt eine flexible Immobilisierungsmethode für verschiedene Materialien und Enzyme dar. Diese eignet sich insbesondere für additiv gefertigte Materialien.
- Das Rapid Prototyping (RP) kann für eine effiziente Entwicklung von strömungsoptimierten Strukturen in mehrphasigen Reaktionssystemen genutzt werden. Die direkte Beobachtung von Phasenverhalten in einem Reaktor wird durch die Verwendung von transparenten Materialien ermöglicht.
- Die Prozessintensivierung kann mit Hilfe der additiven Fertigung optimiert werden. Dies wurde durch die Kombination von Reaktion, Extraktion und Immobilisierung in einem Strömungsreaktor gezeigt.

Wie in Abschnitt 6.1 erwähnt, vereinfacht das tiefere Verständnis über Wechselwirkungen zwischen verschiedenen additiv gefertigten Oberflächen und Ankerpeptiden, aber auch zwischen Enzymen und Spacern, die Auswahl dieser für die Immobilisierung. Wird dieses Verständnis gewonnen, ist der in dieser Arbeit durchgeführte Schritt des Screenings von Ankerpeptiden und Spacern für ein spezifisches Material nicht mehr erforderlich. Ungeachtet dessen bestehen jedoch keine Restriktionen, die diese Methodik nicht auch auf andere Träger¹⁶⁵, auch konventioneller Art, erlauben. Somit können alle Enzyme durch die Fusion mit Ankerpeptiden an beliebige Materialien für nachfolgende Biokatalysen angebunden werden, sofern das Wissen über die AS-Sequenz und die Möglichkeit der rekombinanten Herstellung vorliegt. Die Immobilisierung über Ankerpeptide bietet eine einfache und umweltschonende Methode, die auch für etablierte Immobilisierungen eine Alternative darstellt. Additiv gefertigte Metalle wurden in dieser Arbeit bereits charakterisiert (Abschnitt 3.2) und die Möglichkeit der Anbindung von Ankerpeptiden auf diesen gezeigt (3.6.1). Somit kann die

Immobilisierungstechnik auch für Strukturen dieser Materialien angewendet werden. Dies sollte dann in Erwägung gezogen werden, wenn Vorteile gegenüber Polymeren, die sich aus den Eigenschaften von Metallen ergeben, die höheren Kosten für eine additiv gefertigte Struktur aus Metall rechtfertigen. Dies sind zum Beispiel eine höhere Stabilität gegenüber Lösungsmitteln, Temperatur, oder Strömungen, sowie eine höhere Wärmeleitfähigkeit, die für andere Reaktionssysteme benötigt werden. Auch die Verhinderung der Adsorption von Reaktanden kann durch die Wahl eines anderen Materials vermieden werden. Die Immobilisierungstechnik kann hierbei ohne aufwendige Anpassungen übernommen werden.

Für die Untersuchung von Struktureinflüssen auf Zweiphasensysteme innerhalb eines Strömungsrohres eignen sich transparente Strukturen, durch welche eine optische Auswertung ermöglicht wird. Insbesondere, wenn eine Phase spezifisch eingefärbt wird, ermöglicht ein starker Kontrast zwischen den Phasen eine genaue Beobachtung von Verhalten dieser Phasen in unterschiedlichen Bedingungen oder bei dem Einsatz verschiedener Strukturen. Dieses Prinzip lässt sich über die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen hinaus, auf andere Reaktionssysteme übertragen. Durch die schnelle additive Fertigung von Prototypen und deren direkte Untersuchung in einem Puffer-Heptansystem im Gegenstrom konnte in kurzer Zeit eine Struktur zur Steigerung der Dispergierung der Heptanphase entwickelt werden. Mit weiteren Anpassungen dieser Struktur können auch weitere Verbesserungen in Bezug auf dessen Einsatz in einem hybriden Reaktor erzielt werden. Das Verkleinern der Einheitszelle der entwickelten POCS kann zu einer noch feineren Heptandispergierung und einer höheren Trägeroberfläche führen. Dies ist jedoch nur solange möglich, bis die Strukturen nicht mehr zu einem Aufbrechen von Tropfen, sondern zu einer Kanalbildung und Akkumulation in der Struktur führen. Durch weitere Experimente und Strukturentwicklung kann der optimale Betriebsbereich herausgefunden werden. Die stärkere Nutzung von CFD-Simulation kann diesen Prozess unterstützen. Die Entwicklung von strömungsoptimierenden Strukturen mittels CFD sollte parallel zu, und iterativ mit der experimentellen Validierung erfolgen. Die Nutzung von größeren Rechenkapazitäten kann hier für komplexe mehrphasige Systeme Entwicklungen beschleunigen.

Die in 1.4 gegebene Definition einer Prozessintensivierung („Any chemical engineering development that leads to a substantially smaller, cleaner, and more energy efficient technology is process intensification⁷¹“) von Stankiewicz und Moulijn wurde in dieser Arbeit für die Synthese von 4-VG realisiert. Es wurde eine Reaktortechnologie entwickelt, in der additiv gefertigtes Material als Enzymträger und gleichzeitig als Strömungsführer genutzt wird. Dies resultierte in einer *in situ* Gegenstromextraktion. Eine Prüfung über die tatsächlich benötigten Ressourcen und der systematische Vergleich zu der konventionellen Synthese von 4-VG sind notwendig für die Etablierung der hier gezeigten alternativen Synthese. Die limitierte Oberfläche vieler additiv gefertigter Materialien hat sich als Problem für die robuste Synthese von 4-VG herausgestellt. Biokatalysatoren mit einer höheren Aktivität können trotz geringerer Enzymmengen pro Reaktionsvolumen zu effizienten Prozessen führen. Um das Potential von additiv gefertigten Trägerstrukturen umfänglich zu nutzen, bedarf es größerer spezifischer Oberflächen, damit ausreichende Enzymmengen in einen Reaktor eingebracht werden können. Hierbei stellt die Erzeugung von porösen Strukturen in der additiven Fertigung einen vielversprechenden Ansatz dar. Jakus *et al.* zeigten beispielsweise, dass mit der Kombination eines neu entwickelten Fertigungsprozesses und der Salzauswaschung Strukturen mit

Porositäten von bis zu 94,4 % erzielt werden können¹⁷⁵. Das Herauslösen einer Substanz nach der additiven Fertigung kann also Materialporosität und große Oberflächen erzeugen. Auch die nachträgliche Aufbringung von Materialien mit innerer Oberfläche stellt einen Ansatz für die Vergrößerung von additiv gefertigten Oberflächen dar. Zum Beispiel kann durch das Aufbringen von Polymerfäden auf verschiedenen Materialien die Beladungsdichte von Enzymen erhöht werden^{176,177}. Auch die Benetzung additiv gefertigter Enzymträgerstrukturen mit rekombinant produzierter Spinnenseide, die kovalent eingebettete Enzyme enthält¹⁷⁸, ist ein Ansatz zur Erhöhung von einbringbarer Enzymaktivität in einen Reaktor.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Möglichkeiten des Einsatzes der additiven Fertigung in der Biokatalyse gezeigt. Der Fokus liegt auf deren Anwendung im Strömungsrohr, in denen additiv gefertigte Reaktoreinbauten zur Verbesserung von Stofftransportvorgängen und als Träger für Enzyme dienen. Die Untersuchung von Immobilisierungen an verschiedenen additiv fertigen Materialien legte die Grundlage für die Entwicklung einer Reaktortechnologie zur Effizienzsteigerung von biokatalytischen Reaktionen. Kern dieser Technologie ist die Verbesserung des Massentransportes durch additiv gefertigte Strömungsführer in einer *in situ* Extraktion, um Produktinhibierungen zu minimieren. Dies wurde für ein komplexes Zweiphasensystem entwickelt und geprüft. Nachfolgend sind erzielte Forschungsergebnisse aufgeführt:

- Additiv fertige Materialien müssen zur Anwendung in der Biokatalyse auf Kriterien der Lösungsmittelbeständigkeit, Stabilität, Fertigungsauflösung, Temperaturstabilität und Kosten geprüft werden. Im Fall der Decarboxylierung von Ferulasäure und *in situ* Extraktion mit *n*-Heptan erfüllen PET, PA12, AlSi10Mg, Ti6Al4V und Edelstahl (1.4404) die geforderten Kriterien. Die Fertigung von Enzymträgern mittels SLS aus PA12 hat sich auf Grund seiner hohen Fertigungsauflösung, chemischen Beständigkeit und einer für die Enzymimmobilisierung vorteilhaften hohen Rauigkeit als günstig erwiesen.
- Spezifische Immobilisierungsstrategien sind selten auf verschiedene Materialien und/oder Enzyme übertragbar^{24,25}. In dieser Arbeit ist es gelungen, zwei Methoden vorzustellen, die material- und enzymunabhängig funktionieren. Weiterhin wurde eine spezifische Immobilisierungsmethode von Tyrosinase an PA12 realisiert.
 - Die materialunabhängig einsetzbare Beschichtung von PET mit PD erlaubt die Änderung der Oberflächenhydrophobizität (Reduzierung des Kontaktwinkels von Wassertropfen von 73 ° auf 30 °) und die Immobilisierung von CALB an PET. Bei Einsatz von $0,28 \pm 0,01$ g Immobilisat in 4 mL einer mit Wasser gesättigten Ethyldodecanoatlösung, können bei 60 °C und 1000 rpm 80 % des Wassers durch die Bildung von Dodecanonsäure und Ethanol umgesetzt werden. Das wiederholte Einsetzen der Immobilisate führt zu identischen Umsätzen. Aktivitätsverluste von 17 % nach dem ersten Batch und 27 % nach dem zweiten Batch sind vornehmlich auf Immobilisatverluste im Spülvorgang zurückzuführen. Immobilisierungen über eine Dopaminbeschichtung sind für additiv gefertigte Materialien einsetzbar.
 - Die Immobilisierung von Tyrosinase an PA12-Pulver ($d < 50 \mu\text{m}$, $a_s = 3,816 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) ermöglichte den vollen Umsatz von 1 mM L-Tyrosin nach weniger als 30 min mit einer Startaktivität von $0,323 \pm 0,143 \text{ U m}^{-2}$. Die Übertragbarkeit von konventionellen Funktionalisierungen für Standardträger auf additiv gefertigte Träger wurde somit gezeigt.

- Die genetische Supplementierung von PAD mit verschiedenen Spacer- und Ankerpeptiden mittels PLICing ermöglichte die adhäsive, gerichtete Anbindung an hydrophobe Materialien wie PET und PA12.
- Durch ein Screening von Kombinationen verschiedener Spacer und Anker konnte die oberflächenspezifische Aktivität auf PET-Pulver ($d < 300 \mu\text{m}$, $a_s = 0,344 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) von $0,39 \pm 0,19$ auf $1,80 \pm 0,41 \text{ U m}^{-2}$, sowie der Umsatz nach 120 min von $19,2 \pm 3,7 \%$ auf $59,9 \pm 3,9 \%$ erhöht werden.
- Die Charakterisierung des Ankerpeptidfusionsproteins PAD-DSI-GS und deren Immobilisaten PA12-PAD-DSI-GS, wurden im Hinblick auf die kinetischen Parameter durchgeführt. Während die Fusionsproteine einen K_m -Wert von $3,4 \pm 0,1 \text{ mM}$ und ein v_{max} von $64,4 \pm 0,5 \text{ U mg}^{-1}$ aufweisen, wurde für die Immobilisate ein K_m -Wert von $2,8 \pm 0,7 \text{ mM}$ und ein V_{max} von $8,9 \pm 0,7 \text{ U mg}^{-1}$ (auf Trägermasse bezogen) gemessen.
- Die Änderung der Hydrophobizität der Träger durch die Immobilisierung von Ankerpeptidfusionsproteinen ermöglicht deren Einsatz in einem wässrig-organischen System. Im Vergleich zur Reaktion ohne ISPR konnten im Batch nach 120 min $88,0 \pm 3,8 \%$ statt $59,9 \pm 3,9 \%$ FA umgesetzt werden, was einen um 47 % erhöhten Umsatz entspricht. Die eingesetzte Immobilisatmasse war in beiden Fällen $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$.
- Eine passende Struktur zur Optimierung von Stofftransportvorgängen in einem Strömungsrohr wurde mit Hilfe des *Rapid Prototyping*s und über iterative Anpassungsvorgänge für die *in situ* Extraktion von 4-VG ermittelt.
 - Periodisch offenzellige Strukturen (POCS) mit Stegbreiten von 0,6 mm und spezifischen Oberflächen von 0,9 - 1,2 m^{-1} (Oberfläche/Reaktionsvolumen) in einem Gegenstromextraktor führen zu Phasenstau vor dem Eintritt in die Struktur und Kanalbildung sowie Akkumulationen der Extraktionsphase in der POCS.
 - Die Vergrößerung der Stegbreite auf 1 mm und die iterative Anpassung von Form und Einheitszellgröße ermöglicht die feine Dispergierung der Extraktionsphase, kleine Tropfendurchmesser und eine erhöhte Verweilzeit von Heptanvolumenelementen für eine gesteigerte Extraktionseffizienz. Eine Phasengrenzfläche pro Extraktionsvolumen von $9,0 \pm 0,4 \text{ cm}^{-1}$ im Reaktor resultierte.
- Das *Rapid Manufacturing* von POCS aus PA12 als Enzymträgersmaterial erlaubt die Etablierung der Decarboxylierung der Ferulasäure in einem Reaktor mit additiv gefertigter Enzymträger- und Strömungsführerstruktur mit immobilisierter PAD und *in situ* Gegenstromproduktextraktion mit *n*-Heptan.
 - Immobilisierungsausbeuten an der gefertigten PA12-Trägerstruktur wurden abhängig von eingesetzten CFE des PAD-Fusionsproteins bestimmt.
 - Aktivitätsausbeuten der Trägerstruktur wurden für den Einsatz von 201 U in der Immobilisierung zu 0,54 % bestimmt.
 - In einem im Gegenstrom betriebenen Reaktor mit additiv gefertigter Enzymträgerstruktur und ISPR mit Lösungsmittelrecycling, wurden nach 1 h

80 % Ferulasäure (5 mM in 70 mL) umgesetzt. Die Enzyminhibierung kann durch eine effiziente Extraktion des Produktes verringert werden. Die Produktkonzentration in der wässrigen Reaktionsphase blieb unter 0,5 mM.

- Die einbringbare Enzymaktivität pro Reaktorvolumen ist durch die Oberfläche des additiv gefertigten Enzymträgers begrenzt. Während sich abhängig vom Enzym und Material Aktivitätsdichten zwischen $0,323 \pm 0,143 \text{ U m}^{-2}$ und $1,80 \pm 0,41 \text{ U m}^{-2}$ erreichen ließen, ermöglicht die geringe spezifische Oberfläche eine geringe einbringbare Aktivität in den hier additiv gefertigten Reaktoren ($0,31 \text{ U mL}^{-1}$).

8 Anhänge

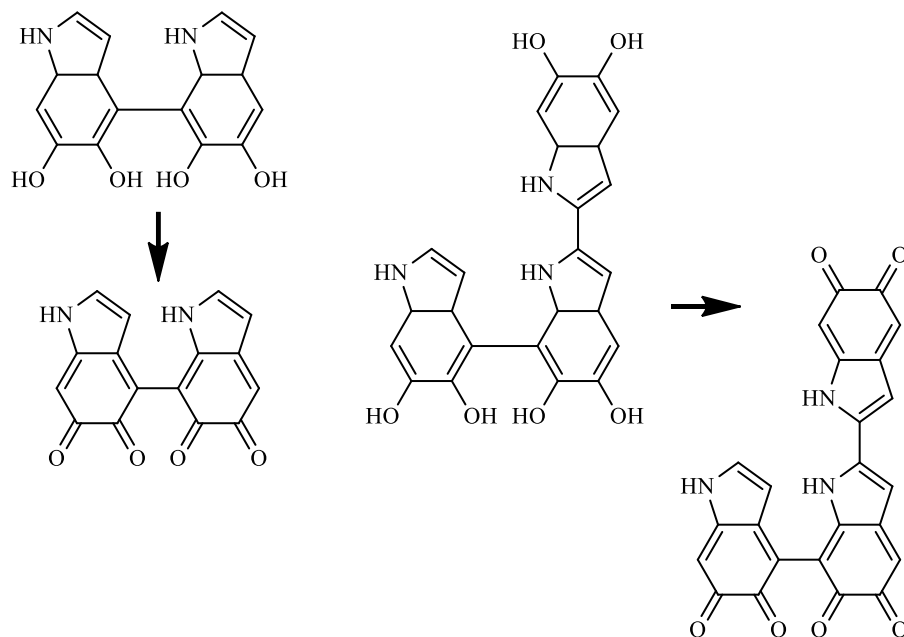


Abbildung 8.1: Postulierte Polymerisierungsmechanismen von 5,6-Dihydroxyindol nach Salazar *et al.*⁴⁷

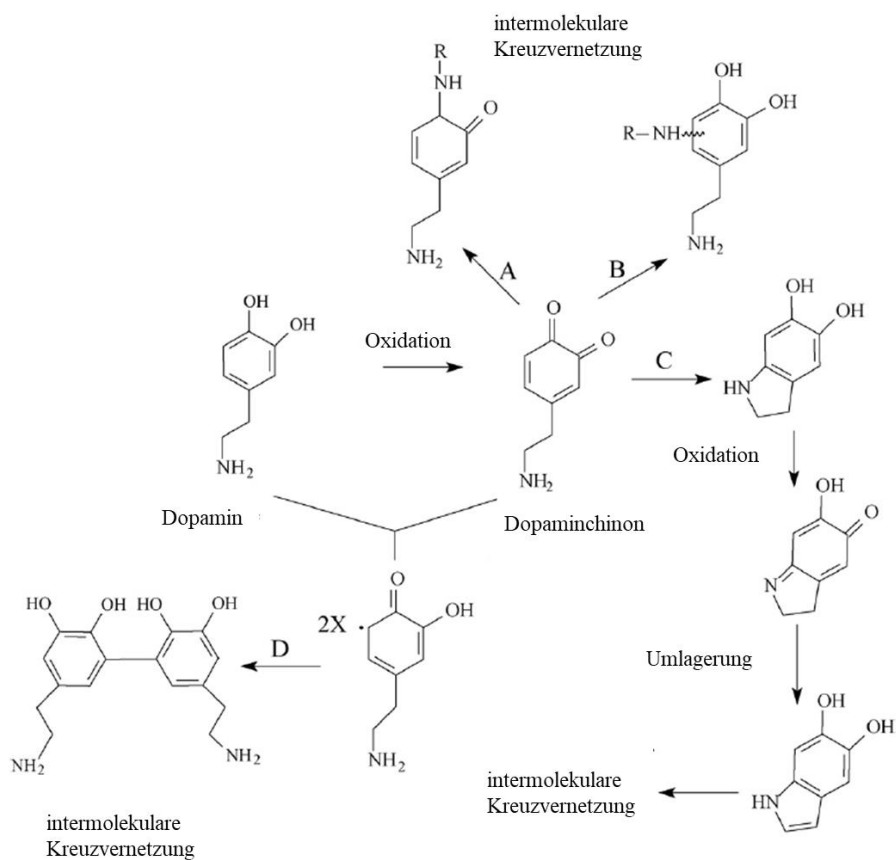


Abbildung 8.2: Dopamin Polymerisierung aus Pan *et al.*⁴⁶

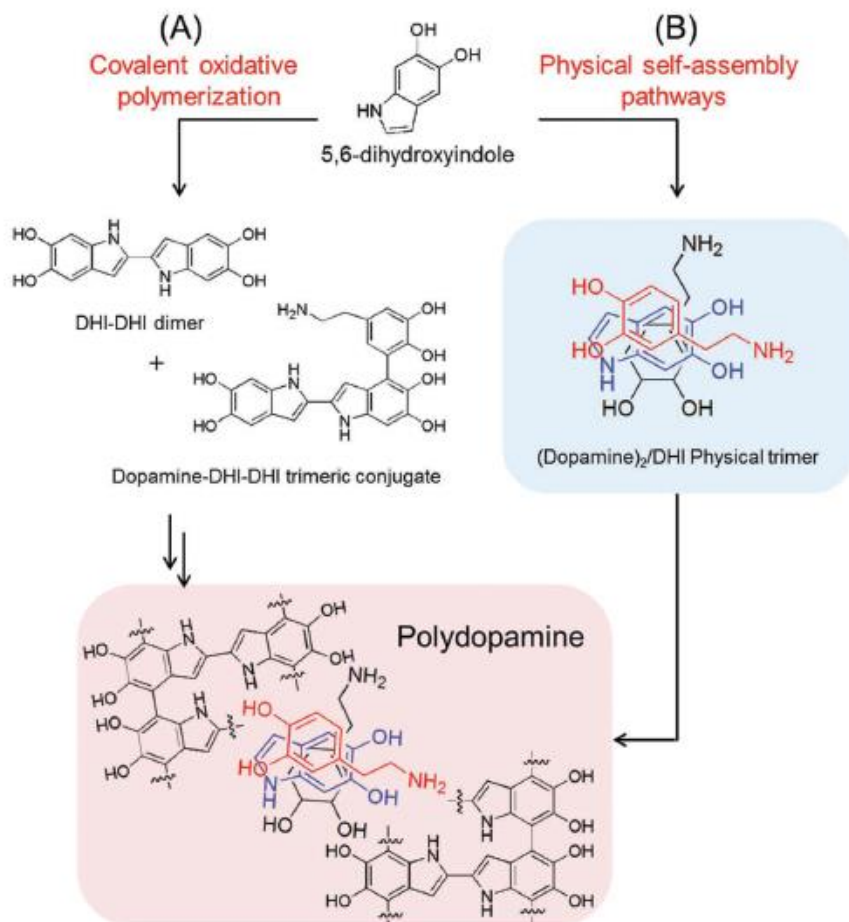


Abbildung 8.3: Polymerisierung von Dopamin aus Hong *et al.*⁴⁸

Tabelle 8.1: Zusammenfassung der Anpassung für das RSM-Design. Hervorgehoben ist das von Design-Expert vorgeschlagene Modell

Quelle	sequentieller p-Wert	Passungsgenauigkeit p-Wert	angepasster R ²	vorausgesagter R ²
linear	0,0009	0,0023	0,5786	0,3702
2FI	0,8156	0,0015	0,5481	0,0797
quadratisch	0,0001	0,2454	0,8976	0,7010
kubisch	0,1340	0,5631	0,9200	0,5556

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Klassifizierung von additiven Fertigungsverfahren.....	2
Abbildung 1.2: Prinzipen der Enzymimmobilisierung	5
Abbildung 1.3: Prinzip der Beschichtung von Oberflächen mit Polydopamin nach Waite ⁴⁰ ...	7
Abbildung 1.4: Chemische Reaktionsschritte zur Bildung von Polydopamin	8
Abbildung 1.5: Kovalente Anbindung von Thiol und Aminogruppen von Enzymen	9
Abbildung 1.6: Konzentrationsdifferenzen beim Stoffdurchgang zweier flüssiger Phasen ...	11
Abbildung 1.7: Technische Dispergierung eines Lösungsmittels für die Extraktion	13
Abbildung 1.8: Möglichkeiten der Prozessintensivierung nach Stankiewicz ⁷³	15
Abbildung 1.9: Decarboxylierung der Ferulasäure zu 4-Vinylguaiacol	16
Abbildung 1.10: Hydrolyse von Laurinsäureethylester mit immobilisierter Lipase	18
Abbildung 1.11: Strukturformeln zur Oxidation von L-Tyrosin	19
Abbildung 2.1: Kalibrierung der Bestimmung von Proteinkonzentrationen	30
Abbildung 2.2: Kalibriergerade für die Konzentrationsbestimmung von FA bei 280 nm	31
Abbildung 2.3: Exemplarisches Chromatogramm der HPLC	32
Abbildung 2.4: Kalibriergerade für die Konzentrationsbestimmung von L-Tyrosin	33
Abbildung 2.5: Kalibrierung der GC für die Bestimmung von 4-VG in <i>n</i> -Heptan	34
Abbildung 2.6: Kalibrierung für die Bestimmung von 4-VG-Konzentrationen in <i>n</i> -Heptan.	34
Abbildung 3.1: Ausgangsmaterialien für die additive Fertigung.....	39
Abbildung 3.2: Vergrößerung von Polyethylenterephthalatpulver.....	40
Abbildung 3.3: Vergrößerung von additiv gefertigten AlSi10Mg.....	41
Abbildung 3.4: Vergrößerung von additiv gefertigten Edelstahl 1.4404.....	41
Abbildung 3.5: Vergrößerung von additiv gefertigtem Ti6Al4V	42
Abbildung 3.6: Schritte zur Immobilisierung an additiv fertigmaren Polymeren	43
Abbildung 3.7: Wasserumsatz in 4 mL wassergesättigter Laurinsäureethylesterlösung.....	45
Abbildung 3.8: Katalysatorperformance von PET-PD-CALB	46
Abbildung 3.9: Mit Glutaraldehyd funktionalisierte Immobilisate	49
Abbildung 3.10: Umsatz von 1 mM L-Tyrosin bei Einsatz von 400 mg Immobilisaten	50
Abbildung 3.11: Prinzip einer adhäsiven Immobilisierungsstrategie	51
Abbildung 3.12: Optimierung von Immobilisierungen mit Ankerpeptiden	55
Abbildung 3.13: Vergleich von Immobilisaten mit verschiedenen Ankerpeptiden	56
Abbildung 3.14: Vergleich von Immobilisaten mit verschiedenen Spacern	59
Abbildung 3.15: Einfluss von Spülvolumen auf Immobilisate.....	60
Abbildung 3.16: Enzymkinetik und Expressionslevel.....	62
Abbildung 4.1: Löslichkeit von 4-VG in <i>n</i> -Heptan	66
Abbildung 4.2: Temperaturstabilität von 4-VG.....	67
Abbildung 4.3: Einfluss von ISPR auf die 4-VG-Synthese	68
Abbildung 4.4: Veränderung der Hydrophobizität durch Immobilisierung	69
Abbildung 4.5: Einfluss von ISPR bei Einsatz von Immobilisat	69
Abbildung 4.6: Einfluss vom Lösungsmittelverhältnis auf das ISPR.....	71
Abbildung 4.7: Additiv fertigmare Strömungsführer- und Enzymträgerstrukturen	72
Abbildung 4.8: Gefärbtes Heptan in dichter Phasenverteilerstruktur	72
Abbildung 4.9: Aufbau zur Unteruchung von durch POCS induzierten Strömungen.....	74
Abbildung 4.10: Exemplarisches Konturdiagramm.....	75
Abbildung 4.11: Geometrie eines Heptantropfens.....	75
Abbildung 4.12: Strömungsverhalten in einem Extraktor	76
Abbildung 4.13: Relative Lichtintensität während einer Entfärbung	77

Abbildung 5.1: Maße und Bestandteile eines hybriden Reaktors.....	80
Abbildung 5.2: Immobilisierung an additiv gefertigter Enzymträgerstruktur	82
Abbildung 5.3: Einflusses von Rauigkeit auf eine Oberfläche	83
Abbildung 5.4: Hybrider Reaktor zur effizienten 4-VG-Synthese.	88
Abbildung 5.5: Hybrider Reaktor zur 4-VG-Synthese	88
Abbildung 6.1: Prinzipien der Funktionalisierung für Immobilisierungen.	91
Abbildung 8.1: Postulierte Polymerisierungsmechanismen von 5,6-Dihydroxyindol	99
Abbildung 8.2: Dopamin Polymerisierung	99
Abbildung 8.3: Polymerisierung von Dopamin aus Hong et al. ⁴⁸	100

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien und ihre Hersteller	22
Tabelle 2.2: Verwendete Enzyme, Organismen und Reagenzien	22
Tabelle 2.3: Als Enzymträger und für die additive Fertigung genutzte Materialien.....	23
Tabelle 2.4: Verwendete Geräte und ihre Hersteller	23
Tabelle 2.5: Verwendete Programme	24
Tabelle 2.6: Primersequenzen für die Herstellung von Fusionsproteinen ^a	25
Tabelle 2.7: Aminosäuresesequenzen genutzter Anker (oben) und Spacer (unten) ³⁸	26
Tabelle 2.8: Konzentrationsbestimmung von FA und 4-VG	31
Tabelle 2.9: Methodeigenschaften aller HPLC-Messungen.....	32
Tabelle 2.10: GC-Einstellungen für die Bestimmung der Konzentration von 4-VG	33
Tabelle 2.11: Heizprogramm des Säulenofens der GC	33
Tabelle 3.1: In dieser Arbeit untersuchte Enzyme zur Immobilisierung	36
Tabelle 3.2: Screening additiv fertiger Materialien für die Biokatalyse	37
Tabelle 3.3: Über BET gemessene massenspezifische Oberflächen.....	40
Tabelle 3.4: Kontaktwinkelmessung mit Wasser auf einer additiv gefertigten PET Probe	44
Tabelle 3.5: Visualisierung von Adhäsionsvermittlern	53
Tabelle 3.6: Mittels DOE untersuchte Grenzbereiche von Immobilisierungsparametern	55
Tabelle 3.7: Aktivität und Umsatz bei Einsatz von PET-PAD-Immobilisaten.....	57
Tabelle 3.8: Kinetische Daten für freie Enzyme und PA12-DSI-GS-PAD Immobilisat	61
Tabelle 4.1: Eigenschaften und Wirkungen von periodisch offenzelligen Strukturdesigns ...	73
Tabelle 4.2: Charakteristika von periodisch offenzelligen Strukturen (POCS)	73
Tabelle 4.3: POCS induzierte Tropfendispersion:	76
Tabelle 5.1: Draufsicht auf offenzellige Struktur.....	81
Tabelle 5.2: Vergleich von Reaktorkonzepten:	84
Tabelle 5.3: Vergleich von Reaktorsystemen mit unterschiedlichen Enzymträgern	85
Tabelle 6.1: Vergleich von Immobilisierungsmethoden für additiv gefertigte Materialien....	92
Tabelle 6.2: Oberflächenspezifische Aktivitätetn für verschiedene Immobilisatpräparate....	92
Tabelle 8.1: Zusammenfassung der Anpassung für das RSM-Design	100

Literatur

- (1) Gebhardt, A. *Understanding additive manufacturing. Rapid prototyping, rapid tooling, rapid manufacturing*; Hanser: Munich, 2012.
- (2) Hull, C. W. Apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography. 638,905.
- (3) Gross, B. C.; Erkal, J. L.; Lockwood, S. Y.; Chen, C.; Spence, D. M. Evaluation of 3D printing and its potential impact on biotechnology and the chemical sciences. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 3240–3253.
- (4) Shallan, A. I.; Smejkal, P.; Corban, M.; Guijt, R. M.; Breadmore, M. C. Cost-effective three-dimensional printing of visibly transparent microchips within minutes. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 3124–3130.
- (5) Comina, G.; Suska, A.; Filippini, D. Low cost lab-on-a-chip prototyping with a consumer grade 3D printer. *Lab Chip* **2014**, *14*, 2978–2982.
- (6) Su, C.-K.; Peng, P.-J.; Sun, Y.-C. Fully 3D-Printed Preconcentrator for Selective Extraction of Trace Elements in Seawater. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 6945–6950.
- (7) Fee, C.; Nawada, S.; Dimartino, S. 3D printed porous media columns with fine control of column packing morphology. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1333*, 18–24.
- (8) Su, C.-K.; Yen, S.-C.; Li, T.-W.; Sun, Y.-C. Enzyme-Immobilized 3D-Printed Reactors for Online Monitoring of Rat Brain Extracellular Glucose and Lactate. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 6265–6273.
- (9) Kazenwadel, F.; Biegert, E.; Wohlgemuth, J.; Wagner, H.; Franzreb, M. A 3D-printed modular reactor setup including temperature and pH control for the compartmentalized implementation of enzyme cascades. *Eng. Life Sci.* **2016**, *16*, 560–567.
- (10) Grande, Carlos A., Dubois, Jean-Luc, Cambior, Juan C. Piquero, Vistad, Ørnulv, Didriksen, Terje, Blom, Richard, Spjelkavik, Aud I., Akporiaye, Duncan. *Additive manufacturing: haute couture for chemical industries*, 2015.
- (11) Parra-Cabrera, C.; Achille, C.; Kuhn, S.; Ameloot, R. 3D printing in chemical engineering and catalytic technology: structured catalysts, mixers and reactors. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 209–230.
- (12) Cao, L. *Carrier-bound immobilized enzymes. Principles, applications and design*; WILEY-VCH: Weinheim, 2005.
- (13) Liese, A.; Hilterhaus, L. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6236–6249.
- (14) Sheldon, R. A.; van Pelt, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6223–6235.
- (15) Messing, R. A.; Filbert, A. M. Immobilized glucose isomerase for the continuous conversion of glucose to fructose. *J. Agric. Food Chem.* **1975**, *23*, 920–923.
- (16) Tecelão, C.; Guillén, M.; Valero, F.; Ferreira-Dias, S. Immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase: A feasible biocatalyst for the production of human milk fat substitutes. *Biochem. Eng. J.* **2012**, *67*, 104–110.
- (17) Manoel, E. A.; Ribeiro, M. F.P.; dos Santos, J. C.S.; Coelho, M. A. Z.; Simas, A. B.C.; Fernandez-Lafuente, R.; Freire, D. M.G. Accurel MP 1000 as a support for the

- immobilization of lipase from *Burkholderia cepacia* : Application to the kinetic resolution of myo -inositol derivatives. *Process Biochem.* **2015**, *50*, 1557–1564.
- (18) Hicks, R. E. Pressure Drop in Packed Beds of Spheres. *Ind. Eng. Chem. Fund. [Online]* **1970**, *9*(3), 500–502.
- (19) Freund, H.; Zeiser, T.; Huber, F.; Klemm, E.; Brenner, G.; Durst, F.; Emig, G. Numerical simulations of single phase reacting flows in randomly packed fixed-bed reactors and experimental validation. *Chem. Eng. Sci.* **2003**, *58*, 903–910.
- (20) Di Felice, R.; Gibilaro, L. G. Wall effects for the pressure drop in fixed beds. *Chem. Eng. Sci.* **2004**, *59*, 3037–3040.
- (21) Dancy, C. L.; Balakrishnan, M.; Diplas, P.; Papanicolaou, A. N. The spatial inhomogeneity of turbulence above a fully rough, packed bed in open channel flow. *Exp. Fluids* **2000**, *29*, 402–410.
- (22) Buchholz, K.; Kasche, V.; Bornscheuer, U. T. *Biocatalysts and enzyme technology*, 2nd, completely rev., and enl. ed (Online-ausg.); Wiley-Blackwell: Weinheim, 2012.
- (23) Maier, M.; Radtke, C. P.; Hubbuch, J.; Niemeyer, C. M.; Rabe, K. S. On-Demand Production of Flow-Reactor Cartridges by 3D Printing of Thermostable Enzymes. *Angew. Chem.* **2018**, *57*, 5539–5543.
- (24) Torres, P.; Reyes-Duarte, D.; López-Cortés, N.; Ferrer, M.; Ballesteros, A.; Plou, F. J. Acetylation of vitamin E by *Candida antarctica* lipase B immobilized on different carriers. *Process Biochem.* **2008**, *43*, 145–153.
- (25) Aßmann, M.; Mügge, C.; Gaßmeyer, S. K.; Enoki, J.; Hilterhaus, L.; Kourist, R.; Liese, A.; Kara, S. Improvement of the Process Stability of Arylmalonate Decarboxylase by Immobilization for Biocatalytic Profen Synthesis. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 448.
- (26) Jesionowski, T.; Zdarta, J.; Krajewska, B. Enzyme immobilization by adsorption: a review. *Adsorption* **2014**, *20*, 801–821.
- (27) Rübsam, K.; Stomps, B.; Böker, A.; Jakob, F.; Schwaneberg, U. Anchor peptides: A green and versatile method for polypropylene functionalization. *Polymer* **2017**, *116*, 124–132.
- (28) Rübsam, K.; Davari, M. D.; Jakob, F.; Schwaneberg, U. KnowVolution of the Polymer-Binding Peptide LCI for Improved Polypropylene Binding. *Polymers* **2018**, *10*.
- (29) Kuang, Z.; Kim, S. N.; Crookes-Goodson, W. J.; Farmer, B. L.; Naik, R. R. Biomimetic chemosensor: designing peptide recognition elements for surface functionalization of carbon nanotube field effect transistors. *ACS nano* **2010**, *4*, 452–458.
- (30) Park, T. J.; Zheng, S.; Kang, Y. J.; Lee, S. Y. Development of a whole-cell biosensor by cell surface display of a gold-binding polypeptide on the gold surface. *FEMS Microbiol. Lett.* **2009**, *293*, 141–147.
- (31) Park, T. J.; Lee, S. Y.; Lee, S. J.; Park, J. P.; Yang, K. S.; Lee, K.-B.; Ko, S.; Park, J. B.; Kim, T.; Kim, S. K.; Shin, Y. B.; Chung, B. H.; Ku, S.-J.; Kim, D. H.; Choi, I. S. Protein nanopatterns and biosensors using gold binding polypeptide as a fusion partner. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 7197–7205.
- (32) Seker, U. O. S.; Demir, H. V. Material binding peptides for nanotechnology. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2011**, *16*, 1426–1451.
- (33) Islam, S.; Apitius, L.; Jakob, F.; Schwaneberg, U. Targeting microplastic particles in the void of diluted suspensions. *Environ. Int.* **2019**, *123*, 428–435.

- (34) Zernia, S.; Ott, F.; Bellmann-Sickert, K.; Frank, R.; Klenner, M.; Jahnke, H.-G.; Prager, A.; Abel, B.; Robitzki, A.; Beck-Sickinger, A. G. Peptide-Mediated Specific Immobilization of Catalytically Active Cytochrome P450 BM3 Variant. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 1090–1097.
- (35) Gong, W.; Wang, J.; Chen, Z.; Xia, B.; Lu, G. Solution structure of LCI, a novel antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **2011**, *50*, 3621–3627.
- (36) Zou, Z.; Mate, D. M.; Rübsam, K.; Jakob, F.; Schwaneberg, U. Sortase-Mediated High-Throughput Screening Platform for Directed Enzyme Evolution. *ACS Comb. Sci.* **2018**, *20*, 203–211.
- (37) Rübsam, K.; Weber, L.; Jakob, F.; Schwaneberg, U. Directed evolution of polypropylene and polystyrene binding peptides. *Biotechnol. Bioeng.* **2018**, *115*, 321–330.
- (38) Büscher, N.; Sayoga, G. V.; Rübsam, K.; Jakob, F.; Schwaneberg, U.; Kara, S.; Liese, A. Biocatalyst Immobilization by Anchor Peptides on an Additively Manufacturable Material. *Org. Process Res. Dev. [Online]* **2019**, No. 23, 1852–1859.
- (39) Pahujani, S.; Kanwar, S. S.; Chauhan, G.; Gupta, R. Glutaraldehyde activation of polymer Nylon-6 for lipase immobilization: enzyme characteristics and stability. *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 2566–2570.
- (40) Waite, J. H. Mussel Power. *Nat. Mater.* **2008**, *7*, 8–9.
- (41) Wang, W.; Cheng, W.; Tian, M.; Zou, H.; Le Li; Zhang, L. Preparation of PET/Ag hybrid fibers via a biomimetic surface functionalization method. *Electrochimica Acta* **2012**, *79*, 37–45.
- (42) Lee, Y. B.; Shin, Y. M.; Lee, J.-H.; Jun, I.; Kang, J. K.; Park, J.-C.; Shin, H. Polydopamine-mediated immobilization of multiple bioactive molecules for the development of functional vascular graft materials. *Biomaterials* **2012**, *33*, 8343–8352.
- (43) You, I.; Jeon, H.; Lee, K.; Do, M.; Seo, Y. C.; Lee, H. A.; Lee, H. Polydopamine coating in organic solvent for material-independent immobilization of water-insoluble molecules and avoidance of substrate hydrolysis. *J. Ind. Eng. Chem.* **2017**, *46*, 379–385.
- (44) Kim, P. M.; Korbel, J. O.; Chen, X.; Gerstein, M. B. Copy Number Variants and Segmental Duplications Show Different Formation Signatures. *arXiv preprint* **2007**, arXiv0709.4200.
- (45) Lee, H.; Dellatore, S. M.; Miller, W. M.; Messersmith, P. B. Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings. *Science* **2007**, *318*, 426–430.
- (46) Pan, F.; Jia, H.; Qiao, S.; Jiang, Z.; Wang, J.; Wang, B.; Zhong, Y. Bioinspired fabrication of high performance composite membranes with ultrathin defect-free skin layer. *Journal of Membrane Science* **2009**, *341*, 279–285.
- (47) Salazar, P.; Martin, M.; Gonzales-Mora, J. L. Polydopamine-modified surfaces in biosensor applications. *Polymer Science: Research Advances, Practical Applications and Educational Aspects [Online]* **2016**, 385–396.
- (48) Hong, S.; Na, Y. S.; Choi, S.; Song, I. T.; Kim, W. Y.; Lee, H. Non-Covalent Self-Assembly and Covalent Polymerization Co-Contribute to Polydopamine Formation. *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *22*, 4711–4717.
- (49) Wei, Q.; Li, B.; Yi, N.; Su, B.; Yin, Z.; Zhang, F.; Li, J.; Zhao, C. Improving the blood compatibility of material surfaces via biomolecule-immobilized mussel-inspired coatings. *Journal of biomedical materials research. Part A* **2011**, *96*, 38–45.

- (50) Liebscher, J.; Mrówczyński, R.; Scheidt, H. A.; Filip, C.; Hädade, N. D.; Turcu, R.; Bende, A.; Beck, S. Structure of polydopamine: a never-ending story? *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2013**, *29*, 10539–10548.
- (51) Wei, Q.; Zhang, F.; Li, J.; Li, B.; Zhao, C. Oxidant-induced dopamine polymerization for multifunctional coatings. *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 1430.
- (52) Ren, Y.; Rivera, J. G.; He, L.; Kulkarni, H.; Lee, D.-K.; Messersmith, P. B. Facile, high efficiency immobilization of lipase enzyme on magnetic iron oxide nanoparticles via a biomimetic coating. *BMC biotechnology* **2011**, *11*, 63.
- (53) Yeroslavsky, G.; Girshevitz, O.; Foster-Frey, J.; Donovan, D. M.; Rahimipour, S. Antibacterial and antibiofilm surfaces through polydopamine-assisted immobilization of lysostaphin as an antibacterial enzyme. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2015**, *31*, 1064–1073.
- (54) Sureshkumar, M.; Lee, C.-K. Polydopamine coated magnetic-chitin (MCT) particles as a new matrix for enzyme immobilization. *Carbohydrate Polymers* **2011**, *84*, 775–780.
- (55) Lee, H.; Rho, J.; Messersmith, P. B. Facile Conjugation of Biomolecules onto Surfaces via Mussel Adhesive Protein Inspired Coatings. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* **2009**, *21*, 431–434.
- (56) Feuerriegel, U. *Verfahrenstechnik mit EXCEL. Verfahrenstechnische Berechnungen effektiv durchführen und professionell dokumentieren*; Springer Vieweg: Wiesbaden, 2016.
- (57) Mersmann, A.; Kind, M.; Stichlmair, J. *Thermische Verfahrenstechnik. Grundlagen und Methoden*, 2., wesentlich erw. and aktualisierte Aufl.; Chemische Technik/Verfahrenstechnik; Springer: Berlin, 2005.
- (58) Behr, A.; Agar, D. W.; Jörisen, J.; Vorholt, A. J. *Einführung in die Technische Chemie*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2016.
- (59) Pfennig, A.; Pilhofer, T.; Schröter, J. Flüssig-Flüssig-Extraktion. In *Fluidverfahrenstechnik: Grundlagen, Methodik, Technik, Praxis*, 1. Aufl.; Goedecke, R., Ed.; WILEY-VCH: Weinheim, 2011.
- (60) Nernst, W. Theorie der Reaktionsgeschwindigkeit in heterogenen Systemen. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **1904**, *47U*.
- (61) Fick, A. Ueber Diffusion. *Ann. Phys. Chem.* **1855**, *170*, 59–86.
- (62) Christen, D. S. *Praxiswissen der chemischen Verfahrenstechnik. Handbuch für Chemiker und Verfahreningenieure*; Verfahrenstechnik; Springer: Berlin, 2005.
- (63) Blaß, E.; Goldmann, G.; Hirschmann, K.; Mihailowitsch, P.; Pietzsch, W. Fortschritte auf dem Gebiet der Flüssig/Flüssig-Extraktion. *Chem. Ing. Tech. [Online]* **1985**, No. 57, 565–581.
- (64) Horvath, M.; Hartland, S. Mixer-settler-extraction column: Mass transfer efficiency and entrainment. *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev. [Online]* **1985**, No. 24, 1220–1225.
- (65) Haroun, Y.; Raynal, L.; Legendre, D. Mass transfer and liquid hold-up determination in structured packing by CFD. *Chemical Engineering Science* **2012**, *75*, 342–348.
- (66) Handlos, A. E.; Baron, T. Mass and heat transfer from drops in liquid-liquid extraction. *A.I.Ch.E. Journal [Online]* **1957**, 127–136.
- (67) Agrawal, A.; Kumari, S.; Sahu, K. K. Liquid–liquid extraction of sulphuric acid from zinc bleed stream. *Hydrometallurgy* **2008**, *92*, 42–47.

- (68) Saji, J.; Reddy, M.L.P. Liquid–liquid extraction separation of iron(III) from titania wastes using TBP–MIBK mixed solvent system. *Hydrometallurgy* **2001**, *61*, 81–87.
- (69) Marcilla, A.; Gómez, A.; Reyes, J. A.; Olaya, M. M. New Method for Quaternary Systems Liquid–Liquid Extraction Tray to Tray Design. *Ind. Eng. Chem. Res.* **1999**, *38*, 3083–3095.
- (70) Seibert, A. F.; Fair, J. R. Hydrodynamics and mass transfer in spray and packed liquid–liquid extraction columns. *Ind. Eng. Chem. Res.* [Online] **1988**, No. 27, 470–481.
- (71) Stankiewicz, A. I.; Moulijn, J. A. Process Intensification: Transforming Chemical Engineering. *Chemical Engineering Progress* **2000**, *96*, 22–34.
- (72) Zink, T.; Geyer, R. Circular Economy Rebound. *Journal of Industrial Ecology* **2017**, *21*, 593–602.
- (73) Stankiewicz, A. Reactive separations for process intensification: an industrial perspective. *Chemical Engineering and Processing* **2003**, *42*, 137–144.
- (74) Mathew, S.; Abraham, T. E. Bioconversions of ferulic acid, an hydroxycinnamic acid. *Critical reviews in microbiology* **2006**, *32*, 115–125.
- (75) Maga, J. A.; Katz, I. Simple phenol and phenolic compounds in food flavor. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **1978**, *10*, 323–372.
- (76) Wuensch, C.; Pavkov-Keller, T.; Steinkellner, G.; Gross, J.; Fuchs, M.; Hromic, A.; Lyskowski, A.; Fauland, K.; Gruber, K.; Glueck, S. M.; Faber, K. Regioselective Enzymatic β -Carboxylation of para-Hydroxy- styrene Derivatives Catalyzed by Phenolic Acid Decarboxylases. *Advanced synthesis & catalysis* **2015**, *357*, 1909–1918.
- (77) Pesci, L.; Baydar, M.; Glueck, S.; Faber, K.; Liese, A.; Kara, S. Development and Scaling-Up of the Fragrance Compound 4-Ethylguaiaicol Synthesis via a Two-Step Chemo-Enzymatic Reaction Sequence. *Org. Process Res. Dev.* **2017**, *21*, 85–93.
- (78) Leisch, H.; Grosse, S.; Morley, K.; Abokitse, K.; Perrin, F.; Denault, J.; Lau, P. C.K. Chemicals from agricultural biomass: chemoenzymatic approach for production of vinylphenols and polyvinylphenols from phenolic acids. *Green Process. Synth.* **2013**, *2*, 2–17.
- (79) Yang, J.; Wang, S.; Lorrain, M.-J.; Rho, D.; Abokitse, K.; Lau, P. C. K. Bioproduction of lauryl lactone and 4-vinyl guaiacol as value-added chemicals in two-phase biotransformation systems. *Applied microbiology and biotechnology* **2009**, *84*, 867–876.
- (80) Linda G. Lee and George M. Whitesides. Preparation of optically active 1,2-diols and .alpha.-hydroxy ketones using glycerol dehydrogenase as catalyst. Limits to enzyme-catalyzed synthesis due to noncompetitive and mixed inhibition by product. *J. Org. Chem.* [Online] **1985**, 25–36.
- (81) Liese, A.; Karutz, M.; Kamphuis, J.; Wandrey, C.; Kragl, U. Enzymatic resolution of 1-phenyl-1,2-ethanediol by enantioselective oxidation: Overcoming product inhibition by continuous extraction. *Biotechnol. Bioeng.* [Online] **1996**, No. 51, 544–550.
- (82) Goedecke, R. *Fluidverfahrenstechnik. Grundlagen, Methodik, Technik, Praxis*, [Elektronische Ressource]; WILEY-VCH: Weinheim, 2006.
- (83) Boudart, M. Turnover Rates in Heterogeneous Catalysis. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 661–666.
- (84) Janssen, M.; Müller, C.; Vogt, D. Recent advances in the recycling of homogeneous catalysts using membrane separation. *Green Chem.* **2011**, *13*, 2247.
- (85) Blaser, H. U.; Pugin, B.; Studer, M. Enantioselective heterogeneous catalysis: academic and industrial challenges. In *Chiral catalyst immobilization and recycling*; Vos, D. E. d.,

- Vankelecom, I. F. J., Jacobs, P. A., Eds.; WILEY-VCH: Weinheim, New York, 2010; pp 1–17.
- (86) Kragl, U.; Dwars, T. The development of new methods for the recycling of chiral catalysts. *Trends in Biotechnology* **2001**, *19*, 442–449.
- (87) Chapuis, C.; Jacoby, D. Catalysis in the preparation of fragrances and flavours. *Appl. Catal. [Online]* **2001**, 93–117.
- (88) Chouchi, D.; Barth, D.; Reverchon, E.; Porta G. Della. Bigarade Peel Oil Fractionation by Supercritical Carbon Dioxide Desorption. *J. Agric. Food Chem. [Online]* **1996**, No. 44, 1100–1104.
- (89) Palma, M.; Taylor, L. T.; Varela, R. M.; Cutler, S. J.; Cutler, H. G. Fractional extraction of compounds from grape seeds by supercritical fluid extraction and analysis for antimicrobial and agrochemical activities. *Journal of agricultural and food chemistry* **1999**, *47*, 5044–5048.
- (90) Johannsen, J.; Meyer, F.; Fieg, G.; Waluga, T. Process for the Preparation of Fatty Aldehydes from Renewable Resources. *Chemie Ingenieur Technik [Online]* **2020**.
- (91) Nagatsu, T.; Sawada, M. L-dopa therapy for Parkinson's disease: Past, present, and future. *Parkinsonism & Related Disorders* **2009**, *15*, 3–8.
- (92) Min, K.; Park, D.-H.; Yoo, Y. J. Electroenzymatic synthesis of l-DOPA. *J. Biotechnol.* **2010**, *146*, 40–44.
- (93) Min, K.; Park, K.; Park, D.-H.; Yoo, Y. J. Overview on the biotechnological production of L-DOPA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 575–584.
- (94) Knowles, W. S. Asymmetric Hydrogenation - The Monsanto L-Dopa Process. In *Asymmetric Catalysis on Industrial Scales: Challenges, Approaches and Solutions*, 1st ed.; Blaser, H. U., Ed.; WILEY-VCH: Weinheim, 2003.
- (95) Sayyed, I. A.; Sudalai, A. Asymmetric synthesis of l-DOPA and (R)-selegiline via, OsO₄-catalyzed asymmetric dihydroxylation. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 3111–3116.
- (96) Valdés, R. H.; Puzer, L.; Gomes Jr., M.; Marques, C. E.S.J.; Aranda, D. A.G.; Bastos, M. L.; Gemal, A. L.; Antunes, O.A.C. Production of L-DOPA under heterogeneous asymmetric catalysis. *Catalysis Communications* **2004**, *5*, 631–634.
- (97) Pahujani, S.; Kanwar, S. S.; Chauhan, G.; Gupta, R. Glutaraldehyde activation of polymer Nylon-6 for lipase immobilization: enzyme characteristics and stability. *Bioresource technology* **2008**, *99*, 2566–2570.
- (98) Chapman, J.; Ismail, A.; Dinu, C. Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. *Catalysts* **2018**, *8*, 238.
- (99) Prasad, S.; Roy, I. Converting Enzymes into Tools of Industrial Importance. *Recent patents on biotechnology* **2018**, *12*, 33–56.
- (100) Choi, J.-M.; Han, S.-S.; Kim, H.-S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology advances* **2015**, *33*, 1443–1454.
- (101) Sheldon, R. A.; Woodley, J. M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chemical reviews* **2018**, *118*, 801–838.
- (102) Fellechner, O.; Blatkiewicz, M.; Smirnova, I. Reactive Separations for In Situ Product Removal of Enzymatic Reactions: A Review. *Chem-Ing-Tech.* **2019**, *18*, 2130.

- (103) Freeman, A.; Woodley, J. M.; Lilly, M. D. In Situ Product Removal as a Tool for Bioprocessing. *Bio/Technology* **1993**, *11*, 1007–1012.
- (104) Leisch, H.; Grosse, S.; Morley, K.; Abokitse, K.; Perrin, F.; Denault, J.; Lau, P. C.K. Chemicals from agricultural biomass: chemoenzymatic approach for production of vinylphenols and polyvinylphenols from phenolic acids. *Green Process. Synth.* **2013**, *2*.
- (105) Kertest, A. S.; King, C. J. Extraction chemistry of fermentation product carboxylic acids. *Biotechnol. Bioeng. [Online]* **1985**, No. 28, 269–282.
- (106) Lee, I.-Y.; Volm, T. G.; Rosazza, J. P. N. Decarboxylation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by *Bacillus pumilus* in aqueous-organic solvent two-phase systems. *Enzyme Microb. Tech.* **1998**, *23*, 261–266.
- (107) Hu, H.; Li, L.; Ding, S. An organic solvent-tolerant phenolic acid decarboxylase from *Bacillus licheniformis* for the efficient bioconversion of hydroxycinnamic acids to vinyl phenol derivatives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 5071–5081.
- (108) Wuensch, C.; Gross, J.; Steinkellner, G.; Gruber, K.; Glueck, S. M.; Faber, K. Asymmetric enzymatic hydration of hydroxystyrene derivatives. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2013**, *52*, 2293–2297.
- (109) Blanusa, M.; Schenk, A.; Sadeghi, H.; Marienhagen, J.; Schwaneberg, U. Phosphorothioate-based ligase-independent gene cloning (PLICing): An enzyme-free and sequence-independent cloning method. *Analytical biochemistry* **2010**, *406*, 141–146.
- (110) Bryksin, A. V.; Matsumura, I. Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. *BioTechniques* **2010**, *48*, 463–465.
- (111) Ren, Y.; Rivera, J. G.; He, L.; Kulkarni, H.; Lee, D.-K.; Messersmith, P. B. Facile, high efficiency immobilization of lipase enzyme on magnetic iron oxide nanoparticles via a biomimetic coating. *Ren et al. BMC Biotechnology [Online]* **2011**, No. 11, 2–8.
- (112) Wörmeyer, K.; Alnaief, M.; Smirnova, I. Amino functionalised Silica-Aerogels for CO₂-adsorption at low partial pressure. *Adsorption* **2012**, *18*, 163–171.
- (113) Ligon, S. C.; Liska, R.; Stampfl, J.; Gurr, M.; Mülhaupt, R. Polymers for 3D Printing and Customized Additive Manufacturing. *Chemical reviews* **2017**, *117*, 10212–10290.
- (114) Eckel, Z. C.; Zhou, C.; Martin, J. H.; Jacobsen, A. J.; Carter, W. B.; Schaedler, T. A. Additive manufacturing of polymer-derived ceramics. *Science (New York, N.Y.)* **2016**, *351*, 58–62.
- (115) Herzog, D.; Seyda, V.; Wycisk, E.; Emmelmann, C. Additive manufacturing of metals. *Acta Materialia* **2016**, *117*, 371–392.
- (116) Mechtcherine, V.; Nerella, V. N. 3-D-Druck mit Beton: Sachstand, Entwicklungstendenzen, Herausforderungen. *Bautechnik 95 [Online]* **2018**, No. 4, 275–287.
- (117) Tan, C.; Toh, W. Y.; Wong, G.; Lin, L. Extrusion-based 3D food printing – Materials and machines. *Int J Bioprint* **2018**, *4*.
- (118) Maier, M.; Radtke, C. P.; Hubbuch, J.; Niemeyer, C. M.; Rabe, K. S. On-Demand Production of Flow-Reactor Cartridges by 3D Printing of Thermostable Enzymes. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2018**, *57*, 5539–5543.
- (119) Zhu, Y.; Gao, C.; Liu, X.; He, T.; Shen, J. Immobilization of biomacromolecules onto aminolyzed poly(L-lactic acid) toward acceleration of endothelium regeneration. *Tissue engineering* **2004**, *10*, 53–61.

- (120) Pham, D. T.; Dotchev, K. D.; Yusoff, W. A. Y. Deterioration of polyamide powder properties in the laser sintering process. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part C: Journal of Mechanical Engineering Science* **2008**, *222*, 2163–2176.
- (121) Seong, G. H.; Crooks, R. M. Efficient mixing and reactions within microfluidic channels using microbead-supported catalysts. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 13360–13361.
- (122) Bora, U.; Sharma, P.; Kumar, S.; Kannan, K.; Nahar, P. Photochemical activation of a polycarbonate surface for covalent immobilization of a protein ligand. *Talanta [Online]* **2006**, No. 70, 624–629.
- (123) Sun, H.; Chen, R.-c.; Li, A.; Xu, G.-z. Immobilization of Bovine Serum Albumin on Poly(ether ether ketone) for Surface Biocompatibility Improvement. *Chem. Res. Chin. Univ. [Online]* **2012**, *28*(2), 353–357.
- (124) Yiğitoğlu, M.; Temoçin, Z. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glutaraldehyde-activated polyester fiber and its application for hydrolysis of some vegetable oils. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2010**, *66*, 130–135.
- (125) Bulmuş, V.; Ayhan, H.; Pişkin, E. Modified PMMA monosize microbeads for glucose oxidase immobilization. *he Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal [Online]* **1997**.
- (126) Bosley, J. A.; Peilow, A. D. Immobilization of lipases on porous polypropylene: Reduction in esterification efficiency at low loading. *J Amer Oil Chem Soc* **1997**, *74*, 107–111.
- (127) Araujo, A. M.; Neves Jr., M. T.; Azevedo, W. M.; Oliveira, G. G.; Ferreira Jr., D. L.; Coelho, R.A.L.; Figueiredo, E.A.P.; Carvalho Jr, L. B. Polyvinyl alcohol-glutaraldehyde network as a support for protein immobilisation. *Biotechnology Techniques* **1997**, *11*, 67–70.
- (128) Cheng, J.; Ming Yu, S.; Zuo, P. Horseradish peroxidase immobilized on aluminium-pillared inter-layered clay for the catalytic oxidation of phenolic wastewater. *Water research* **2006**, *40*, 283–290.
- (129) Minier, M.; Salmain, M.; Yacoubi, N.; Barbes, L.; Méthivier, C.; Zanna, S.; Pradier, C.-M. Covalent immobilization of lysozyme on stainless steel. Interface spectroscopic characterization and measurement of enzymatic activity. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2005**, *21*, 5957–5965.
- (130) Dubs, M.; Weisser, J.; Linke, R.; Pfuch, A.; Imhof, D.; Schnabelrauch, M. Dextran-based coating system for the immobilization of cell adhesion promoting molecules on titanium surfaces. *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* **2009**, *40*, 853–860.
- (131) Ji, J.; Zhang, Y.; Zhou, X.; Kong, J.; Tang, Y.; Liu, B. Enhanced protein digestion through the confinement of nanozeolite-assembled microchip reactors. *Analytical chemistry* **2008**, *80*, 2457–2463.
- (132) Ganapathy, R.; Sarmadi, M.; Denes, F. Immobilization of alpha-chymotrypsin on oxygen-RF-plasma functionalized PET and PP surfaces. *Journal of biomaterials science. Polymer edition* **1998**, *9*, 389–404.
- (133) Sato, S.; Gondo, D.; Wada, T.; Kanehashi, S.; Nagai, K. Effects of various liquid organic solvents on solvent-induced crystallization of amorphous poly(lactic acid) film. *J. Appl. Polym. Sci.* **2013**, *129*, 1607–1617.
- (134) HSM Stahl- und Metallhandel GmbH. *Werkstoffdatenblatt 3.7164 / Ti6Al4V*, 2020.

- (135) M. Woite GmbH. *Werkstoffdatenblatt - 1.4404*, 2020.
- (136) EOS GmbH - Electro Optical Systems. *EOS Aluminium AlSi10Mg Datenblatt*, 2020.
- (137) GESTIS-Stoffdatenbank. *Polyethylenterephthalat*, 2020.
- (138) eos. *Materialdatenblatt PA 2200*, 2008.
- (139) Ortiz, C.; Ferreira, M. L.; Barbosa, O.; dos Santos, J. C. S.; Rodrigues, R. C.; Berenguer-Murcia, Á.; Briand, L. E.; Fernandez-Lafuente, R. Novozym 435: the “perfect” lipase immobilized biocatalyst? *Catal. Sci. Technol.* **2019**, *9*, 2380–2420.
- (140) Lee, H.; Rho, J.; Messersmith, P. B. Facile Conjugation of Biomolecules onto Surfaces via Mussel Adhesive Protein Inspired Coatings. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* **2009**, *21*, 431–434.
- (141) Wei, Q.; Zhang, F.; Li, J.; Li, B.; Zhao, C. Oxidant-induced dopamine polymerization for multifunctional coatings. *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 1430.
- (142) Zhang, L.; Shi, J.; Jiang, Z.; Jiang, Y.; Qiao, S.; Li, J.; Wang, R.; Meng, R.; Zhu, Y.; Zheng, Y. Bioinspired preparation of polydopamine microcapsule for multienzyme system construction. *Green Chem* **2011**, *13*, 300–306.
- (143) Sureshkumar, M.; Lee, C.-K. Polydopamine coated magnetic-chitin (MCT) particles as a new matrix for enzyme immobilization. *Carbohydrate Polymers* **2011**, *84*, 775–780.
- (144) Yeroslavsky, G.; Girshevitz, O.; Foster-Frey, J.; Donovan, D. M.; Rahimipour, S. Antibacterial and antibiofilm surfaces through polydopamine-assisted immobilization of lysostaphin as an antibacterial enzyme. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2015**, *31*, 1064–1073.
- (145) Gunda, N. S. K.; Singh, M.; Norman, L.; Kaur, K.; Mitra, S. K. Optimization and characterization of biomolecule immobilization on silicon substrates using (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) and glutaraldehyde linker. *Applied Surface Science* **2014**, *305*, 522–530.
- (146) Williams, E. H.; Davydov, A. V.; Motayed, A.; Sundaresan, S. G.; Bocchini, P.; Richter, L. J.; Stan, G.; Steffens, K.; Zangmeister, R.; Schreifels, J. A.; Rao, M. V. Immobilization of streptavidin on 4H–SiC for biosensor development. *Applied Surface Science* **2012**, *258*, 6056–6063.
- (147) Care, A.; Bergquist, P. L.; Sunna, A. Solid-binding peptides: smart tools for nanobiotechnology. *Trends in Biotechnology* **2015**, *33*, 259–268.
- (148) Tang, Z.; Palafox-Hernandez, J. P.; Law, W.-C.; Hughes, Z. E.; Swihart, M. T.; Prasad, P. N.; Knecht, M. R.; Walsh, T. R. Biomolecular recognition principles for bionanocombinatorics: an integrated approach to elucidate enthalpic and entropic factors. *ACS nano* **2013**, *7*, 9632–9646.
- (149) Goede, K.; Busch, P.; Grundmann, M. Binding Specificity of a Peptide on Semiconductor Surfaces. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 2115–2120.
- (150) Hnilova, M.; Oren, E. E.; Seker, U. O. S.; Wilson, B. R.; Collino, S.; Evans, J. S.; Tamerler, C.; Sarikaya, M. Effect of molecular conformations on the adsorption behavior of gold-binding peptides. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2008**, *24*, 12440–12445.
- (151) Seker, U. O. S.; Wilson, B.; Dincer, S.; Kim, I. W.; Oren, E. E.; Evans, J. S.; Tamerler, C.; Sarikaya, M. Adsorption behavior of linear and cyclic genetically engineered platinum

- binding peptides. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2007**, *23*, 7895–7900.
- (152) Corni, S.; Hnilova, M.; Tamerler, C.; Sarikaya, M. Conformational Behavior of Genetically-Engineered Dodecapeptides as a Determinant of Binding Affinity for Gold. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 16990–17003.
- (153) Amram Mor/Nguyen Van Huong/Antoine Delfour/Daniele Migliore-Samour/Pierre Nicolas. Isolation, amino acid sequence and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin. *Biochemistry [Online]* **1991**, No. 30, 8824–8830.
- (154) Arai, R.; Ueda, H.; Kitayama, A.; Kamiya, N.; Nagamune, T. Design of the linkers which effectively separate domains of a bifunctional fusion protein. *Protein engineering* **2001**, *14*, 529–532.
- (155) Maioa, A. de; El-Masry, M. M.; Portaccio, M.; Diano, N.; Di Martino, S. Influence of the spacer length on the activity of enzymes immobilised on nylon/polyGMA membranes Part 1. Isothermal conditions. *J. Mol. Catal. B-Enzym. [Online]* **2003**, No. 21, 239–252.
- (156) Ream, W.; Field, K. G. *Molecular biology techniques: an intensive laboratory course. An intensive laboratory course*; Academic Press: San Diego, CA, 1998.
- (157) Li, L.; Long, L.; Ding, S. Bioproduction of High-Concentration 4-Vinylguaiacol Using Whole-Cell Catalysis Harboring an Organic Solvent-Tolerant Phenolic Acid Decarboxylase From *Bacillus atrophaeus*. *Frontiers in microbiology* **2019**, *10*, 1798.
- (158) Lee, I.-Y.; Volm, T. G.; Rosazza, J. P.N. Decarboxylation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by *Bacillus pumilus* in aqueous-organic solvent two-phase systems. *Enzyme and Microbial Technology* **1998**, *23*, 261–266.
- (159) Alfonsi, K.; Colberg, J.; Dunn, P. J.; Fevig, T.; Jennings, S.; Johnson, T. A.; Kleine, H. P.; Knight, C.; Nagy, M. A.; Perry, D. A.; Stefaniak, M. Green chemistry tools to influence a medicinal chemistry and research chemistry based organisation. *Green Chem* **2008**, *10*, 31–36.
- (160) Sohn, Y. T.; Oh, J. H. Characterization of Physicochemical Properties of Ferulic Acid. *Arch. Pharm. Res. [Online]* **2003**, No. 26, 1002–1008.
- (161) Garcia-Conesa, M. T.; Wilson, P. D.; Plumb, G. W.; Ralph, J.; Williamson, G. Antioxidant properties of 4,4-dihydroxy-3,3-dimethoxy-bicinnamic acid (8-8-diferulic acid, non-cyclic form). *J. Sci. Food. Agr. [Online]* **1999**, No. 79, 379–384.
- (162) Kertest, A. S.; King, C. J. Extraction chemistry of fermentation product carboxylic acids. *Biotechnol. Bioeng. [Online]* **1986**, No. 28, 269–282.
- (163) Kakiuchi, T. Potential-dependent adsorption and partitioning of ionic components at a liquid liquid interface. *J. Electroanal. Chem. [Online]* **2001**, No. 496, 137–142.
- (164) Ozkorucuklu, S. P.; Beltrán, J. L.; Fonrodona, G.; Barrón, D.; Alsancak, G.; Barbosa, J. Determination of Dissociation Constants of Some Hydroxylated Benzoic and Cinnamic Acids in Water from Mobility and Spectroscopic Data Obtained by CE-DAD. *J. Chem. Eng. Data* **2009**, *54*, 807–811.
- (165) Dedisch, S.; Wiens, A.; Davari, M. D.; Söder, D.; Rodriguez-Emmenegger, C.; Jakob, F.; Schwaneberg, U. Matter-tag: A universal immobilization platform for enzymes on polymers, metals, and silicon-based materials. *Biotechnology and bioengineering* **2020**, *117*, 49–61.

- (166) Woodcock, L. L.; Wiles, C.; Greenway, G. M.; Watts, P.; Wells, A.; Eyley, S. Enzymatic synthesis of a series of alkyl esters using novozyme 435 in a packed-bed, miniaturized, continuous flow reactor. *Biocatalysis and Biotransformation* **2008**, *26*, 466–472.
- (167) Coxson, H. O.; Rogers, R. M.; Whitthall, K. P.; D'yachkova, J.; Paré, P. D.; Scirba, F. C.; Hogg, J. C. A Quantification of the Lung Surface Area in Emphysema Using Computed Tomography. *Am. J. Respir. Crit. Care Med. [Online]* **1999**, No. 159, 851–856.
- (168) Lanxess. Datenblatt: Lewatit-VP-OC-1600-Resin-Lenntech [Online] **2011**.
- (169) Wiemann, L. O.; Nieguth, R.; Eckstein, M.; Naumann, M.; Thum, O.; Ansorge-Schumacher, M. B. Composite Particles of Novozyme 435 and Silicone: Advancing Technical Applicability of Macroporous Enzyme Carriers. *ChemCatChem* **2009**, *1*, 455–462.
- (170) Mei, Y.; Miller, L.; Gao, W.; Gross, R. A. Imaging the distribution and secondary structure of immobilized enzymes using infrared microspectroscopy. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 70–74.
- (171) Good Fellow. *Datenblatt: Eigenschaften - Polyethylenterephthalat*, 2020.
- (172) Stojkovič, G.; Plazl, I.; Žnidaršič-Plazl, P. l-Malic acid production within a microreactor with surface immobilised fumarase. *Microfluid Nanofluid* **2011**, *10*, 627–635.
- (173) Miyazaki, M.; Maeda, H. Microchannel enzyme reactors and their applications for processing. *Trends in Biotechnology* **2006**, *24*, 463–470.
- (174) Walt, D. R.; Agayn, V. I. The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. *Trend. Anal. Chem. [Online]* **1994**, No. 13, 425–430.
- (175) Jakus, A. E.; Geisendorfer, N. R.; Lewis, P. L.; Shah, R. N. 3D-printing porosity: A new approach to creating elevated porosity materials and structures. *Acta biomaterialia* **2018**, *72*, 94–109.
- (176) Cullen, S. P.; Liu, X.; Mandel, I. C.; Himpsel, F. J.; Gopalan, P. Polymeric brushes as functional templates for immobilizing ribonuclease A: study of binding kinetics and activity. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2008**, *24*, 913–920.
- (177) Barbey, R.; Lavanant, L.; Paripovic, D.; Schüwer, N.; Sugnaux, C.; Tugulu, S.; Klok, H.-A. Polymer brushes via surface-initiated controlled radical polymerization: synthesis, characterization, properties, and applications. *Chemical reviews* **2009**, *109*, 5437–5527.
- (178) Humenik, M.; Mohrand, M.; Scheibel, T. Self-Assembly of Spider Silk-Fusion Proteins Comprising Enzymatic and Fluorescence Activity. *Bioconjugate chemistry* **2018**, *29*, 898–904.