

Anwendung von Feinblasentechnologie in der Biokatalyse

**Vom Promotionsausschuss der
Technischen Universität Hamburg**

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

genehmigte Dissertation

von
Benjamin Thomas

aus
Berlin

2021

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Liese
 2. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Michael Schlüter
- Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. habil. Dr. h.c. Stefan Heinrich

Tag der mündlichen Prüfung: 22.02.2021

Lizenz:

Creative Commons Lizenzvertrag

Der Text steht, soweit nicht anders gekennzeichnet, unter der **Creative-Commons-Lizenz Namensnennung 4.0 (CC BY 4.0)**. Das bedeutet, dass er vervielfältigt, verbreitet und öffentlich zugänglich gemacht werden darf, auch kommerziell, sofern dabei stets der Urheber, die Quelle des Textes und o. g. Lizenz genannt werden. Die genaue Formulierung der Lizenz kann unter <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.de> aufgerufen werden.

ORCID:

<https://orcid.org/0000-0002-6416-5440>

Benjamin Thomas

DOI:

<https://doi.org/10.15480/882.3438>

Kurzzusammenfassung

Die hohe Diversität der Biokatalysatoren bietet ein großes Potenzial für die Anwendung in einer Vielzahl von Prozessen der Chemie-, Pharma- und Lebensmittelindustrie. Das Potenzial von Sauerstoff verbrauchenden Enzymen, wie z.B. Oxidasen, hinsichtlich der Anwendungen und der Synthese interessanter Produkte ist industriell bedeutsam. Eine Herausforderung stellt die geringe Löslichkeit von Substraten in wässrigen Medien dar, welche häufig die Limitierung des Prozesses ausmachen. Hierfür bietet die sogenannte Feinblasentechnologie ein hohes Potenzial zur Optimierung des Sauerstoffeintrags durch Verkleinerung der eingebrachten Phasengrenzfläche und höhere Verweilzeiten der Blasen. Um dabei die begasungsspezifischen Effekte, insbesondere die erzeugten Blasengrößen, auf eine biokatalytische Reaktion zu untersuchen, werden detaillierte Kenntnisse bezüglich der Reaktionsparameter wie Stabilität, Temperatur- und pH-Profil des Modellenzymystems benötigt. Es konnten erfolgreich vier Modellenzymssysteme Glucoseoxidase/Katalase, Tyrosinase/Ascorbat, NADH Oxidase/Alkoholdehydrogenase und Cytochrom P450/Glucosedehydrogenase etabliert und für einen Begaservergleich ausgewählt werden. Die optimalen Reaktionsbedingungen wurden ermittelt und hinsichtlich des auf v_{\max} basierenden enzymmengenspezifischen Sauerstoffverbrauchs verglichen. Um die Einschränkung durch geringe Sauerstofflöslichkeit zu umgehen, ist die Optimierung der Sauerstofftransportrate durch Verringerung der Blasengröße der Schlüssel zur Erhöhung der Reaktionsraten. Hierbei konnten verschiedene Fein-, Submilli- und Makroblasenbegaser bezüglich des Stofftransports charakterisiert werden. Im Vergleich zur Feinblasenbegasung resultierte die Begasung mit Makroblasen in einem 25-fachem und die Begasung mit Submilliblasen in einem 12-fachem höheren Gasverbrauch, welches die hohe Effizienz der Feinblasenbegasung bezüglich Gasverbrauch und Stofftransport im Rührkessel unterstreicht. Neben dem begaserspezifischen Stofftransport sind die maximalen Sauerstoffverbrauchsraten und insbesondere die Enzymstabilität im begasten System von entscheidender Bedeutung, um hohe Reaktionsgeschwindigkeiten zu erreichen. In dieser Arbeit konnte ein signifikanter Einfluss der generierten Blasengrößen auf die Enzymstabilität im begasten Rührkessel im direkten Vergleich von Makro- und Feinblasenbegasung für 6 verschiedene Enzyme festgestellt werden. Am Beispiel der Glucoseoxidase konnte erfolgreich demonstriert werden, dass die Feinblasen- im Vergleich zur Makroblasenbegasung bei konstanten $k_L a$ von 160 1/h zu einer Erhöhung der Halbwertzeit von 2,11 h auf 33,4 h um den Faktor 15,8 führte. Weiter wurde festgestellt, dass Scherkräfte, welche durch Rühren, Gasimpuls, Koaleszenz sowie Blasenauflaufen auf das Enzym wirken, durch die Bestimmung des kleinsten durch Energiedissipation erzeugten Wirbel (Kolmogorov-Länge) nicht beeinflusst werden. Dennoch führen die eingebrachten Scherkräfte zu einer Erhöhung der Phasengrenzfläche zusätzlich zu der durch die Begasung generierten Phasengrenzfläche. Infolge dessen kann die Wechselwirkung des Proteins mit der Phasengrenzfläche zur Abnahme der Enzymstabilität führen. Die Wahl des Begasers ist dabei immer eine Abwägung zwischen Steigerung des Stofftransports und Verringerung der Enzymstabilität. Am Beispiel der Gluconolactonsynthese konnte durch Feinblasenbegasung die Ausbeute um 30% und die Sauerstoffökonomie um den Faktor 41 im Vergleich zur Begasung mit Makroblasen gesteigert werden. Ergänzend konnten am Anwendungsbeispiel der L-DOPA Synthese die vorherigen Ergebnisse erfolgreich mit einem unabhängigen zweiten Reaktionssystem reproduziert werden. Dies unterstreicht die hohe Effizienz der Feinblasenbegasung im Hinblick auf die Gasnutzung, ihr enormes

Potenzial zur Reduzierung des Gasverbrauchs und zur Optimierung der Produktivität für Anwendungen in der Biokatalyse.

Abstrakt engl./ dt.

This work is focusing on oxygen as gaseous substrate, in order to compare fine bubble with established macro- and submillibubble aeration techniques and investigates the feasibility for application in biocatalysis. The utilization of fine bubble aeration is demonstrated to be beneficial in view of yield, gas utility, oxygen atom economy, mass transfer performance and enzyme stability. Especially, the enhanced gas utilization and enzyme stability provides a high potential for the optimization of processes in aerated (bio)-catalytic reactions. Due to this, fine bubble technology is offering the possibility to reduce the production costs by reducing process gas streams and the demand of enzymes in industrial biocatalysis.

Im Fokus dieser Arbeit steht Sauerstoff als gas förmiges Substrat, Begasungstechniken mit Fein-, Submilli- und Makroblasen bezüglich der Anwendung und Machbarkeit in der Biokatalyse wurden dafür miteinander verglichen. Die vorteilhafte Anwendung von Feinblasenbegasung konnte anhand der Erhöhung der Ausbeute, der Gasnutzung, der Sauerstoffökonomie, des Stofftransports und der Enzymstabilität demonstriert werden. Insbesondere die erhöhte Gasnutzung und Enzymstabilität verfügt über ein hohes Potenzial für die Optimierung von Prozessen in begasten (bio)-katalytischen Reaktionen. Weshalb die Feinblasentechnologie eine Möglichkeit darstellt, Produktionskosten durch Reduzierung der Prozessgasströme sowie des Enzymbedarfs in der industriellen Biokatalyse zu senken.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	13
1.1	Begasung in der Verfahrenstechnik	14
1.1.1	Stofftransport und Filmtheorie	14
1.1.2	Rührkesselreaktoren und Strömungsregime.....	16
1.2	Fein-, Submilli- und Makroblasen	21
1.3	Enzyme	25
1.3.1	Oxidoreduktasen	25
1.3.2	Michaelis-Menten Kinetik und Enzymdeaktivierung.....	26
1.4	Motivation und Zielsetzung.....	28
2	Material und Methoden	29
2.1	Verwendete Chemikalien, Enzyme und Geräte	29
2.2	Enzymaktivitätsassay.....	31
2.2.1	Glucoseoxidase (GOx) Assay.....	31
2.2.2	NADH-Oxidase (NOX) Assay.....	31
2.2.3	Tyrosinase (TYR) Assay	32
2.2.4	Monooxygenase (BM3 Cytochrom P450 WT) Assay	32
2.2.5	Alkoholdehydrogenase (ADH) Assay	32
2.2.6	Glucosedehydrogenase (GDH 105) Assay	32
2.3	Herstellung von zellfreiem Extrakt der NADH-Oxidase	33
2.4	Fein- Submilli- und Makroblasenbegaser.....	34
2.5	Dynamische Methode zur Bestimmung des $k_L a$ -Wertes und Sauerstoffkonzentrationsmessung.....	35
2.6	Proteinkonzentrationsbestimmung	35
2.7	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	36
2.8	Gaschromatographie (GC).....	37
2.9	Bestimmung der Blasengrößenverteilung mit SOPAT.....	38
2.10	Ultrafeinblasen Generation mit AMB3.....	38
2.11	Nanopartikel-/ Ultrafeinblasenmessung	39
2.12	Reaktions- und Enzymstabilitätsversuche.....	40
2.13	Funktionalisierung und Immobilisierung an Polyamid 12 (PA-12) Partikel.....	41
3	Ergebnisse und Diskussion	42
3.1	Enzym Charakterisierung im nicht begasten System	42
3.1.1	Glucoseoxidase (GOx)/ Katalase (Cat.).....	42
3.1.2	Tyrosinase (TYR)/Ascorbat (Asc.).....	44
3.1.3	NADH Oxidase (NOX)/ Alkoholdehydrogenase (ADH).....	47
3.1.4	BM3 Cytochrom P450 WT (P450)/ Glucosedehydrogenase (GDH 105).....	52
3.1.5	Übergeordnete Diskussion der enzymmengenspezifischen Sauerstoffverbrauchsdaten und Enzymcharakterisierung.....	54
3.2	Untersuchung der begaserspezifischen Stofftransportleistung und Blasengrößenverteilung	55
3.2.1	Begaserspezifischer Stofftransport bei Variation der Begasungsrate.....	56

3.2.2	Vergleich der ausgewählten Begaser hinsichtlich der erzeugten Blasengrößenverteilung bei konstantem $k_L a$	60
3.2.3	Zusammenfassung und übergeordnete Diskussion bezüglich Gasverbrauch und Stofftransportlimitierung	64
3.3	Charakterisierung und Anwendung von Ultrafeinblasen am Beispiel der Glucoseoxidase	69
3.4	Untersuchung der Enzymstabilität im begasten Rührkessel	75
3.4.1	Untersuchung der Enzymstabilität bei Makro- und Feinblasenbegasung	76
3.4.2	Variation der Begasungsrate und Enzymstabilität am Beispiel der Glucoseoxidase	80
3.4.3	Enzymdeaktivierung durch Oxidation und Scherkräfte	82
3.4.4	Intermediäre Zusammenfassung zur Enzymdeaktivierung	89
3.5	Anwendung von verschiedenen Begasungssystemen in präparativen Biotransformationen	90
3.5.1	Untersuchung des Rührer-Leistungseintrags auf die Produktivität einer enzymatischen Himbeerketonsynthese	91
3.5.2	Anwendung der Feinblasentechnologie am Beispiel der Gluconolactonsynthese	95
3.5.3	Anwendung der Feinblasentechnologie am Beispiel einer L-DOPA Synthese sowie Selektivitätsoptimierung	100
3.5.4	Immobilisierung von Glucoseoxidase (GOx) und Tyrosinase (TYR)	104
3.5.5	Fazit	107
4	Übergeordnete Diskussion und Ausblick	108
5	Zusammenfassung	112
6	Anhang	115
7	Literatur	118

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien	29
Tabelle 2: Verwendete Enzyme und Proteine.....	29
Tabelle 3: Verwendete Geräte	30
Tabelle 4: Liste der verwendeten Begaser	34
Tabelle 5: Reaktionsbedingungen der Oxidasen.....	54
Tabelle 6: Vergleich der enzymmengenspezifischen Sauerstoffverbrauchsraten für die Oxidasen.....	55
Tabelle 7: Vergleich der BSD relevanten Parameter der Begaser bei konstantem $k_L a$	64
Tabelle 8: Berechnung der <i>OTR</i> für die Reaktionstemperatur der untersuchten Oxidasen bei konstantem $k_L a$.	65
Tabelle 9: Vergleich der enzymmengenspezifischen Sauerstoffverbrauchsraten und der enzymmengenspezifischen, modifizierten Damköhlerzahl der Oxidasen	67
Tabelle 10: Berechnung zur Blasengrößenmessung für die UFB	70
Tabelle 11: GOx, NOX34 und Tyrosinase Stabilität im begasten STR.....	77
Tabelle 12: ADH97L, GDH 105 und BM3 Cytochrom P450 Stabilität im begasten STR.....	79
Tabelle 13: Gravy-Wert der verwendeten Enzyme aufgelistet mit ansteigender Hydrophobizität.....	88
Tabelle 14: Rührercharakterisierung anhand dimensionsloser Kennzahlen.....	93
Tabelle 15: Berechnung der Sauerstofflimitierung für ADH97L/NOX34 Reaktionen.....	94
Tabelle 16: Begaserspezifische, eingebrachte Oberfläche ohne Variation des Leistungseintrags	95

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Konzentrationsprofile in der Gas-/Flüssigkeitsgrenzschicht nach der Zweifilmtheorie	16
Abb. 2: Newton-Zahl in Abhängigkeit von der Reynolds-Zahl für verschiedene Rührertypen	18
Abb. 3: Schema der unterschiedlichen Strömungsprofile von axial- und radialmischenden Rührern .	19
Abb. 4: Schema der Blasenbildung und Blasenablösung (Räbiger et al. 2013).....	21
Abb. 5: Charakteristische Größenklassen von Gasblasen	23
Abb. 6: Schema der idealen Eigenschaften von Makro-, Submilli- und Feinblasen bezüglich Einlösung und Auftriebsgeschwindigkeit	24
Abb. 7: Berechnung des Young-Laplace-Drucks in den Blasen und der SV (volumenspezifische Oberfläche) in Abhängigkeit von der Blasengröße.....	24
Abb. 8: Einlösen von Feinblasen durch hohe Laplace-Drücke „Feedback-Loop“.....	25
Abb. 9: Kalibriergerade mit BSA nach Pierce Assay	37
Abb. 10: HPLC-Kalibrierung von L-Tyrosin.....	37
Abb. 11: GC-Kalibrierung von Himbeerketon.....	38
Abb. 12: Versuchsaufbau der Blasengrößenmessung mit SOPAT.....	39
Abb. 13: Funktionsprinzip AMB3 Mikroblasengenerator.....	40
Abb. 14: Schema und Bild des Versuchsaufbaus der Reaktions- und Enzymstabilitätsversuche	41
Abb. 15: Reaktionsschema des Glucoseoxidase (GOx)/Katalase (Cat.) Systems	43
Abb. 16: Michael-Menten Kinetik für die GOx VII.....	44
Abb. 17: Charakterisierung einer Glucoseoxidase (GOx) Typ VII bezüglich pH, enzymmengenspezifischen Sauerstoffverbrauch und Temperaturstabilität	45
Abb. 18: Reaktionsschema des Tyrosinase (TYR)/Ascorbat (Asc) Reaktionssystems.....	45
Abb. 19: Michael-Menten Kinetik für die Tyrosinase.....	46
Abb. 20: Charakterisierung einer Tyrosinase-Reaktion.....	47
Abb. 21: Sauerstoffkonzentration Abb. A) und Selektivität (S) Abb B) bei Variation der Tyrosinasekonzentration im nicht begasten Reaktor	47

Abb. 22: Reaktionsschema des NADH Oxidase (NOX)/ Alkoholdehydrogenase (ADH) Systems	49
Abb. 23: Michael-Menten Kinetik für die ADH97L	50
Abb. 24 : ADH97L Charakterisierung mit Photometer	50
Abb. 25: NOX Charakterisierung	51
Abb. 26: Reaktionsschema BM3 Cytochrom P450 WT (Cytochrom P450)/ Glucosedehydrogenase (GDH 105) System	53
Abb. 27: Vergleich der Stofftransportleistung in Abhängigkeit der Begasungsrate und Begaserart....	59
Abb. 28: Vergleich des Gasverbrauchseffektivitätsfaktors bezogen auf Makroblasenbegasung	61
Abb. 29: Bestimmung der Blasengrößenverteilung (BSD) von 1 μm SPG Membran und 2 μm Sinterfritte	62
Abb. 30: Darstellung der enzymmengenspezifischen modifizierten Damköhlerzahl für die $k_L a$ -Messungen des offenen Rohres am Beispiel der Oxidasen.....	67
Abb. 31: Begasercharakterisierung bezüglich Stofftransportlimitierung des GOx-Systems	68
Abb. 32: Begaserspezifischer Gasnutzungsvergleich bezogen auf den übertragenen Sauerstoff	69
Abb. 33: Blasenkonzentrationsmessung über die Generationszeit des AMB3	71
Abb. 34: Inkubation der UFB-Suspension und Einfluss der Zentrifugation	72
Abb. 35: Effekt der Variation von Temperatur und pH Wert auf die Stabilität einer UFB-Suspension	73
Abb. 36: Vergleich der Anwendung von suspendierten UFB in einer mit Feinblasen (Mikroblasen) begasten Gluconolactonsynthese.....	74
Abb. 37: Berechnung der Einlösezeit mittels des Laplace-Drucks nach Epstein und Plesset	75
Abb. 38: Enzymstabilität der GOx, NOX34 und Tyrosinase bei Fein- und Makroblasenbegasung	78
Abb. 39: Enzymstabilität der ADH97L, GDH 105 und BM3 Cytochrom P450 bei Fein- und Makroblasenbegasung.....	79
Abb. 40: Untersuchung der Enzymstabilität einer Glucoseoxidase bei Variation der eingestellten Stofftransportleistung $k_L a$	82
Abb. 41: Vergleich der Enzymstabilitäten der ADH97L mit Luft/N ₂	85
Abb. 42: Enzymstabilität der ADH97L bei unterschiedlicher Scherbeanspruchung im begasten Rührkessel.....	87

Abb. 43: Vergleich der Enzymstabilitäten im feinblasenbegasten, makroblasenbegasten und unbegasten System.....	90
Abb. 44: Reaktionsschema und Konzept der Himbeerketonsynthese.....	92
Abb. 45: Untersuchung der Ausbeute einer Himbeerketon-Synthese bei Variation des Leistungseintrags, des Strömungsprofils und der eingebrachten Blasengröße	95
Abb. 46: Reaktionsschema und Konzept des Begaservergleichs am Beispiel der GOx katalysierten Umsetzung von Glucose zu Gluconolacton	97
Abb. 47: Begaservergleich bezüglich der Ausbeute einer GOx katalysierten Gluconolactonsynthese bei konstanter Begasungsrate	97
Abb. 48: Zeiteffektivitätsfaktor η_{op} bei konstantem $v_{vm} = 0,67$	98
Abb. 49: Begaservergleich bezüglich der Ausbeute einer GOx katalysierten Gluconolactonsynthese bei konstanter Stofftransportrate	99
Abb. 50: Vergleich der Zeiteffektivitätsfaktor η_{op}	99
Abb. 51: Vergleich der Sauerstoffatomökonomie bei konstantem $k_L a$	101
Abb. 52: Reaktionsschema der chemo-enzymatischen L-DOPA Synthese mit enzymatischer Oxidation von L-Tyrosin durch Tyrosinase (TYR) und chemischer Reduktion des Folgeproduktes zum Produkt L-DOPA durch Ascorbat (Asc).	102
Abb. 53: Vergleich der Fein- und Makroblasenbegasung mit 0,05 mg/mL Tyrosinase, A: Umsatz und B: Selektivität (S) der L-DOPA-Synthese	103
Abb. 54: Vergleich der Fein- und Makroblasenbegasung mit 0,013 mg/mL Tyrosinase, A: Umsatz und B: Selektivität (S) der L-DOPA-Synthese	104
Abb. 55: Wiederholte Batchversuche der immobilisierten Tyrosinase am Beispiel der L-DOPA Synthese.....	105
Abb. 56: Vergleich der Reaktionsselektivität von gelöster und immobilisierter Tyrosinase	106
Abb. 57: Wiederholte Batchversuch der immobilisierten Tyrosinase am Beispiel der L-DOPA Synthese.....	107
Abb. 58: Aktivitätsbestimmung einer Glucoseoxidase bei Variation der Pufferkonzentration	116
Abb. 59: Aktivitätsbestimmung einer Tyrosinase bei Variation der Pufferkonzentration	116
Abb. 60: Bestimmung der Halbwertszeit bei Variation der Temperatur für eine Tyrosinase	116

Abb. 61: Bestimmung der Aktivität bei Variation des pH und der Temperatur einer Tyrosinase	117
Abb. 62: Aktivitätsbestimmung einer Alkoholdehydrogenase (ADH) bei Variation der Pufferkonzentration.....	117
Abb. 63: Aktivitätsbestimmung einer NADH-Oxidase (NOX34) bei Variation der Pufferkonzentration	117
Abb. 64: Aktivitätsbestimmung einer NADH-Oxidase (NOX-Opp.) bei Variation der Pufferkonzentration.....	118

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

\dot{a}	Oberflächenerneuerungsrate (m^2/min)
a_{Effektiv}	Effektive Oberfläche (m^2)
ADH	Alkoholdehydrogenase
BSD	Blasengrößenverteilung
c	Konzentration (mmol/L)
c^*	Sättigungskonzentration (mmol/L)
Da	Damköhlerzahl
Da^*	Modifizierte Damköhlerzahl
d_B	Blasendurchmesser (mm)
d_R	Rührerdurchmesser (mm)
d_N	Lochöffnung (mm)

d_{av}	Mittlerer Durchmesser (mm)
d_{32}	Sauterdurchmesser (mm)
g	Fallbeschleunigung (m/s^2)
GDH	Glucosedehydrogenase
GOx	Glucoseoxidase
H	Henry-Koeffizient ($mol/L \cdot atm$)
h_L	Lochabstand (mm)
h	Reaktorhöhe (m)
k_L	Flüssigseitiger Stofftransportkoeffizient (m/s)
$k_{L,a}$	Volumenspezifischer Stofftransportkoeffizient (1/s)
K_m	Michaelis-Menten Konstante (mM)
n_R	Rührerdrehzahl (rpm)
NOX	NADH Oxidase
P450	P450 Monooxygenase
p_{atm}	atmosphärischer Druck (kPa)
Δp	Druckdifferenz (kPa)
P	Leistung (Watt)
SV	volumenspezifische Oberfläche (m^{-1})
STR	Rührkesselreaktor
T	Temperatur ($^{\circ}C$)

TYR	Tyrosinase
t	Zeit (min)
ρ	Dichte (kg/m^3)
σ	Oberflächenspannung (mN/m)
U	Enzymaktivität in Unit ($\mu\text{mol/min}$)
vvm	Flüssigkeitsvolumenspezifische Begasungsrate (min^{-1})
V_{Medium}	Volumen des Reaktionsmediums (L)
v	Aktivität ($\mu\text{mol/min}$ oder U)
τ	Verweilzeit (s)
φ	Formfaktor (-)
ρ	Dichte (kg/m^3)
ε	Gasgehalt (%)
σ	Oberflächenspannung (mN/m)
η	Dynamische Viskosität (mPa*s)
η_{op}	Zeiteffektivitätsfaktor (-)
η_{EH}	Gasnutzungseffizienzfaktor(-)
$\eta_{\text{O}_2 \text{ economy}}$	Sauerstoffatomökonomie (%)

Dimensionslose Kennzahlen:

Fr Froudzahl (-)

Ne Newtonzahl (-)

Re Reynoldzahl (-)

We Weberzahl (-)

1 Einleitung

Die Verwendung von Gas als Substrat findet breite Anwendung bei der Synthese von Bulk-, Fein- und Spezialchemikalien in der klassischen chemischen, biochemischen und pharmazeutischen Industrie (Chapman et al. 2018; Terasaka, K. Hirabayashi, Ai et al. 2011). Sauerstoff wird z.B. als Oxidationsmittel in ganz unterschiedlichen Anwendungen eingesetzt. Diese Anwendungen reichen von enzymatischen Oxidationsreaktionen, über die biologische aerobe Abwasserbehandlung, bis hin zur aeroben Fermentation (Chapman et al. 2018; Hone and Kappe 2018; Terasaka, K. Hirabayashi, Ai et al. 2011). Die Luft, die wir atmen, enthält 21 Vol.-% Sauerstoff. Sie stellt eine vergleichsweise kostengünstige und einfach zugängliche natürliche Sauerstoffquelle für die Anwendung in Oxidationsreaktionen dar (Toftgaard Pedersen et al. 2017). Um Sauerstoff für enzymatische Oxidationsreaktionen zugänglich zu machen, muss dieser in einer flüssigen Phase gelöst werden. (Gemoets et al. 2016; Woodley 2019). Jedoch ist die Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser mit 0,256 mM (bei 25°C, pH 7, 101,3 kPa) sehr gering, weshalb eine kontinuierliche Zufuhr durch Begasung benötigt wird. Deshalb gilt den Biooxidationsreaktionen ein besonderes Interesse in dieser Arbeit. Auf Grund ineffizienter Begasungssysteme stellt die Stofftransportrate des gasförmigen Substrats in die flüssige Phase häufig die Limitierung der Reaktionsgeschwindigkeit dar (Chapman et al. 2018; Garcia-Ochoa and Gomez 2009; Woodley 2019). Jedoch ist die Steigerung des Stofftransports durch Erhöhung des Energieeintrags und der Begasungsrate bei etablierten Begasungstechniken, wie z.B. dem Siebboden, nur begrenzt möglich (Mersmann et al. 1990). Eine Erhöhung der Sauerstofftransportleistung durch den Einsatz neuer effizienter Begasungstechniken, welche eine große Phasengrenzfläche erzeugen, ist daher ein essentieller Bestandteil der Prozessoptimierungen (Lee 2020b; Lindeque and Woodley 2020; Woodley 2019). Eine weitere Möglichkeit den Stofftransport zu erhöhen, ist die Begasung mit reinem Sauerstoff, sowie mit sauerstoffangereicherter Luft (Lee 2020a, 2020b; Lindeque and Woodley 2020). Neben dem Stofftransport stellen der Energieeintrag (Schereintrag) und die Katalysatorstabilität, häufig eine weitere Limitierung in der Prozessoptimierung dar (Böhm et al. 2019; D'Imprima et al. 2019; Fitschen et al. 2019). Eine etablierte Begasungsmethode ist die klassische Makroblasenbegasung mit Blasendurchmessern im Bereich von 1 -5 mm, welche in Rührkesselreaktoren oder Blasensäulen eine breite Anwendung findet (Mafrá et al. 2015; Nienow 2003; Sánchez Mirón et al. 2000; Wu et al. 2020). Beispiele für eine solche Anwendung sind die Butanol-Fermentation (Kujawska et al. 2015) oder die Veresterung von Fettsäuren (Hilterhaus et al. 2008). Dagegen ist die Stofftransportrate für Oxidationsreaktionen bei der Makroblasenbegasung häufig durch die geringe Phasengrenzfläche, sowie den hohen benötigten Energieeintrag zur Desintegration von Blasen in gerührten Systemen limitiert (Cappello et al. 2020; Gaddis 2013; Linek et al. 2012; Thomas et al. 2020; Toftgaard Pedersen et al. 2017). Daher besteht ein Bedarf an neuen Begasungstechnologien für biokatalytische Prozesse, die sich durch eine hohe Stofftransportrate, einen geringen Druckabfall, eine geringe Scherbeanspruchung und eine verringerte Schaumneigung auszeichnen (Terasaka, K. Hirabayashi, Ai et al. 2011). Neue Technologien wie Hochdruckanwendungen (Bolivar et al. 2019; Xing et al. 2014), blasenfreie Begasung (Kaufhold et al. 2012; Rissom et al. 1997) und Begasung mit Feinblasen (Matthes et al. 2020; Ohde et al. 2019; Thomas et al. 2020; Tsuge 2014) sind daher vielversprechend bei der Entwicklung neuer Prozesse und der Optimierung bereits etablierter Prozesse in der Industrie.

1.1 Begasung in der Verfahrenstechnik

Dieses Kapitel ist der Beschreibung der theoretischen Grundlagen, die für die Interpretation und das Verständnis der Ergebnisse dieser Arbeit erforderlich sind, gewidmet. Der Stofftransport und die Bedeutung von Rührern zur Einstellung verschiedener Strömungsregime im Rührkessel werden vorgestellt. Weiter wird der Vorgang der Blasenbildung an einzelnen und mehreren Lochöffnungen sowie an porösen Sinterfritten zur Erzeugung von Blasen im Fein-, Submilli- und Makrobereich vorgestellt. Insbesondere auf die verschiedenen Eigenschaften von Gasblasen unterschiedlicher Größe, auf ihr Verweilzeitverhalten, den Stofftransport sowie ihr Mischverhalten wird im Folgenden eingegangen. Weiter werden Biokatalysatoren und deren Bedeutung für Prozesse in der Industrie beschrieben.

1.1.1 Stofftransport und Filmtheorie

Beim direkten Phasenkontakt in Gas/Flüssigkontakoren wie dem begasten Rührkessel und der Blasensäule, kommt es zum Einlösen oder Entfernen einer Komponente aus oder in die flüssige Phase. Dabei geht die Gaskomponente so lange in die flüssige Phase über, bis die Flüssigkeit gesättigt ist und sich ein thermodynamisches Gleichgewicht unter konstanten Bedingungen wie Druck, Temperatur etc. einstellt (Atkins et al. 2013). Der Vorgang des Einlösen (Absorption) eines Gases (Absorbens) in einer flüssigen Phase (Absorbat) wird im Allgemeinen als physikalische Absorption bezeichnet (Lewis and Whitman 1924). Hierbei beschreibt die physikalische Absorption das Zufügen oder Entfernen einer gasförmigen Komponente entweder vom Gas in die Flüssigkeit oder umgekehrt. Mittels des Massenerhaltungsgesetzes wird der Stofftransport in Gleichung (1) mathematisch beschrieben (Baehr and Stephan 2013).

$$\frac{\partial c_n}{\partial t} = - \left(\frac{\partial u_x c_n}{\partial x} + \frac{\partial u_y c_n}{\partial y} + \frac{\partial u_z c_n}{\partial z} \right) + D_n \cdot \left(\frac{\partial^2 c_n}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c_n}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 c_n}{\partial z^2} \right) + P_n \quad (1)$$

Hierbei ist u der Geschwindigkeitsvektor, D_n (m^2/s) der Diffusionskoeffizient und P_n der Produktionsterm. Somit wird der Stofftransport einer Komponente n aus der Bilanzierung von Konvektions-, Diffusions- und Produktionsterm an einem beliebigen Volumenelement durch Gleichung (1) beschrieben. Im Fall der Einlösung einer gasförmigen Komponente wie Sauerstoff in Wasser liegt keine Änderung der stofflichen Eigenschaften vor, wodurch der Produktionsterm P_n in Gleichung (1) entfällt. Mittels des in Gleichung (1) beschriebenen Zusammenhangs kann der Stofftransport beliebiger Gas/Flüssigkontakoren beschrieben werden (Baehr and Stephan 2013). Jedoch führt die Lösung dieser Gleichung für komplexe Geometrien, Systeme und Strömungsverhältnisse, oft zu einem erheblichen Aufwand, weshalb in der Praxis häufig auf vereinfachte Stofftransportmodelle, wie die Filmtheorie, zurückgegriffen wird. Im Jahre 1855 beschrieb Adolf Fick die Diffusion in einer Grenzschicht zwischen zwei Phasen, anhand der Annahme, dass ein von der Konvektion unabhängiger Film zwischen zwei Phasen besteht und die Molekülbewegung (Diffusion) innerhalb dieses Films lediglich von der Bewegung der Moleküle in Richtung eines Konzentrationsgefälles abhängt (Fick 1855). Mit dem ersten Fick'schen Gesetz wird der Stofftransportstrom pro Phasengrenzfläche J_n ($mol/m^2/s$) berechnet. Dieser resultiert aus dem Konzentrationsunterschied (Konzentrationsgradient) an einer differentiell betrachteten Stelle des

Films x und dem Diffusionskoeffizienten D_n (m^2/s). Der Zusammenhang wird durch folgende Gleichung (2) beschrieben (Fick 1855).

$$J_n = -D_n \left(\frac{\partial c_n}{\partial x} \right) \quad (2)$$

Jedoch umfasst das erste Fick'sche Gesetz nur den eindimensionalen Stofftransport, wodurch dreidimensionale Konzentrationsprofile in der Grenzschicht von z.B. Blasen durch diese vereinfachte Gleichung nicht exakt beschrieben werden können (Baehr and Stephan 2013). Neben der Filmtheorie sind die Penetrations-, Oberflächenerneuerungs- und Grenzschichttheorie als weitere vereinfachte Modelle zur Beschreibung des Stofftransports zu nennen (Atkins et al. 2013). Im Folgenden wird die Filmtheorie vorgestellt.

Die von Lewis und Whitman 1924 vorgestellte Filmtheorie beruht auf der Annahme, dass zwischen der Gas- und Flüssigphase die Diffusion in einer ruhenden Grenzschicht mit einer klaren Phasentrennung zwischen den Phasen stattfindet (Lewis and Whitman 1924). Besonders für Gase mit schlechter Löslichkeit (wie Sauerstoff) gilt, dass die Absorptionsrate, resultierend aus dem Gradienten in der jeweiligen Gasgrenzschicht δ_G und Flüssiggrenzschicht δ_L , sehr niedrig ist. Deshalb wird nur ein geringer Konzentrationsunterschied der Komponente n im Film benötigt, um im flüssigseitigen Film an der Phasengrenzfläche die Sättigungskonzentration c_n^* zu erreichen (Lewis and Whitman 1924). Aus diesem Grund hängt für Gase mit schlechter Löslichkeit die Einlösung in eine Flüssigkeit lediglich von dem Konzentrationsgradienten aus Sättigungskonzentration c_n^* zur Konzentration $c_{n,L}$ in der ideal gemischten flüssigen Phase ab (Lewis and Whitman 1924).

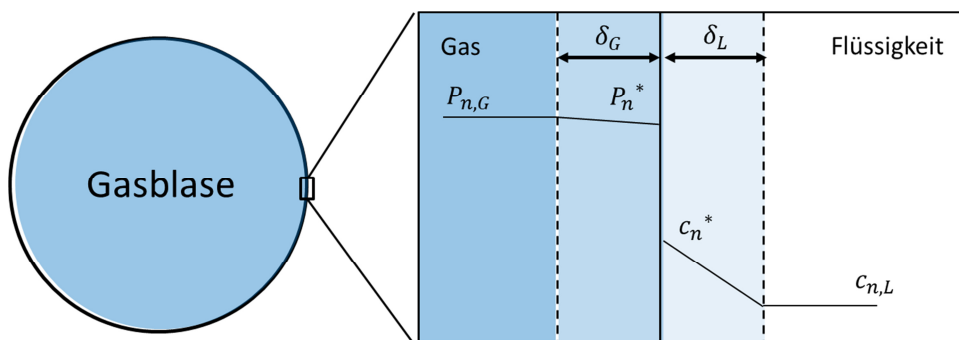


Abb. 1: Konzentrationsprofile in der Gas-/Flüssigkeitsgrenzschicht nach der Zweifilmtheorie

Der Konzentrationsgradient in der flüssigen Phase ist abhängig vom Partialdruck $P_{n,G}$ (Pa) der Komponente n in der Gasphase. Mittels des Gesetzes von Henry wird der Zusammenhang zwischen Sättigungskonzentration c_n^* (mol/L) als Funktion des Partialdrucks $P_{n,G}$ (Pa) und der Henry-Konstanten H_n (mol/L/Pa) wie folgt dargestellt (Henry 1803).

$$c_n^* = \frac{P_{n,G}}{H_n} \quad (3)$$

Unter den Annahmen $P_n = 0$ (Produktionstherm) und $\frac{\partial c_n}{\partial t} = 0$ (quasi-stationäre Bedingungen), kann die Zweifilmtheorie mittels des Fick'schen Gesetzes wie folgt beschrieben werden.

$$J_n = -D_n \left(\frac{\Delta c_n}{\delta_L} \right) \quad (4)$$

Dabei ist $\Delta c_n = c_{n,L} - c_n^*$ (mol/L) der Konzentrationsgradient und δ_L (m) die Grenzschichtdicke. Somit wird der flüssigkeitsseitige Stoffübergangskoeffizient k_L (m/s) definiert.

$$J_n = -k_L \cdot \Delta c_n \text{ und } k_L = \frac{D_n}{\delta_L} \quad (5)$$

Die Grenzschichtdicke ist häufig nicht bekannt. Um dieses Problem zu lösen, kann der Ansatz von Lewis und Whitman zur Anwendung kommen (Lewis and Whitman 1924). Durch Kenntnis der auf das Gasvolumen bezogenen Phasengrenzfläche a (m²/m³) und des Volumens der flüssigen Phase V_{Medium} (L) kann aus Gleichung (5) die Gleichung (6) erhalten werden.

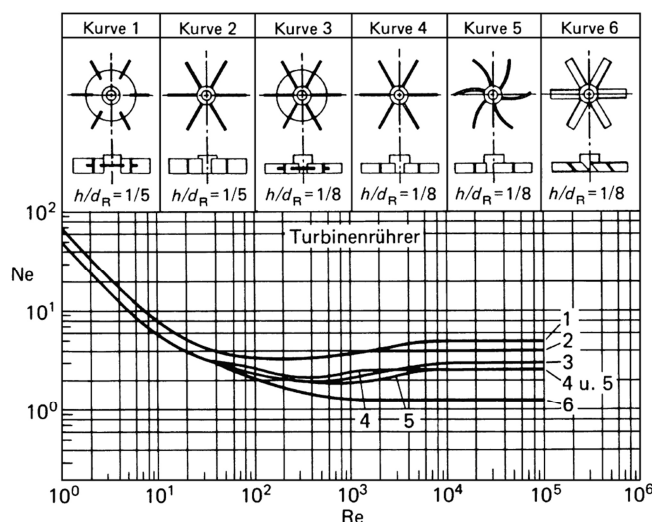
$$\dot{n} = k_L \cdot a \cdot \Delta c_n \cdot V_{Medium} \quad (6)$$

Die Konzentration der Komponente n ist messtechnisch zugänglich. Daher kann der häufig verwendete volumenbezogene Stoffübergangskoeffizient $k_L a$ -Wert (1/h) unter konstanten äußeren Bedingungen experimentell bestimmt werden (Garcia-Ochoa and Gomez 2009).

1.1.2 Rührkesselreaktoren und Strömungsregime

Als Mehrphasen-Kontaktoren finden die Blasensäule und der Rührkesselreaktor eine breite Anwendung in der Industrie (Bashiri et al. 2016; Dias Gomes et al. 2019a). Da in dieser Arbeit ausschließlich Rührkesselreaktoren zur Anwendung gebracht werden, wird nur auf den Leistungseintrag und das Strömungsfeld im Rührkesselreaktor eingegangen. Der Rührkesselreaktor ist weit verbreitet. Durch die gute Mischleistung und den effizienten Phasenkontakt ist der Rührkesselreaktor in biochemischen und pharmazeutischen Prozessen zur diskontinuierlichen Chargenproduktion immer noch der vorwiegend eingesetzte Reaktortyp. Er findet in einer Vielzahl von industriellen Verfahren Anwendung. Beispiele dafür sind chemische und biochemische Prozesse wie die Polymerisation, Oxid-Chlorierung, Fermentation, enzymatische Reaktion, Abwasserbehandlung (Bashiri et al. 2016).

Im Rührkesselreaktor hängen die Mischleistung, der Schereintrag, der Leistungseintrag sowie das Strömungsregime vom eingesetzten Rührertyp ab. Die Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten Rührer erfolgte auf der Basis des Leistungseintrags (P/V). Der Leistungseintrag des Rührers kann bei einphasigen Systemen und newtonschen Flüssigkeiten als Funktion der Reynoldszahl Re (7), der Newton-Zahl Ne (8) und der Froud-Zahl beschrieben werden (Chmiel 2011; Gaddis 2013). Hierbei kann die Froud-Zahl Fr in Rührkesselreaktoren vernachlässigt werden, wenn die Thrombenbildung (wie auch in dieser Arbeit) durch den Einsatz von Strömungsbrechern unterdrückt wird (Gaddis 2013). Folglich werden die genannten dimensionslosen Kennzahlen eingeführt.



Reynolds-Zahl:

$$Re = \frac{n \cdot d_R^2 \cdot \rho}{\eta} \quad (7)$$

Newton-Zahl:

$$Ne = \frac{P}{\rho \cdot n^3 \cdot d_R^5} \quad (8)$$

Abb. 2: Newton-Zahl in Abhängigkeit von der Reynolds-Zahl für verschiedene Rührertypen nach Bates *et al.* (Bates et al. 1963)

Die Reynolds-Zahl (Re) ist eine dimensionslose Kennzahl, welche das Verhältnis von Trägheits- zur Zähigkeitskraft innerhalb eines Fluids beschreibt. Die Re -Zahl kann durch Einführung der Rührerdrehzahl n (1/s) und des Durchmessers des Rührers d_R zur Beschreibung des Strömungszustandes am Rührer wie in Gleichung (7) angepasst werden. Im Rührkesselreaktor wird ab einer $Re \geq 10^4$ von einem turbulenten Strömungsregime am Rührer ausgegangen (Zlokarnik 2012). Weitere Variablen sind die dynamische Viskosität η (Pa s) und die Dichte der Flüssigkeit ρ (g/m³).

Die Newton-Zahl (Ne) beschreibt das Verhältnis von eingebrachter Leistung P (Watt) zur Trägheitskraft der Flüssigkeit (8) (Chmiel 2011). Wird der Leistungseintrag durch Erhöhung der Rührerdrehfrequenz n_R bis in den turbulenten Bereich (ab einem Wert von $Re \geq 10^4$) gesteigert, so nimmt die Ne -Zahl in Abhängigkeit vom Rührertyp einen konstanten Wert an (siehe Abb. 2) (Bates et al. 1963; Zlokarnik 2012). Hierbei ist der Leistungseintrag im turbulenten Bereich unabhängig von der Ne -Zahl (Gaddis 2013). Zur Bestimmung der Ne -Zahl können die experimentell bestimmten Leistungskurven von Bates *et al.* genutzt werden (Abb. 2). Aus Abb. 2 kann ab einem Wert von $Re \geq 10^4$ die dann konstante Ne -Zahl für den Scheibenrührer und den Schrägblattrührer abgelesen werden. Die Gleichung (8) kann zur Berechnung des Leistungseintrags verwendet werden (Baker et al. 2014). Das erzeugte Strömungsfeld des Scheiben- und Schrägblattrührers ist für den Einsatz in einer Enzymkatalyse von Interesse (siehe Abb. 3). Rührer können auf Grund ihrer Strömungseigenschaften als axial und radial klassifiziert werden.

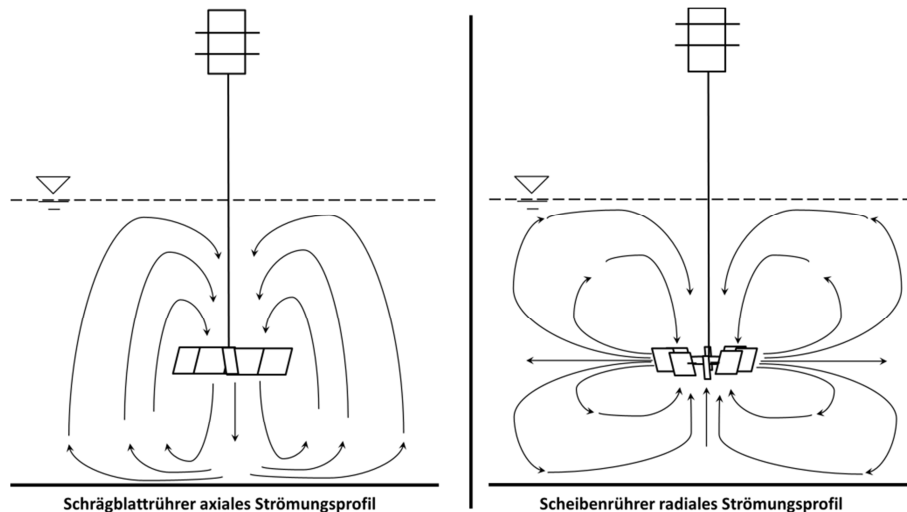


Abb. 3: Schema der unterschiedlichen Strömungsprofile von axial- und radialmischenden Rührern

Wie in Abb. 3 dargestellt, zeichnet sich das axiale Strömungsprofil des Schrägblattrührers durch eine Flüssigkeitsumwälzungszone im Reaktor aus. Der in dieser Arbeit eingesetzte Schrägblattrührer fördert das Reaktionsmedium in axialer Richtung, so dass eine Umlenkung der Strömung am Reaktorboden erfolgt (siehe Abb. 3). Auf Grund der geringen Ne -Zahl von 1,36 können axialmischende Rührer für scherempfindliche Suspensionen, wie auch zur Suspendierung von Enzymimmobilisaten eingesetzt werden (Bates et al. 1963; Harrison et al. 2020; Metzner and Otto 1957).

Der zweite Rührertyp in dieser Arbeit ist der Scheibenrührer, welcher sich durch ein radiales Strömungsprofil auszeichnet (siehe Abb. 3). Durch axiales Ansaugen und radiale Förderung der Flüssigkeit in Richtung der Reaktorwand werden zwei Flüssigkeitsumwälzungszonen im Reaktor erzeugt. Der Scheibenrührer erzeugt auf Grund des Rührerblattanstellwinkels von 90° hohe Schergeschwindigkeiten durch Umlenkung des Mediums (Chmiel 2011; Metzner and Otto 1957). Besonders durch die hohen lokalen Scherkräfte am Rührerblatt findet der Scheibenrührer zur Desintegration des Gaststroms und Erhöhung des Stofftransports in begasten Rührkesseln breite Anwendung (Chmiel 2011; Parthasarathy and Ahmed 1994).

Metzner und Otto beschreiben die gemittelte Scherrate $\dot{\gamma}$ über den gesamten Rührkessel als proportional zur Rührerdrehzahl (1/s) und Scherkonstante K_s (Metzner and Otto 1957; Wu et al. 2006). Der K_s ist eine dimensionslose Konstante, welche von der Geometrie des Rührers abhängt (Torrez and André 1998; Wu et al. 2006).

$$\dot{\gamma} = K_s \cdot n \quad (9)$$

Nach Wu *et al.* werden der K_s Wert für den Scheibenrührer mit $\sim 11,5$ (Torrez and André 1998) und für den Schrägblattrührer mit $\sim 5,4$ (Weetman and J. 1988) angegeben (Wu et al. 2006). Die Flow-Zahl ist das Verhältnis aus dem vom Rührer geförderten Volumenstrom \dot{V}_R (m^3/s) zur Drehzahl n (1/s) und zum Durchmesser d (m) des Rührers (Zhang et al. 2018). Diese dimensionslose Kennzahl findet Anwendung in der Charakterisierung von Axial- und Radialrührern.

$$F_l = \frac{\dot{V}_R}{n \cdot d_R^3} \quad (10)$$

Für die Berechnung der Flow-Zahl wird in Wu *et al.* eine einfache Korrelation aus experimentellen Daten der Scherkonstante K_s als Funktion der Flow-Zahl beschrieben (Wu *et al.* 2006). Damit wird ein linearer Zusammenhang zwischen Flow-Zahl und Scherkonstante des Rührers hergestellt (Wu *et al.* 2006). Auf dieser Basis kann nach Wu *et al.* die K_s in Annäherung wie folgt bestimmt werden.

Für axial mischende Rührer:

$$K_s \approx 7 \cdot F_l \quad (11)$$

Für radial mischende Rührer:

$$K_s \approx 14 \cdot F_l \quad (12)$$

Zur weiteren Charakterisierung der verwendeten Rührer kann die Effektivität (Förderleistungseffizienz) η_R definiert werden (Zhang *et al.* 2018):

$$\eta_R = \frac{F_l}{Ne} \quad (13)$$

η_R ermöglicht den Vergleich der genannten Rührertypen bezüglich der Energieeffizienz, wenn im Rührkessel turbulente Bedingungen angenommen werden. Neben der Energieeffizienz ist die Fähigkeit, Gasblasen durch hohe lokale Scherkräfte zu dispergieren, vor allem für die Begasungen mit Makroblasen von Vorteil. Besonders der Scheibenrührer eignet sich durch seinen hohen Energieeintrag am Rührer mit $Ne = 5$ zur effektiven Desintegration von Blasen (Bates *et al.* 1963; Matthes *et al.* 2020; Zlokarnik 2012).

1.1.2.1 Blasenbildung

Auf Grund der geringen Löslichkeit von Sauerstoff ist dessen kontinuierliche Zufuhr mittels Begasung unabdingbar, um hohe Reaktionsraten in biokatalytischen Prozessen zu erreichen. Durch das Dispergieren des Gasstroms können große Oberflächen und hohe Stofftransportraten sichergestellt werden. In der industriellen Anwendung werden hierzu häufig hohe Durchsätze der Begasung im Strahlgas-Bereich gewählt (Räbiger *et al.* 2013). Dabei führen die Trägheitskräfte zu einer Desintegration der primär gebildeten Blasen kurz nach der Blasenbildung. Als Folge des Strahlgasens wird die Gasphase dispergiert und damit eine hohe Phasengrenzfläche erzeugt (Räbiger *et al.* 2013). Die Gaszufuhr kann durch eine Vielzahl von Begasern, vom offenen Rohr mit einer Öffnung und gelochten Siebböden, bis hin zur fein porösen Sinterfritten, realisiert werden. Die Blasengröße und Bildungsfrequenz werden durch den Lochdurchmesser, die Durchflussrate des Gases, die Oberflächenspannung, die Viskosität der Flüssigkeit und den Dichteunterschied zwischen der Flüssigkeit und dem Gas bestimmt (Kazakis *et al.* 2008b; Mersmann 1977). Neben den Flüssigkeitseigenschaften und der Gasrate ist die Größe der Lochöffnung entscheidend für die erzeugte Blasengröße. Im Fall von mehreren Lochöffnungen wirkt sich zusätzlich der Lochabstand auf

die erzeugte Blasengröße aus (Mersmann 1977). Besonders interessant ist hierbei der Übergang von Primärblasen- zur Sekundärblasenbildung, welche durch die dimensionslose Weber- und Froud-Zahl beschrieben werden.

Die Weber-Zahl (We) beschreibt das Verhältnis von der Trägheitskraft zur Oberflächenkraft (Mersmann 1977). In Gleichung (14) ist u_N die Geschwindigkeit in der Lochöffnung (m/s), d_N die Lochöffnung (m), ρ die Dichte (kg/m^3) und σ die Oberflächenspannung (N/m). Hierbei kann die We -Zahl entweder mit der Dichte des Gases ρ_G zu We_G oder der Flüssigkeitsdichte ρ_L zu We_L gebildet werden.

$$We = \frac{u_N^2 \cdot d_N \cdot \rho}{\sigma} \quad (14)$$

Die Froud-Zahl (Fr) wird als das Verhältnis von Trägheitskraft zur Schwerkraft definiert. Dabei ist g (m/s^2) die Fallbeschleunigung.

$$Fr = \frac{u_N^2}{g \cdot d_N} \quad (15)$$

Zur Beschreibung der Blasenbildung an Lochöffnungen unterschiedlicher Größe wird die modifizierte Fr -Zahl (Fr_N) aus Rübiger *et al.* eingesetzt (Rübiger *et al.* 2013).

$$Fr_N = \frac{u_N^2}{g \cdot d_N} \left(\frac{\rho_G}{\rho_L - \rho_G} \right)^{5/4} \quad (16)$$

Die Beschreibung der Sekundärblasenbildung wird zunächst für die einfache Lochöffnung, wie das offene Rohr vorgestellt (siehe Abb. 4).

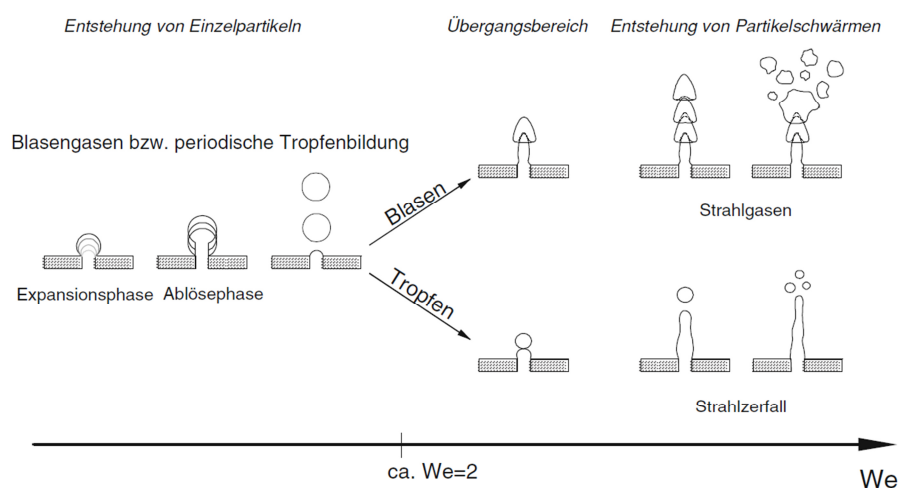


Abb. 4: Schema der Blasenbildung und Blasenablösung (Rübiger *et al.* 2013)

Hierbei wird ab einer $We_G \geq 2$ (wie in Abb. 4) der Blasengasen-Bereich verlassen und der Strahlgasen-Bereich beginnt. Im Strahlgasen-Bereich erfolgt durch den hohen Impuls des Gases kurz über dem Begaser eine Scherung der Blasen, so dass neben den Primärblasen auch kleinere Sekundärblasen gebildet werden (Mersmann 1977). Zusätzlich resultiert die Blasengrößenverteilung aus dem Gleichgewicht von Aufplatzen und Koaleszenz der generierten Blasen. Der Übergang in den

Strahlgasen-Bereich kann durch das kritische Verhältnis von We_L und modifizierter Fr -Zahl beschrieben werden (Räbiger et al. 2013).

$$\left(\frac{We_L^2}{Fr_N}\right) \geq 675 \quad (17)$$

Im Strahlgasen-Bereich findet die Sekundärblasenbildung auf Grund des Aufplatzens der instabilen Blasen statt (Kulkarni and Joshi 2005). Für Begaser mit mehreren Lochöffnungen führt die Ausbildung eines starken Scherfeldes oberhalb des Begaser ab einer $We_L \geq 6$ zu einer Sekundärblasenbildung. Diese ist unabhängig vom Gasdurchsatz. Dabei hängt die Blasengröße neben dem Lochdurchmesser auch vom Lochabstand (Lochteilung) h_L ab (Klug 1983; Räbiger et al. 2013). Danach kann als Grenzkriterium die Koaleszenz der Primärblasen am Lochboden für Lochabstände kleiner h_L mit folgender Gleichung beschrieben werden (Klug 1983; Mersmann 1977; Räbiger et al. 2013).

$$h_L \leq 2,7 \cdot d_N \left(\frac{u_N^2}{g \cdot d_N}\right)^{1/6} \quad (18)$$

Dieser kritische Lochabstand wird bei fein porösen Sintermaterialien unterschritten. Die sehr nahe beieinander liegenden Poren werden gleichzeitig aktiviert und tragen zum Wachstum einer Blase bei (Kazakis et al. 2008a, 2008b). So wird die Blase durch die gemeinsame Wirkung vieler benachbarter Poren erzeugt. Hierbei beeinflussen sich die Poren gegenseitig. Die Blasen bilden an der Oberfläche des porösen Begasers ab einem kritischen Wert von $We^2/Fr \geq 675$ Sekundärblasen. Der beschriebene Effekt des Lochabstands bei fein porösen Sintermaterialien führt bei hohem Gasdurchsatz zur Erzeugung von größeren Blasen, wenn eine Sekundärblasenbildung eintritt (Kulkarni and Joshi 2005).

1.2 Fein-, Submilli- und Makroblasen

In chemischen und biochemischen industriellen Prozessen haben Gas/Flüssigkeits-Reaktionen einen hohen Stellenwert. Deshalb kommt der Beschreibung und Identifizierung von Stofftransportphänomenen eine immer größere Bedeutung zu. Die Nachfrage nach neuen Technologien mit hoher Stoffübergangsleistung, geringem Druckabfall, geringer Scherbeanspruchung und Vermeidung von Schaumbildung, ist hoch (Terasaka and Tsuge 1993; Tsuge 2014; Woodley 2019). Eine Möglichkeit, diese Ziele zu erreichen, ist die Begasung mit Feinblasen, deren Durchmesser typischerweise weniger als 100 μm beträgt (Tsuge 2014). Nach ISO/TC 281 werden Blasen mit einem volumengleichen Äquivalenzdurchmesser von kleiner 100 μm als Feinblasen definiert. Dies wurde 2013 von der Organisation für Normung (ISO) zertifiziert. Per Definition werden Feinblasen in Mikroblasen ($1 \mu\text{m} < d < 100 \mu\text{m}$) und Ultrafeinblasen ($d_B \leq 1 \mu\text{m}$) eingeteilt. Besonders Ultrafeinblasen können nicht einfach mit dem bloßen Auge erfasst werden (Abb. 5). In dieser Arbeit werden alle Blasen $100 \mu\text{m} < d_B < 1 \text{mm}$ als Submilliblasen und Blasen größer als 1 mm als Makroblasen definiert. Auf Grund des Blaseneinlösens und der Blasenexpansion verläuft der Übergang zwischen den Blasenklassen fließend. Durch die schrägen Einteilungen in Abb. 5 wird dieses Verhalten dargestellt.

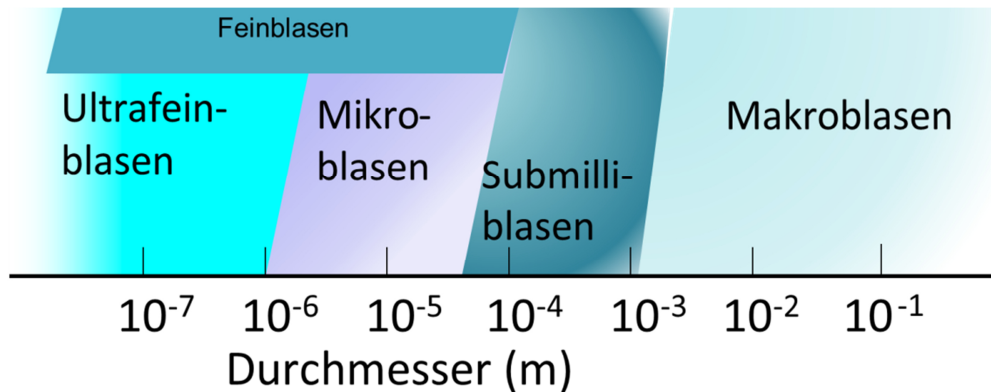


Abb. 5: Charakteristische Größenklassen von Gasblasen

Die Blasengröße ist entscheidend für die Eigenschaften wie Mischverhalten und Stofftransport der Gasphase in einem begasten Reaktionssystem. Im Folgenden werden Feinblasen mit Submilli- und Makroblasen bezüglich Verweilzeit, Einlöseverhalten und Mischeigenschaften verglichen.

In der Literatur berichten mehrere Autoren über eine Verweilzeit von Ultrafeinblasen im Bereich von mehreren Wochen bis Monaten (Borkent et al. 2007; Duval et al. 2012; Gurung et al. 2016; Maali and Bhushan 2013; Ushikubo et al. 2010b). Auf Grund dieser Verweilzeiten wird viel Forschung auf dem Gebiet der Blasenstabilität in Abhängigkeit von Verunreinigungen oder der Oberflächenladung betrieben. Die Ergebnisse werden in der Literatur widersprüchlich diskutiert (Alheshibri et al. 2016; Jadhav and Barigou 2020; Kim et al. 2019; Yasui et al. 2018). Im Vergleich zu Submilli- und Makroblasen wird für Feinblasen eine geringere Koaleszenz- und Aufplatztendenz beschrieben (Alheshibri et al. 2016; Oliveira and Rubio 2011; Tsuge 2014). Die Charakterisierung dieses Effekts steht jedoch noch aus. Wie in Abb. 6 dargestellt, weisen Feinblasen, resultierend aus ihrem kleinen Volumen, eine geringere Auftriebsgeschwindigkeit als Submilli- und Makroblasen auf. Diese Eigenschaft bietet die Möglichkeit, die Verweilzeit deutlich zu erhöhen (Duval et al. 2012; Jia et al. 2019; Parkinson et al. 2008; Struthwolf and Blanchard 1984). Zum Vergleich der Auftriebsgeschwindigkeiten von Blasen kann das Stokes-Gesetz verwendet werden (Stokes 1851). Beispielsweise hat beim Stokes-Ansatz eine $10\ \mu\text{m}$ Blase eine Auftriebsgeschwindigkeit von $0,05\ \text{mm/s}$ (Abb. 6). Weiter wird in der Literatur berichtet, dass Feinblasen, insbesondere jedoch Mikroblasen, ein sehr schnelles Einlösen in ungesättigten Flüssigkeiten zeigen (Epstein and Plesset 1950; Iwakiri et al. 2017). Dies führt zu einem schnellen Schrumpfen der Blasen, das mit hohen Einlöseraten (Stofftransportraten) in das umgebende Medium verbunden ist (Abb. 6). Dieser Effekt kann durch die Young-Laplace-Gleichung erklärt werden: $\Delta p = 4\sigma/d_B$ (σ : Oberflächenspannung, d_B : Blasendurchmesser (Alheshibri et al. 2016; Atkins et al. 2013; Iwakiri et al. 2017)).

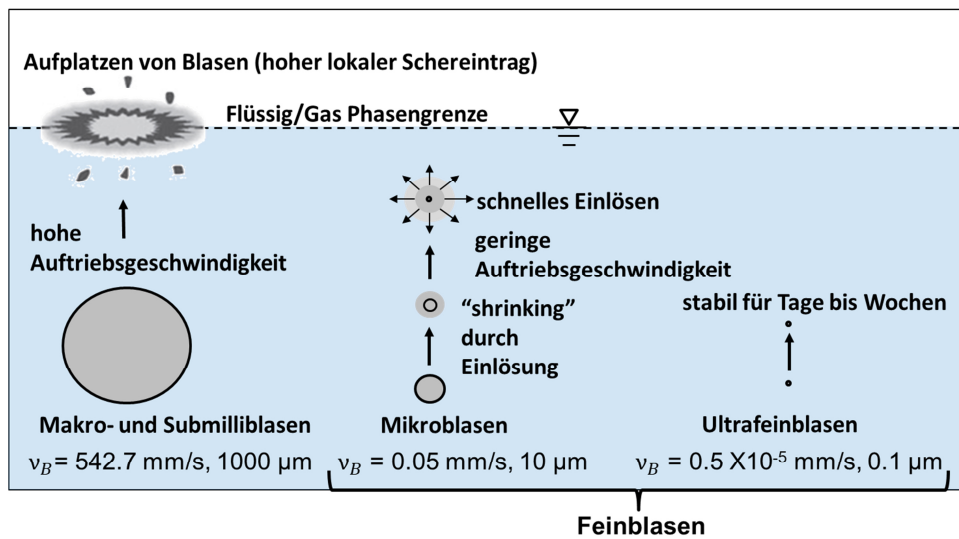


Abb. 6: Schema der idealen Eigenschaften von Makro-, Submilli- und Feinblasen bezüglich Einlösung und Auftriebsgeschwindigkeit ($T = 25^\circ\text{C}$, $\eta = 0,81 \text{ mPa s}$, $g = 9,81 \text{ m/s}^2$, $\rho_{Luft} = 1,18 \text{ kg/m}^3$, $\rho_L = 1000 \text{ kg/m}^3$)

Auf Basis der Young-Laplace Gleichung kann der Innendruck einer Blase mit abnehmendem Blasendurchmesser d_B berechnet werden (Iwakiri et al. 2017; Tsuge 2014). Wird das Gesetz von Henry berücksichtigt, ist der Unterschied des Partialdrucks der Komponente n die treibende Kraft für den Stofftransport (Konzentrationsgradient siehe 1.1.1) von der Blase in die Flüssigkeit. Durch die Erhöhung des Laplace-Drucks steigt die Löslichkeit in der Umgebung der Blase deutlich an (Alheshibri et al. 2016). So kann die schnelle Abnahme des Blasendurchmessers auch in gesättigten Lösungen stattfinden (Alheshibri et al. 2016; Epstein and Plesset 1950). In der Gesamtflüssigkeit hängt jedoch die Löslichkeit einer Gaskomponente n vom Systemdruck ab (Alheshibri et al. 2016; Atkins et al. 2013). Hier ist dieser Effekt von der Größe der Blasen abhängig, wie die Laplace-Druckkurve in Abb. 7 dargestellt.

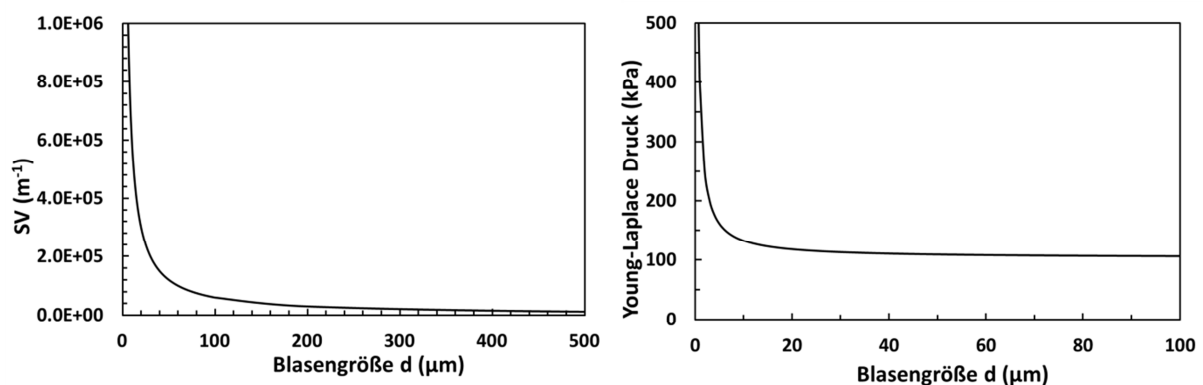


Abb. 7: Berechnung des Young-Laplace-Drucks in den Blasen und der SV (volumenspezifische Oberfläche) in Abhängigkeit von der Blasengröße (Bedingungen: $T = 20^\circ\text{C}$, $\rho_{water} = 998,23 \text{ kg/m}^3$ (Kell 1975), $\sigma_{water} = 72,75 \text{ mN/m}$ (Straub et al. 1980) $h_{Flüssigkeit} = 0,02 \text{ m}$, $g = 9,81 \text{ m/s}^2$, $p_{atm} = 101.32 \text{ kPa}$)

Iwakiri et al. berichtet von einer erhöhten Einlöserate, wenn ein Blasendurchmesser kleiner $\sim 15 \mu\text{m}$ erreicht wird (Iwakiri et al. 2017). Das Ergebnis von Iwakiri et al. befindet sich in guter Übereinstimmung mit der berechneten Laplace-Druckkurve für Mikroblasen (Abb. 7). Auch Epstein

und Plesset berichten, dass der Laplace-Druck entscheidend für den Stofftransport und die Reduktion des Blasendurchmessers („shrinking“) verantwortlich ist (Epstein and Plesset 1950). Weiter führt die rapide Abnahme der Blasengröße durch die Erhöhung der volumenspezifischen Grenzfläche zum Ansteigen des $k_L a$ -Werts (siehe Abschnitt 1.1.1). Zusätzlich kann ein steigender Stofftransportkoeffizient k_L mit sinkender Blasengröße angenommen werden (Iwakiri et al. 2017; Othmer and Thakar 1953). Die Anlagerung von amphiphilen Additiven wie Proteinen oder Tween 20 an die Phasengrenzfläche kann zur Verringerung des k_L Werts führen (Bredwell and Worden 1998). Hierbei sinkt der k_L Wert als Teil einer Sättigungsfunktion mit steigender Additivkonzentration (Bredwell and Worden 1998). Für Mikroblasen werden in Bredwell *et al.*, k_L im Bereich von $2,9 \times 10^{-4}$ - $2,2 \times 10^{-4}$ m/s sowie $k_L a = 200 - 1800$ 1/h berichtet (Bredwell and Worden 1998). Wie in Abb. 7 dargestellt, steigt die volumenspezifische Grenzfläche beim Einlösen von Feinblasen deutlich stärker als der k_L Koeffizient an. Deshalb wird im Bereich der Submilliblasen ein geringer und bei Feinblasen ein hoher Einfluss der Grenzfläche auf das Einlöseverhalten beschrieben (Cappello et al. 2020; Iwakiri et al. 2017; Tsuge 2014). Ein vielversprechender Vorteil ist, neben der hohen Verweilzeit von Feinblasen, somit die große volumenspezifische Grenzfläche. Eine Blase mit einem Durchmesser von $100 \mu\text{m}$ hat eine volumenspezifische Fläche $SV = 6 \times 10^4 \text{ m}^{-1}$, welche um den Faktor 10 größer ist, als der einer Makroblase ($d_B = 1000 \mu\text{m}$) mit $SV = 6 \times 10^3 \text{ m}^{-1}$. Wie in Abb. 8 dargestellt, kann aus den zuvor beschriebenen Vorgängen der Reduktion des Blasendurchmessers und der Erhöhung des Laplace-Drucks im Fall von Feinblasen eine Verstärkung („Feedback-Loop“ Verhalten) der positiv auf den Einlöseprozess wirkenden Parameter festgestellt werden (Tsuge 2014)(Abb. 8).

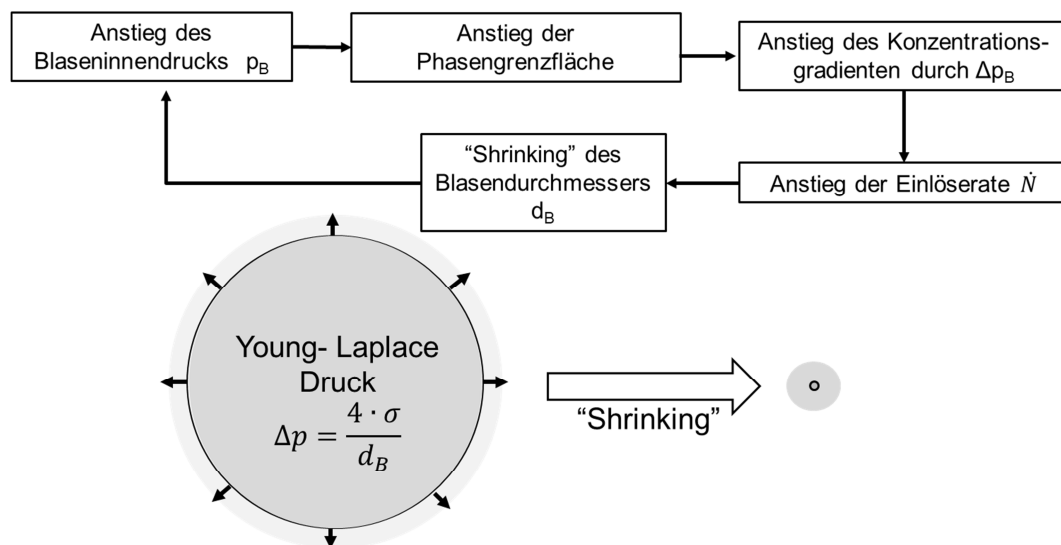


Abb. 8: Einlösen von Feinblasen durch hohe Laplace-Drücke „Feedback-Loop“

Bei Makroblasen hängt die Stofftransportleistung von der Dispersion der Gasphase durch vom Rührer induzierte Scherkräfte im begasten Rührkessel ab (Gaddis 2013; Liu et al. 2019). Dies ist häufig mit einem hohen Energieeinsatz und einer ineffizienten Gasnutzung verbunden (Liu et al. 2019; Terasaka, K. Hirabayashi, Ai et al. 2011). Infolge der hohen Auftriebsgeschwindigkeit, der hohen Begasungsraten und des hohen Gasimpulses kann mit Makroblasen das Reaktionsmedium in Blasensäulen gemischt werden (Hilterhaus et al. 2008). Im Gegensatz dazu haben Feinblasen eine niedrige Auftriebsgeschwindigkeit und liefern daher einen geringeren Beitrag zum Mischen des Reaktionsmediums (Parkinson et al. 2008). Daher ist zur Einstellung von optimalen

Mischungsbedingungen bei mit feinblasenbegasten Reaktionen, Rühren erforderlich. Jedoch werden Feinblasen nicht durch die vom Rührer induzierten Scherkräfte desintegriert (Matthes et al. 2020; Tsuge 2014). Dadurch kann der erforderliche Energieeintrag auf ein Minimum reduziert werden.

1.3 Enzyme

Nach der Definition sind Katalysatoren Substanzen, welche an einer Reaktion beteiligt sind, ohne selbst verbraucht oder umgesetzt zu werden (Bisswanger 2000).

Katalysatoren nehmen in der Chemieindustrie eine entscheidende Rolle ein. Sie tragen dazu bei, Reaktionen ökonomischer und ökologischer zu realisieren (Chmiel 2011). In der organischen Chemie sind vor allen Säure-Basenkatalyse, Übergangsmetallkatalyse, Organokatalyse und Biokatalyse von Bedeutung (Atkins et al. 2013). Hierbei wird zwischen chemischen und Biokatalysatoren unterschieden (Buchholz et al. 2012). Die chemischen Katalysatoren zeichnen sich durch hohe Temperaturbeständigkeit und daraus resultierende, hohe Reaktionsgeschwindigkeiten aus (Bisswanger 2000). Nachteile des Einsatzes von chemischen Katalysatoren sind deren Toxizität, Umweltschädlichkeit und die geringe Selektivität (Atkins et al. 2013; Chmiel 2011). Biokatalysatoren, finden in der Petrochemie, der Feinchemie, der Pharmaindustrie und in der Lebensmittelindustrie Anwendung (Bisswanger 2000; Chmiel 2011). Enzyme sind überwiegend natürlichen Ursprungs, weshalb deren Stabilität und Aktivität an das Wachstumsoptimum des Ursprungsorganismus angepasst ist (Chmiel 2011). Im Gegensatz zu chemischen Katalysatoren zeichnen sich Enzyme durch geringe Toxizität, sowie gute Umweltverträglichkeit und eine hohe Selektivität aus (Bartholomew and Farrauto 2010; Chmiel 2011; König and Butenschön 2007). Von besonderem Interesse für die Forschung und Industrie sind Enzyme aus extremophilen Mikroorganismen. Diese Mikroorganismen sind auch unter extremen Umwelteinflüssen wie z.B. Temperatur oder pH-Wert stabil und zeigen Aktivität (Demirjian et al. 2001). Als Beispiele dienen die an Tiefseevulkanen entdeckten Enzyme aus thermophilen Bakterien, welche noch bis 80°C Aktivität aufweisen (Atkins et al. 2013). Jedoch bietet die wachsende Anzahl an Methoden des so genannten „Enzyme-Engineering“ die Möglichkeit, Enzyme an die Bedingungen eines Prozesses anzupassen (Woodley 2019). Die meisten industriell genutzten Biokatalysatoren weisen Aktivität im gemäßigten Temperaturbereich zwischen 30°C und 60°C auf (Atkins et al. 2013). Enzyme werden nach der Art der katalysierten Reaktion in Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen, Lipasen, Isomerasen und Ligasen unterteilt (Bisswanger 2000; König and Butenschön 2007). Für diese Arbeit sind die Oxidoreduktasen mit Sauerstoffverbrauch (Oxidasen) von großem Interesse.

1.3.1 Oxidoreduktasen

Die Enzyme der Oxidoreduktasen EC. 1. kommen in einer Vielzahl von Lebewesen und in vielen wichtigen Stoffwechselwegen vor. Daher finden Enzyme dieser Klasse bei einer Vielzahl von industriellen Synthesen zur Produktion von pharmazeutischen Produkten (z.B. Synthese von L-DOPA) Anwendung (Chagraoui et al. 2019; Pialis and Saville 1998). Hierbei besteht die Reaktion aus der Oxidation bei der A zu $A^+ + e^-$ und der Reduktion bei der $B^+ + e^-$ zu B reagieren. Die Gesamtgleichung der Redoxreaktion ist in Gleichung (19) beschrieben. Jedoch verdanken viele Oxidoreduktasen den typischerweise enthaltenen Übergangsmetallen wie Zn^{2+} , Cu^{2+} und Fe^{2+} oder dem Co-Faktor FAD als Teil des aktiven Zentrums ihre katalytische Wirkung (Ryabov 2004).

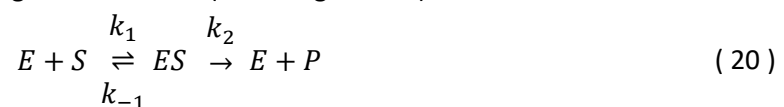


Sauerstoff wird von vielen Oxidoreduktasen als Oxidationsmittel oder Elektronenakzeptor umgesetzt. In Elektrolytlösung, gelöster Sauerstoff fungiert in Wasser als Oxidationsmittel nach folgenden Reaktionsschema: $O_2 + 2 H_2O + 4 e^- \rightarrow 4 OH^-$ bei neutralem bis alkalischem pH (Forker et al. 1981). Auf Grund der geringen Sauerstofflöslichkeit von 0,256 mM (25°C, pH 7, 101,32 kPa) im wässrigen Milieu benötigen viele Oxidoreduktasen eine kontinuierliche Zufuhr von Sauerstoff durch Begasung des Reaktionsmediums. Ein Beispiel dafür ist die sauerstoffabhängige Biotransformation von β -D-Glucose und Sauerstoff zu D-Glucono-1,5-Lacton und Wasserstoffperoxid, welche durch das Enzym Glucoseoxidase katalysiert wird (Bankar et al. 2009; Ramachandran et al. 2006; Tomotani et al. 2005). Die Gruppe der Oxidoreduktasen findet eine sehr breite industrielle Anwendung, da die Verwendung schädlicher Metalloxidationsmittel vermieden wird (Dias Gomes et al. 2019a). Weiter wird häufig $NAD^+/NADH$ und $NADP^+/NADPH$ als Co-Faktor in der Redoxreaktion benötigt. In dieser Arbeit werden die Oxidoreduktasen als Modellenzyme im Rührkesselreaktor untersucht: Glucoseoxidase (GOx), NADH-Oxidase (NOX), Cytochrom P450, Alkoholdehydrogenase (ADH), Glucosedehydrogenase (GDH) und Tyrosinase (TYR).

1.3.2 Michaelis-Menten Kinetik und Enzymdeaktivierung

In diesem Abschnitt werden die Grundlagen der für die Enzymcharakterisierung genutzten kinetischen Modelle und Zusammenhänge erörtert.

Die durch Michaelis und Menten beschriebene Kinetik stellt den einfachsten Fall einer enzymatischen Katalyse dar (Bisswanger 2000). Diese Kinetik findet sehr häufig in der Beschreibung von homogen katalysierten Reaktionen Anwendung (Atkins et al. 2013). Als Teil einer reversiblen Gleichgewichtsreaktion wird aus Enzym E und Substrat S ein Substratenzymkomplex ES gebildet (20). Im zweiten irreversiblen Reaktionsschritt zerfällt der Enzymsubstratkomplex ES in das Produkt P und Enzym E , welche freigesetzt werden. (Bisswanger 2000)



Mit der Annahme von stationären Bedingungen ergeben sich für die Bildung des Enzymkomplexes Gleichung (21) und für die Produktbildung Gleichung (22).

$$\frac{d(ES)}{dt} = 0 = -k_{-1} \cdot (ES) - k_2 \cdot (ES) + k_1 \cdot (E) \cdot (S) \quad (21)$$

$$\frac{d(P)}{dt} = k_2 \cdot (ES) \quad (22)$$

Unter der Annahme von $(S) \gg (E)$ (Substratüberschuss) kann wie folgt die Gleichung der Michaelis-Menten Kinetik aufgestellt werden. Hierzu werden die Michaelis-Konstante K_m (mol/L), die Anfangskonzentration des Enzyms E_0 (mol/L), die aus dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gesamtreaktion resultierende Geschwindigkeit v ($U = \mu\text{mol}/\text{min}$) und die Maximalgeschwindigkeit v_{max} (U) definiert. Hierbei entspricht eine Unit (U) einer Reaktionsrate von $1 \mu\text{mol}/\text{min}$.

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (23)$$

$$(E_0) = (E) + (ES) \text{ bei } (S) \gg (E) \text{ folgt } (E_0) = (ES)$$

$$v = k_2 \cdot (ES)$$

$$v_{max} = k_2 \cdot (E_0) = k_2 \cdot ES \text{ bei } (S) \gg (E)$$

Wird $K_m, (E_0), v$ und v_{max} in Gleichung (21) eingesetzt, lässt sich das Geschwindigkeitsgesetz der Michaelis-Menten Kinetik aufstellen.

$$v = \frac{k_2 \cdot (E_0) \cdot (S)}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + (S)} = \frac{v_{max} \cdot (S)}{K_m + (S)} \quad (24)$$

In der experimentellen Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit bei Variation der Substratkonzentration beschreibt die Michaelis-Menten Kinetik die Sättigungsfunktion von E mit S (Bisswanger 2000). So kann K_m als die Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit mit folgendem Zusammenhang vereinfacht beschrieben werden.

$$K_m = \frac{v_{max}}{2} \quad (25)$$

Analog zum Zerfallsgesetz (wie des radioaktiven Zerfalls von Atomen) kann auch die Deaktivierung eines Enzyms betrachtet werden (Atkins et al. 2013). Mit dem Modell des Zerfallsgesetzes wird die Deaktivierungskinetik als exponentielle zeitliche Abnahme der Enzymaktivität beschrieben. Nach der Zeit t (s) ist von a_0 Anfangsaktivität (U) noch eine Restaktivität von $a(t)$ vorhanden. Der Ausdruck in Gleichung (26) wird zur Interpretation der Enzymstabilität unter festgelegten äußeren Bedingungen eingesetzt. k_{des} beschreibt hierbei die Deaktivierungskonstante in 1/s.

$$v(t) = v_0 \cdot e^{-k_{des} \cdot t} \quad (26)$$

Die Halbwertszeit $t_{1/2}$ (s) ermöglicht einen direkten Vergleich der Enzymstabilität verschiedener Enzyme und beschreibt die Zeit t , bei der die Anfangsaktivität a_0 halbiert ist. Mit dem vereinfachten Zusammenhang in Gleichung (27) kann aus der Halbwertszeit $t_{1/2}$ direkt die Deaktivierungskonstante berechnet werden.

$$k_{des} = \frac{\ln(2)}{t_{1/2}} \quad (27)$$

Besonders interessant ist die Untersuchung der Enzymstabilität bei Variation der Begasungsbedingungen sowie der Variation der Reaktionsbedingungen wie pH, Temperatur etc.

1.4 Motivation und Zielsetzung

Gase finden als Substrate eine breite Anwendung in chemischen, biochemischen und pharmazeutischen Verfahren (Chapman et al. 2018; Terasaka, K. Hirabayashi, Ai et al. 2011). Besonders der Einsatz von Gasen mit geringer Löslichkeit wie Sauerstoff macht eine kontinuierliche Zufuhr zum Prozess unabdingbar. Hierbei stellt Luft, mit einem Anteil von 21 Vol.-% Sauerstoff eine vergleichsweise günstige und einfach zugängliche, natürliche Quelle für die Anwendung in Oxidationsreaktionen dar. Sauerstoff wird in der Industrie als Oxidationsmittel in verschiedenen Anwendungen eingesetzt, von enzymatischen Oxidationsreaktionen über die biologische aerobe Abwasserbehandlung, bis hin zur aeroben Fermentation (Chapman et al. 2018; Hone and Kappe 2018; Terasaka, K. Hirabayashi, Ai et al. 2011). Allerdings verursacht die geringe Löslichkeit von Sauerstoff mit 0,256 mmol/L (25°C, pH 7, 101,32 kPa) in vielen biokatalytischen Prozessen eine Limitierung der Reaktionsgeschwindigkeit (Bolivar et al. 2019). Um dieses Problem zu überwinden, bietet die Feinblasentechnologie ein großes Potenzial für die Optimierung der Sauerstofftransportrate.

Ziel dieser Arbeit war der Nachweis möglicher Anwendungen der Feinblasentechnologie in der Biokatalyse

Hierzu wurden folgende Ziele definiert:

- Identifizierung und Charakterisierung von enzymatischen Modellreaktionssystemen mit dem Fokus auf hohe Sauerstoffverbrauchsraten
- Identifizierung des Gasverbrauchs und Untersuchung des Potenzials zur Gasersparnis mit Feinblasenbegasung
- Bestimmung und Berechnung der Blasengrößen mit dem Ziel eines Begaservergleichs für die Fein-, Submilli- und Makroblasenbegasung
- Bestimmung der Stofftransportleistung und des Gasnutzungspotenzials im begasten Rührkessel
- Bestimmung der Enzymstabilität im begasten Rührkessel
- Anwendung von verschiedenen Begasungssystemen in der Biotransformation

Die Untersuchung der Effekte von Begasungssystemen bezüglich der erzeugten Blasengröße (Feinblasen) auf Produktivität, Gasnutzung (Stofftransport), Sauerstoff-Ökonomie sowie Enzymstabilität im begasten Rührkessel, stehen im Fokus dieser Arbeit.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien, Enzyme und Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

Substanz	Reinheit	Hersteller	Stadt	Land
Acetonitril	≥99,95% (LC-MS)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe	D
Kanamycinsulfat	Kein Angabe	Merck KGaA	Darmstadt	D
Protein Reagenz, Pierce™ 660 nm	Keine Angabe	Thermo Fisher Scientific GmbH	Rockford	USA
NAD ⁺ freie Säure	≥97,5 %	Carl Roth GmbH	Karlsruhe	D
NADP-Dinatriumsalz	≥84 %	Carl Roth GmbH	Karlsruhe	D
NADPH-Tetranatriumsalz	≥95 %	Carl Roth GmbH	Karlsruhe	D
NADH-Dinatriumsalz	≥84 %	Carl Roth GmbH	Karlsruhe	D
D(+)-Glucose	≥98%	Carl Roth GmbH	Karlsruhe	D
L-Tyrosin	≥99%,	Carl Roth GmbH	Karlsruhe	D
PA-12-Pulver, Polyamid-12, d ~ 56 µm	Keine Angabe	EOS GmbH	Krailling	D
L-DOPA	≥98% (TLC)	Merck KGaA	Darmstadt	D
Rhododendrol	>98.0%(GC)	Tokyo Chemical Industry Co.	Tokyo	JP
Himbeerketon	>99.0%(GC)	Tokyo Chemical Industry Co.	Tokyo	JP
12-pNCA	>98.0%(GC)	abcr GmbH	Karlsruhe	D
o-Dianisidine	>98.0%	Merck KGaA	Darmstadt	D
Trifluoressigsäure (TFA)	≥99,95%	Carl Roth GmbH	Karlsruhe	D
MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure)	≥99%	Carl Roth GmbH	Karlsruhe	D
Zitronensäure	≥99,95%	Carl Roth GmbH	Karlsruhe	D
Natriumhydroxid (NaOH)	≥98%	Carl Roth GmbH	Karlsruhe	D
Essigsäure	100%	Carl Roth GmbH	Karlsruhe	D
Kaliumchlorid (KCl)	≥99%	Carl Roth GmbH	Karlsruhe	D
Magnesiumchlorid (MgCl)	≥98.5%	Carl Roth GmbH	Karlsruhe	D
di-Kalium-hydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	≥98%	Carl Roth GmbH	Karlsruhe	D
Kalium-dihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	≥98%	Carl Roth GmbH	Karlsruhe	D

Weiter wurde mit folgenden Enzymen gearbeitet:

Tabelle 2: Verwendete Enzyme und Proteine

Substanz	Organismus	Hersteller	Stadt	Land
Glucoseoxidase Typ VII	<i>Aspergillus niger</i>	Merck KGaA	Darmstadt	D
Peroxidase Typ II	<i>Amoracia rusticana</i>	Merck KGaA	Darmstadt	D
Tyrosinase	<i>Agaricus bisporus</i>	Merck KGaA	Darmstadt	D

Katalase	<i>Aspergillus niger</i>	Merck KGaA	Darmstadt	D
NOX24	<i>Streptococcus mitis</i>	c-LEcta GmbH	Leipzig	D
NOX34	<i>Streptococcus mitis</i>	c-LEcta GmbH	Leipzig	D
NOX-Opp auch <i>SmNOX</i> mit den beiden Mutationen (V193R/V194H)(Petschacher et al. 2014)	<i>Streptococcus mutants</i>	Plasmid von Dr. Diederik Johannes Opperman	University of Free State South Africa	ZAF
GDH-105	Keine Daten	Codexis	Redwood City	USA
ADH168L	Keine Daten	c-LEcta GmbH	Leipzig	D
ADH97L	Keine Daten	c-LEcta GmbH	Leipzig	D
BM3 P450 (CYP102A1)	<i>Bacillus megaterium</i>	HUU-Biochemie II	Düsseldorf	D

Die zur Durchführung der Experimente eingesetzten Geräte sind folgend aufgelistet:

Tabelle 3: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller	Stadt	Land
UV/VIS Photometer UvikonXL	Goebel Instrumentelle Analytik GmbH	Au i.d. Hallertau	D
Pipetten, Research®, Reference® 10, 20, 200, 1000, 5000 µL	Eppendorf AG	Hamburg	D
Gas Chromatographie, 7890 A GC System	Agilent Technologies Inc.	Santa Clara	USA
GC-Säule Chrompack CP-ChiraSil-Dex B (25m, 250µm, 0.25µm)	Agilent Technologies Inc.	Santa Clara	USA
Lauda 003 Thermostate	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG	Lauda-Königshofen	D
Laborwaage, MC1 Laboratory LC 2200 P	Sartorius AG	Göttingen	
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
NanoSight NS 300 (Nanopartikeltracking)	Malvern Instruments Ltd.	Worcestershire	UK
Schräglatrührer d = 46 mm	Bohlender GmbH (Bola)	Grünsfeld	D
Scheibenrührer d = 46 mm	Applikon Biotechnology B.V.	Delft	NL
2 L and 0,5 L Rührkesselreaktor (STR)	Applikon Biotechnology B.V.	Delft	NL
RW 20 digital Überkopfrührwerk	IKA®-Werke GmbH & CO. KG	Staufen	D
848 Titrino plus Metrohm	Metrohm AG	Herisau	CH
ThermoFlow 0.05-0.4 L/min	Profi Mess GmbH	Bremerhaven	D
El-Flow Select 0.05-0.2 N L/min	Bronkhorst High-Tech BV	Ruurlo	NL
Schwebekörperflowmeter, 1-5 NL/min	Hosco Unitec	Gersthofen	D
Fibox 4	PreSens Precision Sensing GmbH	Regensburg	D
SP-PSt3- NAU-D5-YOP	PreSens Precision Sensing GmbH	Regensburg	D
0.5 µm, 2 µm und 10 µm Sinterfritte	Techlab GmbH	Braunschweig	D
1 µm pore size Shirasu Porous Glass Membran (SPG Membran)	SPG Technology Co	Miyazaki-city	JP
AMB3- Mikroblassengenerator	Hack UFB Co., Ltd	Yamanashi	JP
Vortexer (REAX 2000)	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG	Schwabach	D
Zellulosefilter, MN 640 d, 125 mm	MACHEREYNAGEL GmbH & Co. KG	Düren	D
Zentrifuge 5427 R	Eppendorf AG	Hamburg	D

2.2 Enzymaktivitätsassay

Zur Bestimmung der Aktivität in U/mg ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) findet in dieser Arbeit die etablierte photometrische Konzentrationsmessung (UV/VIS Photometer Uvikon-XL) Anwendung. Auf Basis des Lambert-Beer'schen Gesetzes wurde die Konzentrationsänderung Δc (mM) aus dem Verhältnis der Absorptionsänderung ΔAbs zu dem Produkt aus Extinktionskoeffizienten ϵ ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bei einer festgelegten Wellenlänge λ (nm) und der Schichtdicke d (cm) der Küvette für stark verdünnte Lösungen ermittelt (28).

$$\Delta c = \Delta Abs / \epsilon_{\lambda} \cdot d \quad (28)$$

Der Vorteil dieser Methode ist, dass keine Kalibrierung für die direkte Konzentrationsbestimmung benötigt wird. Mit Hilfe dieses Zusammenhangs und der eingesetzten Enzymmenge (mg) wurde die Aktivität für die Enzyme in dieser Arbeit bestimmt.

2.2.1 Glucoseoxidase (GOx) Assay

Die Bestimmung der Enzymaktivität wurde basierend auf dem Glucoseoxidase (GOx)/ Peroxidase (POD) photometrischen Assay von Bateman und Evans durchgeführt (Bateman and Evans 1995). Eine Substratlösung mit der Konzentration von 0,21 mM o-Dianisidin und 9,44 mM D-Glucose in 10 mM Na-Acetatpuffer (pH 5,3) wurde eingesetzt. Die Proben enthielten 936 μL Substratlösung gemischt mit 32 μL POD-Lösung (60 Purpurogallin U/mL). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 32 μL GOx-Lösung (40 U/mL) initiiert. Als Referenz diente eine Lösung mit einer Zusammensetzung von 936 μL Substratlösung, 32 μL POD-Lösung (60 Purpurogallin Units/mL = $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$) und 32 μL eines 10 mM Na-Acetatpuffer (pH 5,3). Die Aktivität wird angegeben in Unit/mg ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$). Dabei ist definiert, dass eine Unit der Oxidation von 1 μmol β -D-Glucose pro Minute und eingesetzter Enzymmenge entspricht.

2.2.2 NADH-Oxidase (NOX) Assay

Die Aliquots der Enzymlösung mit einer Konzentration von 1,1 mg/mL wurden erstellt und bei -20°C gelagert. Vor der Aktivitätsuntersuchung erfolgte das Auftauen des Aliquots auf Eis. Die Aktivität wurde durch Messung der Absorptionsänderungen von gebildetem NADH über 3 min bei einer Wellenlänge von 340 nm, $\epsilon = 6220 \text{ L}/\text{mM}/\text{cm}$ sowie einer Raumtemperatur von 20°C durchgeführt. Der Reaktionsansatz bestand aus 0,1 mM NADH in 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 8). Alle Lösungen wurden zuvor begast. Daher kann eine Sauerstoffsättigungskonzentration von etwa $c^* = 0,284 \text{ mM}$ angenommen werden. Als Referenz zur Reaktionslösung sind 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 8) in der Messung eingesetzt worden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,26 U/mL NOX gestartet. Eine Unit ist definiert als die Absorptionsdifferenz, die mit der Oxidation von 1 μmol NADH zu NAD^+ pro Minute und der eingesetzten Enzymmenge (mg) bei pH 8 und 20°C gemessen wird.

2.2.3 Tyrosinase (TYR) Assay

Zur Aktivitätsbestimmung der Tyrosinase wurde die Unit-Definition des photometrischen Assays aus dem Datenblatt der Tyrosinase des Herstellers Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Corp. 2018) verwendet und für ein Volumen von 1 mL angepasst. Dem Datenblatt von Sigma-Aldrich wurde die Unit-Definition wie folgt entnommen: eine Unit ($\mu\text{mol}/\text{min}$) ist als die Absorptionsänderung von 0,001 bei 280 nm definiert (Sigma-Aldrich Corp. 2018). Der Aktivitätstest wurde in 50 mM KPi (pH 6,5), einer Substratkonzentration von 0,5 mM L-Tyrosin, einer Aktivität von 60 U/mL ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$) Tyrosinase und einer Temperatur von 25°C durchgeführt. Als Referenz zur Reaktionslösung ist eine Lösung mit 0,5 mM L-Tyrosin in 50 mM KPi Puffer (pH 6,5) eingesetzt worden. Die Messung wurde durch Zugabe von 2 U/mL (34 μL mit 60 U/mL ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$)) Tyrosinase gestartet. Die Absorptionsänderung ist bei einer Wellenlänge von 280 nm über einen Zeitraum von 20 min verfolgt worden. Um eine Sauerstoffsättigung einzustellen, wurden die Pufferlösung und das Reaktionsgemisch kurz vor Beginn der Reaktion mit Druckluft begast.

2.2.4 Monooxygenase (BM3 Cytochrom P450 WT) Assay

Im Aktivitätstest wurde mit zellfreiem Extrakt aus Zellen des Wildtyp der BM3 Cytochrom P450 (CYP102A1) aus *Bacillus megaterium* gearbeitet. Das Cytochrom P450 wurde in *Escherichia coli* Bl 21 pet 28a (*E. coli*) überexprimiert. Zuerst ist eine 0,74 mM 12-pNCA Lösung in DMSO angesetzt worden. Die Absorptionsänderung wurde im Photometer (Uvikon XL) bei 20°C und einer Wellenlänge von 410 nm ($\epsilon = 13,2/\text{mM}/\text{cm}$) über einen Zeitraum von 10 min gemessen. Der Reaktionsansatz beinhaltet 0,37 mM 12-pNCA, 0,1 mM NADPH, 50 mM KPi (pH 8). Die Reaktion startete dann durch die Zugabe von 0,15 U der BM3 Cytochrom P450 WT (0,7 U/mg, zellfreies Extrakt). Als Referenzlösung ist ein 50 mM KPi Puffer (pH 8) verwendet worden. Ein ähnliches Vorgehen zur Aktivitätsbestimmung wurde auch bei Schwaneberg *et al.* und Eiben *et al.* beschrieben (Eiben *et al.* 2007; Schwaneberg *et al.* 1999).

2.2.5 Alkoholdehydrogenase (ADH) Assay

Die Aktivität der ADH wurde auf Basis der Adsorptionsdifferenz bei der Wellenlänge von 340 nm ($\epsilon = 6220/\text{mM}/\text{cm}$) bestimmt. Somit konnte die Umwandlung von NAD^+ zu NADH bei 20°C verfolgt werden. Als Reaktionsansatz kam eine Substratkonzentration von 2 mM Rhododendrol, 0,1 mM NAD^+ in 10 mM Tris-HCl Puffer (pH 8) zum Einsatz. Die Messung startete kurz nach der Zugabe von 0,15 U/mL ADH zum Reaktionsgemisch. Als Referenz ist gegen 10 mM Tris-HCl Puffer (pH 8) gemessen worden. Eine Unit/mg entspricht dabei der umgesetzten Stoffmenge von 1 μmol NAD^+ pro min und eingesetzter Enzymmenge (mg).

2.2.6 Glucosedehydrogenase (GDH 105) Assay

Für die Aktivitätsbestimmung der GDH setzte sich das Reaktionsgemisch aus 0,44 M D-Glucose und 0,1 mM NADP^+ in 50 mM KPi Puffer (pH 7) zusammen. Das Assay wurde durch Zugabe von 0,05 U/mL der verwendeten GDH-Lösung (0,05 mg/mL) gestartet und die Absorptionsänderung über 3 min im Photometer verfolgt. Für die Messung ist die Absorptionsdifferenz von NADPH bei 20°C bestimmt

worden. Es wurde bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen. Die Berechnung erfolgte mit dem Extinktionskoeffizienten $\epsilon = 6220/\text{mM}/\text{cm}$. In diesem Assay wurde gegen 50 mM KPi Puffer (pH 7) als Referenz gemessen. Die Aktivität von einer Unit/mg (U/mg) ist definiert als die Umwandlung von 1 μmol NADP^+ zu NADPH, was der Umwandlung von Glucose in Gluconolacton entspricht.

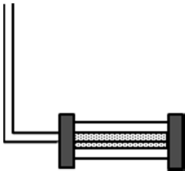
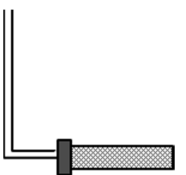
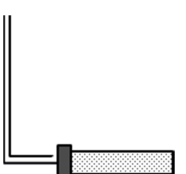
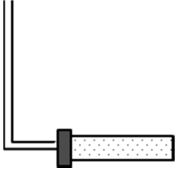
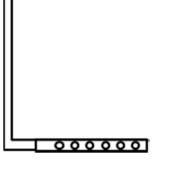
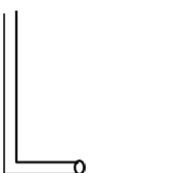
2.3 Herstellung von zellfreiem Extrakt der NADH-Oxidase

Es wurden bei -80°C gelagerte *E.coli* BI 21 Zellen zur Herstellung der NADH-Oxidase (NOX-Opp, NOX-Enzym der Arbeitsgruppe von Prof. Oppermann) verwendet. Die *E.coli* BI 21 mit dem Plasmid der NOX-Opp konnten für die Vorkultur in 20 mL autoklaviertes Luria-Bertani (LB) Medium gegeben werden. Das LB-Medium wurde zuvor mit 20 μL (100 mg/mL) des Antibiotikums Kanamycinsulfat versetzt. Die Vorkultur ist bei 120 rpm und 37°C für 16 h inkubiert worden. Auch die 400 mL LB-Medium der Hauptkultur wurde mit 400 μL Kanamycinsulfatlösung (100 mg/mL) versetzt. Durch Inokulation mit 4 mL Vorkultur wurde die Hauptkultur gestartet. Die Hauptkultur ist danach bei 180 rpm und 37°C für 2 - 3 h inkubiert worden. Hierbei wurde gewartet, bis sich ein OD600-Wert von 0,6 - 0,7 einstellte. Als ein OD600-Wert von 0,6 - 0,7 erreicht wurde, erfolgte die Zugabe von 200 μL einer 0,5 mM IPTG-Lösung, um die Überexpression der NOX zu initiieren. Anschließend wurde die Hauptkultur zur Überexpression des Enzyms bei 120 rpm und Raumtemperatur (20°C) für weitere 30 h inkubiert. Die Abtrennung der Zellen vom Medium erfolgte durch Zentrifugation (Beckmann-Coulter-Avanti, JA-10-Aufsatz, 9000 rpm, 15 min, 4°C). Zur Reinigung wurde das Zellpellet dreimal in frischem 500 mM KPi Puffer (pH 7) resuspendiert und zentrifugiert. Anschließend konnte das, mittels Ultraschallhomogenisator in 500 mM KPi Puffer (pH 7) resuspendierte Zellpellet gekühlt, gelagert und umgehend aufgeschlossen werden. Die anschließende Beschallung mit einer 5 mm Ultraschallspitze (70% Leistung im 50% Arbeitszyklus) erfolgte dann 3-mal für jeweils 3 min. Die Zellreste wurden durch Zentrifugation von der Lösung abgetrennt (Beckmann-Coulter-Avanti, j-25.50 Aufsatz, 24.000 rpm, 30 min, 4°C). Der Überstand wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Realisation des Zellaufschlusses der Cytochrom P450 enthaltenen Zellen wurde analog durchgeführt.

2.4 Fein- Submilli- und Makroblasenbegaser

Die in Tabelle 4 aufgelistet Begaser wurden in der weiteren Arbeit immer unter Angabe des mittleren Porendurchmessers oder dem Durchmesser der Lochöffnung wie Folgt angegeben:

Tabelle 4: Liste der verwendeten Begaser

Begaser	Bild	Spezifikation
1 µm SPG Membran		<ul style="list-style-type: none"> - Aus gesinterten $Al_2O_3 \cdot SiO_2$ Glass - 1 µm mittlere Porengröße - 3 cm lang und 1 cm Durchmesser - SPG (Shirasu Porous Glass) Membran - SPG Technology Co. Ltd.
0,5 µm Sinterfritte		<ul style="list-style-type: none"> - Aus gesinterten Edelstahlpartikeln - 0,5 µm mittlere Porengröße - 3 cm lang und 1 cm Durchmesser - PerfectPeak® Eluentfilterfritte von Scientific Instrument Services/ Adaptas /Mott
2 µm Sinterfritte		<ul style="list-style-type: none"> - Aus gesinterten Edelstahlpartikeln - 2 µm mittlere Porengröße - 3 cm lang und 1 cm Durchmesser - Eluentfilterfritte von TECHLAB GmbH
10 µm Sinterfritte		<ul style="list-style-type: none"> - Aus gesinterten Edelstahlpartikeln - 10 µm mittlere Porengröße - 3 cm lang und 1 cm Durchmesser - Eluentfilterfritte von TECHLAB GmbH
6 x 0,5 mm gelochtes Rohr		<ul style="list-style-type: none"> - Edelstahlrohr mit 6 mm Außendurchmesser - 6 Löcher, Durchmesser von 0,5 mm - 5 mm Abstand zwischen Lochöffnungen - Lochöffnungen sind vom Reaktorboden abgewandt gebohrt - Eigenbau Forschungswerkstatt
offenes Rohr		<ul style="list-style-type: none"> - Edelstahlrohr mit 6 mm Außendurchmesser - eine Lochöffnungen mit 5 mm Durchmesser - Eigenbau

2.5 Dynamische Methode zur Bestimmung des $k_L a$ -Wertes und Sauerstoffkonzentrationsmessung

Die $k_L a$ -Messungen wurden in 1 L Reaktionsmedium bei 25°C in einem 2 L Rührkessel (Applicon) durchgeführt. Um ein turbulentes Strömungsregime $Re \geq 10^4$ sicherzustellen, Installation eines Schrägblattrührer mit einem Leistungseintrag von 0,17 W/L (430 rpm). Die folgenden Begaser wurden getestet: 1 µm SPG Membran, 2 µm und 10 µm Sinterfritte sowie das 6 x 0,5 mm gelochte Rohr und ein 5 mm offenes Rohr. Für die Messungen wurde eine Modelllösung aus 0,22 M D (+) Glucose, 83,3 mg/L BSA in 10 mM Na-Acetatpuffer verwendet. Die Begasungsrate wurde mittels Durchflussregler (ThermoFlow, Bronkhorst und Hocom), konstant gehalten und die Durchflussrate im Bereich von 0,0067 bis 16,66 vvm variiert. Die Stoffübergangsleistung ist gemäß der von Garcia-Ochoa & Gomez sowie von Tribe *et al.* beschriebenen dynamischen Methode bestimmt worden (Garcia-Ochoa and Gomez 2009; Tribe *et al.* 1995). In dieser Methode wurde zuerst mit Stickstoff der gelöste Sauerstoff aus dem Medium fast vollständig entgast c_0 . Anschließend wurde die Begasung mit Luft angestellt und die Änderung der Sauerstoffkonzentration c_n gemessen bis nahezu die Sättigungskonzentration c^* erreicht wurde. Die Messung der Sauerstoffkonzentration wurde mit der Fibox 4 von PreSens mit dem Sauerstoffsensorspot SP-PSt3-NAU-D5-YOP inline durchgeführt. Dabei wurde vor jeder Messreihe eine Kalibrierung mit den Messpunkten c^* (gesättigtes Medium) und c_0 (Sauerstoff entleertes Medium, mittels N_2 Begasung) durchgeführt. Unter der Anwendung der folgenden Linearisierung (29) bei der Zeitdifferenz $t_n - t_0$ zwischen den Sauerstoffmessungen kann aus der Steigung des exponentiellen Anstiegs der Sättigungskurve der dynamische $k_L a$ bestimmt werden.

$$k_L a = \ln \left(\frac{c^* - c_n}{c^* - c_0} \right) / (t_n - t_0) \quad (29)$$

2.6 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde nach dem PierceTM 660 nm Proteinassay durchgeführt. Der Proteinassay nach Pierce ist ein gebrauchsfertiges, mit Detergenzien und Reduktionsmitteln kompatibles Assay-Reagenz ("Pierce 660 nm Protein Assay Reagenz - Thermo Fisher Scientific", n. D.) zur Messung der Proteinkonzentration mittels einer BSA-Standardkalibrationsreihe. Für die Bestimmung der Enzym- oder Proteinkonzentration wurde die Enzymlösung auf eine Konzentration von 0,1 - 0,3 mg/mL verdünnt. Anschließend wurden 150 µL der Pierce-Lösung in eine Mikrotiterplatte pipettiert und mit 10 µL Enzymlösung versetzt. Die Lösung wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die Farbänderung bei Proteinbindung von rotbraun nach grün beobachtet werden konnte. Dieser Protein-Farbstoff-Komplex wurde mit dem Mikroplattenleser der Firma Tecan gemessen. Die Kalibrierkurve wurde unter Verwendung einer bekannten Konzentration von BSA und Messung der Absorption bei 660 nm und 25°C für eine Verdünnungsreihe bekannter Konzentrationen beginnend mit 2 mg/mL, bestimmt (Abb. 9). Diese Kalibrierungsgerade wird zur Berechnung der Enzymkonzentrationen verwendet. Die Inkubationszeit beeinflusst die Ergebnisse

des Assays erheblich, daher wurde sichergestellt, dass jedes Mal nach dem gleichen Verfahren vorgegangen wurde.

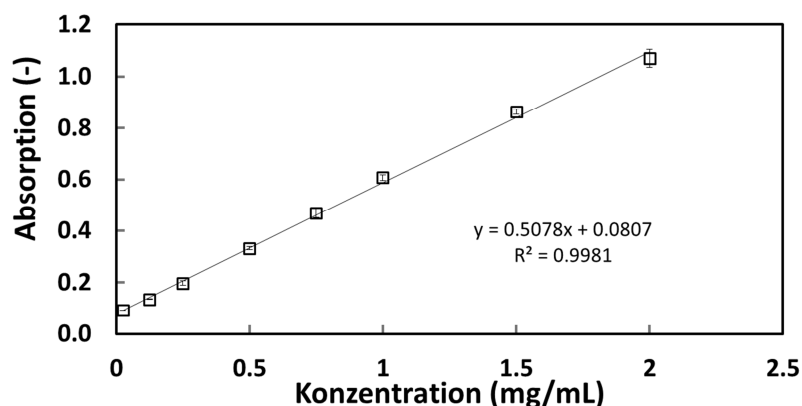


Abb. 9: Kalibriergerade mit BSA nach Pierce Assay (Mikroplattenleser, $\lambda = 660 \text{ nm}$, $T = 25^\circ\text{C}$)

2.7 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Konzentrationsbestimmung von L-Tyrosin und L-DOPA erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) von Agilent. In Abb. 10 ist die HPLC-Kalibrierung von L-Tyrosin und L-DOPA dargestellt.

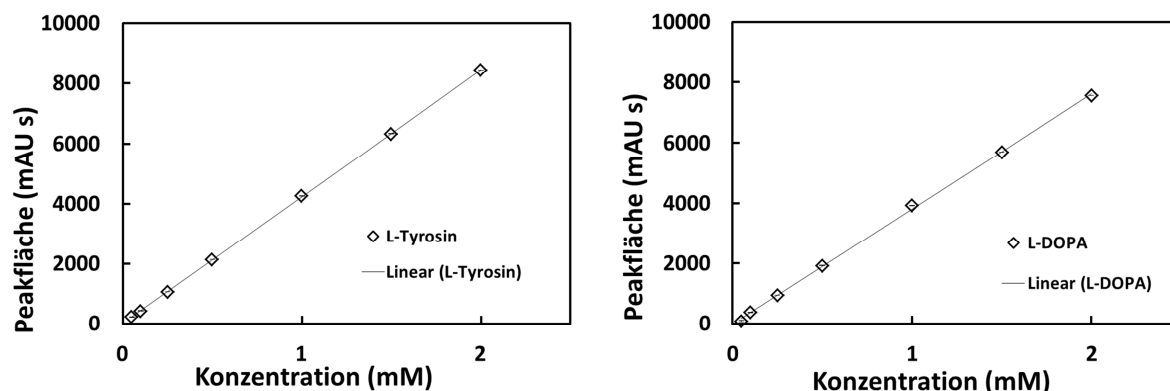


Abb. 10: HPLC-Kalibrierung von L-Tyrosin ($y = 4215,8x + 15,57$, $R^2 = 0,99$, $n = 1$) und L-DOPA ($y = 3818,2x - 14,24$, $R^2 = 1$, $n = 1$)

Die $100 \mu\text{L}$ Proben wurden mittels $100 \mu\text{L}$ Stopplösung (80 Vol.-% Acetonitril und 20 Vol.-% Wasser mit zusätzlich 3 Vol.-% TFA) versetzt, anschließend für 5 min bei 13000 rpm und Raumtemperatur ($\sim 20^\circ\text{C}$) zentrifugiert. Der Überstand dieser Lösung wurde in ein HPLC-Gefäß mit Mikroeinlass durch Pipettieren überführt und analysiert. Proben, welche aus dem Versuch noch Immobilisate enthielten, wurden zuvor filtriert ($d = 0,45 \mu\text{m}$). Die Konzentrationsmessung erfolgte mittels HPLC Agilent 1200 Infinity Series mit Dioden-Array-Detektor (DAD) und der Säule LiChrospher® 100 RP-18 ($5 \mu\text{m}$). Weiter ist ein Eluent eingesetzt worden mit der Zusammensetzung 97,52 Vol.-% Wasser, 2,4 Vol.-% Acetonitril, 0,078 Vol.-% TFA. Für die HPLC-Messung wurden eine Flussrate von $0,8 \text{ mL/min}$ und ein Injektionsvolumen von $10 \mu\text{L}$ eingestellt. Die Absorption von L-DOPA und L-Tyrosin wurde bei einer Wellenlänge von 224 nm und

einer Temperatur von 30°C gemessen. L-Tyrosin wies eine Retentionszeit von 8,7 min und L-DOPA von 13,3 min auf.

2.8 Gaschromatographie (GC)

Die Konzentration von Rhododendrol (Rho.) und Himbeerketon (Rasp.) wurde mit dem GC-FID System von Agilent und der chiralen Säule CP-Chirasil-Dex B (25 m*250 µm*0,25 µm) bestimmt, siehe Kalibrierung Abb. 11.

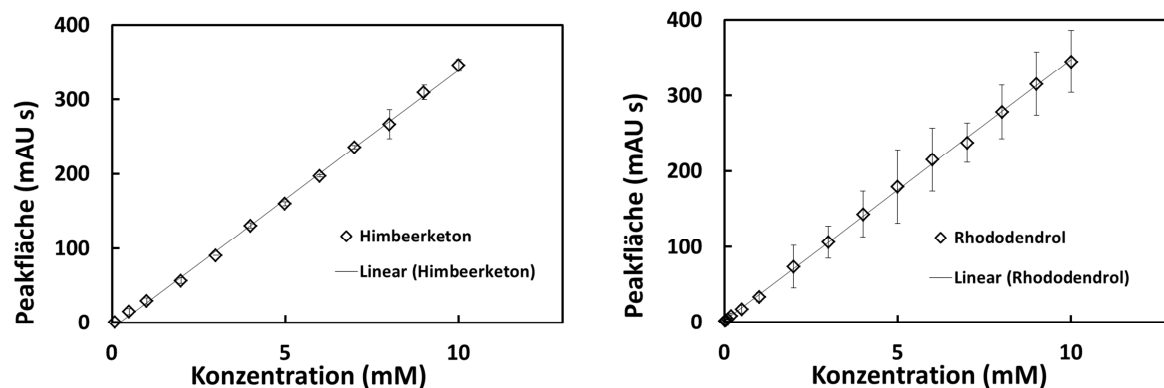


Abb. 11: GC-Kalibrierung von Himbeerketon ($y = 32,31x - 2,33$, $R^2 = 0,994$, $n = 3$) und Rhododendrol ($y = 33,08x - 0,33$, $R^2 = 0,993$, $n = 3$) in Ethylacetat

Zuerst wurden die Probe (Rho. oder Rasp. in 10 mM Tris-HCl Puffer, pH 8) im Verhältnis von 1:1 mit Ethylacetat versetzt und auf einen Vortex-Mischer bei 3000 rpm für 5 min gemischt. Anschließend konnten die Phasen durch Zentrifugation (Eppendorf Zentrifuge 5415D) der Probe für 5 min bei 13000 rpm getrennt und 150 µL der organischen Phase durch Pipettieren in ein GC-Probengefäß überführt werden. Das Injektionsvolumen für die Probe wurde für die Spritzengröße von 10 µL auf 1 µL eingestellt. Die Kolbengeschwindigkeit wurde als "schnell" festgelegt und der Standardinjektionstyp mit einem Luftloch von 0,2 µL für die Methode ausgewählt. Für die Analyse ist das Temperaturprofil für die GC festgelegt worden. Die Einlassheizung wurde auf 250°C eingestellt, der Druck auf 0,64 bar mit einem Gesamtfluss von 79,5 mL/min. Der Septumspülfluss wurde auf 3 mL/min sowie der Gassparmodus nach 2 min Methodenstart bei 20 mL/min eingeschaltet. Die Fließgeschwindigkeit in der Säule wurde auf 1,5 mL/min festgelegt, mit einem Druck, der dem des Einlasses bei 0,64 bar und einer Geschwindigkeit von 47,671 cm/s entsprach. Die Haltezeit wurde auf 0,9 min eingestellt und ein konstanter Durchfluss für das Trägergas in den Säuleneinstellungen gewählt. Die erste Rampe startete bei 100°C bis 180°C mit einer Haltezeit von 1 min. Die Temperaturanstiegsrate betrug 20°C/min. Die zweite Rampe startete dann bei 180°C bis 200°C mit einer Temperaturanstiegsrate von 10°C/min und einer Haltezeit von 2 min. Die gesamte Trennmethode dauerte 9 min. Es wurde ein Split von 1:50 für die Analysemethode festgelegt. Die Retentionszeit für Himbeerketon betrug 6,8 min und für Rhododendrol 7,3 min. Die Heizung des Detektors wurde auf 300°C, der Luftstrom auf 400 mL/min und die Brenngas (H₂)-Durchflussrate auf 30 mL/min sowie die Zusatzgasströmungsrate (He) auf 25 mL/min eingestellt. Mittels dieser GC-Methode wurden die Kalibration im Bereich von 0,02 - 12 mM für Rhododendrol und Himbeerketon durchgeführt (Abb. 11). Besonders sind die hohen Abweichungen innerhalb des

Extraktionsschritts zu erwähnen, welche vor allem von der Zentrifugationszeit abhängen. Dieses führte zu einer Abweichung von $\pm 10\%$ für Rhododendrol und einer Abweichung von $\pm 4\%$ (innerhalb der GC Abweichung) für das Himbeerketon im Vergleich zur erwarteten Konzentration. Auf Grund der deutlich präziseren Bestimmung des Himbeerketons wurde auf die weitere Betrachtung des Rhododendrol verzichtet.

2.9 Bestimmung der Blasengrößenverteilung mit SOPAT

Zur Bestimmung der Blasengrößenverteilung wurde eine endoskopische optische Sopat-VI Sc-Sonde von SOPAT (Berlin, Deutschland) mit einem Messbereich von 9 - 1200 μm verwendet. Diese Sonde war mit einer Kappe mit Spiegeleinsatz versehen. Durch die Kappe konnte die Spaltbreite zwischen Sonde und Teflonspiegel eingestellt werden. Für die Messungen wurde eine Spaltbreite von 5 mm verwendet.

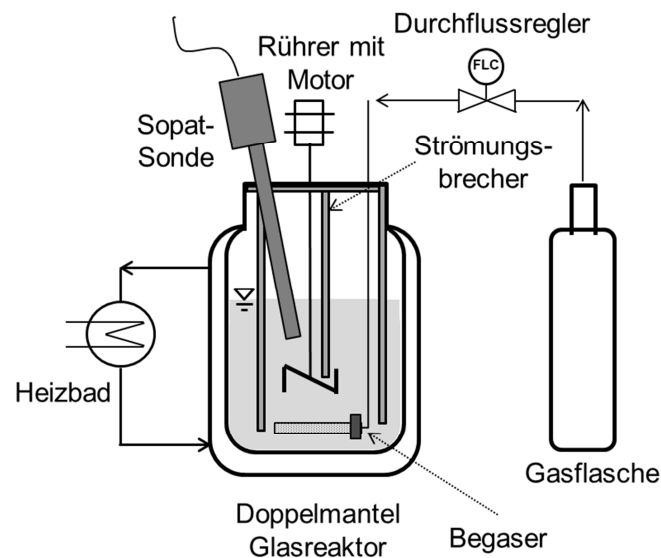


Abb. 12: Versuchsaufbau der Blasengrößenmessung mit SOPAT

Die Messungen wurden in einem begasten Rührkesselreaktor $V = 2 \text{ L}$ mit einem begasten Volumen von 1 L bei konstantem Leistungseintrag von 0,17 W/L (Schrägblattrührer) und einer Temperatur von 25°C durchgeführt. Das Medium enthielt 83,3 mg/L GOx in 10 mM Na-Acetatpuffer (pH 5,3). Eine Spaltbreite von 10 mm ist für die zuvor genannte Sonde eingestellt worden. Die erhaltenen Bilder wurden mit der integrierten Bildanalysesoftware von SOPAT (SOPAT Batcher Version 2.1.17.1623) analysiert. Die weitere Datenaufbereitung wie die logarithmische Regressionen wurden mit der Datenanalyse- und Grafiksoftware Origin 2019b von OriginLab (Massachusetts, USA) durchgeführt.

2.10 Ultrafeinblasen Generation mit AMB3

Das Generationsprinzip basiert auf einer Übersättigung des Mediums durch Kompression eines Gas/Flüssigkeitsgemisches, welches anschließend über einer Düse entspannt wird, siehe Abb. 13. Die Entspannung des Gemisches führt zum Ausgasen vom gelösten Gas, es bilden sich Mikro- und

Ultrafeinblasen. Hierbei wird das Medium kontinuierlich durch den Generator zirkuliert, wodurch Ultrafeinblasen akkumuliert werden können. Weiter besteht die theoretische Möglichkeit, dass Mikroblasen durch schnelles Einlösen und Selbst-Kompression zur Ultrafeinblasenbildung beitragen können (Iwakiri et al. 2017). Für die Generation der UFBs in Puffer-Lösung wurde das Volumen von 1 L in einem Tank vorgelegt. Der Generator wurde für 5 h betrieben, wobei in regelmäßigen Abständen 0,5 mL Probe aus dem Tank entnommen wurde. Alle Proben wurden wie in Abschnitt 2.11 mittels Nanopartikel-Tracking mit dynamischer Lichtstreuung im NS300 Nanosight nach beschriebenenem Vorgehen analysiert.

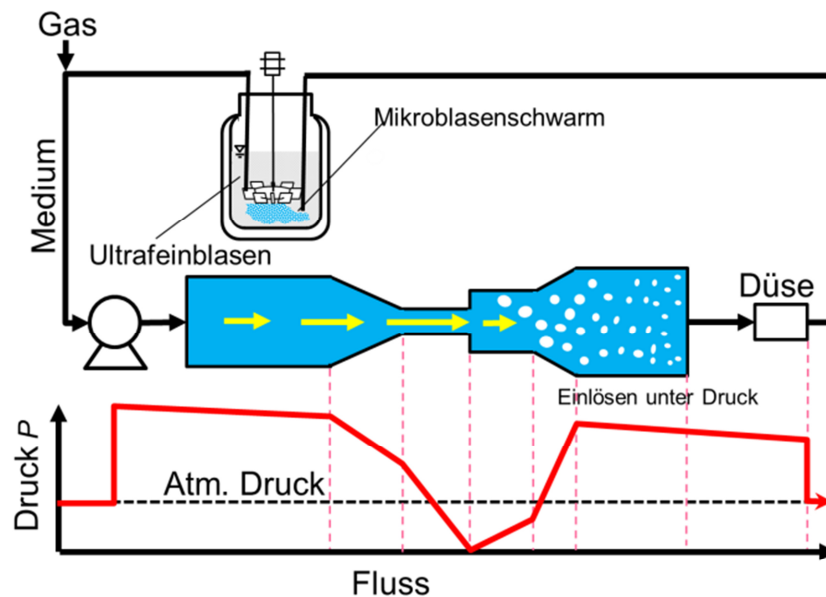


Abb. 13: Funktionsprinzip AMB3 Mikroblasengenerator

2.11 Nanopartikel-/ Ultrafeinblasenmessung

Für die Charakterisierung und Visualisierung von Nanopartikeln und Ultrafeinblasen wurde das NanoSight NS300 der Firma Malvern Instruments Ltd., welches Partikel mit einem Durchmesser im Bereich von 10 bis 1000 nm detektieren kann, verwendet. Das Messprinzip des Nanosight beruht auf der „Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)“ Technologie, welche die Eigenschaften der Lichtstreuung und Brown'schen Molekularbewegung nutzt, um suspendierte UFBs und Nanopartikel zu messen. Hierbei wird ein Lichtstrahl durch die Probe geleitet, wodurch dieser von den Partikeln in der Suspension gestreut wird (dynamische Lichtstreuung). Das gestreute Licht kann dann mittels der Kamera sCMOS aufgenommen werden. Diese Kamera arbeitet mit 30 Bildern pro Sekunde, woraus eine Videodatei erstellt wird. Basierend auf der Brown'schen Molekularbewegung wird die Bewegung von vielen einzelnen Partikeln verfolgt. Mittels der Stokes-Einstein-Gleichung können die hydrodynamischen Durchmesser der Partikel berechnet werden. Die Informationen zur Methoden und zum Funktionsprinzip des NanoSight NS3000 wurden der Broschüre „NANOSIGHT RANGE Visualize and measure particle size and concentration“ (www.malvernpanalytical.com, 15.06.2020,) von der Firma Malvern Panalytical entnommen.

Die Bestimmung von UFB Konzentration, der Blasengrößenverteilung sowie die Berechnung des mittleren Blasendurchmessers wurden mit dem NanoSight NS300 und der zugehörigen Software NanoSight NTA 3.2 durchgeführt. Hierbei konnten die mit dem AMB3 erzeugten UFBs im Puffer und Wasser gemessen werden. Zunächst Reinigung und Spülung der Messkammer mit ca. 3 mL Wasser bei Raumtemperatur (20°C), anschließend wurde die Messkammer geöffnet und mit einem nicht fasernden Tuch trocken gewischt. Im nächsten Schritt wurde die trockene Messkammer mit 1 mL Probe gespült, wobei die Messkammer komplett mit der Probenflüssigkeit gefüllt wurde. Daran anschließend konnte die Probenkammer auf 39°C temperiert werden. Die Aufzeichnung von Videos mit der Länge von jeweils 1 min erfolgte an fünf verschiedenen Stellen der Probe. Dieser Vorgang wurde für jede Probe wiederholt. Die Messung erfolgte durch einen grünen Laser mit der Wellenlänge von 532 nm bei einer Temperatur der Messkammer von 39°C. Um die bessere Reproduzierbarkeit der Einstellungen in der Programmsteuerung des NanoSight zu ermöglichen, wurden die Einstellung in englischer Sprache beibehalten: camera level 12, screen level 5, screen gain 10, slide gain 73, detector 5 und FPS 25. Die einzelne Aufnahmezeit betrug 1 min mit 5 einzelnen Videos (captures 5).

2.12 Reaktions- und Enzymstabilitätsversuche

Der Reaktionsaufbau bestand aus einem 500 mL Glasreaktor mit 3 Strömungsbrechern und einem Rührer. Die drei Strömungsbrecher haben einen Abstand von 120°, eine Länge von 10 cm und eine Breite von 1 cm. In diesem Reaktor wurde ein nach unten pumpender Schrägblattrührer (45°Schaufel, $d = 46$ mm) und ein Scheibenrührer eingesetzt. Die Begasungsrate wurde mit einem Durchflussmesser eingestellt. Die getesteten Belüfter waren offenes Rohr, gelochtes Rohr, AMB3, 1 µm SPG Membran, 0,5 µm, 2 µm und 10 µm Sinterfritte. Die Temperatur wurde mittels eines Thermostaten eingestellt. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms zum Reaktionsgemisch gestartet. Um einen konstanten pH-Wert und die Aufzeichnung der Titrationskurve der Gluconsäure sicherzustellen, wurde eine Autotitrationseinheit in den Aufbau aufgenommen.

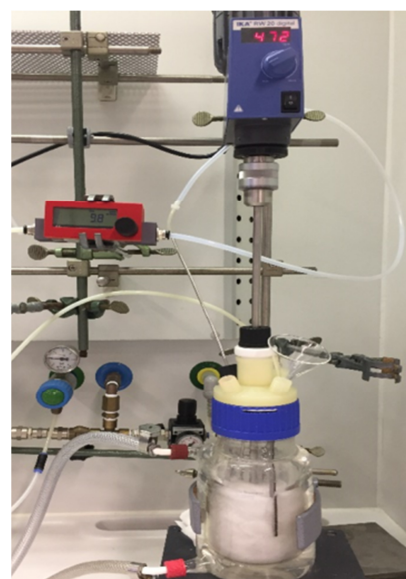
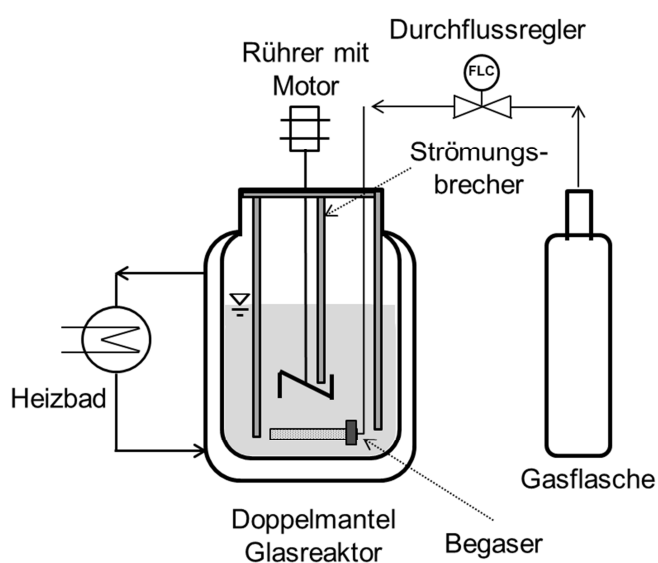


Abb. 14: Schema und Bild des Versuchsaufbaus der Reaktions- und Enzymstabilitätsversuche

In den Enzymstabilitätsmessungen wurde die 0.3 L Enzymlösung im begasten STR eingesetzt. Hierfür wurde eine Gaswaschflasche zur Befeuchtung des Begasungsstroms in den Aufbau integriert. Dennoch erfolgte durch Evaporation und den Begasungsstrom eine Aufkonzentration der begasten Enzymlösung. Daher wurde der Flüssigkeitsstand vor jeder Probenentnahme gemessen und in die Berechnung der Enzymstabilität integriert.

2.13 Funktionalisierung und Immobilisierung an Polyamid 12 (PA-12) Partikel

Die TYR und GOx VII wurden mittels der kovalenten Immobilisierungsmethode an Glutaraldehyd funktionalisiertes Polyamid 12 (PA-12) Partikel gebunden.

Die Funktionalisierung der PA-12 Partikel und Immobilisierung der Enzyme erfolgte analog der von Pahujani *et al.* beschriebenen Methode zur Immobilisierung von Lipase (Pahujani et al. 2008). Es wurde eine Konzentration von 0,285 g/mL PA-12 in einer 6 M Salzsäurelösung eingestellt, danach suspendiert bei Raumtemperatur (~20°C) für 30 min und inkubiert am Überkopfschüttler. Anschließend wurde das PA-12 Pulver mit < 0,08 g/mL mit destilliertem Wasser gespült und filtriert. Das PA-12 Pulver wurde (bezogen auf das trockene PA-12 Pulver) in 2,5 Vol-%. Glutaraldehydlösung (0,1 M KP_i, pH 7) suspendiert und eine Konzentration von 0,3 g/mL eingestellt. Anschließend Inkubation für 60 min bei Raumtemperatur am Überkopfschüttler. Danach folgte ein zweiter Spülschritt, in welchem das Glutaraldehyd funktionalisierte PA-12 Pulver mit einer Konzentration von mindestens 0,08 g/mL mit destilliertem Wasser gespült und erneut filtriert wurde. Zur Immobilisierung wurde das funktionalisierte PA-12 Pulver in einer 1 mg/mL Enzymlösung von GOx oder TYR suspendiert und eine Konzentration von 0,285 g/mL eingestellt. Diese Suspension konnte bei 4°C für 20 h am Überkopfschüttler inkubiert werden. Weiter ist das Immobilisat mit Puffer mit mindestens 0,08 g/mL (bezogen auf das trockene Pulver) gespült und anschließend erneut filtriert worden. Der Spülschritt erfolgte für GOx mit 10 mM Na-Acetat Puffer (pH 5,3) und für TYR mit 50 mM KP_i Puffer (pH 6,5). Die feuchten PA-12 Immobilisate wurden bei 4°C nach Filtration gelagert.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Enzym Charakterisierung im nicht begasten System

Um die begasungsspezifischen Effekte, besonders die erzeugte Blasengröße auf eine biokatalytische Reaktion zu untersuchen, werden detaillierte Kenntnisse der Reaktionsparameter wie Lagerstabilität, Temperatur- und pH-Profil, Michaelis-Menten Parameter etc. des Modellenzymystems benötigt. Hierbei ist die Lagerstabilität die Stabilität des gelösten Enzyms unter den angegebenen Reaktionsbedingungen. Zu diesem Zweck sind vier Modellenzymssysteme Gegenstand der Untersuchungen: Glucoseoxidase/Katalase, Tyrosinase, NADH Oxidase/Alkoholdehydrogenase und Cytochrom P450/Glucosedehydrogenase. Alle genannten Systeme zeichnen sich durch ihre Abhängigkeit vom gelösten Sauerstoff als Substrat aus. Die Löslichkeit von Sauerstoff in wässrigen Lösungen ist mit einer Sättigungskonzentration von 0,284 mmol/L (20°C) im Vergleich zu anderen Komponenten wie Glucose, welche eine deutlich höhere Löslichkeit von 2608 mmol/L (20°C) besitzt, sehr gering. Deshalb stellt die geringe Sauerstofflöslichkeit in vielen biokatalytischen Prozessen eine Limitierung dar (Bolivar et al. 2019). Hierfür werden nachfolgend die einzustellenden Reaktionsbedingungen ermittelt und die Oxidasen bezüglich der enzymmengenspezifischen Sauerstoffverbrauchsrate (basierend auf der dem gemessenen v_{max}) verglichen. Die in dieser Arbeit aus den Experimenten bestimmten kinetischen Parameter werden in erster Näherung mit Literaturdaten verglichen, die unter ähnlichen Bedingungen ermittelt wurden.

3.1.1 Glucoseoxidase (GOx)/ Katalase (Cat.)

Die Transformation von β -D-Glucose zu D-Glucono-1,5-lacton (siehe Abb. 15) wird durch das Enzym Glucoseoxidase katalysiert (EC 1.1.3.4). Dabei entstehen stöchiometrische Stoffmengen an Wasserstoffperoxid (H_2O_2) als Nebenprodukt. Die Bildung von Wasserstoffperoxid als Nebenprodukt tritt bei einer Vielzahl von Oxidasen auf (Bao et al. 2003; Cui et al. 2019). Weiter reagiert D-Glucono-1,5-lacton mit Wasser zu D-Gluconsäure. Die gebildete D-Gluconsäure kann durch Titration mit NaOH zu Na-Gluconat reagieren. Aus der erhaltenen Titrationskurve der D-Gluconsäure kann direkt die Ausbeute der Reaktion bestimmt werden.

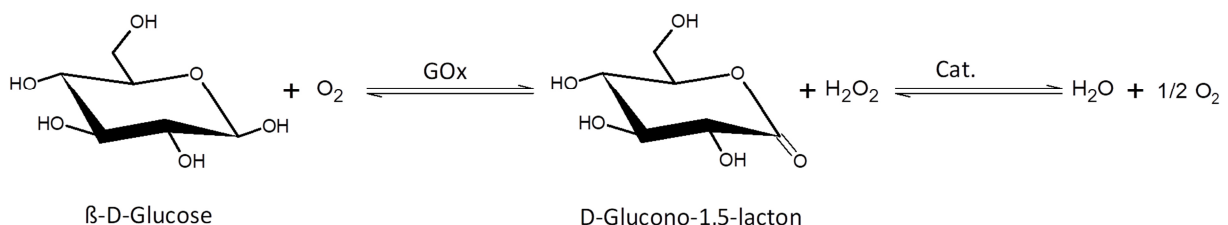
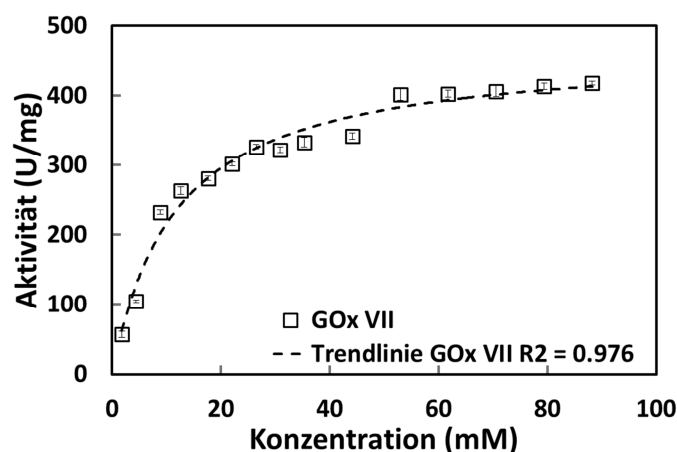


Abb. 15: Reaktionsschema des Glucoseoxidase (GOx)/Katalase (Cat.) Systems

Insbesondere die Untersuchung der Einflussfaktoren wie Temperatur, pH, Puffersystem, Lagerstabilität und Michaelis-Menten Parameter sind von großer Bedeutung, um Experimente zu entwerfen, welche eine Interpretation hinsichtlich der Begasungsart zulassen. Hierfür wird eine β -D-Glucoseoxidase (GOx) Type VII aus *Aspergillus niger* untersucht. Diese GOx besitzt eine

$v_{max} = 450$ U/mg, (Herstellerangabe), woraus sich eine enzyemmengenspezifische Sauerstoffverbrauchsrate von $450 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ergibt (Sigma-Aldrich Co. LLC 2018). Mit dem Ziel, einen Puffer für die folgenden Experimente auszuwählen, wurden drei verschiedene Puffersysteme getestet (Abb. 58). Im Vergleich der Puffersysteme MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure), Phosphat-Citrat und Na-Acetat konnte im Konzentrationsbereich von 10 - 500 mM kein Einfluss der GOx-Aktivität festgestellt werden (siehe Anhang, Abb. 58). In der Literatur wird ein pH- und Temperatur-Aktivitätsmaximum im Bereich von pH 5 - 6 und 30 - 60°C für GOx aus *A. niger* beschrieben, welches in Übereinstimmung mit den Ergebnissen (siehe Abb. 17 A) in dieser Untersuchung ist (Bankar et al. 2009; Wilson and Turner 1992). Aus der Untersuchung der Lagerstabilität (Abb. 17 B), geht ein für diese Untersuchungen geeigneter Temperaturbereich von 35 - 40°C mit den Halbwertszeiten von 81 h und 64 h hervor. Bankar, Bule *et al.* berichten für eine vergleichbare GOx-Mutante aus *A. niger* eine niedrigere Halbwertszeit von 30 min bei 37°C (Bankar et al. 2009). In der Literatur wird weiterhin eine Halbwertszeit von GOx aus *A. niger* mit Werten im Bereich von 58 - 141 h angegeben (Mafra et al. 2015). Dieser Wert entspricht den in dieser Arbeit ermittelten Stabilitäten (Abb. 17 B). Auf Basis der beschriebenen Ergebnisse wird die Michaelis-Menten-Kinetik (MMK) der Umwandlung von β -D-Glucose in 10 mM Na-Acetatpuffer (pH 5,3) bei 35°C mit einem $K_m = 11,7 \pm 1,1$ mM und $v_{max} = 474,6 \pm 12,4$ U/mg bestimmt (Abb. 16).



GOx VII	
v_{max}	$474,6 \pm 12,4$ U/mg
K_m	$11,7 \pm 1,1$ mM

Abb. 16: Michael-Menten Kinetik für die GOx VII (0,021 mM o-Dianisidin, 10 mM Na-Acetat Puffer pH = 5,3, 1 Gew.-% D-Glucose, 520 nm, T = 35°C, 20 U/mL GOx, 20 U/mL Katalyse, n = 3)

Nakamura *et al.* berichten von einem $K_{m, O_2} = 0,18$ mM für eine Mutante von GOx aus *A. niger* bei 25°C in 50 mM Na-Acetatpuffer und pH 5,5 (Nakamura et al. 1976). Wie zuvor genannt, entsteht Wasserstoffperoxid (H_2O_2) als Nebenprodukt der Reaktion (siehe Abb. 15). Wasserstoffperoxid kann inhibierend und bei hohen Konzentrationen auch deaktivierend auf die GOx wirken (Silva et al. 2011; Tomotani et al. 2005). Um die Anreicherung von Wasserstoffperoxid während der Reaktion zu vermeiden, wird Katalase mit einem Überschuss an Aktivität zugesetzt (Bao et al. 2003; Hernandez et al. 2012; Zhang et al. 2019). In der Folge wird eine teilweise Rückführung von $1/2 O_2$ aus H_2O_2 durch Katalase erreicht (Bolivar et al. 2019). Die Zugabe von Katalase ändert die Gesamtreaktionsgleichung, wodurch nur $1/2 O_2$ für die Bildung von D-Glucono-1,5-Lacton benötigt wird. Dadurch halbiert sich die enzyemmengenspezifische Sauerstoffverbrauchsrate von $450 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ auf $225 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Aus der Abwägung von hohen enzyemmengenspezifischen Sauerstoffverbrauchsraten und hoher Enzymstabilität (Halbwertszeit) konnte eine geeignete Reaktionstemperatur von 35°C (siehe Abb. 17, B) identifiziert werden.

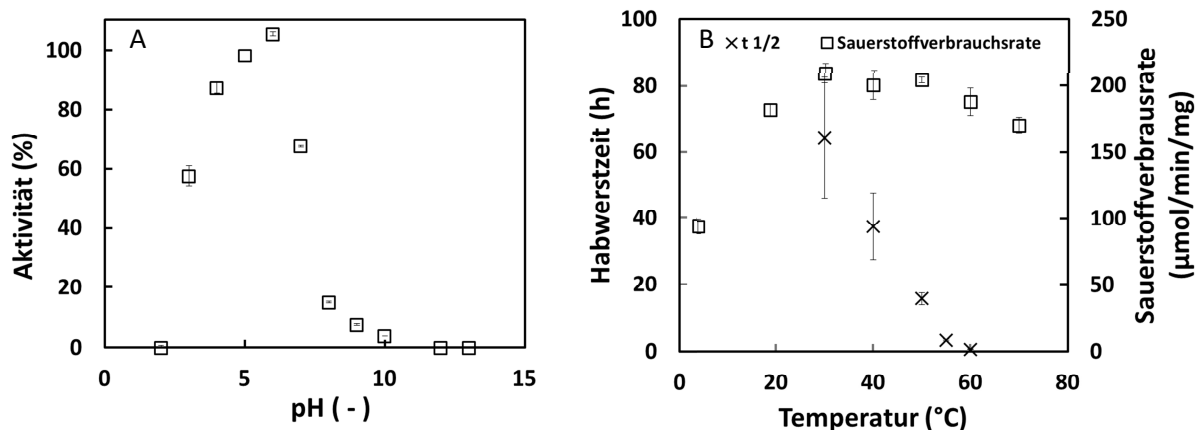


Abb. 17: Charakterisierung einer Glucoseoxidase (GOx) Typ VII bezüglich pH, enzymmengenspezifischen Sauerstoffverbrauch und Temperaturstabilität (0,021 mM o-Dianisidin, 10 mM Na-Acetat Puffer pH = 5,3, 1 Gew.-% D-Glucose, 520 nm, T = 35°C (pH Untersuchung), 20 U/mL GOx, 20 U/mL Katalase, n = 3)

Basierend auf den Ergebnissen der Enzymcharakterisierung wurden weitere Experimente bei 35°C und pH 5,3 in 0,3 L Reaktionsmedium durchgeführt. Hierbei wurde eine Konzentration von 87,8 mM D-Glucose mit 11865 ± 310 U GOx und Katalase in geringen Überschuss an Aktivität eingesetzt. Mit der gewählten GOx-Konzentration kann eine enzymmengenspezifische Sauerstoffverbrauchsrate von $237,3 \pm 6,2$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (5932 ± 155 $\mu\text{mol}/\text{min}$ für 0,3 L (unter Berücksichtigung des Sauerstoffrecyclings durch Katalase) für die vorliegende GOx Typ VII berechnet werden.

3.1.2 Tyrosinase (TYR)/Ascorbat (Asc.)

Das Enzym Tyrosinase EC 1.14.18.1 aus *Agaricus bisporus* (Kertesz and Zito 1965; Sigma-Aldrich Corp. 2018) katalysiert die Oxidation von L-Tyrosin mit Sauerstoff zu L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) siehe Abb. 18, dem Hauptwirkstoff in modernen Parkinson-Therapeutika (Chagraoui et al. 2019).

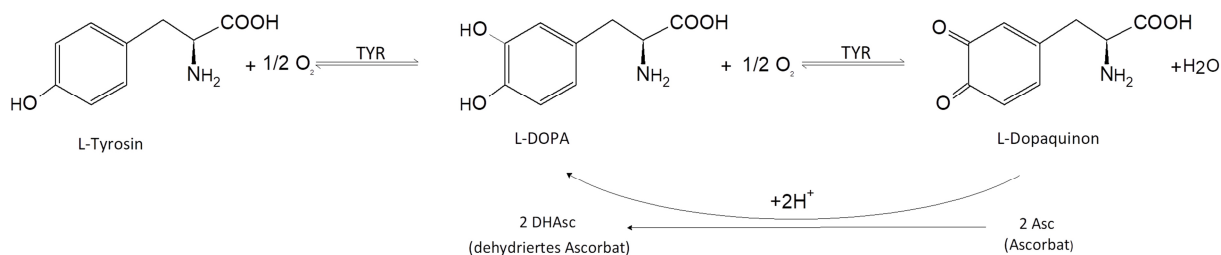


Abb. 18: Reaktionsschema des Tyrosinase (TYR)/Ascorbat (Asc) Reaktionssystems

Die Tyrosinase (TYR) weist im Vergleich zu anderen Oxidasen in dieser Arbeit, wie NOX34 mit einem $v_{max} = 12,86 \pm 1,22$ U/mg und GOx Typ VII mit einem $v_{max} = 474 \pm 12,4$ U/mg, die höchste Aktivität mit einer v_{max} von 8300 U/mg (Muñoz-Muñoz et al. 2008) auf. Aus den experimentellen Daten in Abb. 19 wurde in dieser Arbeit eine höhere v_{max} von $9172 \pm 440,8$ U/mg (T = 25°C, Substrat L-Tyrosin) mittels Regression bestimmt. In der Reaktion wird $1/2 \text{O}_2$ zur Oxidation von L-Tyrosin zu L-DOPA benötigt. In

Bezug auf die v_{max} kann die enzymmengenspezifische Sauerstoffverbrauchsrate von $3750 \pm 220,4 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ berechnet werden. Im Vergleich zur GOx mit $237,3 \pm 6,2 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ weist die TYR deutlich höhere enzymmengenspezifische Sauerstoffverbrauchsrate auf. Jedoch ist die hohe enzymmengenspezifische Sauerstoffverbrauchsrate von TYR auch ein Resultat der Folgereaktion von L-DOPA mit $1/2 \text{O}_2$ zu L-Dopaquinon. Zusätzlich absorbieren L-Dopaquinon und L-DOPA bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ unterschiedlich stark, wodurch es zu einer Überschätzung der Reaktionsgeschwindigkeit im Photometer-Assay kommen kann. Dennoch bieten die hohe enzymmengenspezifische Sauerstoffverbrauchsrate und die hohe Aktivität der TYR ein großes Potenzial für die Anwendung von Feinblasen zur Erhöhung des Stofftransports. Hierzu wird die TYR detailliert charakterisiert und die Zusammensetzung der Substratlösung angepasst. Die Variation der Pufferstärke im Bereich von 10 - 1000 mM in Na-Acetat (pH 6,5), Citrat-Phosphat (pH 6,5) und Kalium-Phosphat Puffer (pH 6,5) hatte hohe Aktivitätsverluste zur Folge. Lediglich bei niedrigen Konzentrationen von bis zu 100 mM KP_i Puffer konnte kein Aktivitätsverlust beobachtet werden (siehe Anhang, Abb. 59). In der Literatur wird ein Aktivitätsmaximum von pH 6-7 beschrieben (Bru et al. 1989; Selinheimo et al. 2009).

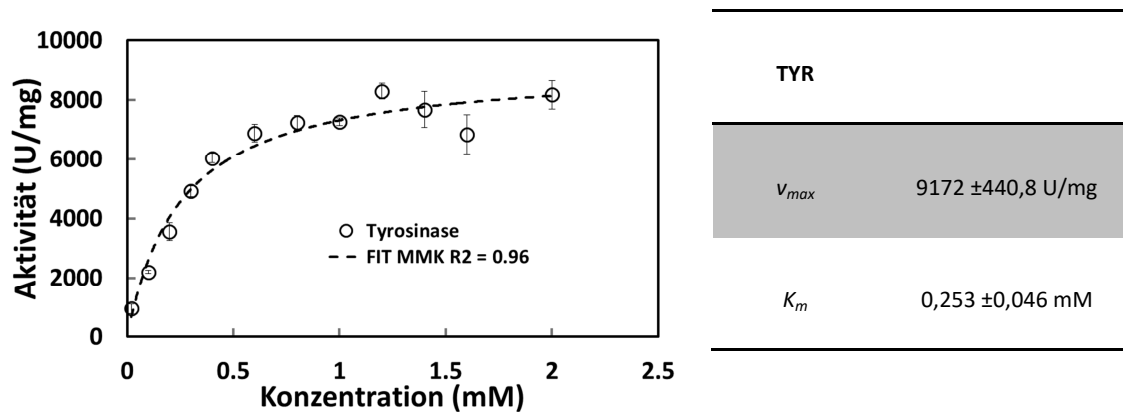


Abb. 19: Michael-Menten Kinetik für die Tyrosinase (Photometerassay: 0,05 mg/mL Tyrosinase, 1 mM L-Tyrosin, 50 mM KP_i Puffer, pH 6,5 bei 20°C, $\lambda = 280 \text{ nm}$, K_m bezüglich L-Tyrosin)

Dieses Aktivitätsmaximum kann mit den Messdaten dieser Untersuchung bestätigt werden (Abb. 20 A). Yang *et al.* beschreibt ein temperaturabhängiges Aktivitätsmaximum für TYR aus *Agaricus bisporus* im Bereich von 20 - 50°C mit der höchsten Aktivität bei 45°C (Yang et al. 2008). In der Untersuchung der Enzymstabilität im Temperaturbereich von 4 - 30°C ist ab 20°C eine Halbwertszeit von ca. 10 h bestimmt worden (Abb. 20, A). Gouzi et al. berichtet, dass TYR aus *Agaricus bisporus* nur bis maximal 35°C eine Halbwertszeit von mehr als einer Stunde aufweist (Gouzi and Benmansour 2007). Im Gegensatz hierzu wird in älterer Literatur von Kertesz *et al.* von einer Lagerstabilität der TYR aus *Agaricus bisporus* des Herstellers Sigma Aldrich mit 40% - 60% Restaktivität nach 7 d bei 37°C berichtet, welche deutlich höher ist, als die experimentell bestimmten Stabilitäten in dieser Arbeit (siehe Abb. 20 B) (Kertesz, Rotilio, Brunori, Zito, & Antonini, 1972). Auf Grund der geringen Temperaturstabilität der TYR wird eine Reaktionstemperatur von 15°C und ein pH von 6,5 für weitere Experimente gewählt (Abb. 20 B).

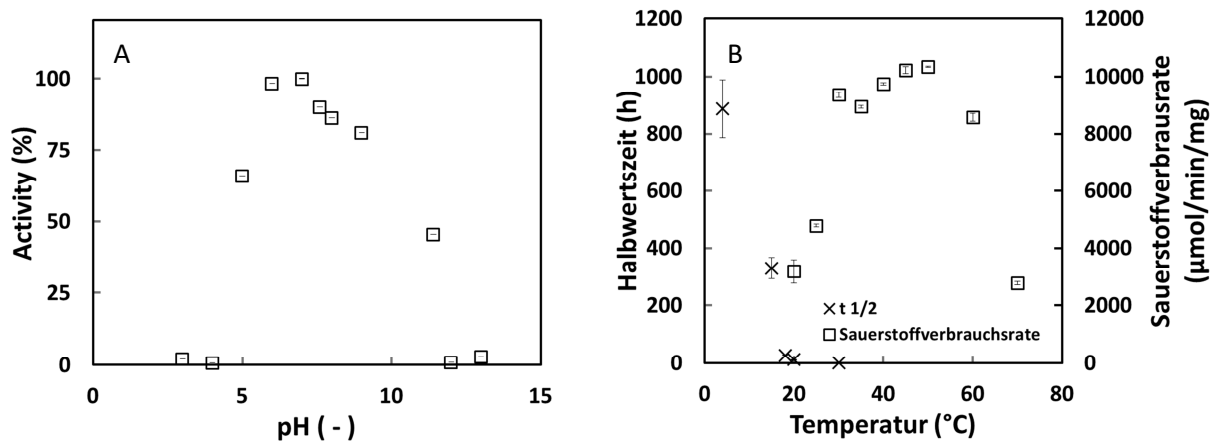


Abb. 20: Charakterisierung einer Tyrosinase-Reaktion (Photometerassay: 0,05 mg/mL Tyrosinase, 1 mM L-Tyrosin, 50 mM KP_i Puffer, pH 6,5 bei 20°C, $\lambda = 280$ nm)

Die Bestimmung der TYR-Kinetik in Abb. 19 ergab für die TYR in dieser Arbeit einen $K_{m, L-Tyrosin} = 0,253 \pm 0,05$ mM (20°C), welcher nur halb so hoch ist, wie der vom Hersteller und Espin *et al.*, angegebene $K_{m, L-Tyrosin} = 0,5$ mM (Espín *et al.* 1999; Sigma-Aldrich Corp. 2018). In späteren Veröffentlichungen werden $K_{m, L-Tyrosin} = 0,21$ mM (TYR *Agaricus bisporus*) angegeben, welche in guter Übereinstimmung mit den $K_{m, L-Tyrosin}$ dieser Arbeit sind (Espín *et al.* 2000; Garcia-Jimenez *et al.* 2016; Ortiz-Ruiz *et al.* 2015a). Jedoch sind auch höhere $K_{m, L-Tyrosin}$ von 0,347 mM (*Agaricus bisporus*) in der Literatur beschrieben (Chiari *et al.* 2011). Eine Herausforderung dieses Modellreaktionssystems besteht in der Selektivitätsoptimierung durch Unterdrückung der Folgereaktion vom Produkt L-DOPA zum Folgeprodukt L-Dopaquinon (Ortiz-Ruiz *et al.* 2015b). Die L-Dopaquinon-Bildung kann durch Reduktion zu L-DOPA durch die Zugabe von Ascorbat vermindert oder unterdrückt werden (Behbahani *et al.* 1993; Ros *et al.* 1993). Im Experiment ohne Begasung konnte eine Selektivität von $S = 1$ bei einem Einsatz von Enzym- (0,013 mg/mL) und Ascorbatkonzentration (40 mM) bestimmt werden, wobei nur geringe Ausbeuten von ca. $Y = 30\%$ (20°C) und geringe Sauerstoffkonzentrationsabnahmen gemessen werden konnten (Abb. 21 A).

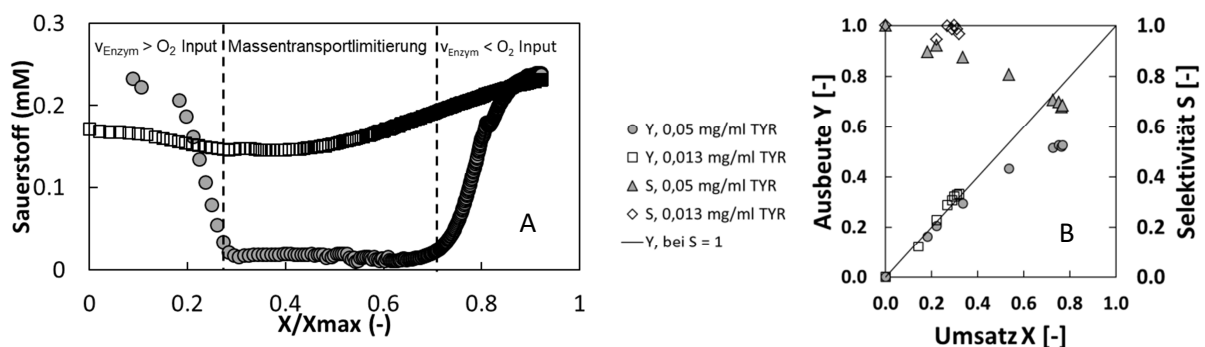


Abb. 21: Sauerstoffkonzentration Abb. A) und Selektivität (S) Abb. B) bei Variation der Tyrosinasekonzentration im nicht begasten Reaktor (0,05 und 0,013 mg/mL Tyrosinase in 5 mL Reaktionsansatz mit 1 mM L-Tyrosin, 40 mM Ascorbat und 50 mM KP_i Puffer, pH 6,5 bei 20°C und 100 rpm mit Magnetrührer, $n = 1$)

Wie in Abb. 21 dargestellt ist, führt eine Erhöhung der Enzymmenge auf 0,05 mg/mL bei gleicher Ascorbatkonzentration von 40 mM zur Steigerung des Umsatzes und der Ausbeute. In der Folge sinkt

die Selektivität (bezüglich L-DOPA) im betrachteten Zeitraum von zwei Stunden auf $S = 0,69$ (bei 1 mM L-Tyrosin) im Vergleich zur niedrigeren Enzymmenge von 0,013 mg/mL.

Die in der Literatur verzeichneten Michaelis-Menten Konstanten für TYR aus *Agaricus bisporus* und L-DOPA als Substrat sind für die Interpretation der Folgereaktion von Bedeutung. Es sind $K_{m,L-DOPA} = 0,15$ mM (Espín et al. 1999), $K_{m,L-DOPA} = 0,17$ mM (Flurkey et al. 2008; Selinheimo et al. 2009) und $K_{m,L-DOPA} = 0,8$ mM (Espín et al. 2000). Im Vergleich wird für die in dieser Arbeit verwendete TYR ein $K_{m,L-DOPA} = 1,5 \pm 0,07$ mM angegeben (Espín et al. 1999; Sigma-Aldrich Corp. 2018). Weiter ist die Reaktion und Folgereaktion von der Konzentration an gelöstem Sauerstoff als zweites Substrat abhängig. Die Michaelis-Menten Konstante bezüglich Sauerstoff für die TYR aus *Agaricus bisporus* ist in der Literatur mit $K_{m,O_2} = 0,5 \pm 0,04$ mM (Substrat L-Tyrosin, pH 6,8) angegeben (Espín et al. 1999). Zusätzlich zu der hohen enzymmengenspezifischen Sauerstoffverbrauchsrate von TYR befindet sich der K_{m,O_2} deutlich unterhalb der Sättigungskonzentration von 0,256 mM (20°C), welches zur Limitierung der Reaktion durch Sauerstoff beiträgt. In der Literatur ist für eine vergleichbare, andere Präparation von Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* (mit geringerer Aktivität von 1530 U/mg) ein $K_{m,O_2} = 0,015 - 0,016 \pm 0,001$ μ M (pH 4,5 -7, Substrat L-Tyrosin) (Muñoz-Muñoz et al. 2009) beschrieben. Sie befinden sich deutlich unterhalb der Sättigungskonzentration von 0,315 mM (bei 15°C, in reines Wasser). Für die verwendete Präparation wird eine $K_{m,O_2} = 2,1 \pm 0,11$ μ M (pH 6,8, L-Tyrosin) angegeben (Espín et al. 1999). Hingegen ist für die Folgereaktion eine deutlich höhere $K_{m,O_2} = 38,2 \pm 3,1$ μ M (Substrat L-DOPA) bekannt (Espín et al. 1999), welche deutlich höher ist, als für die Umsetzung von L-Tyrosin. Durch den K_{m,O_2} wird jedoch nur die Affinität der Reaktionsschritte zu Sauerstoff beschrieben, nicht aber die eigentliche Reaktionsgeschwindigkeit der unerwünschten Folgereaktion.

3.1.2.1 Übergeordnete Diskussion zum Enzymsystem Tyrosinase mit Ascorbat

Aus der oben dargelegten Charakterisierung der verwendeten Tyrosinase werden folgende Reaktionsbedingungen für weitere Experimente mit Begasung ausgewählt: 1 mM L-Tyrosin, 40 mM Ascorbat, 50 mM KP_i Buffer, pH 6,5 bei 15°C. Besonders von Bedeutung ist der Einfluss des Verhältnisses von Enzym- zu Ascorbatkonzentration für die Selektivität bezüglich L-DOPA. Bei einer Enzymkonzentration von 0,050 mg/mL kann eine deutliche Abnahme der Sauerstoffkonzentration festgestellt werden. Unter Berücksichtigung der enzymmengenspezifischen Reaktionsrate von $v = 7500$ U/mg (MMK bei 1 mM L-Tyrosin siehe Abb. 19) ergibt sich eine enzymmengenspezifische Sauerstoffverbrauchsrate von 3,75 mmol/min/mg. Für erste Experimente wurde eine Enzymkonzentration von 0,05 mg/mL gewählt. Auf Grund der hohen enzymmengenspezifischen Sauerstoffverbrauchsraten eignet sich dieses Reaktionssystem besonders für Experimente zur Validierung der mit GOx beobachteten Effekte. Neben der Sauerstofflimitierung stellt die Optimierung der Selektivität der chemo-enzymatischen L-DOPA Synthese eine zusätzliche Herausforderung im Vergleich zum GOx-System dar. Weiter ist der Einfluss bei Anwendung verschiedener Begasungssysteme und Blasengrößen auf den Reaktionsumsatz und die Selektivität von Interesse.

3.1.3 NADH Oxidase (NOX)/ Alkoholdehydrogenase (ADH)

Als drittes Reaktionssystem wurde eine Enzymkaskade aus NADH-Oxidase (NOX) und Alkoholdehydrogenase (siehe Abb. 22) bezüglich der optimalen Reaktionsparameter und Begaser

verglichen und charakterisiert. Hierzu wurde als Modellreaktion die Umsetzung von Rhododendrol und NAD^+ zu Himbeerketon und NADH untersucht. Diese Reaktion steht modellhaft für eine Vielzahl von Synthesen, in welchen NAD^+ und NADH als Co-Faktoren/ Substrat zum Einsatz kommen (Abb. 22). In der Industrie werden häufig Glucosedehydrogenase oder Wasserstoffperoxid formende NOX eingesetzt (Higuchi et al. 1999; Panday et al. 2015). Die Bildung von Wasserstoffperoxid als Nebenprodukt stellt eine besondere Herausforderung dar.

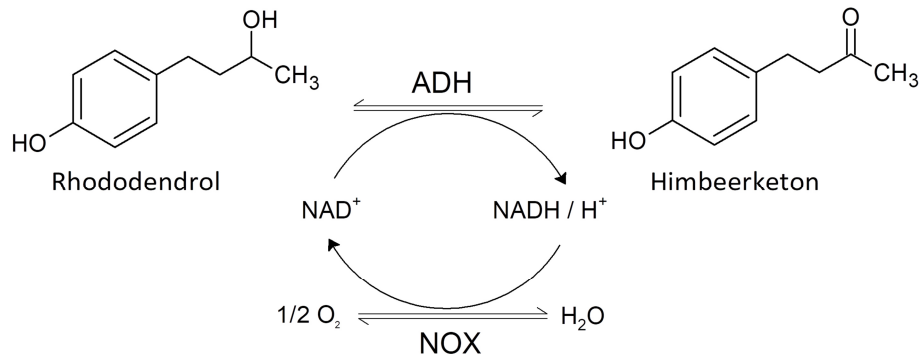


Abb. 22: Reaktionsschema des NADH Oxidase (NOX)/ Alkoholdehydrogenase (ADH) Systems (Rhododendrol auch als 4-(3-Hydroxybutyl) phenol und Himbeerketon auch als 4-(4-Hydroxyphenyl)-butan-2-on bekannt)

In dieser Untersuchung wird der Fokus auf den Einsatz von wasserformenden NADH-Oxidasen gelegt (Higuchi et al. 1993; Kawasaki et al. 2004; Wu et al. 2020). In Anbetracht dessen kann der Aufwand der Abtrennung im Downstream reduziert, sowie der Enzymeinsatz von Katalase vermieden werden. Ziel der Charakterisierung sind Kenntnisse über Einflussfaktoren, v_{max} basierender Sauerstoffverbrauch, Enzymstabilität und Michaelis-Menten Parameter, um eine vom Sauerstofftransport abhängige Untersuchung der verschiedenen Begasungsarten auf die Ausbeute der Reaktion zu ermöglichen.

3.1.3.1 Alkoholdehydrogenase (ADH97L)

Ziel dieses Abschnitts ist die Auswahl und Charakterisierung einer stabilen ADH für den Einsatz im begasten Rührkesselreaktor. Um eine geeignete ADH auszuwählen, wurden die ADH Präparationen von c-LEcta: ADH99L, ADH168 und ADH97L bezüglich der Umsetzung von sekundären Alkoholen zu Ketonen am Beispiel von 2-Propanol untersucht. Im Vergleich zu den ADH-Präparationen erzielten ADH99L und ADH168 geringe Aktivitäten von 0,02 U/mg und 0,002 U/mg, welche die Detektionsgrenze des Photometers unterschritten. Die höchste Aktivität mit 0,3 U/mg (100 mM Tris-HCL Puffer pH 7, 0,1 mM NAD^+ , 10 mM 2-Propanol, $T = 30^\circ\text{C}$) wurde mit der ADH97L gemessen, welche für weitere Experimente ausgewählt wurde. Die ADH97L ist ein kommerziell erhältliches industrielles Enzym, weshalb leider keine Information zum Ursprungsorganismus vorliegt. In ersten Aktivitätsmessungen mit dem Substrat Rhododendrol konnte eine hohe Aktivität für die ADH97L von 30 U/mg (100 mM Tris-HCL, Puffer pH 8, 2 mM MgCl_2 , 0,1 mM NAD^+ , 0,4 mM Rhododendrol, $T = 30^\circ\text{C}$) bestimmt werden. In weiteren Experimenten ist die Aktivität der ADH97L in Tris-HCL und KP_i Puffer im Konzentrationsbereich von 10 - 1000 mM bestimmt worden (siehe Abb. 62). Bei niedrigen Konzentrationen von 0,01 - 0,1 mM ist kein Einfluss auf die Aktivität sichtbar. Im

Mein Dank gilt Dr. S. Kara und D. J. Opperman (University of Free State, South Africa), wodurch die NOX-Opp im Rahmen einer Kooperation auch in dieser Arbeit getestet werden konnte. Weiter gilt mein Dank Andreas Vogel von c-LEcta für die Unterstützung und die Bereitstellung der NOX24 und NOX34.

Bereich ab 200 - 1000 mM ist eine hohe Aktivitätsabnahme im KP_i Puffer zu beobachten. Im Gegensatz dazu, ist im Tris-HCL Puffer kein Einfluss auf die Aktivität im Konzentrationsbereich von 200 - 1000 mM zu verzeichnen (siehe Abb. 62). Eine Erklärung für die geringe ADH Aktivitäten in hohen Konzentrationen von KP_i Puffer ist der negative Einfluss auf die $NAD^+/NADH$ Stabilität durch Adduktbildung zwischen Phosphat und dem $NAD^+/NADH$ (Pyridinring) (Rover Júnior et al. 1998). Es ist bekannt, dass $NADH$ Stabilität bei milden Temperaturen bis maximal $30^\circ C$ und alkalischem pH aufweist (Rover Júnior et al. 1998; Schauenstein et al. 1980). Aus diesem Grund ist die Reaktionstemperatur durch die Stabilität von $NADH$ auf den genannten Wert beschränkt. Die Aktivität der ADH97L steigt mit höherem pH (im alkalischen) bis auf 37 U/mg an (Abb. 24). Es konnte für die Michaelis-Menten-Kinetik ein $v_{max} = 40,94 \pm 1,13$ U/mg sowie $K_m = 0,023 \pm 0,002$ mM (siehe Abb. 23) mittels Regression bestimmt werden ($T = 25^\circ C$).

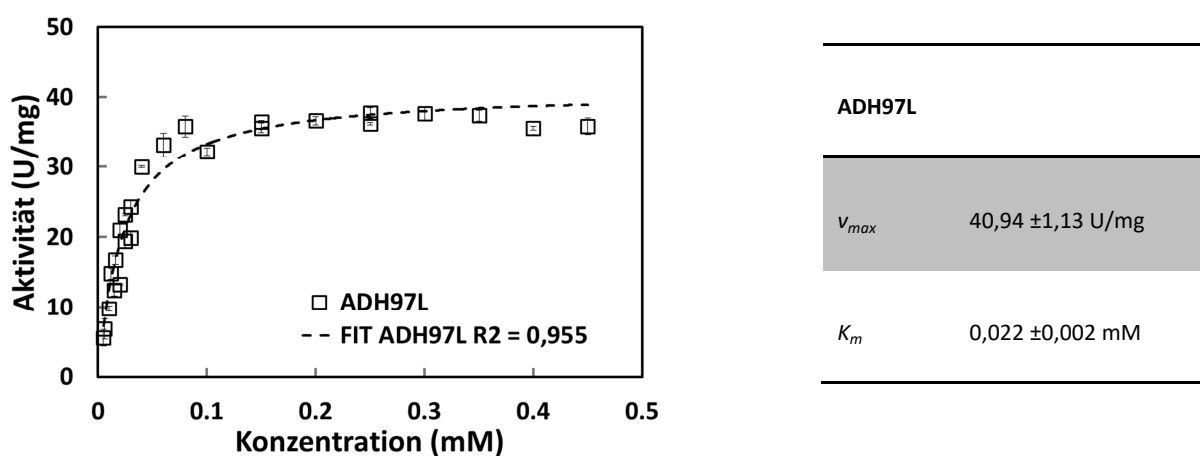


Abb. 23: Michael-Menten Kinetik für die ADH97L (Photometerassay: $\lambda = 340$ nm, $d = 1$ cm, $V = 1$ mL $T = 25^\circ C$, 100 mM Tris-HCL, Puffer pH 8, 2 mM MgCl, 0,1 mM NAD^+ , Variation der Rhododendrol Konzentration, $n = 3$)

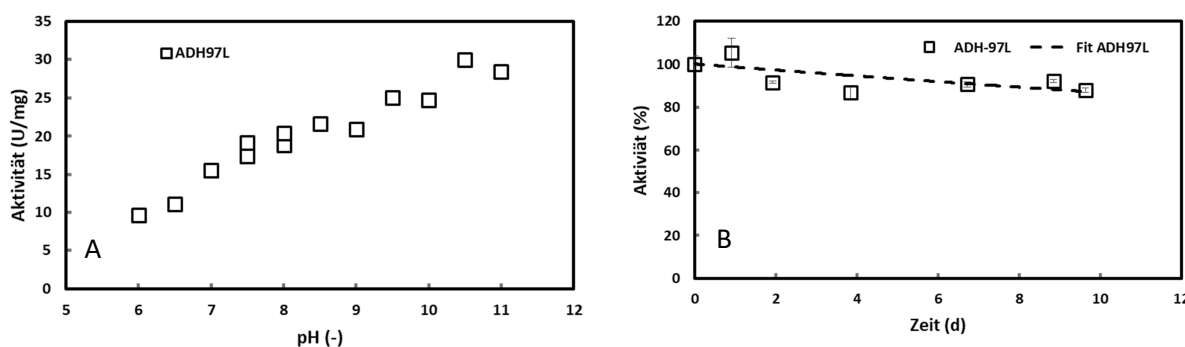


Abb. 24 : ADH97L Charakterisierung mit Photometer (Photometerassay: $\lambda = 340$ nm, $d = 1$ cm, $V = 1$ mL $T = 30^\circ C$, 100 mM Tris-HCL, Puffer pH 8, 2 mM MgCl, 0,1 mM NAD^+ , 0,4 mM Rhododendrol, $T = 30^\circ C$, $n = 3$)

Zum Vergleich ergibt sich für eine ADH-A mit Himbeerketon als Substrat ein $v_{max, \text{Himbeerketon}} = 31,69$ U/mg und ein $K_{m, \text{NAD}^+} = 4,18$ mM ($T = 30^\circ C$, 50 mM KP_i Puffer pH 7,5) aus *R. ruber* DSM 44541 (Goldberg et al. 2006), welche eine deutlich geringere Substrataffinität (K_m)

Mein Dank gilt Dr. S. Kara und D. J. Opperman (University of Free State, South Africa), wodurch die NOX-Opp im Rahmen einer Kooperation auch in dieser Arbeit getestet werden konnte. Weiter gilt mein Dank Andreas Vogel von c-LEcta für die Unterstützung und die Bereitstellung der NOX24 und NOX34.

bezüglich Himbeerketon im Vergleich zu Rhododendrol aufweist. Diese Ergebnisse bestätigen die Eignung der ADH97L bezüglich hoher Aktivität (v_{max}) und Substrataffinität (K_m) für Rhododendrol. Die Bestimmung der Lagerstabilität ergab $t_{1/2} = 48,9 \pm 12,7$ d und $k_{des} = 0,014 \pm 0,004/d$ (30°C). Basierend auf der oben beschriebenen Charakterisierung ist die ADH97L für den Einsatz zur Oxidation von Rhododendrol in einer Enzymkaskade mit NOX ausgewählt worden

3.1.3.2 NADH Oxidase (NOX)

Die Besonderheit der NADH-Oxidase (NOX) EC 1.6.3.4 ist die Bildung von Wasser (H_2O). Als NAD^+ Regenerationssystem werden die Präparationen NOX-Opp aus *Streptococcus mutants* (auch häufig als *SmNOX* bezeichnet (Petschacher et al. 2014)) sowie NOX34 und NOX24 aus *Streptococcus mitis* (c-LEcta), hinsichtlich ihrer Eignung zur Anwendung in einer Reaktionskaskade aus ADH97L und NOX untersucht. Die in dieser Arbeit als NOX-Opp (nach dem Kooperationspartner D. J. Oppermann von der University of Free State, South Africa) bezeichnete NADH-Oxidase entspricht der *SmNOX*, welche von Glieder und Co-Arbeitern in 2014 mit den beiden Mutationen (V193R/V194H) beschrieben wurde (Petschacher et al. 2014). In Abb. 25 B und C sind die Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen dargestellt.

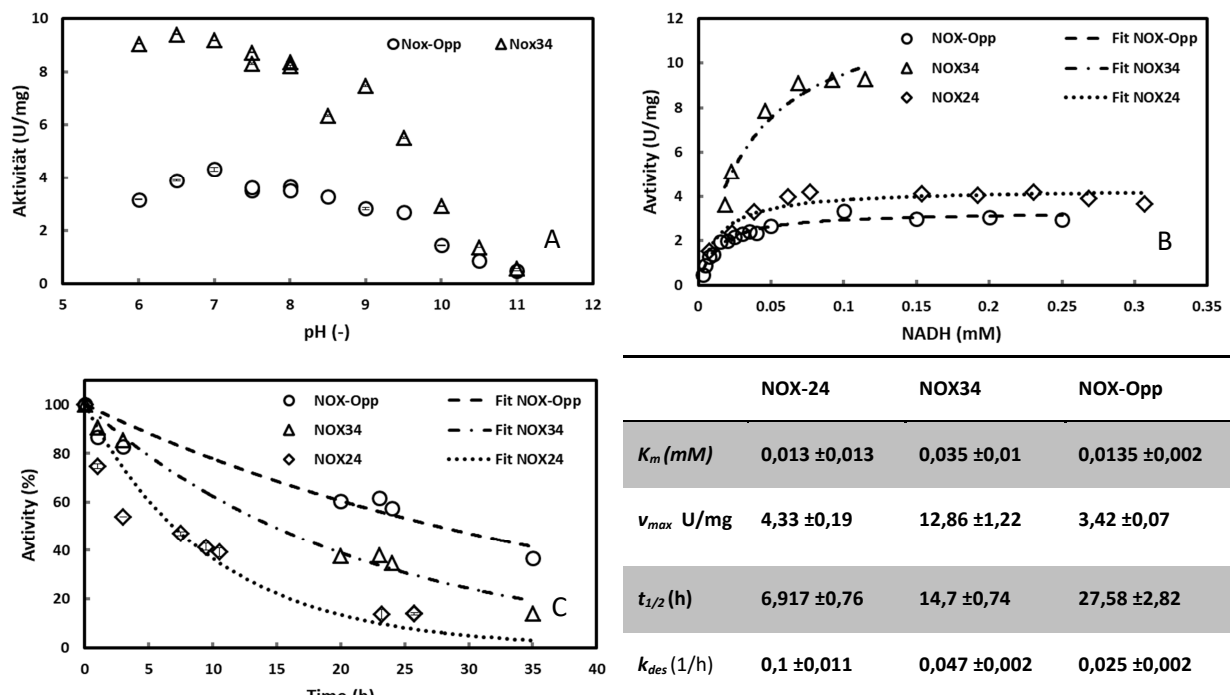


Abb. 25: NOX Charakterisierung im Photometer (Reaktionsbedingungen: $\lambda = 340$ nm, $d = 1$ cm, $V = 1$ ml $T = 25^\circ\text{C}$, 100 mM Tris-HCL Puffer (pH = 7), 0,1 mM NADH, Sauerstoffsättigung)

In diesem Vergleich wurde der höchste $v_{max} = 12,86$ U/mg mit NOX34 und der niedrigste $K_m = 0,013$ mM mit NOX-Opp* und NOX24 bestimmt (Abb. 25 B). Eine Halbwertszeit von 14,7 h und 27,58 h konnte mit der NOX34 und NOX-Opp (Abb. 25 C) gemessen werden ($T = 25^\circ\text{C}$, pH 8). Auf Grund der geringen Halbwertszeit von 6,9 h (NOX24) im Vergleich zu NOX34 und NOX-Opp. wird die NOX24 nicht für weitere Untersuchungen ausgewählt. Mit einer fast doppelt so hohen Lagerstabilität von 27,6 h (Abb. 25 D) ist die NOX-Opp die stabilste NOX im Vergleich. Dennoch ist die NOX34

Mein Dank gilt Dr. S. Kara und D. J. Opperman (University of Free State, South Africa), wodurch die NOX-Opp im Rahmen einer Kooperation auch in dieser Arbeit getestet werden konnte. Weiter gilt mein Dank Andreas Vogel von c-LEcta für die Unterstützung und die Bereitstellung der NOX24 und NOX34.

hinsichtlich eines hohen enzymmengenspezifischen Sauerstoffverbrauchs auf Grund der 3,7-fach höheren v_{max} und der Lagerstabilität von 14,7 h (20°C, pH 8) der NOX-Opp für einen Begaservergleich vorzuziehen. In Abb. 25 sind die $K_{m, NADH}$ dargestellt, welche für NOX24, NOX-Opp und NOX34 eine NADH-Affinität im Bereich von 0,013 – 0,035 mM aufweisen. Die K_m -Werte in dieser Arbeit sind in guter Übereinstimmung mit den Literaturwerten für NOX aus *Streptococcus mutants* mit $K_{m, NADH} = 0,025$ mM (Higuchi et al. 1993). Kawasaki et al. berichten für NOX aus *Anaerocolumna aminovalerica* einen $K_{m, O_2} = 0,0619$ mM, welcher deutlich unterhalb der Sättigungskonzentration von 0,256 mM (20°C, Wasser) liegt (Kawasaki et al. 2004). Die Variation der Pufferstärke von 10 - 1000 mM in Tris-HCL und KP_i Puffer ergaben für NOX-Opp und NOX34 höhere Aktivitäten in KP_i Puffer als in Tris-HCL Puffer, vor allem bei hohen Konzentrationen > 150 mM (siehe Abb. 63 und Abb. 64). Nur mit NOX34 konnte kein Aktivitätsverlust bei niedrigen Konzentrationen < 150mM in Tris-HCL Puffer gemessen werden. Eine steigende Aktivität bis zu einen pH = 8 konnte für NOX34 und NOX-Opp gemessen werden, wobei die NOX34 eine ca. 2,5-fach höhere Aktivität bei pH 8 aufwies (Abb. 25 A). In der Literatur wird ein pH Aktivitätsmaximum im Bereich von 7 - 7,5 (Higuchi et al. 1993) und im pH Bereich von 6 - 9,3 (Higuchi et al. 1993) beschrieben. Higuchi et al. berichtet für NOX aus *Streptococcus mitis* die höchste temperaturabhängige Anfangsaktivität bei 45°C, sowie einen Temperaturbereich von 30°- 50°C, in welchem hohe Aktivitäten realisiert werden können (Higuchi et al. 1993). Auf Grund des temperatursensitiven Co-Faktors $NAD^+/NADH$ wurde eine Temperatur von 20 - 25°C, wie in 3.1.3.1 beschrieben, gewählt. Auch die geringe Lagerstabilität von 1 h bei 37°C von NADH-Oxidase aus *Streptococcus mitis* (Higuchi et al. 1993) wies auf eine temperaturbedingte Denaturierung vom Enzym im Vergleich zu 14,7 h (NOX34) bei 20°C auf. Auf der Grundlage der v_{max} besitzt die NOX34 im Vergleich zu NOX-Opp die höhere enzymmengenspezifische Sauerstoffverbrauchsrate.

3.1.3.3 Übergeordnete Diskussion zum Enzymsystem NOX/ADH

Bezüglich der Eignung zur Untersuchung von Begasungssystemen ist eine hohe enzymmengenspezifische Sauerstoffverbrauchsrate, und daraus folgend eine mögliche Stofftransportlimitierung sicherzustellen. Die Reaktionsstöchiometrie mit O_2 , 2 NADH und 2 H^+ zu 2 H_2O und 2 NAD^+ zeigt das hohe Potenzial hinsichtlich der Co-Faktorregenerierung der NOX mittels Sauerstoff und Kopplung mit der ADH97L für die Umsetzung von Rhododendrol. Zur Auswahl einer geeigneten NOX ist die v_{max} basierte enzymmengenspezifische Sauerstoffverbrauchsrate entscheidend. Die NOX34 besitzt die höchste enzymmengenspezifische Sauerstoffverbrauchsrate von 0,012 mmol/min/mg der miteinander verglichenen NOX Präparationen. Weiterhin wurde die NOX34 auf Grund der hohen Aktivität von $v_{max} = 12,86$ U/mg und der Lagerstabilität von 14,7 h (bei 30°C) für den Einsatz als NAD^+ Regenerationssystem ausgewählt. Die hohe NOX34 Aktivität von 9 U/mg im alkalischen Milieu zeigt die Eignung für die Kopplung mit der zuvor charakterisierten ADH97L. Auf Grund der geringen Substratlöslichkeit von Rhododendrol (ca. 20 mM) wird eine Konzentration von 10 mM Rhododendrol eingestellt. Weiter konnte der Zerfall von $NAD^+/NADH$, durch Einstellen einer milden Reaktionstemperatur von 25°C, vernachlässigt werden. Es wurde Tris-HCL Puffer mit einer Pufferstärke von 10 mM und einem pH von 8 gewählt. Aus den genannten Reaktionsbedingungen resultierte eine Aktivität von $v_{NOX34} = 9$ U/mg und $v_{ADH97L} = 20$ U/mg. Für beide

Enzyme wurde eine Konzentration von 0,3 U/mL eingesetzt. In Folge dessen ergibt sich für ein Volumen von 0,25 L eine Sauerstoffverbrauchsrate von 0,075 mmol/min.

3.1.4 BM3 Cytochrom P450 WT (P450)/ Glucosedehydrogenase (GDH 105)

Das Flavocytochrom P450 BM3 Wildtyp (WT) (CYP102A1 (Narhi and Fulco 1986)) ist ein natürlich fast in allen Lebensformen vorkommendes Hybridprotein bestehend aus Cytochrom P450 und NADPH Cytochrom P450-Reduktasedomäne (Jeffreys et al. 2019; Kang et al. 2011). Die BM3 Cytochrom P450 katalysiert typischerweise die Oxidation einer Vielzahl von mittel- bis langkettigen Fettsäuren durch Hydroxylierung an den Positionen ω -1, ω -2 und ω -3 (Jeffreys et al. 2019). Jedoch ist das Substratspektrum der Varianten des Cytochrom P450 Wildtyps (CYP102A1) durch geringe bis keine Bindungsaffinität begrenzt (Chen et al. 2020b; Jeffreys et al. 2019; Kim et al. 2010). Durch erfolgreiches Enzyme-Engineering konnte das Substratspektrum der BM3 Cytochrom P450 auf Steroide, Terpene und verschiedene pharmazeutische Wirkstoffe erweitert werden (Butler et al. 2013; Jeffreys et al. 2019). In Abb. 26 ist das Reaktionsschema des Cytochrom P450/ GDH Systems dargestellt.

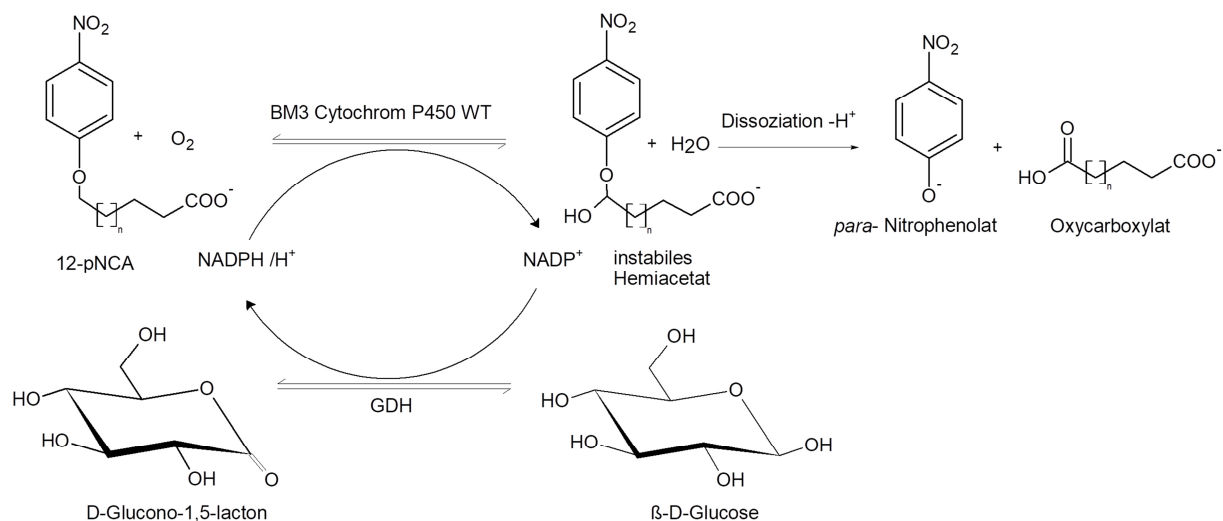


Abb. 26: Reaktionsschema BM3 Cytochrom P450 WT (Cytochrom P450)/ Glucosedehydrogenase (GDH 105) System ($n = 8$, es wird *para*-Nitrophenolat photometrisch gemessen, D-Glucono-1,5-Lacton dissoziiert zu Gluconsäure)

3.1.4.1 Cytochrom P450

In dieser Untersuchung wird die Oxidation von ω -*para*-Nitrophenoxy-Dodekansäure (12-pNCA) mit Sauerstoff und NADPH/H⁺ zu *para*-Nitrophenolat, Oxycarboxylat, H₂O und NADP⁺ als Teil eines photometrischen Assays zur Bestimmung der Aktivität einer BM3 Cytochrom P450 WT eingesetzt (Eiben et al. 2007; Schwaneberg et al. 1999). Hierzu wird mit zellfreiem Extrakt aus Zellen des Wildtyp der BM3 Cytochrom P450 (CYP102A1) aus *Bacillus megaterium*, welche in *Escherichia coli* Bl 21 pet 28a (*E. coli*) überexprimiert wurde, gearbeitet. Die Lagerstabilität der BM3 Cytochrom P450 CYP102A1 ist in der Literatur beschrieben und beträgt 8 - 10 min inkubiert in 50 mM KPi Puffer, pH 7,5 bei 30 - 20°C und einer Enzymkonzentration von 3,5 – 8 μ M (Eiben et al. 2006; Eiben et al. 2007). Eiben *et al.* beschreibt eine Lagerstabilität mit einer Halbwertszeit von 8 min bei 30°C (Eiben et

al. 2007). Die BM3 Cytochrom P450 CYP102A1 enthaltene Zellen wurden durch das Institut für Biochemie II an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, bereitgestellt, welche eine Cytochrom P450 Konzentration von 30 mg pro 3 g Zellpellet aufwies ($C_{P450BM3} = 10,73 \mu\text{M}$, $M_{P450BM3} = 117779,4 \text{ g/mol}$). Mittels BSA-Pierce-Assay konnte ein Gesamtproteingehalt des in dieser Arbeit eingesetzten zellfreien Extrakts von 12,72 mg/mL festgestellt werden. Aus der Kombination von Gesamtproteingehalt (12,72 mg/mL) und Cytochrom P450-Konzentration (2 mg/mL) sowie einer SDS-Page, konnte ein hoher Fremdproteinanteil von 10,72 mg/mL im zellfreien Extrakt festgestellt werden. Infolge dessen konnte eine Anfangsaktivität von $v_{P450} = 0,74 \pm 0,062 \text{ U/mg}$ bei 20°C in 50 mM KPi pH 8,1 gemessen werden. Diese Aktivität entspricht einer enzymmengenspezifischen Sauerstoffverbrauchrate von 0,37 $\mu\text{mol/min/mg}$. Unter Berücksichtigung der Löslichkeit von Sauerstoff bei 20°C von 0,284 mM (pH 7), dem hohen Anteil an Protein und der im Vergleich zur GOx deutlich geringeren Cytochrom P450 enzymmengenspezifischen Sauerstoffverbrauchrate von 0,37 $\mu\text{mol/min/mg}$ wird von einer detaillierten Charakterisierung der Cytochrom P450 abgesehen und lediglich die Untersuchung der Enzymstabilität unter Begasung mit dem Enzym CytochromP450 weiter verfolgt.

3.1.4.2 Glucose-Dehydrogenase (GDH 105)

Die kommerziell erhältliche GDH 105 der Firma Codexis ist ein industrielles Enzym, welches eine Aktivität von ca. 50 U/mg sowie eine erhöhte Temperaturstabilität und Stabilität in einer Vielzahl von organischen Lösungsmitteln aufweist (Codexis). Die GDH 105 findet breite Anwendung als Enzym zur Regeneration von NADPH in einer Vielzahl an Redoxsystemen in Forschung und Industrie. Jedoch ist auch für die GDH 105 der Ursprungorganismus nicht angegeben. Die GDH 105 katalysiert die Reaktion von D-Glucose mit NADP^+ zu D-Glucono-1,5-Lacton, NADPH und H^+ . Hierbei reagiert das D-Glucono-1,5-Lacton mit H_2O zu Gluconsäure. Um einen negativen Effekt auf die GDH 105 Aktivität durch Bildung der Gluconsäure zu vermeiden, kann mit entsprechender Pufferkonzentration oder Titration mit einer Base der pH konstant gehalten werden. In der Literatur sind K_m und v_{max} Werte für eine vergleichbare GDH aus *Gluconobacter oxydans* zu finden welche, wie die GDH 105, ein hohes Aktivitätsmaximum bei 50°C und eine spezifische Aktivität von ca. 50 U/mg aufweist (Adachi et al. 1980). Für die in Adachi et al. 1980 beschriebene Variante der GDH ist eine Affinität zu D-Glucose mit $K_{m, D-Glucose} = 5 \text{ mM}$ beschrieben (Adachi et al. 1980). Auf Grund der geringen enzymmengenspezifischen Sauerstoffverbrauchrate der Cytochrom P450 wird auch beim NADPH Regenerationsenzym der GDH 105 auf eine detaillierte Charakterisierung verzichtet. Jedoch eignet sich die GDH 105 durch die einfache Bestimmung der Aktivität und hoher beschriebener Temperaturstabilität als Ergänzung zur ADH97L in der Stabilitätsuntersuchung der nicht sauerstoffabhängigen Enzyme in dieser Arbeit.

Zwischenzusammenfassung Cytochrom P450/GDH 105 System

Auf Grund der geringen Stabilität sowie des geringen Potenzials hinsichtlich des enzymmengenspezifischen Sauerstoffverbrauchs von 0,37 $\mu\text{mol/min/mg}$ wurde die BM3 Cytochrom P450 WT lediglich als ein weiteres Anwendungsbeispiel diskutiert und in die Stabilitätsuntersuchung mit einbezogen. Besonders durch die Anwendung von zellfreiem Extrakt des Wild Typs Cytochrom P450 in der Untersuchung, ist der Proteinanteil von ca. 10 mg/mL sehr hoch und die Konzentration des Zielenzym mit 2 mg/mL niedrig. Dieser hohe Proteinanteil kann zu

erhöhter Schaumbildung in den späteren Begasungsexperimenten führen. Dagegen stellt die GDH 105 ein stabiles und bekanntes Modellenzym dar, welches sich zur Untersuchung der Enzymstabilität von nicht-sauerstoffabhängigen Enzymen in begasteten Systemen als Ergänzung zur ADH97L eignet.

3.1.5 Übergeordnete Diskussion der enzymmengenspezifischen Sauerstoffverbrauchsrate und Enzymcharakterisierung

Das Potenzial von sauerstoffverbrauchenden Oxidasen hinsichtlich vielfältiger Anwendungen und interessanter Produkte in der Industrie, ist groß. Eine Herausforderung ist die geringe Löslichkeit der Substrate im wässrigen Medium, was häufig die Limitation des Reaktionsumsatzes darstellt. Hierfür bieten neue Technologien, wie die Begasung mit Feinblasen, ein hohes Potenzial zur Optimierung des Sauerstoffeintrags durch Verkleinerung der eingebrachten Phasengrenzfläche und der höheren Verweilzeit. Für die angestrebte detaillierte Untersuchung zum Stofftransport, sowie für die Anwendung und das Studium der Effekte auf die Enzymstabilität, werden geeignete Modellreaktionssysteme benötigt. Um die Auswirkungen und Effekte des Stofftransportpotenzials zu untersuchen, ist als Hauptkriterium die Einstellung einer Stofftransportlimitierung zu nennen. Die Stofftransportlimitierung ermöglicht es, die Effekte der generierten Blasengröße durch den Vergleich von Umsatz und Ausbeute einer Modellreaktion messbar zu machen. Hierbei wird der Fokus auf die Enzymklasse der Oxidoreduktasen, insbesondere auf ihre hohe enzymmengenspezifische Sauerstoffverbrauchsrate, gelegt. Durch die detaillierte Charakterisierung der zuvor beschriebenen Oxidasen und Ihrer Reaktionssysteme konnten folgende Reaktionsbedingungen ermittelt werden (Tabelle 5).

Tabelle 5: Reaktionsbedingungen der Oxidasen ^{a)} K_m -Wert für Cytochrom P450 wurde der Literatur entnommen (Eiben et al. 2006)

Parameter	GOx Type VII	Tyrosinase	NOX34	BM3 Cytochrom P450 WT
T	35°C	15°C	25°C	20°C
pH	5,3	7	8	8,1
Puffer	Autotitrator mit 1 M NaOH	50 mM KPi	10 mM Tris-HCL, 2 mM MgCl	50 mM KPi
C_s	87,7 mM Glucose	1 mM L-Tyrosin	0,2 mM NADH/ 10 mM Rhododendrol	0,37 mM 12-pNCA
v_{max}	474,6 ±12,4 U/mg	9172 ±440,8 U/mg	12,9 ±1,2 U/mg	0,74 ±0,06 U/mg
K_m	11,7 ±1,1 mM	0,25 ±0,05 mM	0,013 ±0.01 mM	0,0025 - 0,02 mM ^{a)}
K_{m,O_2} (Lit.)	0,18 mM	0,015 - 2.1 mM	0,025 mM	Keine Daten

Die Oxidasen zeichnen sich durch einen K_{m,O_2} im Bereich von 0,025 - 0,18 mM aus (Tabelle 5). Mit einer Sauerstofflöslichkeit von $C^* = 0,232 - 0,282$ mM (20 - 30°C, in Wasser) wird deutlich, dass ein hoher Sauerstoffgehalt für die Reaktionsgeschwindigkeit von großer Bedeutung ist. Hierfür werden die Oxidasen hinsichtlich des auf v_{max} basierenden Sauerstoffverbrauchs pro mg (Einwaage) an Enzym verglichen (Tabelle 6).

Tabelle 6: Vergleich der enzymmengenspezifischen Sauerstoffverbrauchsrate für die Oxidasen

Parameter	GOx Type VII	Tyrosinase	NOX34	BM3 P450 WT
\dot{v}_{O_2max}	237,3 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	3750 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	3,21 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	0,37 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$

Die GOx Typ VII zeichnet sich durch eine hohe enzymmengenspezifische Sauerstoffverbrauchsrate von 237,3 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ und eine hohe Lagerstabilität von 81 h (35°C) aus. Es besteht die Möglichkeit der Autotitration des Folgeprodukts Gluconsäure. Daher wird die GOx VII als Hauptreaktionssystem für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Die TYR hingegen ist ein Beispiel für eine Reaktion mit sehr hohem Sauerstoffbedarf (Tabelle 6). Die Folgereaktion von L-DOPA zu Dopaquinon verschlechtert die Selektivität der Gesamtreaktion erheblich (bezüglich L-DOPA). Durch die auftretende Folgereaktion entsteht ein zusätzlicher Sauerstoffbedarf. Die Selektivität wurde durch die Reduktion von L-Dopaquinon zu L-DOPA mittels eines Überschusses von 40 mM Ascorbat optimiert. Unter diesen Bedingungen (20°C, pH 6,5, c^* 0,256 mM) ist die Oxidation von L-Tyrosin, auf Grund des kleinen $K_{m, O_2} = 2,1 \text{ mM}$ im Vergleich zum $K_{m, O_2} = 38 \text{ mM}$ der Folgereaktion mit L-DOPA, effektiver. Die TYR als Referenzsystem zur GOx (bei den Bedingungen aus Tabelle 6) zeichnet sich durch den höchsten enzymmengenspezifischen $k_L a$ von 2929,08 1/h/mg aus. Daher kann eine Stofftransportlimitierung sichergestellt werden. Als drittes System wird die NOX34 untersucht, welche sich durch die Abhängigkeit und Limitierung bezüglich der Temperaturstabilität des Co-Faktors NAD^+ auszeichnet. Hierbei wurden maximale enzymmengenspezifische Sauerstoffverbrauchsrate von 3,21 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ermittelt. Die Synthese des Aromastoffes Himbeerketon wird als Beispiel für eine NAD^+ abhängige Reaktion in dieser Arbeit untersucht. Weiter wurde die Wirkung der Phasengrenzfläche, erzeugt durch den Leistungseintrag von verschiedenen Rührsystemen und Strömungsprofilen bezüglich der Ausbeute, untersucht. Als viertes System wurde die Cytochrom P450/GDH 105 eingeführt. Auf Grund der geringsten enzymmengenspezifischen Sauerstoffverbrauchsrate von 0,37 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ wird die Cytochrom P450 lediglich in der Stabilitätsuntersuchung weiter betrachtet.

3.2 Untersuchung der begaserspezifischen Stofftransportleistung und Blasengrößenverteilung

Die geringe Löslichkeit von Sauerstoff im wässrigen Milieu stellt häufig eine Limitierung von enzymatischen Oxidationsreaktionen dar (Lindeque and Woodley 2020; Woodley 2019). Dieser Effekt wird deutlich, wenn die kinetischen Parameter der Gluconolactonsynthese (GOx System) und die Löslichkeit des Reaktionsmediums (0,21 mM bei 35° C) betrachtet werden. Daher wird eine kontinuierliche Zufuhr an Sauerstoff durch Begasung benötigt. Hierbei sind die Kenntnis des begaserspezifischen, volumenbezogenen Stoffübergangskoeffizienten $k_L a$ und das Verständnis der Stofftransportvorgänge der Schlüssel zur Erhöhung der Reaktionsraten. Eine mögliche Option, die Limitierung durch geringe Sauerstofflöslichkeit zu umgehen, ist die Optimierung der Sauerstofftransportrate mittels Verringerung der Blasengröße. Weitere Optionen sind, die

Sauerstoffsättigungskonzentration durch erhöhten Systemdruck (Bolivar et al. 2019; Woodley 2019) oder durch Zugabe von Additiven, wie Silikonöl (Leung et al. 1997; Zhai et al. 2020) zu steigern.

Ziel dieses Abschnitts ist die Charakterisierung der verwendeten Begaser bezüglich der generierten Blasengröße und des begaserspezifischen Stofftransports. Hierzu werden die in 3.1 beschriebenen Enzymsysteme, welche verschiedene enzymmengenspezifische Sauerstoffverbrauchsraten aufweisen, hinsichtlich des Potenzials zur Erhöhung des Stofftransports gegenübergestellt und diskutiert. Weiterhin wird, mittels Bestimmung der Blasengrößenverteilung von ausgewählten Begasern, die Phasengrenzflächenvergrößerung von Feinblasenbegasung mit der Makroblasenbegasung verglichen.

3.2.1 Begaserspezifischer Stofftransport bei Variation der Begasungsrate

Die Untersuchung des spezifischen Stofftransports ist entscheidend für die Optimierung der Reaktionsgeschwindigkeit und der Gasnutzung. Dabei werden hinsichtlich ihrer Stofftransportleistung folgende Begaser untersucht: als Feinblasenbegaser die 0,5 μm , die 2 μm Sinterfritte, die 1 μm SPG Membran, als Submilliblasenbegaser die 10 μm Sinterfritte, sowie als Makroblasenbegaser ein offenes und gelochtes Rohr (Bezeichnung nach mittlerer Porengröße in μm). Zunächst wird auf die Effekte der Blasenbildung an großen Lochöffnungen (Makroblasenbegaser) und an feinporösen Materialien (Fein- und Submillibegaser) detailliert eingegangen.

Nach Mersmann kann das Verhalten von Blasenverformung und -erzeugung durch die dimensionslosen Kennzahlen wie die Weber- (We) und die Froud-Zahl (Fr) beschrieben werden (Mersmann 1977). Die Kombination aus hohem Young-Laplace-Druck, unbeweglicher Blasenoberfläche ($We/Fr < 0,3$) und hoher, volumenspezifischer Oberfläche von Feinblasen, wird mit der klassischen Begasung von Makroblasen ($We/Fr > 10$) verglichen. Im Gegensatz zu Feinblasen zeigen Makroblasen eine geringe Selbstkompression (Young-Laplace-Druck), eine mobile Blasenoberfläche (instabile Primärblasen) und ein geringes Verhältnis von der Oberfläche zum Volumen (Räbiger et al. 2013). In nicht-koaleszierenden Flüssigkeiten kann beobachtet werden, dass auch hohe, durch Rühren eingebrachte Scherkräfte ($Ne = 5$, Scheibenrührer (Parthasarathy and Ahmed 1994)) mit abnehmender Blasengröße weniger stark zur Dispersion der Gasblasen beitragen (Matthes et al. 2020). Dieser Beobachtung liegt zugrunde, dass mit abnehmender Blasengröße die mobile Oberfläche von Blasen ab einer $We/Fr > 0,3$ immobil wird. Ab $We/Fr > 10$ resultiert eine instabile Blasenoberfläche (Mersmann 1977; Räbiger et al. 2013). Hierbei vergrößert sich der Spannungswinkel der Blasen mit Verringerung des Blasendurchmessers, wodurch die zur Verformung oder Scherung der Blasen anzuwendende Kraft steigt (Kulkarni and Joshi 2005; Mersmann 1977; Räbiger et al. 2013). Unter Berücksichtigung dieser Tatsache könnte die Stofftransportleistung der Makroblasenbegasung weiter erhöht werden. Dazu müsste eine andere Begaserposition im Reaktor oder ein anderer Rührertyp, mit erhöhtem lokalem Leistungseintrag, für eine höhere Gasdispersion gewählt werden (Bouaifi et al. 2001; Garcia-Ochoa and Gomez 2009; Nauha et al. 2015). Um eine mögliche Deaktivierung des Enzyms durch hohe lokale Scherkräfte zu vermeiden, und eine angemessene Mischleistung im Vergleich zu einem Scheibenrührer zu erzielen, wurde der weniger scherintensive Schrägblattrührer mit $Ne = 1,37$ eingesetzt. Der Schrägblattrührer wurde mit einem konstanten Leistungseintrag von 0,17 W/L (bei 430 rpm, $Re \geq 10^4$) betrieben.

Die Mikroblasenbegaser in diesem Vergleich bestehen aus porösen Materialien mit inhomogenen Porengrößenverteilungen (gesinterte Materialien). Wie in der Literatur berichtet, wird erwartet, dass die Porengrößenverteilung die Sauerstoffübertragungsrate durch die erzeugte Blasengrößenverteilung beeinflusst (Kazakis et al. 2008b; Kulkarni and Joshi 2005; Tsuge and Hibino 1983). Weiter werden zwei Makroblasenbegaser mit verschiedenen Lochöffnungsgrößen verglichen. Hierzu werden das 5 mm offene Rohr, sowie ein gelochtes Rohr mit 6 x 0,5 mm (mehrere Löcher) untersucht.

Das 5 mm offene Rohr, als auch das 6 x 0,5 mm gelochte Rohr (Bezeichnung nach Lochöffnung in mm) wurde im Bereich $k_L a = 60 - 160$ 1/h (siehe Abb. 27) untersucht. In diesen $k_L a$ -Bereich und den zugehörigen Durchflussraten (siehe Abb. 27) liegt für das 5 mm offene Rohr eine $We \gg 2$ und für das 6 x 0,5 mm gelochte Rohr eine $We \gg 6$ vor. Dies zeigt, dass sich beide Makroblasenbegaser im Strahlgasen-Bereich befinden, wenn ein $k_L a$ von 160 1/h bzw. 60 1/h in den Experimenten eingestellt wird. Zusätzlich wird der kritische Wert von $We^2/Fr \gg 675$ überschritten, weshalb von Sekundärblasenbildung ausgegangen werden kann (Räbiger et al. 2013). Daher kann die Korrelation von Mersmann *et al.* zur Beschreibung der Makroblasenbegaser angewandt werden. Demnach weisen große Weber-Zahlen darauf hin, dass der Begasungsimpuls hoch ist (Mersmann 1977). In diesem Fall bilden sich am Begaser instabile Primärblasen. Diese instabilen Primärblasen zerfallen kurz nach der Erzeugung und führen zu einer Sekundärblasenbildung. Aus der Kräftebilanz an der Blase kann eine maximal stabile Blasengröße berechnet werden, welche unter dem eingestellten Gasstrom und der Weber-Zahl eine Funktion der Flüssigkeitseigenschaften ist (Mersmann 1977). Nach Mersmann ist eine erzeugte Blase für das Verhältnis von $We/Fr \geq 10$ instabil, besonders wenn zusätzlich ein turbulentes Strömungsregime mit $Re \geq 10^4$ vorliegt (Mersmann 1977).

Diese Bedingung ist bei beiden Makroblasenbegasern (5 mm offenes Rohr und 6 x 0,5 mm gelochtes Rohr) für 0,67 - 16,67 vvm erfüllt. Unter Voraussetzungen wie instabile Blasenoberfläche, turbulentes Strömungsregime und hohe Weberzahl kann mit einer Abschätzung nach Mersmann der Sauterdurchmesser d_{32} mit einer Genauigkeit von $\pm 10\%$ berechnet werden (Mersmann 1977). Im Fall der genannten Bedingungen ist der resultierende Sauterdurchmesser der Blasen unabhängig von der Größe der Lochöffnung. Dieser ist eine Funktion der Flüssigkeitseigenschaften. Daher wird für die Lochöffnung der Makroblasenbegaser mit 0,5 mm und 5 mm kein Unterschied bezüglich der generierten Blasengröße erwartet. Diese Berechnung kann jedoch nur für definierte Bedingungen angewandt werden (Medien mit der Dichte ρ_{Gas} von 1 bis 980 kg/m³, ρ_{Medium} von 779 bis 1254 kg/m³, Viskosität η von 0,01 bis 21,5 mPa s, η_{Medium} von 0,48 bis 1040 mPas, Oberflächenspannung σ von 1,8 bis 72,7 mN/m, Lochdurchmesser d_0 von 0,29 bis 9,5 mm) (Mersmann 1977).

In früheren Untersuchungen unter Verwendung der gleichen Mikroblasenbegaser (BSA als Modellprotein, 25°C, 10 mM Na-Acetatpuffer, pH 5,3) konnte kein signifikanter Unterschied in der Blasengrößenverteilung (BSD) zwischen dem 1 μ m SPG Membran und der 2 μ m Sinterfritte für Begasungsraten bis zu 0,067 vvm gemessen werden (Matthes et al. 2020). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Zugabe des Proteins BSA die BSD in Richtung der Mikroblasenregion verschiebt. Dieser Effekt wird auf Grund vergleichbarer Hydrophobizität und Größe auch für die Anwendung des Enzyms GOx erwartet. Das Vorhandensein von Glucose zeigt allerdings keinen signifikanten Einfluss auf die Blasengrößenverteilung (BSD) (Matthes et al. 2020).

Mit dem Ziel, ein tieferes Verständnis der spezifischen Stoffübergangsleistung der Begaser zu erlangen, wird die Begasungsrate im Bereich von 0,01 - 16,667 vvm gemessen (Abb. 27). Um den Vergleich der Begaser mittels der volumenspezifischen Stoffübergangsrate ($k_L a$) in dieser Studie zu ermöglichen, wird BSA als Modellprotein eingesetzt. Durch die Substitution von z.B. GOx durch BSA kann die Untersuchung des $k_L a$ im stationären Zustand ohne Verbraucher durchgeführt werden.

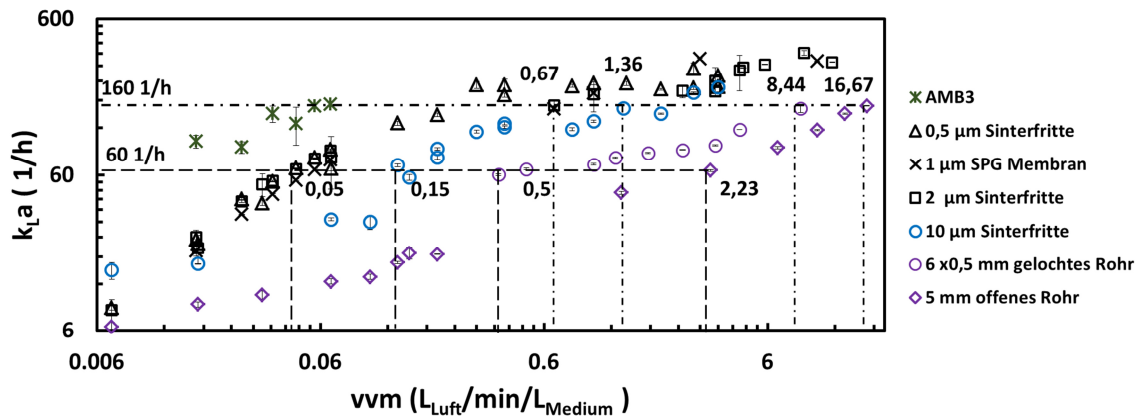


Abb. 27: Vergleich der Stofftransportleistung in Abhängigkeit der Begasungsrate und Begaserart (Dynamische $k_L a$ Bestimmung mittels O_2 PreSens Fibox 4, Reaktionsbedingungen: $T = 25^\circ C$, $V_{Medium} = 1000$ mL, 10 mM Na-Acetat Puffer, pH 5,3, 87,8 mM D-Glucose, 83,3 mg/L BSA, Schrägblattrührer 430 rpm).

Es wurde qualitativ der Stofftransport ($k_L a$ -Kurven) der verschiedenen Begaser in Abb. 27 verglichen. Im Gegensatz zur Begasung mit Makroblasen (offenes Rohr) weisen die Mikroblasenbegaser (AMB3, 2 μm Sinterfritte) sowie die Submillibegasung (10 μm Sinterfritte) einen deutlich höheren Stofftransport auf, wie in Abb. 27 dargestellt. Ein Grund für das beobachtete Verhalten ist die Entstehung von Submilli- und Feinblasen, wodurch eine größere Phasengrenzfläche erzeugt wird. Im Vergleich der Feinblasenbegaser (0,5 μm , 2 μm Sinterfritte und 1 μm SPG Membran) kann kein deutlicher Unterschied im Verlauf der gemessenen $k_L a$ -Werte bei Variation der Begasungsrate über den gesamten Bereich der Begasungsrate festgestellt werden. Es wurde für kleine Begasungsraten (bis zu 0,067 vvm) kein Unterschied in der BSD und dem $k_L a$ für Sinterfritte (0,5 μm und 2 μm) und 1 μm SPG Membran berichtet (Matthes et al. 2020). Dieser Effekt kann mit den Daten in Abb. 27 bestätigt werden.

Mit der 10 μm Sinterfritte werden geringere $k_L a$ Werte (Abb. 27) bis zu einer Begasungsrate von ca. 1 vvm als mit der 1 μm SPG Membran, 0,5 μm und 2 μm Sinterfritte gemessen. Im gesamten Vergleich wird die geringste Begasungsrate bei einem $k_L a$ von 160 1/h mit dem Mikroblasengenerator AMB3 erzielt (Abb. 27). Diese hohen $k_L a$ -Werte werden durch den AMB3 nur erreicht, weil das durch den Generator gepumpte Luft-/Flüssigkeitsgemisch übersättigt dem Reaktionsmedium im Reaktor beigemischt wird. Bedingt durch das Arbeitsprinzip des AMB3 ist das Medium hohen Scherkräften ausgesetzt. Die Ursachen dafür sind die Kompression des Mediums und die folgende Ausgasung durch Entspannung über eine Düse. Weiterhin konnte kein konstanter $k_L a$ -Wert (Betriebspunkt) mit dem AMB3 eingestellt werden. Daher wurde der AMB3 nicht für weitere Experimente bezüglich der Anwendung in der Biokatalyse in dieser Studie genutzt. Jedoch ermöglichte der AMB3 die Untersuchung des Einflusses von hohen Scherkräften (Energieeintrag) sowie eine zuverlässige Erzeugung von Blasen im Bereich von unter 100 μm (Matthes et al. 2020). Die

Begasung mit dem offenen Rohr (Abb. 27) zeigte einen linearen Verlauf zwischen dem angelegten Gasstrom und der Stoffübergangsleistung ($k_L a$) bis zu einer Begasungsrate von 0,067 vvm. Dieses Verhalten wird auch in der Literatur beschrieben (Brierley and Steel 1959). Im Gegensatz dazu nimmt die Stoffübergangsleistung der Mikro- und Submilliblasenbegasung, als Teil einer Sättigungsfunktion zu, bis ungefähr 1 vvm erreicht ist. In Anbetracht dieses Verhaltens wird bei weiterer Erhöhung der Begasungsrate beobachtet, dass der $k_L a$ -Wert einen konstanten Wert von ca. 330 ± 10 1/h erreicht (Abb. 27).

Um ein tieferes Verständnis der beobachteten Effekte zu erhalten, ist die Diskussion der Blasenbildung an porösen Materialien in die Diskussion einzubeziehen (siehe Abschnitt 1.1.2.1). Khuntia *et al.* beschreibt die Blasenbildung an fein porösen Materialien, bei der eine zunehmende Begasungsrate zu einem höheren Kapillardruck und einer Steigerung der Blasenablöserate führte (Khuntia *et al.* 2012; Terasaka and Tsuge 1993). In Folge dessen löst ein erhöhter Druckabfall über das Material der porösen Sinterfritte die Aktivierung kleiner Poren, sowie die Bildung von Blasen über mehrere Poren gleichzeitig aus (Kazakis *et al.* 2008a, 2008b). Eine weitere Erklärung für dieses Verhalten geben Rübiger *et al.* 2013, welche eine sekundäre Blasenbildung über dem porösen Begasermaterial bei hohen Gasströmen beschreiben (Rübiger *et al.* 2013). Dieser Effekt führt zu einer konstanten Blasengrößenverteilung (BSD) als Folge der Sekundärblasenbildung ab einer kritischen Begasungsrate von $We^2/Fr \gg 675$ und einer instabilen Blasenoberfläche ab $We/Fr > 10$ (Mersmann 1977; Rübiger *et al.* 2013). Andere Parameter, die die BSD und die Bildung von Blasen beeinflussen, sind die Flüssigkeitseigenschaften. Dazu gehören Oberflächenspannung, Puffersalzkonzentration, pH-Wert, Rheologie und eingebrachte Scherkräfte (Benedek and Heideger 1971; Kulkarni and Joshi 2005).

Durch Einführen des Gasverbrauchseffizienzfaktors η_{O_2Eff} in Abb. 28, konnte bei konstanten $k_L a$ von 160 1/h ein direkter Vergleich der Makro-, Submilli- und Mikrobegasung zunächst ohne Reaktion realisiert werden. Für die Makroblasenbegasung wurde ein 25-mal höherer und für die Submilliblasenbegasung ein 12-mal höherer Gasverbrauch im Gegensatz zur Begasung mit Feinblasen ermittelt. Zum quantitativen Vergleich wird die Gasnutzung bei 160 1/h und 60 1/h berechnet. Das hohe Potenzial der Feinblasenbegasung gegenüber der Submilli- und Makroblasenbegasung wird dabei deutlich. Der Vergleich des Gasverbrauchs bei konstanten $k_L a$ war hier die Methode der Wahl. Hierzu wird, wie in Abb. 27 dargestellt, die Begasungsrate (vvm) bei konstanten $k_L a$ von 60 1/h und 160 1/h mittels des Effektivitätsfaktors η_{Gas} in Beziehung gesetzt.

$$\eta_{Gas} = \frac{vvm_{sparger}}{vvm_{5\text{ mm open pipe}}}, \quad k_L a = const \quad (30)$$

In dieser Hinsicht führt die Begasung mit Makroblasen bei einem $k_L a$ von 160 1/h zu einem 25-mal höheren Gasverbrauch im Vergleich zur Begasung mit Mikroblasen und zu einem 12-fach höheren Gasverbrauch im Vergleich zur Begasung mit Submilliblasen (10 μm Sinterfritte) (Abb. 28). Dies unterstreicht die Effizienz der Feinblasenbegasung im Hinblick auf die Gasnutzung und das hohe Potenzial zur Reduzierung des erforderlichen Gasverbrauchs im Rührkesselreaktor (siehe Abb. 28). Um die positiven Effekte der erzeugten Blasen weiter zu untersuchen, ist die Abschätzung der Blasengrößenverteilung von großer Wichtigkeit.

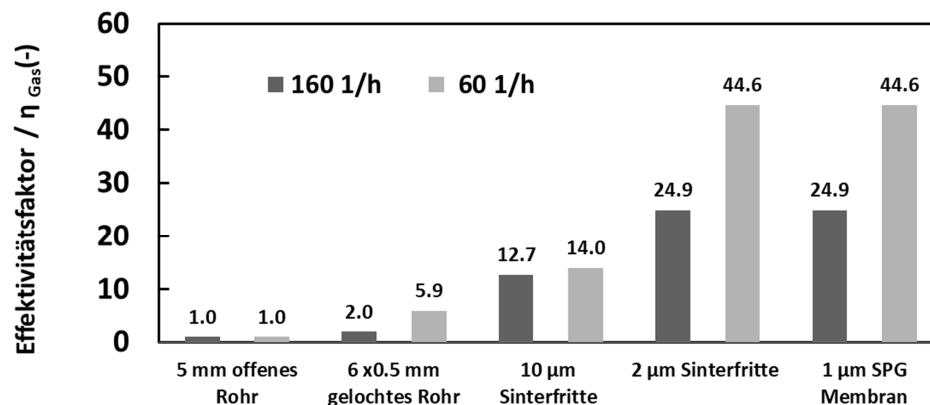


Abb. 28: Vergleich des Gasverbrauchseffektivitätsfaktors bezogen auf Makroblasenbegasung (Dynamische $k_L a$ Bestimmung mittels O₂ PreSens Fibox 4, Reaktionsbedingungen: T = 25 °C, V_{Medium} = 1000 mL, 10 mM Na-Acetat Puffer, pH 5,3, 87,8 mM D-Glucose, 83,3 mg/L BSA, Schrägblattrührer 430 rpm)

3.2.2 Vergleich der ausgewählten Begaser hinsichtlich der erzeugten Blasengrößenverteilung bei konstantem $k_L a$

Die Möglichkeit, durch Begasung mit Feinblasen den Gasverbrauch bei konstanter Stofftransportrate gegenüber einer klassischen Makroblasenbegasung zu verringern, ist wichtig für die Optimierung von begasteten Reaktionssystemen in der Biokatalyse. Um ein besseres Verständnis für die zugrunde liegenden Effekte zu erlangen, bedarf es der Messung oder Abschätzung der generierten Blasengrößenverteilungen und somit der eingebrachten Phasengrenzfläche a /min. Die volumenspezifische Phasengrenzfläche a nach Gleichung (31) ist essentiell für das Verständnis von Stofftransport, Hydrodynamik, Mischverhalten, sowie der Interaktion von Proteinen mit der Gas-/Flüssigphasengrenzfläche. Zum Vergleich der generierten Grenzflächen von Sinterfritten (10 μm, 2 μm, 1 μm) und Rohrbegasern (offenes, gelochtes Rohr), wird wie in 3.2.1 ein konstanter $k_L a$ Wert von 160 1/h gewählt. In Bezug auf die vorherige $k_L a$ -Messung (Abb. 27) weisen beide Mikroblasenbegaser bei einem vvm von 0,67 einen durchschnittlichen $k_L a$ von 160 1/h auf. Wie in Abb. 27 dargestellt (gestrichelte Linie) ergeben sich für verschiedene Begasungssysteme unterschiedliche Begasungsraten. Respektive konnte mittels eines bildgebenden Verfahrens und Auswertung mit dem Programm Sopat Batch (Version 2.1.17.1623). Die Blasengrößenverteilung und der Äquivalenzdurchmesser wurde für die 2 μm Sinterfritte und 1 μm SPG Membran bei 0,67 vvm bestimmt (siehe Abb. 29).

Wie in Abb. 29 dargestellt, befindet sich die Hauptfraktion der durch die 1 μm SPG Membran erzeugten Blasen im Mikroblasenbereich unterhalb von 100 μm. Die Blasenbildung der 2 μm Sinterfritte führt zu einem höheren Anteil an Blasen im Submilliblasenbereich im Vergleich zur 1 μm SPG Membran. Eine Erklärung hierfür könnte im Unterschied der mittleren Porenweite liegen, welche im Fall des Materials der Sinterfritte mit 2 μm Porenweite, doppelt so groß ist. Dennoch resultiert aus beiden Blasengrößenverteilungen ein nahezu identischer Sauterdurchmesser d_{32} von 0,295 mm für die 1 μm SPG Membran und 0,320 mm für die 2 μm Sinterfritte. Wird die Abweichung von 5 - 10%, welche aus der Einstellung der Gasraten resultiert, berücksichtigt, sind beide Begaser vergleichbar. Mittels der in Abb. 29 dargestellten Blasengrößenverteilung kann für beide

Mikroblasenbegaser der Nachweis der Generierung von Feinblasen erbracht werden. Hierbei entspricht der Mengenanteile an Blasen einer festgelegten Blasengröße (einzelne Größenintervalle mit der Einheit μm) einer Fläche unterhalb der Dichteverteilung. Diese Menge wurde auf der Basis der Anzahl an gemessen Blasen bestimmt und ist somit eine Anzahldichteverteilung.

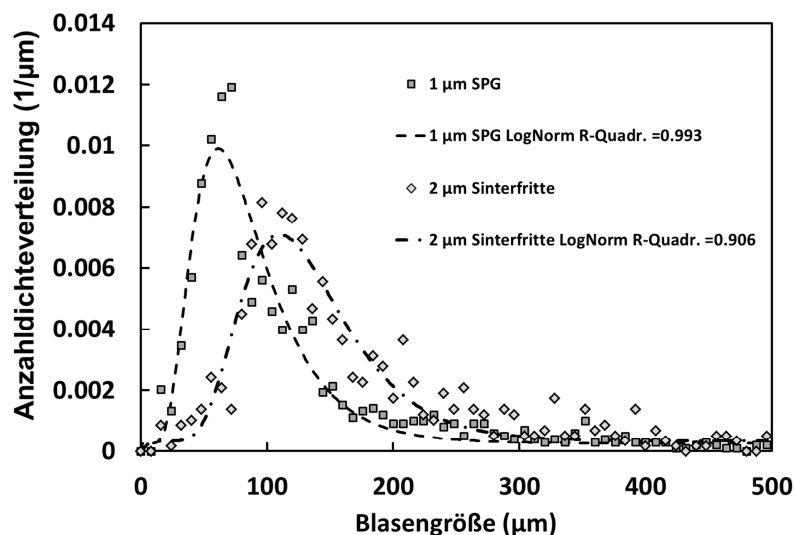


Abb. 29: Bestimmung der Blasengrößenverteilung (BSD) von $1\ \mu\text{m}$ SPG Membran und $2\ \mu\text{m}$ Sinterfritte ($T = 25^\circ\text{C}$, $V = 1000\ \text{mL}$, $10\ \text{mM}$ Na-Acetatpuffer pH 5,3, $83,3\ \text{mg/L}$ GOx, Schrägblattrührer 430 rpm, Begasungsrate = $0,67\ \text{vvm}$, $k_L a = 160\ 1/\text{h}$, Sopat Sonde 5 mm Spaltbreite).

Die Erhöhung der Stofftransportleistung von Blasen verschiedener Größe erfolgt hauptsächlich durch die Zunahme der volumenspezifischen Oberfläche, der Verweilzeit und des Blaseninnendruckes. Aus der verringerten Blasengröße im Feinblasenbereich resultiert eine Vergrößerung der volumenspezifischen Phasengrenzfläche bei konstantem Gasgehalt. Unter der Annahme idealer kugelförmiger Blasen mit dem Formfaktor $\varphi = 1$ und des Sauterdurchmessers d_{32} (μm) wird eine spezifische Oberfläche SV ($1/\mu\text{m}$) berechnet, die durch die Gleichung (31) beschrieben wird (Stieß 2005).

$$SV = \frac{6 \cdot \varphi}{d_b} = \frac{6 \cdot \varphi}{d_{32}} \quad (31)$$

Beispielsweise kann für eine Blase mit einem Durchmesser $d = 100\ \mu\text{m}$ eine $SV = 6 \times 10^4\ \text{m}^{-1}$ berechnet werden, welche um den Faktor ~ 10 höher ist, als für eine Makroblase von $d = 1000\ \mu\text{m}$ mit $SV = 6 \times 10^3\ \text{m}^{-1}$. Die meisten Blasengeneratoren können eine definierte Blasengrößenverteilung erzeugen. Diese ist durch den Prozessgasstrom einstellbar (Terasaka, K. Hirabayashi, Ai et al. 2011). Zu Vergleichszwecken werden die Äquivalenzdurchmesser der $10\ \mu\text{m}$ Sinterfritte und des offenen Rohres auf Basis eines Modells angenähert. Dieser Korrelation liegt die Annahme eines nicht gerührten Systems zugrunde, wodurch es zu einer geringen Überschätzung der berechneten Blasengrößen durch die Abwesenheit von rührerinduzierten Scherkräften kommen kann. Der Blasendurchmesser d_b , welcher mittels der $10\ \mu\text{m}$ Sinterfritte generiert wird, kann mit der Korrelation in Gleichung (32) abgeschätzt werden (Welty et al. 2015).

$$d_{AV} = d_b = \left(\frac{6 \cdot d_p \cdot \sigma_L}{g (\rho_L - \rho_G)} \right) \quad (32)$$

Aus Abb. 27 ist ersichtlich, dass bei einem $k_L a$ von 160 1/h und einer Rate von 1,36 vvm mit der 10 μm Sinterfritte kein Abflachen der $k_L a$ Kurve (Abb. 28) beobachtet wurde. Daher wurde angenommen, dass bei 1,36 vvm keine oder nur eine geringfügige Sekundärblasenbildung stattfindet. Aus Gleichung (32) kann somit ein theoretischer Blasendurchmesser von 768,7 μm berechnet werden. Mit Gleichung (31) und der Annahme, dass die Blasen eine ideale Kugelform besitzen ($\varphi = 1$), entspricht der mittlere Blasendurchmesser d_{AV} dem Sauterdurchmesser.

Um die mit dem offenen Rohr bei 160 1/h und einer, im Vergleich zu den anderen Begasern hohen Begasungsrate von 16,67 vvm, erzeugten Blasengrößen abzuschätzen, wird sich der Korrelation von Mersmann bedient, wie in Gleichung (33) (Mersmann 1977) gezeigt.

$$d_{AV} = d_{b,max} = 3 \cdot \sqrt{\frac{\sigma_L}{\Delta\rho \cdot g}} \quad (33)$$

Mersmann beschreibt für niedrigviskose Flüssigkeiten bis $\eta_L = 3 \text{ mPa s}$ einen Zusammenhang der Auftriebskraft und der Oberflächenspannung. Hieraus ergibt sich die maximale stabile Blasengröße. Ebenso kann für niedrigviskose Flüssigkeiten mit der Gleichung (34) der resultierende Sauterdurchmesser berechnet werden (Mersmann 1977).

$$d_{32} = 0,6 \cdot d_{b,max} \quad (34)$$

Damit ergibt sich für die Begasung mit dem offenen Rohr bei 160 1/h und 16,67 vvm ein $d_{AV} = 8,25 \text{ mm}$ und ein $d_{32} = 5 \text{ mm}$. In Folge einer kontinuierlichen Begasung wurde die eingeführte Oberfläche pro Zeit (m^2/min), basierend auf der volumetrischen Begasungsrate \dot{V} (m^3/min), wie in Gleichung (35) dargestellt, berechnet.

$$\dot{a} = SV \cdot \dot{V} \quad (35)$$

Bei einem konstanten $k_L a$ von 160 1/h ergab die Feinblasenbegasung mit 1 μm SPG Membran eine um 62% niedrigere Oberfläche \dot{a} im Vergleich zur Begasung mit dem offenem Rohr (Tabelle 7). Hierbei benötigte die 10 μm Sinterfritte (Submilliblasen) eine 47% geringere Grenzfläche bei doppelt so hohem Gasverbrauch im Vergleich zur 1 μm SPG Membran.

Der zweite, den Stofftransport beeinflussende Parameter, ist die Verweilzeit der Blasen im Medium. Mit Verringerung des Blasendurchmessers nahm die Auftriebsgeschwindigkeit ab, was zu einer verlängerten Verweilzeit und damit zu einer größeren Zeitspanne für Wechselwirkungen mit dem umgebenden Medium führte. Das Stokes-Gesetz ist der klassische Ansatz zur Berechnung der Auftriebsgeschwindigkeit einer Gasblase (Parkinson et al. 2008; Stokes 1851). Die Annahme einer immobilen Blasenoberfläche bei niedrigen Re -Zahlen $Re \ll 1$ liegt der Stokes-Gleichung zugrunde, welche für Feinblasen zutreffend ist (Stokes 1851). Mit der Stokes-Gleichung ergibt sich für eine

Feinblase von 10 μm Durchmesser eine geringe Auftriebsgeschwindigkeit von 0,05 mm/s. Im Vergleich zur Mikroblase beträgt die Auftriebsgeschwindigkeit einer Makroblase mit $d_b = 1 \text{ mm}$ 542 mm/s. Eine neuere Interpretation der Naiver-Stokes Gleichung wurde 1911 von Hadamard und Rybczynsk eingeführt, wobei als Randbedingungen die Viskosität η (N s/m^2) und die disperse Phase Berücksichtigung finden (Hayashi et al. 2020; Parkinson et al. 2008). Mit Hadamard und Rybczynsk unter Berücksichtigung der Höhe h (m) des Reaktors, kann die resultierende Verweilzeit τ (s) mit Gleichung (36) berechnet werden. Hierfür wurde zur Berechnung die Fallgeschwindigkeit $g = 9,81 \text{ (m/s}^2\text{)}$ sowie die Dichte von Gas und Flüssigkeit ρ (g/m^3) bei idealen Bedingungen ohne Rühren angenommen.

$$\tau = \frac{d_{32}^2 \cdot g \cdot (\rho_{\text{Gas}} - \rho_{\text{Liquid}})}{18 \cdot \eta \cdot h} \quad (36)$$

In Tabelle 7 sind die mit Gleichung (36) resultierenden theoretischen Verweilzeiten im Vergleich dargestellt. Insbesondere die Feinblasenbegaser 1 μm SPG Membran und 2 μm Sinterfritte zeigen deutlich höhere Verweilzeiten im direkten Vergleich mit den Submilliblasen- (10 μm Sinterfritte) und den Makroblasenbegasern. Aus den hohen Verweilzeiten bei der Feinblasenbegasung resultiert eine längere Interaktionszeit der Gasphase mit der Flüssigkeit. Dieses führt zur Steigerung des Stofftransports. Im Vergleich von Fein- mit Makroblasen ergibt sich eine ~ 280 -fach längere Verweilzeit.

Der dritte Einflussparameter ist der Young-Laplace-Druck in der Blase, welcher mit Gleichung (37) berechnet werden kann.

$$\Delta p = p_b - p_{\text{bulk}} = \frac{4 \cdot \sigma}{d_b}; \quad p_b = \frac{c_{\text{O}_2}^b}{H} \quad (37)$$

Unter Berücksichtigung von Gleichung (37) haben die Oberflächenspannung σ (N/m) und der Blasendurchmessers d_b (m) einen direkten Einfluss auf die Druckdifferenz Δp (Pa) vom Systemdruck zum Blaseninnendruck. Der Druck innerhalb der Blase (p_b) ist durch den Henry-Koeffizienten H ($\text{mol/m}^3/\text{Pa}$) mit der Konzentration verknüpft $c_{\text{O}_2}^b$ (mol/L). Somit steigt der Konzentrationsgradient mit abnehmendem Blasendurchmesser (Tsuge 2014).

In einer früheren Studie berichteten Matthes *et al.* über eine Abnahme der Oberflächenspannungen infolge der Zugabe von 67,8 mg/L BSA oder GOx um 15,5% im Vergleich zu reinem Wasser (Matthes et al. 2020). Weiterhin hat der Blasendurchmesser einen direkten Einfluss auf die Druckdifferenz. Gemäß Gleichung (37), ergeben sich große Unterschiede zwischen den Begasern. Hier kann mit der Feinblasenbegasung der höchste Laplace-Druck berechnet werden (Tabelle 7).

Tabelle 7: Vergleich der BSD relevanten Parameter der Begaser bei konstantem $k_L a$ (Berechnungsgrundlage $T = 25^\circ\text{C}$, $\eta = 0,81 \text{ mPa s}$, $g = 9,81 \text{ m/s}^2$, $\rho_{\text{gas}} = 1,18 \text{ kg/m}^3$, $\rho_L = 1000 \text{ kg/m}^3$ (Kell 1975; Straub et al. 1980), Experimentelles $\sigma = 74,2 \text{ mN/m}$ ^{a)} (Mersmann 1977; Rübiger et al. 2013) ^{b)} (Welty et al. 2015))

	1 μm SPG Membran	2 μm Sinterfritte	10 μm Sinterfritte	6 x 0,5 mm gelochtes Rohr	5 mm offenes Rohr
Blasengrößenbereich	Mikroblasen und Submillieblasen		Submillieblasen	Makroblasen	Makroblasen
d_{av} (mm)	0,12	0,17	0,76 ^{b)}	8,6 ^{a)}	8,6 ^{a)}
$d_{3,2}$ (mm)	0,29	0,32	0,76 ^{b)}	5 ^{a)}	5 ^{a)}
vvm ($\text{L}_{\text{Luft}}/\text{min}/\text{L}_{\text{Medium}}$)	0,67	0,67	1,36	8,44	16,67
$k_L a$ (1/h)	160	160	160	160	160
τ (s)	12,6	10,7	1,86	0,044	0,044
\dot{a}_{Air} (m^2/min)	6,667	7,23	3,12	5,36	10,6
Δp_{Blase} (kPa)	1,00	0,92	0,38	0,059	0,059
$\alpha_{\text{effektiv}} (\text{m}^2) = \dot{a}_{Air} \cdot \tau$	1,4	1,28	$9,6 \cdot 10^{-2}$	$3,9 \cdot 10^{-3}$	$7,7 \cdot 10^{-3}$

3.2.3 Zusammenfassung und übergeordnete Diskussion bezüglich Gasverbrauch und Stofftransportlimitierung

In diesem Kapitel konnte erfolgreich die Hypothese des erhöhten Stofftransports durch Vergrößerung der eingebrachten Phasengrenzfläche mittels Feinblasenbegasung bestätigt werden. Hierzu wurde eine umfangreiche Messreihe zur Bestimmung der volumenbezogenen Stofftransportkoeffizienten $k_L a$ in Abhängigkeit der Begasungsrate (vvm) durchgeführt (Abschnitt 3.2.1). Für weitere Experimente wurden folgende Begaser ausgewählt: 5mm offenes Rohr, 1 μm SPG Membran, 2 μm und 10 μm Sinterfritte.

Zusammenfassend konnte über den gesamten Bereich von 0,006 - 16,67 vvm der deutliche Vorteil der Begasung mit Feinblasen im Vergleich zu Makroblasen festgestellt werden. Es folgte der Vergleich der Begaser bei konstantem $k_L a$ von 160 1/h. Bei der Begasung mit dem 5 mm offenen Rohr (Makroblasen) war ein 25-mal höherer Gasverbrauch, im Vergleich zur Begasung mit 1 μm SPG Membran und 2 μm Sinterfritte (Mikroblasen), zu verzeichnen. Ein 12-fach höherer Gasverbrauch ergab sich im Vergleich zur Begasung mit der 10 μm Sinterfritte (Submillieblasen). Die Bestimmung der Blasengrößenverteilung (Abb. 29) zeigte, dass bei der Begasung mittels 1 μm SPG Membran und 2 μm Sinterfritte bei einem $k_L a = 160 \text{ 1/h}$ Feinblasen generiert werden. Durch Modelle wie Mersmann (33) und Wiltey (32) kann der Sauterdurchmesser für die 10 μm Sinterfritte und das offene Rohr berechnet werden. Weiter wurden die Verweilzeit, die eingebrachte Oberfläche, sowie die Druckdifferenz berechnet und verglichen. Es konnte dargestellt werden, dass sowohl bei der Mikro- als auch der Submillieblasenbegasung die Verweilzeit und die Druckdifferenz mit der Verringerung der Blasengröße ansteigen. Die Ergebnisse dieser Berechnung und des Begaservergleich sind in Tabelle 7 dargestellt. Es konnten die positiven Effekte der Verringerung der generierten Blasengrößen bezüglich des Stofftransports und des Gasverbrauchs gezeigt werden. Hierbei erwies sich die Erhöhung der Verweilzeit, des Blaseninnendrucks sowie der effektiven Phasengrenzfläche bei Feinblasenbegasung als vorteilhaft.

Die in 3.1 dargestellten vier Reaktionssysteme weisen durch den maximalen Sauerstoffbedarf (Tabelle 6) ein hohes Potenzial zur Optimierung des Stofftransports auf. Hierzu wurde das in 3.2.1 gewählte Kriterium eines konstanten $k_L a$ von 160 1/h für den Vergleich der Enzymsysteme herangezogen. Zum Vergleich der verschiedenen Oxidasen wird die Sauerstofftransportrate, im Englischen „oxygen transfer rate“ (*OTR*), eingeführt. Die *OTR* (mmol/min) beschreibt den direkten Zusammenhang zwischen dem volumenspezifischen Stoffübergangskoeffizienten $k_L a$ (1/h), der Sättigungskonzentration c^* (mmol/L), der Sauerstoffkonzentration c_n zum Zeitpunkt n und dem Flüssigkeitsvolumen V_{Medium} , siehe Gleichung (38).

$$OTR = k_L a \cdot (c^* - c_n) \cdot V_{Medium} \quad (38)$$

Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Reaktionstemperaturen der Oxidasen (Abschnitt 3.1) resultieren unterschiedliche Sauerstoffsättigungen c^* (mmol/L) im Reaktionsmedium (siehe Tabelle 8). Zur Berechnung der theoretischen *OTR* wurden die Annahme eines Flüssigkeitsvolumens von $V_{Medium} = 0,3$ L und einer Sauerstoffkonzentration c_n zum Zeitpunkt n von 0 mM gewählt. Die berechnete *OTR* ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 8: Berechnung der *OTR* für die Reaktionstemperatur der untersuchten Oxidasen bei konstantem $k_L a$

Parameter	GOx Type VII	Tyrosinase	NOX34	BM3 P450
Temperatur	35°C	20°C	25°C	20°C
c^*	0,215 mM	0,284 mM	0,256 mM	0,284 mM
$k_L a$	160 1/h	160 1/h	160 1/h	160 1/h
<i>OTR</i>	0,17 mmol/min	0,22 mmol/min	0,20 mmol/min	0,22 mmol/min

Um die Begasungssysteme einer enzymatischen Reaktion vergleichen zu können, ist die Annahme einer Stofftransportlimitierung der Reaktion eine Voraussetzung. Daher wurden die einzustellenden Reaktionsbedingungen ermittelt, und die Oxidasen bezüglich der enzymspezifischen Sauerstoffverbrauchsrate (basierend auf v_{max}) als Hauptauswahlkriterium verglichen. Ziel war es, festzustellen, ob mit geringen Mengen an Enzym eine Sauerstofflimitierung der Reaktion eingestellt werden kann.

Die Damköhlerzahl (Da) ist eine dimensionslose Kennzahl und findet in der Interpretation der Stofftransportlimitierung von chemischen und biochemischen Reaktion breite Anwendung. Zur erweiterten Betrachtung der Stofftransportlimitierung wurde die modifizierte Damköhlerzahl (Da^*) eingeführt, siehe Gleichung (39). Sie setzt die Reaktionsgeschwindigkeit, in diesem Fall die enzymspezifischen Sauerstoffverbrauchsrate, bei v_{max} (\dot{v}_{O_2max} in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) zum Stofftransport (*OTR* in $\mu\text{mol}/\text{min}$) des Begasungssystems ins Verhältnis unter Berücksichtigung der Enzymmenge (m_{Enzym} in mg). Die modifizierte Damköhlerzahl (Da^*) wurde in dieser Arbeit wie folgt berechnet.

$$Da^* = \frac{\dot{v}_{O_2max}}{OTR} \cdot m_{Enzym} \begin{cases} > 1 \rightarrow O_2 \text{ Limitation} \\ \leq 1 \rightarrow \text{keine } O_2 \text{ Limitation} \end{cases} \quad (39)$$

Hierbei kann mit $Da^* = 1$ die für das Begasungssystem (OTR) benötigte Enzymmenge abgeschätzt werden, bei welcher keine Stofftransportlimitierung vorliegt. Allerdings werden in der Definition von Da^* die Enzymstabilität sowie die höheren OTR Werte bei kontinuierlichem Sauerstoffverbrauch vernachlässigt. Trotzdem ermöglicht die Da^* eine Interpretation der Stofftransportlimitierung verschiedener Reaktionssysteme. Im Vergleich der volumenspezifischen Stofftransportrate ($k_L a$) der Begaser aus Abb. 27 ist über den gesamten Bereich von 0.006 - 16.67 vvm der deutliche Vorteil der Begasung mit Feinblasen im Vergleich zu Submilli- und Makroblasen dargestellt. Dieses Ergebnis unterstreicht das außerordentliche Potenzial der Feinblasenbegasung bezüglich des hohen Stofftransports. Um diesen Effekt auch in enzymatischen Reaktionen nutzen zu können, ist die Verknüpfung des Begaserstofftransports (OTR) mit der enzymmengenspezifischen Sauerstoffverbrauchsrate nötig. Hierbei ist vor allen die Betrachtung der enzymmengenspezifischen Sauerstoffverbrauchsrate wichtig. Wie in Abb. 30 dargestellt, kann mit Gleichung (39) aus den $k_L a$ -Daten (Abb. 27) für einen beliebigen Begaser eine enzymmengenspezifische Da^*/m_{Enzym} (1/mg) berechnet werden.

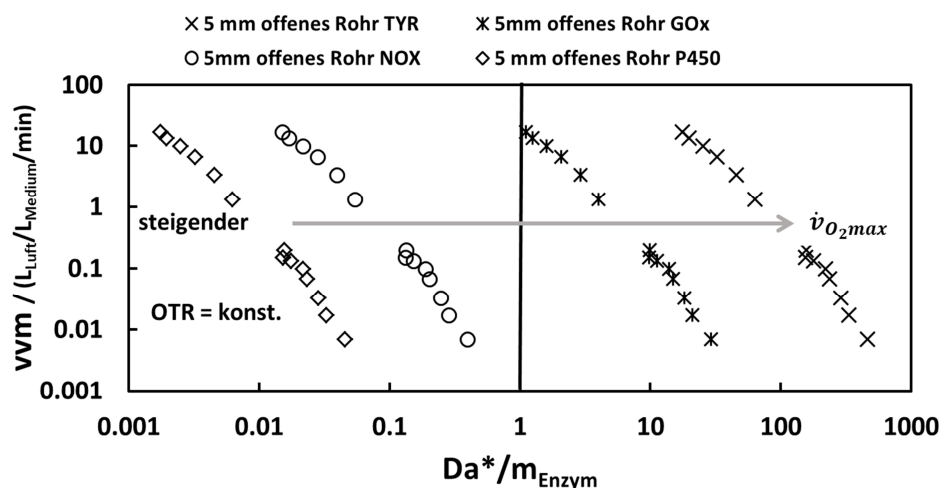


Abb. 30: Darstellung der enzymmengenspezifischen modifizierten Damköhlerzahl für die $k_L a$ -Messungen des offenen Rohres am Beispiel der Oxidasen (Reaktionsbedingungen $T = 25^\circ C$, $c^* = 0,256 \text{ mM}$, $k_L a = 160 \text{ 1/h}$, $OTR = 0,2 \text{ mmol/min}$, $V_{Medium} = 0,3 \text{ L}$, enzymengen spezifische Sauerstoffverbrauchsrate aus Tabelle 8, $n = 1$)

Anhand der Darstellung in Abb. 30 kann das Potenzial zur Optimierung des Stofftransports für die Oxidasen vereinfacht verglichen werden. Hierbei wird bei konstanter Begasung ($OTR = \text{konst.}$) mit dem offenen Rohr deutlich, dass bei geringen enzymmengenspezifischen Sauerstoffverbrauchsrate der Oxidase wie der Cytochrom P450, bereits geringe $k_L a$ -Werte der Makroblasenbegasung ausreichend sind. So kann die Stofftransportlimitierung mit geringem Enzymeinsatz überwunden werden. Wie in Abb. 30 für die Begasung mit dem offenen Rohr dargestellt ist, kann durch den Da^*/m_{Enzym} die eingesetzte Enzymmenge optimiert werden. Bei größerer Enzymmenge erhöht sich der Sauerstoffverbrauch im System und Da^* steigt. Somit kann mittels des Da^* die Stofftransportlimitierung für den Begaservergleich sichergestellt werden. Für das Vergleichskriterium konstanter $k_L a = 160 \text{ 1/h}$ wird bei den ermittelten Reaktionsbedingungen des Sauerstoffverbrauchspotenzials Da^*/m_{Enzym} der GOx VII, TYR, NOX34 und Cytochrom P450 berechnet. Dieser Vergleich ist in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Vergleich der enzymmengenspezifischen Sauerstoffverbrauchsrate und der enzymmengenspezifischen, modifizierten Damköhlerzahl der Oxidasen (\dot{v}_{O_2max} Rate pro mg Enzym aus 3.1.5 in Tabelle 6)

Parameter	GOx Type VII	TYR	NOX34	BM3 P450 WT
v_{max}	474,6 ±12,4 U/mg	9172 ±440,8 U/mg	12,86 ±1,22 U/mg	0,74 ±0,06 U/mg
\dot{v}_{O_2max}	237,3 µmol/min/mg	3750 µmol/min/mg	3,21 µmol/min/mg	0,37 µmol/min/mg
$k_L a/m_{Enzym}$	220,74 1/h/mg	2640,84 1/h/mg	2,5 1/h/mg	0,26 1/h/mg
OTR/\dot{v}_{O_2max}	0,72 mg _{Enzym}	0,058 mg _{Enzym}	62 mg _{Enzym}	594 mg _{Enzym}
Da^*/m_{Enzym}	1,38/ mg _{Enzym}	17,24/ mg _{Enzym}	0,016/ mg _{Enzym}	0,0017/ mg _{Enzym}
1 mg Enzym	limitiert	limitiert	Nicht limitiert	Nicht limitiert

Mit der enzymmengenspezifischen Sauerstoffverbrauchsrate kann ein $k_L a/m_{Enzym}$ berechnet werden. Dieser ist erforderlich, um eine Limitierung durch den Stofftransport zu überwinden. Wie in Tabelle 9 ersichtlich, konnte das hohe Potenzial des GOx- und des TYR-Systems bezüglich der hohen Da^*/m_{Enzym} von 1,38/mg und 17,24/mg festgestellt werden. Daher wurden die GOx als Haupt- und die TYR als Nebensystem für den Begaservergleich ausgewählt. Die weitere Untersuchung der Oxidasen erfolgte hinsichtlich ihrer Enzymstabilität im begasten Rührkessel. Das Reaktionssystem der TYR wurde auf Grund der sehr hohen enzymmengenspezifischen Sauerstoffverbrauchsrate mit dem Nachteil der Nebenproduktbildung (L-Dopaquinon) lediglich als Validierungssystem, der mit GOx beobachteten Effekte, eingesetzt. Im direkten Vergleich wurde das Potenzial der GOx und der TYR zur Einstellung einer Stofftransportlimitierung unter dem Kriterium $k_L a = 160 \text{ }^{\circ}1/\text{h}$ deutlich. Hingegen benötigten die Systeme NOX34 mit $\geq 62 \text{ mg}$ und Cytochrom P450 mit $\geq 594 \text{ mg}$ eine hohe Enzymmenge, um die Stofftransportlimitierung im System für einen Begaservergleich zu gewährleisten (Tabelle 9). Wie für GOx in Abb. 31 dargestellt, kann durch Anpassung der Enzymmenge mit dem Einsatz von 25 mg ($\sim 12000 \text{ U}$) eine $Da^* \geq 1$ (Stofftransportlimitierung) sichergestellt werden. Hierbei wird deutlich, dass bei konstanter Enzymmenge (m_{Enzym}) der hohe Stofftransport der Feinblasenbegasung zu einer Verringerung der Stofftransportlimitierung bei sinkender Da^* führt.

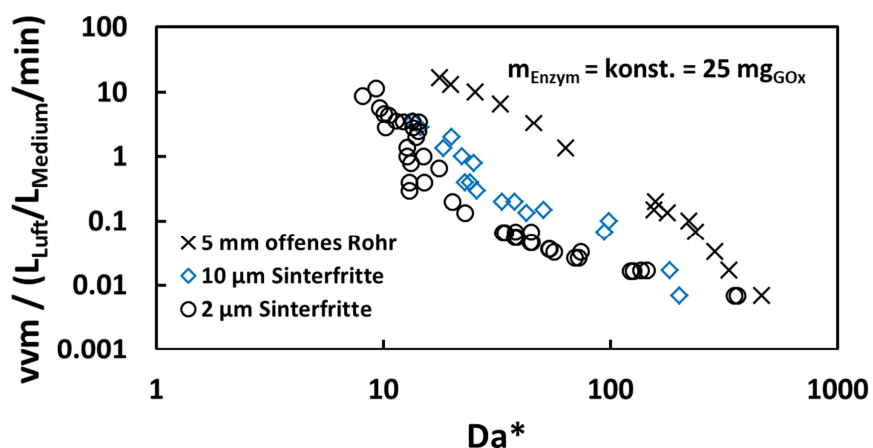


Abb. 31: Begasercharakterisierung bezüglich Stofftransportlimitierung des GOx-Systems (Reaktionsbedingungen: T = 35°C, 11865 U GOx (25 mg GOx VII), $\dot{v}_{O_2max} = 237,3 \text{ } \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, n = 1)

Die Da^* kann auch als Optimierungskriterium $Da^* = 1$ eines bestehenden Prozesses in weiterführenden Experimenten verwendet werden. Dieses Vorgehen kann zur Überprüfung einer Stofftransportlimitierung der Reaktion für andere Enzyme oder auch Reaktionen mit H_2 , CO_2 etc. als Substrat angewandt werden.

3.2.3.1 Vergleich der Begasungssysteme hinsichtlich der Gasnutzungseffizienz

Ein weiterer Optimierungsparameter von begasten Reaktionen ist die Regulierung des zugeführten Gasstroms. Im theoretischen Idealfall kann der komplette, im Gasstrom enthaltene Sauerstoff, in das Medium eingelöst werden ($\eta_{O_2, Eff} = 100\%$). Im Abschnitt 3.2.3. wird auf die theoretisch benötigte OTR , basierend auf der enzymmengenspezifischen Sauerstoffverbrauchsrate der jeweiligen Oxidase, eingegangen. Dabei wird lediglich die benötigte Sauerstoffeintragsrate, bezogen auf das offene Rohr, verglichen. Die in Abb. 28 dargestellten Faktoren η_{Gas} geben lediglich die Erhöhung der Fein- und Submilliblasenbegasung relativ zum Einsatz der Makroblasenbegasung mit dem offenen Rohr an. Um die Effizienz und somit die effektive Gasnutzung zu beschreiben, bedarf es der Relation zwischen dem übertragenen Sauerstoffmolenstrom der benötigten Gasrate, zur Erzielung eines konstanten $k_L a$. Hierzu kann die Gasnutzung durch die Betrachtung der Stofftransportraten OTR bei konstantem $k_L a$ durch die Einführung eines Ausdrucks für die begaserspezifische Gasnutzung $\eta_{O_2, Eff}$ wie folgt beschrieben werden.

$$\eta_{O_2, Eff} (\%) = \frac{OTR_{Begaser}}{OTR_{Maximal, theoretisch}} = \frac{k_L a \cdot (c^*) \cdot V_{Medium}}{(vvm \cdot V_{Medium} \cdot x_{O_2} \cdot \rho_{O_2}) / M_{O_2}} \cdot 100 \quad (40)$$

$$\eta_{O_2, Eff} = \begin{cases} = 100\% (Ideal) & \rightarrow 100\% \text{ des Sauerstoffs wird übertragen} \\ < 100\% (real) & \rightarrow \text{Sauerstoff wird nicht vollständig übertragen} \end{cases}$$

Der $\eta_{O_2, Eff}$ in Gleichung (40) beschreibt das Verhältnis von tatsächlich eingestellter Sauerstoffübergangsrate zu einer theoretischen maximalen OTR , welche erreicht wird, wenn der komplette Sauerstoff des zugeführten Gasstroms in die Flüssigkeit eingelöst und durch die Reaktion instant verbraucht wird ($c^n = 0$ mmol/L). Bei konstantem $k_L a$ von 60 1/h und 160 1/h kann die begaserspezifische Gasnutzung mit der Gleichung (40) berechnet werden (Abb. 32).

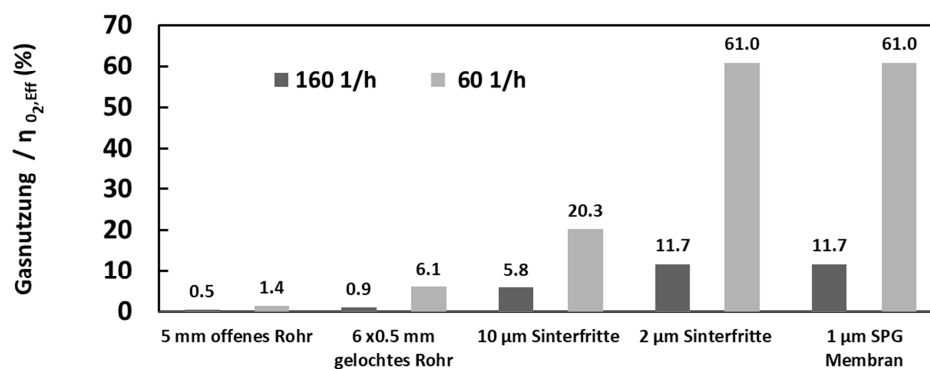


Abb. 32: Begaserspezifischer Gasnutzungsvergleich bezogen auf den übertragenen Sauerstoff. ($k_L a$ aus Abschnitt 3.2.1, Reaktionsbedingungen: $T = 20^\circ C$, $\rho_{O_2} = 1,43$ g/L, $x_{O_2} = 0,21$, $V_{Medium} = 0,3$ L, $M_{O_2} = 32$ g/mol)

Mit der berechneten $\eta_{O_2, \text{Eff}}$ konnte die, zuvor auf die Begasungsrate des offenen Rohres bezogene Erhöhung (dargestellt in 3.2.1), hinsichtlich des Gasverbrauchs bestätigt werden. Die Mikroblasenbegaser weisen bei einem $k_L a$ von 60 1/h eine Gasausnutzung von 61% des eingebrachten Sauerstoffstroms im Vergleich zu 20,3% mit Submilli- und 1,4 - 6,1% mit Makroblasen auf. Wird der $k_L a$ bei konstanten 160 1/h gehalten, steigt der Gasdurchsatz bei allen Begasern stark an. Dieses führt zu einer Reduktion der Gasnutzung auch bei den Mikroblasenbegasern auf 11,7%. Dieses Verhalten, insbesondere der porösen Sinterfritten, weist auf eine Sekundärblasenbildung bei $We \gg 6$ und $We^2/Fr \gg 675$ hin (Mersmann 1977; Rübiger et al. 2013). Im Zuge der Erhöhung der Begasungsraten kommt es zur Steigerung des Stofftransports von 60 auf 160 1/h. Im industriellen Maßstab sind $k_L a$ Werte im Bereich von 114 - 2300 1/h üblich (Moresi and Patete 1988; Woodley 2019). Lösungsansätze, um höhere $k_L a$ -Werte einzustellen, sind die Vergrößerung der porösen Begaseroberfläche oder der Einbau von mehreren parallel geschalteten Sinterfritten.

Als Teil der Prozessoptimierung kann die Gasnutzung typischerweise durch die Verweilzeit und den damit gekoppelten Stofftransport erhöht werden. In der Prozessoptimierung erhöht sich durch ein größeres H/D Verhältnis (Vergrößerung der Reaktorhöhe) und einen höheren Energieeintrag (Verringerung der generierten Blasengrößen) der Stofftransport. Eine weitere Methode ist der Einsatz von reinem Sauerstoff oder sauerstoffangereicherter Luft zur Reduktion des Gasstroms.

3.3 Charakterisierung und Anwendung von Ultrafeinblasen am Beispiel der Glucoseoxidase

In dieser Untersuchung wurden ausschließlich „bulk“ Nanoblasen eingesetzt, weshalb in der folgenden Diskussion suspendierte Nanoblasen als Ultrafeinblasen (UFB) benannt werden. In der Literatur werden UFB oder auch Nanoblasen auf Grund des fehlenden experimentellen und theoretischen Nachweises kontrovers diskutiert (Alheshibri et al. 2016). Die Stabilität und lange Lebensdauer sowie die Unterscheidung von Nanopartikeln und Ultrafeinblasen ist noch nicht abschließend geklärt und bewiesen (Alheshibri et al. 2016; Gurung et al. 2016). Auch in dieser Arbeit kann kein eindeutiger Nachweis für die Existenz von Nanoblasen für die Anwendung der UFB, generiert durch AMB3, erbracht werden. Dennoch ist es möglich, diese Nanoblasen/Nanopartikel mit dem NanoSight zu messen. Es wurden die Erzeugung und Charakterisierung von Ultrafeinblasen und die Anwendung am Beispiel einer Gluconolactonsynthese experimentell untersucht. Ultrafeinblasen haben einen volumenäquivalenten Durchmesser von weniger als 1 μm (Tsuge 2014) (siehe Abschnitt 1.2).

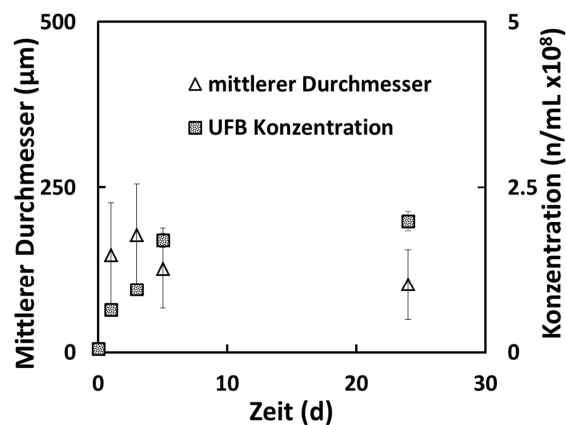


Abb. 33: Blasenkonzentrationsmessung über die Generationszeit des AMB3 (Reaktionsbedingungen: Messung mit NS300 NanoSight, T = 39°C, n = 5, Kameraeinstellungen siehe Kapitel 2, Abschnitt 2.11)

Zur Generierung wurde der Mikroblasengenerator AMB3 eingesetzt. Dabei wurde der Einfluss der zusätzlich bereitgestellten Phasengrenzfläche auf die Ausbeute der Gluconolactonsynthese bei konstanten $k_L a$ von 160 1/h ermittelt. In Abschnitt 3.4.3.2, Abb. 42 wurde bereits untersucht und gezeigt, dass gelöstes Enzym während der Mikroblasenbegasung mit dem AMB3 sehr schnell deaktiviert wird (Abb. 42). In diesen Experimenten wurde mit einer konstanten Konzentration an UFB in 10 mM Na-Acetat Puffer bei pH 5,3 gearbeitet. Zuerst wurden die Blasenkonzentration, sowie der gemittelte Blasendurchmesser über die Generationszeit bestimmt (Abb. 33). Nach einer Betriebszeit von 5 h stellte sich eine maximale Blasenkonzentration von $1,99 \times 10^8 \pm 0,15 \times 10^8$ n/mL mit einem mittlerer Durchmesser von $188 \text{ nm} \pm 46 \text{ nm}$ ein (Abb. 33). Ohgaki *et al.* berichten, mit einem vergleichbaren „Pressurization Dissolution Type“ Mikroblasengenerator um den Faktor 2 höhere Konzentrationen von $1,9 \times 10^{16}$ n/mL (Ohgaki et al. 2010) erzielt zu haben. Weiter wurden von Ohgaki *et al.* Stickstoff, Methan und Argon zur UFB-Generierung eingesetzt. Dabei sei eine UFB-Stabilität von zwei Wochen eingetreten (Ohgaki et al. 2010). Auf der Grundlage der Konzentration an UFBs von $1,99 \times 10^8$ n/mL in 0,3 L konnten der Gasgehalt, die Verweilzeit, der Blaseninnendruck nach Young-Laplace und die effektive Phasengrenzfläche berechnet werden (wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben). Tsuge beschreibt für Ultrafeinblasen, dass eine ideale Kugelform (mit dem Formfaktor $\varphi = 1$, $d_{AV} = d_{32}$) und ein Verhalten ähnlich zu Nanopartikeln, angenommen werden kann (Tsuge 2014). Die Ergebnisse für UFB (in Tabelle 10) konnten nun mit den Berechnungen für Mikro-, Submilli- und Makroblasen verglichen werden, welche in Abschnitt 3.2.2 Tabelle 7 aufgelistet sind.

Tabelle 10: Berechnung zur Blasengrößenmessung für die UFB (Berechnungsgrundlage T = 25°C, $\eta = 0,81 \text{ mPa s}$, $g = 9,81 \text{ m/s}^2$, $\rho_{gas} = 1,18 \text{ kg/m}^3$, $\rho_L = 1000 \text{ kg/m}^3$ (Kell 1975; Straub et al. 1980), Experimentelles $\sigma = 74,2 \text{ mN/m}$, AMB3 t = 24 h, Konzentrationsbestimmung mit NanoSight Messung, 10 mM Na-Acetatpuffer pH 6)

n	d_{AV}	d_{32}	τ	Δp_{Blase}	$a_{Effektiv}$	ϵ (Gasgehalt)
$1,99 \times 10^8 \text{ n/mL}$	188 nm	188 nm	3,59 d	1530 kPa	$6,6 \times 10^{-3} \text{ m}^2$	$6,93 \times 10^{-7} \text{ m}^3/\text{m}^3$

Die effektiven Phasengrenzflächen von suspendierten UFB werden nun mit der, durch Feinblasenbegasung bereitgestellten Grenzfläche (siehe in Abschnitt 3.2.2 Tabelle 7), verglichen.

Die UFB-Suspension generiert mit dem AMB3 besitzt mit $6,6 \times 10^{-3} \text{ m}^2$ eine, um den Faktor $10^7 - 10^5$ geringere Phasengrenzfläche, als bei Begasung mit Mikro-, Submilli- und Makroblasen (in Tabelle 7). Im Vergleich hierzu berichtet Ohgaki *et al.* von einer deutlich höheren, eingebrachten Oberfläche von $0,58 \text{ m}^2/\text{mL}$ (Ohgaki *et al.* 2010). Jedoch basiert dieser Wert (von Ohgaki *et al.*) auf einer, an eine Oberfläche gebundene, einzelne Feinblase mit $d = 50 \text{ nm}$. Der für die UFB-Suspension in Tabelle 10 berechnete Gasgehalt von $6,9 \times 10^{-7}$ ist im Vergleich mit einer Makroblasenbegasung mit $0,05 - 0,2$ (Guy *et al.* 1986) sehr gering. Für Ultrafeinblasen wird häufig eine Lagerstabilität von mehreren Wochen bis Monaten angegeben (Alheshibri *et al.* 2016; Duval *et al.* 2012; Tsuge 2014). Um die Stabilität der generierten UFB zu bestimmen, wurde die Blasenkonzentration und der Durchmesser über einen Zeitraum von 64 d gemessen (Abb. 34 A). Wie in Abb. 34 zu erkennen, war vor allem die Konzentrationsmessung großen Schwankungen von $\pm 0,45 \times 10^8 \text{ n/mL}$ unterworfen. Hierbei wiesen die individuellen Messungen einen Schwankungsbereich von $\pm 10\%$ auf. Auch die fünffache Bestimmung des mittleren Durchmessers unterlag großen Abweichungen. Es konnte eine Schwankung von $\pm 35\%$ des Messwertes innerhalb von fünf individuellen Messungen einer Probe festgestellt werden. Diese Abweichung weist auf eine inhomogene Verteilung der Ultrafeinblasen innerhalb der Probe hin. Die Abweichungen können durch das Design der Messzelle mit Totvolumenzonen, durch Verunreinigung mit Mikroblasen, durch Abrieb in Pumpe und Schläuchen, sowie durch Staubpartikel mit hoher Lichtstreuung in der Messung begründet sein. Um diese Fehler zu minimieren, könnten die Messungen unter Reinraumbedingungen wiederholt werden. Folglich wurde aus der Tendenz der in Abb. 34 gezeigten Daten angenommen, dass eine konstante Konzentration, sowie ein konstanter Blasendurchmesser über 64 d vorliegen.

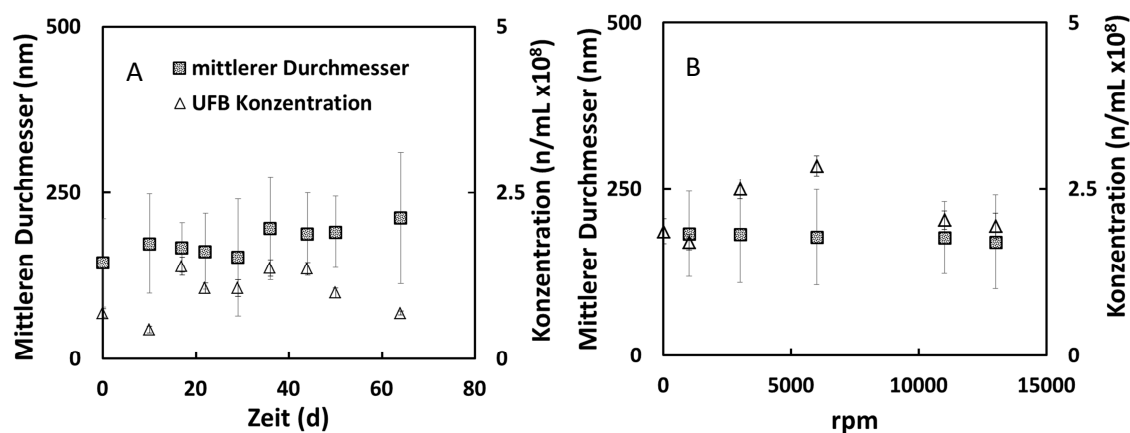


Abb. 34: Inkubation der UFB-Suspension und Einfluss der Zentrifugation (Reaktionsbedingungen: Messung mit NS300 NanoSight, $T = 39^\circ\text{C}$, $n = 5$, Kameraeinstellungen siehe Kapitel 2, Abschnitt 2.11)

Wird die gemessene Lebensdauer der Blasen von 64 d mit der berechneten Verweilzeit τ (basierend auf der Auftriebsgeschwindigkeit) von 3,59 d verglichen, so besteht eine große Abweichung. Dennoch ist dieses Messergebnis in guter Übereinstimmung mit vielen Literaturstellen, wo ähnliche Verweilzeiten von Tagen bis Wochen beschrieben sind (Alheshibri *et al.* 2016; Duval *et al.* 2012; Tsuge 2014). In der weiteren Untersuchung der UFB-Stabilität wurde eine klassische Trennoperation der Biotechnologie, die Abtrennung mittels Dichteunterschied durch Zentrifugation, untersucht. Hierbei führte die Variation der Umdrehungsgeschwindigkeit von $10 - 13 \times 10^3 \text{ rpm}$ zu keinen bis nur geringen Unterschieden des Blasendurchmessers (siehe Abb. 34 B). Anschließend wurden die Temperaturstabilität der generierten UFB-Suspension inklusive des Einfrierhaltens untersucht. Die

Ergebnisse sind in Abb. 35 A dargestellt. Durch Variation der Temperatur wird von einer möglichen Expansion des in der Blase befindlichen Gases ausgegangen. Es konnte keine Änderung des UFB-Durchmessers durch Erhöhung der Temperatur, wie in Johnson *et al.* beschrieben, festgestellt werden (Johnson and Cooke 1981) (Abb. 35 A). Folglich könnten die, in diesem Experiment gemessenen UFBs hypothetisch auch Nanopartikel sein, was in weiteren Studien untersucht werden sollte.

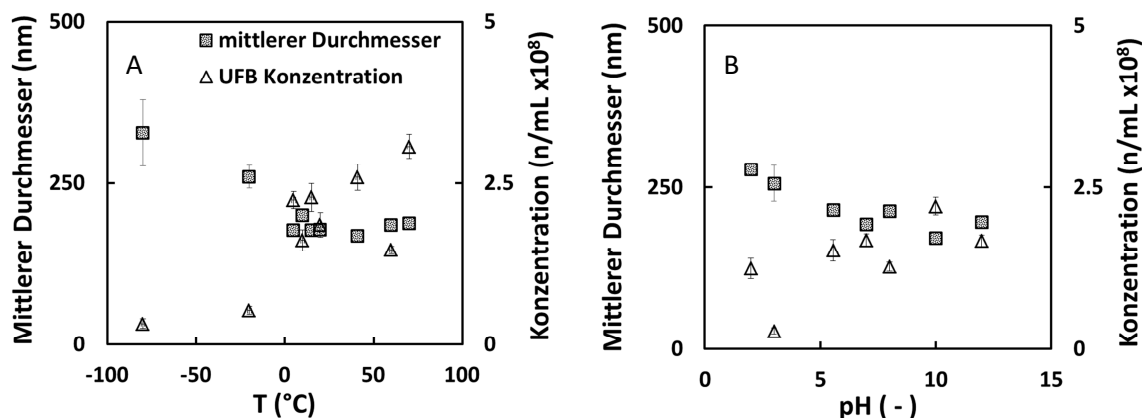


Abb. 35: Effekt der Variation von Temperatur und pH Wert auf die Stabilität einer UFB-Suspension (Reaktionsbedingungen: Messung mit NS300 NanoSight, T = 39°C, n = 5, Kameraeinstellungen siehe Kapitel 2, Abschnitt 2.11)

Durch Einfrieren der Probe konnte eine Vergrößerung des gemittelten Durchmessers und eine deutliche Reduktion der UFB-Konzentration siehe Abb. 35 festgestellt werden. Es ist anzunehmen, dass für diesen Effekt die Aggregation in Folge der Aufkonzentration von UFBs durch die voranschreitende Kristallisationsfront verantwortlich ist. Dadurch wurden die UFBs aus dem Medium ausgetragen, weshalb eine deutlich niedrigere Nanopartikelkonzentration, vergleichbar mit der des Leitungswassers, gemessen wurde. In weiteren Experimenten wurde durch Zugabe von NaOH oder HCL der pH-Wert variiert (Abb. 35 B). Dabei konnte eine geringe Vergrößerung der Blasengröße, sowie eine sinkende UFB-Konzentration unterhalb von pH = 6 beobachtet werden (siehe Abb. 35 B). Dieser Effekt könnte auf die Dissoziation von Wasser im alkalischen Milieu zu OH⁻ und im sauren Milieu zu H₃O⁺ zurückzuführen sein. Infolge der negativ geladenen Blasenoberfläche (Zeta-Potenzial), aggregieren die UFBs bei sauren pH-Werten vermehrt (Tsuge 2014; Ushikubo et al. 2010a). Dieser Effekt wird in der Literatur auch als Teil des Oberflächen Zeta-Potenzial UFB-Stabilisierungsmechanismus beschrieben (Millare and Basilia 2018; Ushikubo et al. 2010a; Zhu et al. 2016). Um nun die beschriebenen Effekte auf die Anwendbarkeit von UFBs in der Biokatayse zu prüfen, wurde mit einer UFB-Konzentration von $1,99 \times 10^8$ n/mL (Na-Acetatpuffer pH 5,3) in der GOx katalysierten Gluconolactonsynthese vorgelegt (siehe Abb. 36 A). Um einen direkten Vergleich zu den vorherigen Begasungsexperimenten zu ermöglichen, wurde mit Feinblasenbegasung (2 µm Sinterfritte) bei konstantem $k_L a = 160$ 1/h gearbeitet. Zusätzlich wurde im Photometer die Anfangsaktivität mit und ohne UFB gemessen (siehe Abb. 36 B). In beiden Versuchen konnte kein Effekt durch die Verwendung von UFB versetztem Puffer auf die Aktivität, sowie die Ausbeutekurve der Gluconolactonsynthese festgestellt werden, siehe Abb. 36.

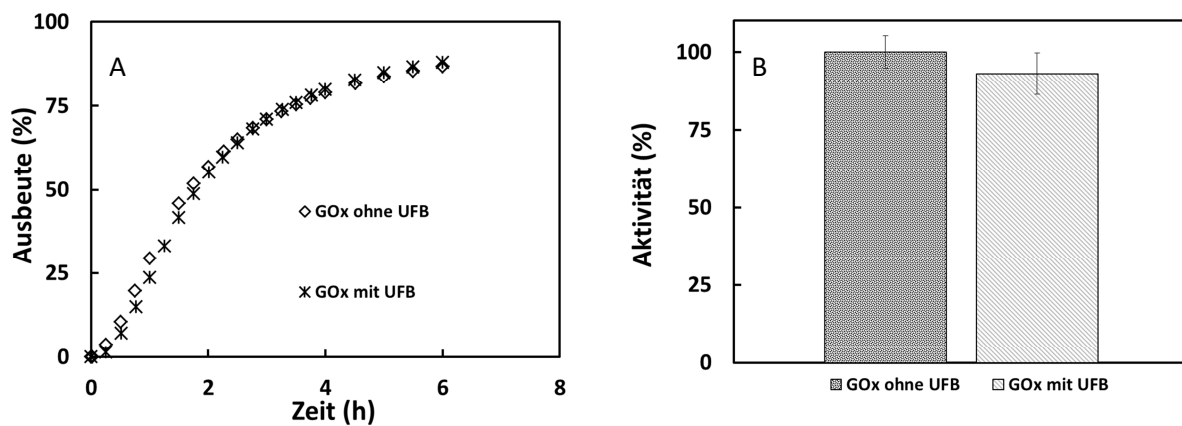


Abb. 36: Vergleich der Anwendung von suspendierten UFB in einer mit Feinblasen (Mikroblasen) begasten Gluconolactonsynthese (Reaktionsbedingungen: $T = 35^{\circ}\text{C}$, $V = 0,3\text{ L}$, $87,6\text{ mM D-Glucose}$, 11865 U GOx , 12320 U Katalase , $10\text{ mM Na-Acetatpuffer pH} = 5,3$, Schrägblattrührer 440 rpm , Titration mit 1 M NaOH in Wasser, $n = 1$)

Eine Erklärung für das Ausbleiben eines Effekts ist die zuvor beschriebene (siehe Tabelle 10) geringe zusätzlich bereitgestellte Oberfläche der Ultrafeinblasen von $6,6 \times 10^{-3}\text{ m}^2$ (in $0,3\text{ L}$). In der Folge überwiegt die durch Begasung ($2\text{ }\mu\text{m}$ Sinterfritte, $0,667\text{ vvm}$) eingebrachte, effektive Oberfläche um den Faktor 10^7 . Deshalb konnte auch bei konstantem $k_L a$ kein signifikanter Effekt durch Protein/Grenzflächen-Wechselwirkungen auf die Enzymaktivität in der Reaktion im STR (Rührkesselreaktor), sowie im Photometerassay festgestellt werden.

Eine weitere Möglichkeit, hohe Oberflächen von $0,58\text{ m}^2/\text{mL}$ bereitzustellen, wäre der Test mit kleineren Blasen und höheren UFB- Konzentrationen, wie diese in Ohgaki *et al.* beschrieben werden (Ohgaki et al. 2010). Auch der leicht saure pH-Wert von $5,3$ könnte, wie zuvor beschrieben, zu einer Aggregation der UFBs geführt haben. Weiter könnten auch ausschließlich Nanopartikel in der Lösung vorliegen, wodurch kein Effekt auf die Reaktion zu erwarten ist. Auch könnte mit dem zuvor in Abschnitt 3.2.2, Gleichung (37) eingeführten Zusammenhängen zwischen exponentiellem Anstieg des Young-Laplace Druck und der Stabilität von Ultrafeinblasen argumentiert werden (Epstein and Plesset 1950). Eine Grundlage für die Beschreibung der UFB-Stabilität ist die von Epstein und Plesset 1950 veröffentlichte Theorie zur Laplace-Druck basierten, thermodynamischen Stabilität von Gasblasen (Epstein and Plesset 1950). Hierbei ist eine Blase erst dann stabil (unveränderter Durchmesser), wenn sich ein Gleichgewicht zwischen dem umgebenen Medium und dem Gas innerhalb der Blase eingestellt hat. In der Theorie von Epstein und Plesset wird in der sogenannten „Laplace Pressure Bubble Catastrophe“ der thermodynamische Widerspruch zwischen dem exponentiellen Anstieg des Laplace-Drucks und des resultierenden Anstiegs des Konzentrationsgradienten zur Langzeitstabilität von UFBs beschrieben (Epstein and Plesset 1950). Dieser Widerspruch wird auch in dieser Arbeit deutlich. Der Unterschied zwischen den Young-Laplace Δp_{Blase} (kPa) der Mikro-, Submilli- und Makroblasenbegasung liegt um den Faktor 1000 höher (Δp_{Blase}) im Vergleich zu UFBs. Nach dieser Theorie wird auch bei Sättigung oder Übersättigung des, die Blase umgebenden Mediums, bei Ultrafeinblasen kein Gleichgewichtszustand erreicht. Daher wird die Blase vollständig eingelöst (Alheshibri et al. 2016). Für eine Feinblase von 1000 nm folgt, dass eine Messung von Ultrafeinblasen nach dieser Theorie unmöglich ist. Epstein *et al.* berichten eine Lebensdauer von $0,02\text{ s}$ (Alheshibri et al. 2016; Epstein and Plesset 1950). Diese Theorie kann auch

auf die Blasengrößen der Begaser in dieser Arbeit in Abschnitt 3.2.2 Tabelle 7 angewandt werden. Dabei wurde der Zeitraum berechnet, bis eine komplette Einlösezeit der Blase erfolgt ist, siehe Abb. 37. Folglich ergibt sich für die UFB aus Tabelle 10 eine Einlösezeit (Lebensdauer) von 0.00018 s, wie von Alheshibri *et al.* beschrieben. Somit besteht theoretisch keine Möglichkeit, diese UFBs mit einem Messsystem zu erfassen.

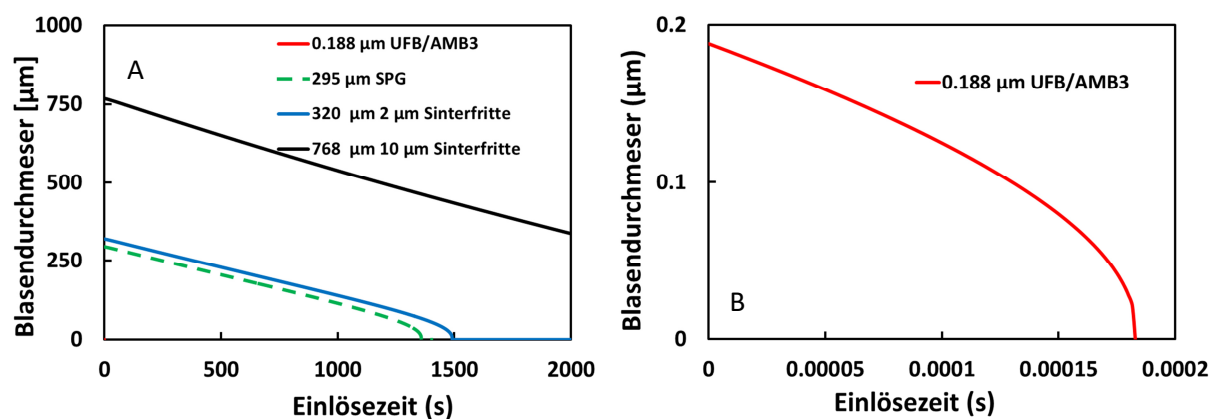


Abb. 37: Berechnung der Einlösezeit mittels des Laplace-Drucks nach Epstein und Plesset (Reaktionsbedingungen: Berechnung nach (Epstein and Plesset 1950) siehe Tabelle 7 und Tabelle 10)

Dennoch zeigen die experimentellen Ergebnisse, dass die Theorie von Epstein und Plesset möglicherweise keine gute Näherung für Blasen größer als ~ 500 nm und nur für Einzelblasen unter Vernachlässigung der Blasenauftriebsgeschwindigkeit darstellt. Die Lebensdauer von Mikroblasen kann nach Epstein und Plesset beschrieben werden. Makroblasen und Submilliblasen sind auf Grund ihrer hohen Auftriebsgeschwindigkeit wohl nicht mit der Theorie von Epstein und Plesset zu beschreiben.

Dennoch wird in einer Vielzahl von Veröffentlichungen von stabilen Ultrafeinblasen (Nanoblasen) mit einer Lebensdauer im Bereich von Wochen bis Monaten ausgegangen (Chen et al. 2020a; Di Wang et al. 2019; Duval et al. 2012; Johnson and Cooke 1981; Tsuge 2014). Besonders interessant ist der in der Literatur kritisch diskutierte und umstrittene Beweis durch Johnson *et al.*, welcher auf Basis der Volumenexpansion einer UFBs enthaltenen Probe feststellte, dass UFBs keine Nanopartikel sind (Johnson and Cooke 1981). Für Stabilisierungsmechanismen von Ultrafeinblasen, sind in der Literatur eine Vielzahl sich häufig gegenseitig widersprechender Publikationen zu finden. Die bekanntesten Mechanismen sind (Chen et al. 2020a):

- die Stabilisierung durch Kontamination z.B. Puffer, Protein etc.
- das Ausbilden einer Schutz/Grenzschicht aus Polymeren etc. (der sogenannte „Skin“ Mechanismus),
- die Oberflächenladung der Blase und enthaltene Ionen in der Grenzschicht (Oberflächen zeta-Potenzial Mechanismus)
- die Steigerung der Gasdichte durch Selbstkompression innerhalb der Gasblase („high density“ Mechanismus).

Dennoch konnten experimentell die Stabilität und Lebensdauer, sowie die Unterscheidung von Nanopartikeln und Ultrafeinblasen noch nicht abschließend geklärt werden. Wie auch in dieser

Arbeit kann kein eindeutiger Nachweis für die Existenz von Nanoblasen erbracht werden. Auch in den Experimenten zur Biokatalyse konnte kein Effekt festgestellt werden.

3.4 Untersuchung der Enzymstabilität im begasten Rührkessel

Die enorme Diversität der Biokatalysatoren bietet ein großes Potenzial für die Anwendung in Prozessen der Chemie- und Pharmaindustrie. Dennoch ist die Anwendung vieler Biokatalysatoren häufig durch ihre geringe Stabilität unter industriellen Prozessbedingungen limitiert.

Von besonderem Interesse für diese Arbeit sind enzymatische Oxidationsreaktionen, welche die kontinuierliche Zufuhr von molekularem Sauerstoff als Oxidationsmittel oder Elektronenakzeptor erfordern. Auf Grund der geringen Löslichkeit von Sauerstoff im wässrigen Milieu wird eine kontinuierliche Begasung mit Luft oder reinem Sauerstoff benötigt. Folglich sind hohe Stofftransportraten vom Gas zur Flüssigkeit erforderlich, um industriell relevante Produktivitäten zu erreichen (Bankar et al. 2009; Tufvesson et al. 2011; Woodley 2017). Begaste Rührkesselreaktoren sind, neben Blasensäulen, die am häufigsten eingesetzten Flüssig-Gasphasen Reaktoren. Durch kontinuierliches Rühren kann eine gute Durchmischung, sowie ein effektiver Stofftransport sichergestellt werden. Dieser wird gewährleistet durch die Erhöhung der Phasengrenzfläche, die effektive Dispersion des Gases und die längere Verweilzeit der Gasblasen.

In einer Vielzahl von Studien konnte gezeigt werden, dass eine Gas-Flüssigphasengrenzfläche zu einer erhöhten Enzymdeaktivierung durch Proteinentfaltung führt (Bhagia et al. 2018; Dias Gomes et al. 2019a; D'Imprima et al. 2019; Donaldson et al. 1980). Jedoch scheint die eingebrachte Phasengrenzfläche, einen entscheidenden Einfluss auf die Enzymstabilität zu haben (D'Imprima et al. 2019). Schon in früheren Publikationen, wie bei Donaldson *et al.*, wird dieses Verhalten am Beispiel der sauren Phosphatasen beschrieben (Donaldson et al. 1980). Colombie *et al.* erwähnen einen Stabilitätsverlust von Lysozyme durch Begasung mit Luft sowie Stickstoff (Colombié et al. 2001). Patil *et al.* und Mohanty *et al.* berichten über ähnliche Effekte auf die Enzymstabilität einer Lipase in Gegenwart einer Gasphase (Mohanty et al. 2001; Patil et al. 2000). Weiter konnte von Findrik *et al.* beobachtet werden, dass mit steigender Begasungsrate im STR, die Stabilität einer D-Aminosäure Oxidase abnimmt (Findrik et al. 2014). Bhagia *et al.* berichten, dass bei geringen Enzymkonzentrationen die Deaktivierung einer Cellulase hauptsächlich an der Phasengrenzfläche zwischen Flüssig- und Gasphase stattfindet (Bhagia et al. 2018). Vergleichbare Ergebnisse zeigen auch die Studien von Bommarius und Karus sowie D'Imprima für FDH und Cellulase (Bhagia et al. 2018; Bommarius and Karau 2005; D'Imprima et al. 2019). Die Deaktivierung ist nicht bei allen Enzymen gleich stark ausgeprägt. Zum Beispiel berichten Toftgaard Pedersen *et al.*, dass im mit Luft begasten Rührkessel keine Deaktivierung einer Galaktose Oxidase festgestellt werden konnte (Toftgaard Pedersen et al. 2015). Die komplexen Wechselwirkungen zwischen Protein und Phasengrenzfläche sind noch nicht ausreichend verstanden. Neurath *et al.* sowie Prins *et al.* beschreiben die Affinität von Proteinen zur Phasengrenzfläche als Funktion der Ladung der endständigen funktionellen Gruppen (Neurath and Bull 1938; Prins and van't Riet 1987).

Zusätzlich zu den rein physikalischen Effekten, welche auf den Stofftransport Einfluss nehmen, ist die Stabilität von Enzymen, wie die in Kapitel 3.1 beschriebene Lagerstabilität, von Bedeutung. Die Untersuchung der Enzymstabilität unter Prozess- oder prozessnahen Bedingungen für die Enzymkatalase ist entscheidend für die erfolgreiche Etablierung biokatalysierter Reaktionen in der

Industrie. Die Untersuchung der Stabilität von Enzymen in begasten Systemen ist von großer Wichtigkeit. Dabei werden die Auswirkungen der eingebrachten Grenzfläche, der Sauerstoffkonzentration und der Scherkräfte diskutiert und experimentell betrachtet. Proteine wie z.B. Enzyme sind auf Grund ihrer amphiphilen Natur als grenzflächensensitive Moleküle beschrieben worden (Maa and Hsu 1997). Daher bedarf es der Untersuchung, wie Proteine mit einer Phasengrenzfläche interagieren und welche Einflussfaktoren zu einer Deaktivierung des Enzyms beitragen.

Um ein tieferes Verständnis der zugrunde liegenden Effekte von Prozessen in der Biokatalyse zu ermöglichen, stehen die Untersuchung der Enzymstabilität, die Diskussion der Effekte zwischen Protein und Phasengrenzfläche, sowie die mögliche Oxidation des Proteins im Fokus dieses Kapitels. In Abschnitt 3.2.2 Tabelle 7 konnte festgestellt werden, dass die effektiv eingebrachte Phasengrenzfläche a_{effektiv} bei konstantem $k_L a$ von 160 1/h mit einer Verringerung der Blasengrößen in den Feinblasenbereich ansteigt. Daher ist die Untersuchung und Diskussion, der komplexen Interaktion des Enzyms mit der Phasengrenzfläche, von großer Wichtigkeit, um ein tieferes Verständnis der Enzymstabilität in begasten Reaktoren zu erlangen. Im Gegensatz zu den lokalen Effekten, wurde in diesem Kapitel die globale Änderung der relativen Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Begasung experimentell untersucht.

3.4.1 Untersuchung der Enzymstabilität bei Makro- und Feinblasenbegasung

Neben dem Stofftransport des Begasers ist die Enzymstabilität (Halbwertszeit, $t_{1/2}$) von entscheidender Bedeutung, um hohe Reaktionsgeschwindigkeiten in enzymatisch katalysierten Reaktionen aufrecht zu erhalten (Lindeque and Woodley 2020; Toftgaard Pedersen et al. 2017; Woodley 2017). Häufig wird die Lager- und Temperaturstabilität eines Enzyms als Grundlage für die Optimierung und Auslegung von biokatalytischen Reaktionen im begasten STR (Rührkesselreaktor) zugrunde gelegt, jedoch weicht die Lagerstabilität von der Prozessstabilität des Enzyms häufig stark ab (Dias Gomes et al. 2019a). Bevor nun weitere Versuche zur Anwendung von Fein-, Submilli- und Makroblasenbegasung angestrebt werden, ist die Enzymstabilität im begasten Rührkesselreaktor (STR) in Abhängigkeit des $k_L a$ und der resultierenden begaserspezifischen Blasengröße zu ermitteln. Es ist zu klären, ob und wie stark die Stabilität des Enzyms von den Wechselwirkungen wie Adsorption/Desorption von der eingebrachten Grenzfläche abhängt (Graham and Phillips 1979b, 1980). Weiterhin ist zu diskutieren, ob die Deaktivierung des Enzyms durch die eingebrachten Scherkräfte im STR beeinflusst wird. Die Scherkräfte können durch Rühren, Koaleszenz, Blasenauflösen sowie Schaumbildung auftreten. Zusätzlich zu den genannten Faktoren kann das Enzym, in Gegenwart von gelöstem Sauerstoff, theoretisch oxidiert werden, was zu einem erhöhten Aktivitätsverlust führen kann (Dias Gomes et al. 2019a; Maa and Hsu 1997).

Im Fokus dieses Abschnittes steht der direkte Vergleich von Feinblasen und Makroblasen auf Grundlage der Enzymstabilität. Bedingt durch die großen Unterschiede zwischen Fein- und Makroblasen hinsichtlich der Blasengröße, Verweilzeit und Begasungsrate bei konstantem $k_L a$, wurde vorerst nur eine Einstellung des Begasers bei 160 1/h zum Vergleich der Enzyme untersucht.

Zur Prüfung des Einflusses von Feinblasen auf die Stabilität wurden die sauerstoffabhängigen Enzyme GOx, NOX34, Tyrosinase und BM3 Cytochrom P450, sowie die nicht sauerstoffabhängigen Enzyme ADH97L und GDH im begasten STR bei konstantem Leistungseintrag von 0,17 W/L und einem

konstanten $k_L a$ von 160 1/h untersucht. Es erfolgte der Vergleich von Feinblasenbegasung mit 2 μm Sinterfritte zur Makroblasenbegasung mit dem 5 mm offenen Rohr. In Abb. 38 sind für die Oxidasen GOx, NOX34 und Tyrosinase Aktivitätsmessungen für Feinblasen und Makroblasenbegasung dargestellt.

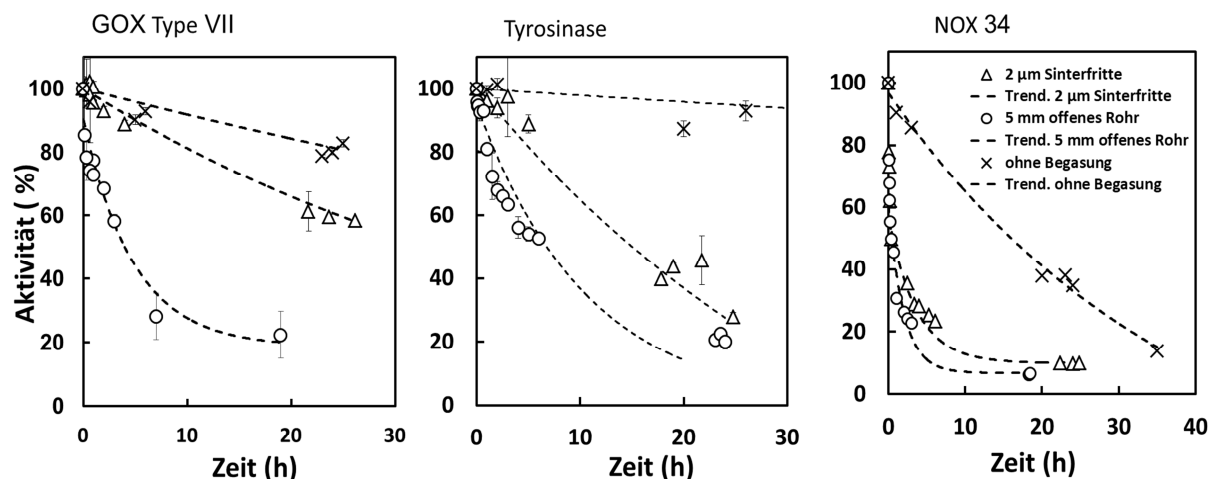


Abb. 38: Enzymstabilität der GOx, NOX34 und Tyrosinase bei Fein- und Makroblasenbegasung (Inkubationsbedingungen GOx: $T = 35^{\circ}\text{C}$, 83,3 mg/L GOx (~ 12000 U), 0,02 mg/mL Katalase (~ 12000 U), 10 mM Na-Acetatpuffer $\text{pH} = 5,3$, 430 rpm, Tyrosinase: $T = 15^{\circ}\text{C}$, 33,3 mg/L TYR (83000 U) 50 mM KPi , $\text{pH} = 7$, 430 rpm, NADH-Oxidase: 50 mg/L NOX34 (183 U) $T = 20^{\circ}\text{C}$, 10 mM Tris-HCL Puffer, 2 mM MgCl , $\text{pH} = 8$ 430 rpm)

Die qualitative Interpretation der in Abb. 38 gezeigten Daten ergibt, dass Inkubation unter der Begasung mit Feinblasenbegasung (2 μm Sinterfritte) zu einer höheren Enzymstabilität im Vergleich zur Makroblasenbegasung führt. Der Unterschied zwischen Makro- und Feinblasenbegasung für die GOx ist mit einer 16-fach höheren Halbwertszeit am deutlichsten ausgeprägt. Diese Daten bestätigen die in der Literatur genannte Hypothese, dass die Gasphase zu einer Deaktivierung der Oxidasen führt (Bhagia et al. 2018; Bommarius and Karau 2005; Dias Gomes et al. 2019a; D'Imprima et al. 2019). Diese Aussage kann durch die hohen Stabilitätsverluste im Gegensatz zu den Stabilitäten ohne Begasung in Tabelle 11 demonstriert werden. Die Halbwertszeit $t_{1/2}$ (h) und die Deaktivierungskonstante k_{des} (h^{-1}) der Stabilitätsmessung sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Tabelle 11: GOx, NOX34 und Tyrosinase Stabilität im begasteten STR (Reaktionsbedingungen siehe Abb. 39)

$k_L a = 160$ 1/h	Rate (vvm)	GOx Type VII ($T = 35^{\circ}\text{C}$)		NOX34 ($T 30^{\circ}\text{C}$)		Tyrosinase (15°C)	
		$t_{1/2}$ (h)	k_{des} (1/h)	$t_{1/2}$ (h)	k_{des} (1/h)	$t_{1/2}$ (h)	k_{des} (1/h)
Sinterfritte	0,67	33,4 \pm 0,5	0,02 \pm 0,0003	1,17 \pm 0,1	0,59 \pm 0,07	15 \pm 0,5	0,046 \pm 0,001
Offenes Rohr	16,67	2,1 \pm 0,3	0,32 \pm 0,042	0,73 \pm 0,2	0,94 \pm 0,28	7,3 \pm 0,8	0,046 \pm 0,001
Ohne Begasung	0	81,1 \pm 16,1	0,008 \pm 0,001	14,7 \pm 0,7	0,047 \pm 0,002	325,8 \pm 30,5	0,002 \pm 0,0002

Wie in Abb. 38 ersichtlich, führt die Begasung zu einer hohen Deaktivierung von NOX und TYR. In der Literatur wird beschrieben, dass NOX-Enzyme in Gegenwart einer Gasphase, sowie durch Oxidation mit Sauerstoff schnell deaktivieren (Dias Gomes et al. 2019a; Dias Gomes et al. 2019b). Dieser Effekt wird auch für die NOX34 in Tabelle 11 beobachtet. Für die Begasung mit Feinblasen im Vergleich zum

unbegasteten Fall wird ein Stabilitätsverlust mit GOx von 58,8%, NOX von 92%, und Tyrosinase von 95,3% gemessen. Werden die Halbwertszeiten der Fein- und Makroblasenbegasung verglichen, so ergibt sich eine signifikante Erhöhung der Stabilität um das 16-fache mit GOx und um das 1,6-fache mit NOX34 und um das 2-fache mit TYR durch Anwendung einer Feinblasenbegasung. Dias Gomes *et al.*, berichten von einem geringeren Stabilitätsverlust auf ~46%, einer vergleichbaren NOX34 im begasteten System (Dias Gomes *et al.* 2019a). Ein Grund für diese Abweichung kann der Unterschied im Mischverhalten des in Dias Gomes *et al.* verwendeten Magnetührers liegen. Dadurch resultieren unterschiedliche Verweilzeiten der Blasen. In den Experimenten dieses Kapitels wird ein Schrägblattrührer verwendet. Um eine Überlagerung der in Abschnitt 3.1.2 beschriebenen hohen Deaktivierung durch die geringe Temperaturstabilität der Tyrosinase zu vermeiden, wurde eine niedrigere Inkubationstemperatur von 15°C gewählt. Ein signifikanter Effekt der Begasung auf die Enzymstabilität der zuvor beschriebenen Oxidasen, wurde festgestellt. Es folgte die Untersuchung der nicht-Sauerstoff abhängigen Enzyme ADH97L und GDH 105 nach gleicher Vorgehensweise als Kontrollexperiment. Zusätzlich wurde die Stabilität einer BM3 Cytochrom P450 WT Monooxygenases (3.1.4.1) im begasteten Rührkessel untersucht. Die Cytochrom P450 ist für ihre geringe Aktivität und geringe Stabilität bekannt (Eiben *et al.* 2006). Wie in Abb. 39 dargestellt, wird auch für die ADH97L, GDH 105 und die Cytochrom P450 ein deutlicher Stabilitätsverlust, bedingt durch die Begasung, festgestellt. Auf Grund der experimentellen Daten für die GDH 105 und Cytochrom P450 kommt es zu einer negativen Anpassung (Fit) der Daten. Es resultieren für die GDH 105 und Cytochrom P450 kürzere Halbwertszeiten, welche das qualitative Ergebnis nicht verändern. Durch weitere Experimente und Wiederholung der Stabilitätsmessungen kann eine genauere Anpassung und Bestimmung der Halbwertszeiten erreicht werden.

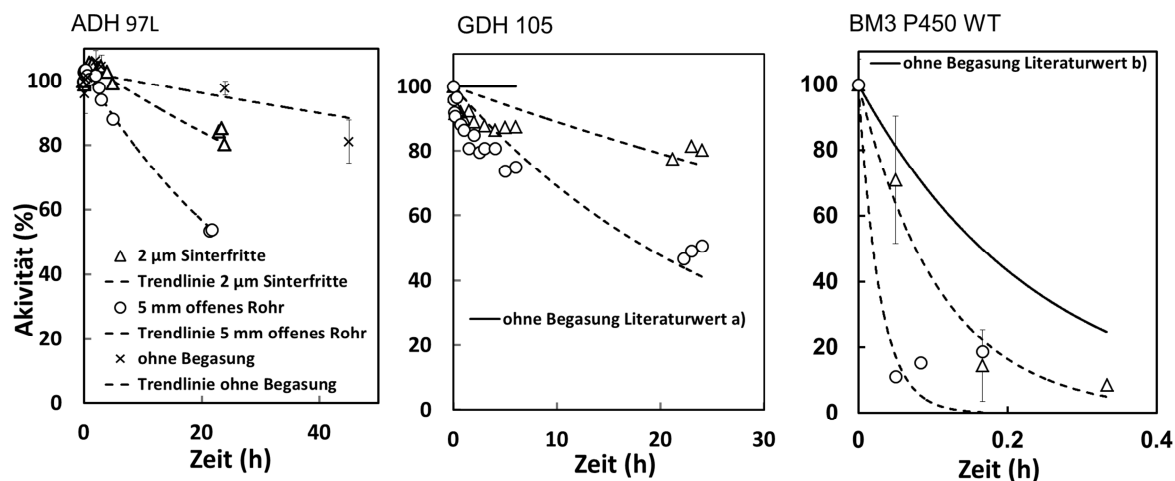


Abb. 39: Enzymstabilität der ADH97L, GDH 105 und BM3 Cytochrom P450 bei Fein- und Makroblasenbegasung (Inkubationsbedingungen $V = 0,3$ L, Schrägblattrührer, ADH: $T = 20^\circ\text{C}$, $0,03$ mg/mL ADH, 10 mM Tris-HCl Puffer, 2 mM MgCl, $\text{pH} = 8$, 430 rpm, Glucosedehydrogenase: $T = 20^\circ\text{C}$, $33,3$ mg/L GDH 105 (500 U), 50 mM KPi $\text{pH} = 8$, Kurve a) berechnet mit (Lapenaite *et al.* 2003), Cytochrom P450 Monooxygenase: $T = 15^\circ\text{C}$, 200 mg/L BM3 Cytochrom P450 WT (156 U), 50 mM KPi $\text{pH} = 8$, Kurve b) berechnet mit (Eiben *et al.* 2007))

Aus der Inkubation der ADH97L resultierte ein Stabilitätsverlust von 16,6% bei Feinblasen- und 74,1% bei Makroblasenbegasung in Relation zum nicht begasteten System (Tabelle 12). Für die GDH 105 und Cytochrom P450 liegen keine Stabilitätsdaten ohne Begasung vor, weshalb hier Literaturdaten zum

Vergleich herangezogen wurden. Für die GDH 105 wurde die Lagerstabilität einer vergleichbar stabilen GDH aus *Bacillus* angenommen, welche über einen Zeitraum von 6 h keinen Aktivitätsverlust bei Temperaturen bis zu 40°C aufweist (Pongtharangkul et al. 2015; Sugii et al. 2014). Im Vergleich von Fein- mit Makroblasenbegasung der GDH 105 weist die Feinblasenbegasung eine um den Faktor 3 höhere Stabilität auf (Tabelle 12). Eiben *et al.* geben die Stabilität einer BM3 Cytochrom P450 WT ohne Begasung mit einer Halbwertszeit von 8 - 10 min bei 20°C in KP_iPuffer an (aufgereinigtes Enzym) (Eiben et al. 2006; Eiben et al. 2007). Folglich kann ein Aktivitätsverlust von 57,8% mit Feinblasen und 89,1% mit Makroblasenbegasung in Bezug auf die unbegaste Cytochrom P450 festgestellt werden. Im Gegensatz zu Eiben *et al.* wurde in diesem Experiment mit Cytochrom P450 als Teil des zellfreien Extraktes gearbeitet und folglich mit einer sehr hohen Proteinkonzentration von 12,72 mg/mL. Ebenso ist zu beachten, dass nur während der Inkubation von Cytochrom P450 im begasten STR eine starke Schaumbildung beobachtet werden konnte. Dieses kann zur Verfälschung der Ergebnisse führen durch den Austrag von im Schaum befindlichen Enzym, und erhöhter Enzyminaktivierung.

Tabelle 12: ADH97L, GDH 105 und BM3 Cytochrom P450 Stabilität im begasten STR ^{b)} (Eiben et al. 2006; Eiben et al. 2007) ^{a)} (Pongtharangkul et al. 2015; Sugii et al. 2014)(Inkubationsbedingungen: siehe Abb. 39)

$k_L a = 160 \text{ 1/h}$	Begasungsrate	ADH 97L (T = 30°C)		GDH 105 (T 20°C)		BM3 Cytochrom P450 WT (15°C)	
		$t_{1/2}$ (h)	k_{des} (1/h)	$t_{1/2}$ (h)	k_{des} (1/h)	$t_{1/2}$ (h)	k_{des} (1/h)
	(vvm)						
Sinterfritte	0,67	78,6 ± 7,2	0,008 ± 0,0008	59 ± 10,3	0,01 ± 0,002	0,07 ± 0,003	9,9 ± 0,4
Offenes Rohr	16,67	24,3 ± 1,1	0,031 ± 0,003	18,7 ± 2,2	0,037 ± 0,004	0,018 ± 0,006	38,5 ± 12,8
Ohne Begasung	0	94,3 ± 24,5	0,007 ± 0,002	^{a)} 100% bei 20°C für 6 h	Keine Daten	^{b)} 0,133*	^{b)} 5,21*

Im Vergleich der Stabilitätsuntersuchungen im begasten STR konnte bei allen Enzymen eine signifikante Erhöhung der Halbwertszeit mit Feinblasen im Vergleich zur Makroblasenbegasung bestimmt werden. Die in der Literatur beschriebene Sensitivität von Enzymen in Gegenwart einer Gasphase konnte mit den Stabilitätsuntersuchen dieses Kapitels bestätigt werden (Bhagia et al. 2018; D'Imprima et al. 2019; Maa and Hsu 1997).

Die zuvor genannten Eigenschaften (Abschnitt 3.2.2, Tabelle 7) der Feinblasenbegasung bezüglich der eingebrachten Gasphasengrenze (\dot{a}_{Air}), der Verweilzeit τ und der effektiven Phasengrenze, scheinen einen positiven Einfluss auf die Enzymstabilität zu haben. Aus Abschnitt 3.2.2, Tabelle 7 ist ersichtlich, dass bei konstantem $k_L a$ von 160 1/h für die 2 μm Sinterfritte (Feinblasen) ein 15-fach geringerer Gasverbrauch (vvm) als bei der Begasung mit dem 5 mm offenen Rohr (Makroblasen) zu beobachten ist. Im direkten Vergleich ist die Verweilzeit der Feinblasen um den Faktor 243 größer als die der Makroblasenbegasung (Tabelle 7). Daher ist auch die Wahrscheinlichkeit der Deaktivierung des Enzyms durch Interaktion wie z.B. Adsorption/Desorption an der Phasengrenze erhöht (D'Imprima et al. 2019). In Bezug auf die Makroblasenbegasung wird für einen $k_L a$ von 160 1/h mit einer Feinblasenbegasung lediglich 68% der Gasphasengrenze (\dot{a}_{Air}) benötigt. In der Folge bietet die

eingebraachte Grenzfläche der Feinblasenbegasung pro min weniger Adsorptionsplätze als die der Makroblasenbegasung.

Werden die effektiven Grenzflächen verglichen (Produkt aus \dot{a}_{Air} und τ) so wird deutlich, dass die Feinblasen eine um den Faktor 166 größere effektive Phasengrenzfläche als Makroblasen bereitstellen. Donaldson *et al.* beschreiben, dass bei der mit Protein gesättigten Grenzfläche nicht die effektiv vorhandene Grenzfläche, sondern die durch Schereintrag, Koaleszenz, Aufplatzen der Blasen sowie Rühren erzeugte Grenzflächenerneuerung, einen entscheidenden Einfluss auf die Deaktivierung haben kann (Donaldson *et al.* 1980; Maa and Hsu 1997; Suñol and González-Cinca 2010). Auch Dias Gomes *et al.*, berichten von erhöhter Deaktivierung durch die rührerinduzierte Dispersion von Blasen und damit der Vergrößerung der Grenzfläche.

Unter Berücksichtigung dessen, ist eine mögliche Erklärung für den Unterschied der Enzymstabilität zwischen Fein- und Makroblasenbegasung bei 160 1/h in der längeren Verweilzeit von Feinblasen zu finden. Das bereits adsorbierte Enzym verringert eine weitere Adsorption an die Grenzfläche und reduziert die Deaktivierung (Donaldson *et al.* 1980). Zusätzlich ist der Gasverbrauch bei Makroblasenbegasung (16,67 vvm) im Vergleich zur Feinblasenbegasung (0,67 vvm) 25-mal höher. Weiter resultiert eine deutlich höhere Frequenz bei der Phasengrenzflächenerneuerung durch Aufplatzen von Blasen und somit eine schnellere Deaktivierung bei Makroblasenbegasung. Dabei ist die Phasengrenzflächenerneuerung, die durch äußere Einflüsse wie z.B. Scherkräfte oder Aufplatzen der Blasen aber auch durch den Gasstrom erzeugte Oberfläche, welche im System vorliegt zu verstehen.

Dennoch ist der komplexe Mechanismus, welcher die Deaktivierung im begasten STR verursacht, noch nicht vollständig verstanden. Die Annahme der Lagerstabilität ohne Begasung führt für die Berechnung und Auslegung eines begasten STR daher häufig zur Unterschätzung der benötigten Enzymmenge oder zu einer längeren Reaktionszeit, um einen bestimmten Umsatz zu erzielen. Weiter ist zu beachten, dass die hohen Begasungsraten des 5 mm offenen Rohres nicht in den industriellen Maßstab überführt werden können, da dort Begasungsraten von maximal $\sim 2 - 3$ vvm und deutlich höhere $k_L a$ Werte von bis zu 114 - 1200 1/h Anwendung finden (Nauha *et al.* 2015; Woodley 2019).

3.4.2 Variation der Begasungsrate und Enzymstabilität am Beispiel der Glucoseoxidase

Ziel dieses Abschnittes ist es, die Enzymstabilität am Beispiel der GOx über den gesamten Arbeitsbereich (vvm und $k_L a$) eines Feinblasen-, Submilliblasen-, und Makroblasenbegasers zu untersuchen. Basierend auf der $k_L a$ Untersuchung in Abschnitt 3.2.1, wurde für verschiedene Begasungsraten und dem hierzu korrespondierenden $k_L a$ Wert die Enzymstabilität bestimmt. In Abschnitt 3.4.1 zeigte die Oxidase GOx mit einer Stabilitätserhöhung um den Faktor 16 im Vergleich von Fein- und Makroblasenbegasung den größten Stabilitätsgewinn der untersuchten Enzyme, sowie eine hohe enzymmengenspezifische Sauerstoffverbrauchsrate von 237,3 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (siehe Abschnitt 3.1.5). Aus den genannten Gründen wurde die GOx als Modellsystem für die Untersuchung der Enzymstabilität unter Feinblasenbegasung in diesem Abschnitt ausgewählt. Die Messergebnisse der GOx-Stabilität bei Variation des $k_L a$ der Feinblasen-, Submilliblasen- und Makroblasenbegaser sind in Abb. 40 aufgetragen. Wie in Abb. 40 dargestellt, ist die Stabilität der GOx abhängig von der

Blasengröße. Werden Fein-, Submilli- und Makroblasenbegasung verglichen, wird deutlich, dass die Begasung im zugrunde liegenden System mit feinen Blasen (2 μm Sinterfritte) über den gesamten untersuchten $k_L a$ Arbeitsbereich zu einer Erhöhung der Enzymstabilität führt. Hierbei ist der Mechanismus der Blasenbildung am porösen Material (2 μm und 10 μm Sinterfritte) und der Einzelöffnung (5 mm offenes Rohr) von entscheidender Bedeutung für die resultierende Blasengröße, wie im Detail in Abschnitt 3.2.2 beschrieben.

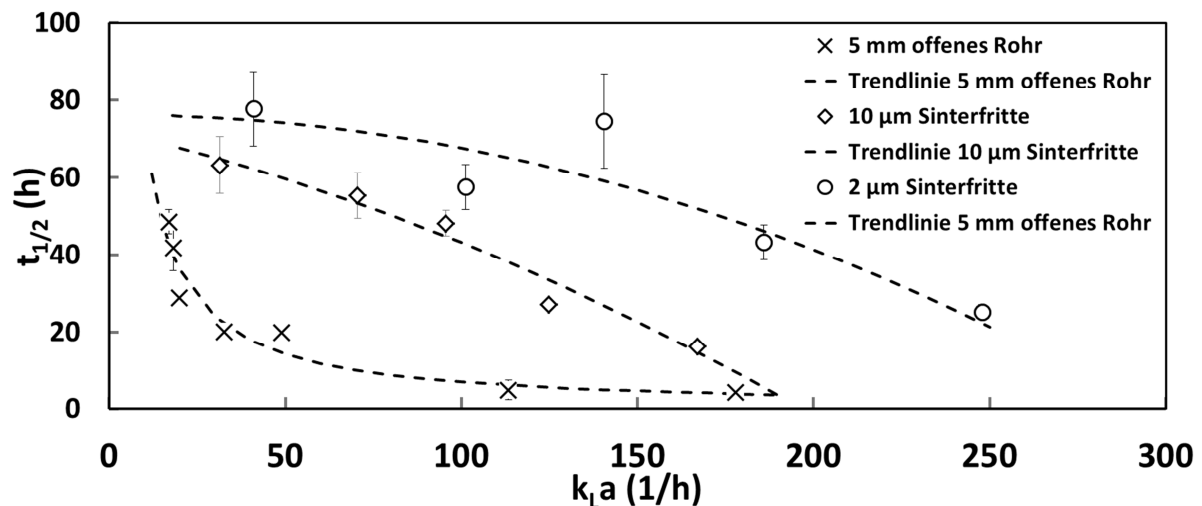


Abb. 40: Untersuchung der Enzymstabilität einer Glucoseoxidase bei Variation der eingestellten Stofftransportleistung $k_L a$ (respektive Begasungsrate) (Inkubationsbedingungen: $V = 300$ mL, Schrägblattrührer, $T = 35^\circ\text{C}$, $83,3$ mg/L GOx ($37,5$ U/mL), $0,02$ mg/mL Katalase (40 U/mL), 10 mM Na-Acetatpuffer pH = $5,3$, Reaktionsbedingungen zur Bestimmung der $k_L a$ -Werte siehe Abb. 27)

Bei der Makroblasenbegasung ist in Abb. 40 ersichtlich, dass schon bei geringen $k_L a$ -Werten (geringe Begasungsraten) die generierte Blasengröße eine sehr kurze Verweilzeit hat. Durch die geringe Verweilzeit resultiert auf der einen Seite ein geringerer Stofftransport, auf der anderen Seite eine erhöhte Frequenz der Phasengrenzflächenerneuerung im Vergleich zur Begasung mit Submilli- oder Feinblasen. Auch Ma und Hus beschreiben die Proteindenaturierung einer rhDNase als Funktion der Phasengrenzflächenerneuerung (Maa and Hsu 1997). Wird bei der Makroblasenbegasung die Begasungsrate, respektive auch der $k_L a$ Wert erhöht, so kann schnell der kritische Grenzwert von $We \gg 2$ und $We^2/Fr > 675$ (Sekundärblasenbildung) überschritten werden (Mersmann 1977). Daraus folgt, dass der resultierende Sauterdurchmesser nach der Korrelation von Mersmann für die Makroblasenbegasung konstant ist. Die eingebrachte Phasengrenzfläche kann dann nur noch durch eine deutliche Erhöhung der Begasungsrate gesteigert werden (Mersmann 1977). Deshalb nimmt die Halbwertszeit der GOx, wie in Abb. 40 dargestellt, bei Makroblasenbegasung schnell ab.

Im Vergleich hierzu stellt der Einsatz einer Submilliblasenbegasung eine deutliche Erhöhung der Enzymstabilität dar (Abb. 40). Jedoch weist die Stabilitätsmessung ab einem $k_L a > 100$ 1/h eine deutliche Verringerung der gemessenen Halbwertszeit bei steigendem $k_L a$ Wert auf. Dieser Umstand kann durch die Kapazitätsgrenze der 10 μm Poren des Begasermaterials verursacht sein. Ein solches Verhalten wurde bereits in Abschnitt 3.2.1 durch das Abflachen der $k_L a$ Kurve ab Begasungsraten von ca. ~ 1 vvm beobachtet. Das entspricht für die Begasung mit der 10 μm Sinterfritte einem $k_L a$ von ~ 100 1/h.

Auch die 2 μm Sinterfritte weist ein ähnliches Verhalten auf, was auf eine dominierende Sekundärblasenbildung ab einer Begasungsrate von ca. 1 vvm beim Einsatz von porösem Material schließen lässt. Hierbei kann es ab einem $We \gg 6$ zur Sekundärblasenbildung über den Begaser, sowie zur Bildung von Blasen über mehrere Poren kommen. Dadurch steigt die generierte Blasengröße an, bis wieder ein konstanter Sauterdurchmesser erreicht wird (Kazakis et al. 2008a, 2008b; Rübiger et al. 2013). Dieser Effekt kann einen deutlichen Einfluss auf die Verweilzeit der Gasblasen haben, sowie durch sinkenden Young-Laplace Druck zu einem geringeren Konzentrationsgefälle führen (Epstein and Plesset 1950; Iwakiri et al. 2017; Terasaka, K. Hirabayashi, Ai et al. 2011). So verringern sich bei der Erhöhung des $k_L a$ die effektive Phasengrenzfläche und die Verweilzeit der Gasblase. Es resultiert eine verminderte Stabilität durch Erhöhung der Phasengrenzflächenerneuerung. Eine mögliche Begründung dafür ist, dass die Stabilität wegen der auftretenden Sekundärblasenbildung sinkt. Bei hohen Begasungsraten ab ~ 1 vvm und hohen $k_L a \sim 180$ 1/h steigt die Grenzflächenerneuerung an (Abb. 40). Im Gegensatz dazu treten bei $k_L a \leq 180$ 1/h und $\text{vvm} \leq 1$ vvm verminderte Sekundärblasenbildung und geringere Frequenz der Phasengrenzflächenerneuerung (durch z.B. Aufplatzen von Blasen) auf, weshalb hier ein geringerer Stabilitätsverlust resultiert (siehe Abschnitt 1.1.2.1. und 3.2.1).

Feinblasen besitzen hohe Young-Laplace Drücke. (Abschnitt 3.2.2, Tabelle 7) (Alheshibri et al. 2016; Epstein and Plesset 1950). Sie können sich durch Selbstkompression und *Shrinking* mit hohen Raten in die umgebende Phase einlösen (Iwakiri et al. 2017; Khuntia et al. 2012; Matthes et al. 2020). Dieser Effekt in Kombination mit hohen Verweilzeiten, geringer Begasungsrate und hoher effektiver Oberfläche, führt zur Realisierung von hohen Stofftransportraten bei gleichzeitig geringer Phasengrenzflächenerneuerung. Auf Grund der geringen Phasengrenzflächenerneuerung kann mit einer Feinblasenbegasung eine höhere Enzymstabilität bei gleicher Stofftransportleistung im Vergleich zu Submilli- und Makroblasen erreicht werden (wie in Abb. 40). Systembedingt wird der $k_L a$ nur durch die maximale Begasungsrate begrenzt, wie auch durch die Schaumbildung (Montero et al. 1993). Hierbei kann Schaumbildung zum Austrag von Enzym von der Bulkphase in den Schaum führen (Dias Gomes et al. 2019a; Montero et al. 1993). In der Folge wird die Enzymkonzentration in der Bulkphase reduziert. Die Reduktion der Enzymmenge in der Bulkphase führt zur Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit. Zusätzlich wird das im Schaum befindliche Enzym vermehrt deaktiviert werden (Dias Gomes et al. 2019a; Montero et al. 1993). Deshalb nimmt auch die Aktivität des Enzyms im gesamten Reaktor ab.

Für die Begaser ist der Einsatz von hohen $k_L a$, respektive auch hohen Begasungsraten immer auch eine Abwägung zwischen Erhöhung des Stofftransports und Verringerung der Enzymstabilität. Eine Fehlerquelle ist die einfache Bestimmung $n = 1$ (Experimente) und $n = 3$ (Photometermessungen) der Enzymstabilitäten, wodurch es bei einzelnen Experimenten zu Abweichungen kommen kann. Der qualitative Effekt der gesteigerten Enzymstabilität durch Feinblasenbegasung ist bei allen untersuchten Enzymen im Experiment nachweisbar ($n = 6$, in Abschnitt 3.4.1).

3.4.3 Enzymdeaktivierung durch Oxidation und Scherkräfte

Der begaste Rührkesselreaktor (STR) ist neben der Blasensäule der am weitesten verbreitete Reaktortyp für Reaktionen mit Gas-/Flüssigkeitskontakt. Der STR bietet eine effektive Möglichkeit, große Stofftransportraten durch einen hohen Grad an Durchmischung und Dispersion der Gasphase

sicherzustellen. Ziel dieses Abschnitts ist die Untersuchung und Diskussion des Einflusses der Oxidation durch gelösten Sauerstoff, sowie die Wirkung von Scherkräften durch Koaleszenz, Blasenauflaufen und Rühren auf die Enzymstabilität.

3.4.3.1 Oxidation von Enzymen durch gelösten Sauerstoff

Auf Grund der geringen Löslichkeit von Sauerstoff im wässrigen Milieu benötigen viele Oxidoreduktasen eine kontinuierliche Zufuhr von molekularem Sauerstoff als Oxidationsmittel oder Elektronenakzeptor. Das macht diese Gruppe von Enzymen sehr attraktiv für die industrielle Anwendung. Die Verwendung schädlicher Metalloxidationsmittel kann vermieden werden (Dias Gomes et al. 2019a). Viele Oxidoreduktasen enthalten typischerweise Übergangsmetalle wie Zn^{2+} , Cu^{2+} und Fe^{2+} als Teil des aktiven Zentrums. Sie benötigen diese zur Stabilisierung bzw. zur Katalyse. Deshalb können viele Oxidoreduktasen in Gegenwart von O_2 , OH^- und H_2O_2 mehr oder weniger stark oxidiert werden (Ryabov 2004). Pacifici *et al.* beschreibt ein ähnliches Verhalten bei dem O_2 und H_2O_2 in Abwesenheit von Übergangsmetallen kaum zur Oxidation von Proteinen beitragen (Pacifici and Davies 1990). In Elektrolytlösung (Puffer wie KP_i , Tris-HCL. etc.), gelöster Sauerstoff fungiert in Wasser als Oxidationsmittel nach folgendem Reaktionsschema: $O_2 + H_2O + 4 e^- \rightarrow 4 OH^-$ (bei neutralem bis alkalischem pH). Dadurch werden zum Beispiel gelöste Metallionen wie Eisen (in P450) nach dem Schema $2 Fe^{2+} + 1,5 O_2 + 3 H_2O \rightarrow 2 Fe(OH)_3$ zu Oxiden und Hydroxiden oxidiert (Forker et al. 1981).

Voraussetzung für eine signifikante Oxidation durch gelösten Sauerstoff ist ein neutraler oder alkalischer pH der Elektrolytlösung (Forker et al. 1981; Niedrach and Stoddard 1985). Weiter muss das Metall-Redoxpaar ein geringeres Standardpotenzial als das Redoxpaar O_2/OH^- besitzen (Forker et al. 1981; Niedrach and Stoddard 1985). Auch die Enzyme in dieser Arbeit enthalten Übergangsmetalle Fe^{2+} in Cytochrom P450 (Johnston et al. 2011), Zn^{2+} in ADH (Ryabov 2004), sowie Cu^{2+} in Tyrosinase (Solano 2018). Auf Grund der fehlenden Information zur GDH 105 von Codexis kann nur angenommen werden, dass diese wie die PQQ-GDH entweder Ca^{2+} (Ryabov 2004), Fe^{2+} (Ryabov 2004) oder kein Metallion enthält. Lediglich die GOx und NOX besitzen FAD als funktionelle Gruppe und keine Übergangsmetalle (Baker et al. 2014; Ryabov 2004). Dieser Zusammenhang steht in guter Übereinstimmung mit der Literatur für GOx, in der bei eingestellter Sättigungskonzentration kein signifikanter Aktivitätsverlust durch gelösten Sauerstoff berichtet wird (Bankar et al. 2009; Bao et al. 2003; Mirón et al. 2004). Daher ist der Einfluss auf die Enzymstabilität durch Oxidation der GOx mit gelöstem Sauerstoff eher unwahrscheinlich. Ludwig *et al.* berichten, dass auch die Erhöhung der Sauerstoffkonzentration durch einen höheren Systemdruck bis 10 MPa zu keiner Oxidation von Protein oder Zellen führt (Ludwig and Macdonald 2005). Dennoch deaktiviert auch die GOx VII aus *A. niger* in Gegenwart stärkerer Oxidationsmittel wie dem Nebenprodukt H_2O_2 (Bankar et al. 2009). Einerseits wäre eine Oxidation durch gelösten Sauerstoff auf Grund des neutralen pH bei Cytochrom P450 und Tyrosinase (pH 7) theoretisch möglich. Andererseits ist dies auch bei leicht alkalischem pH Wert (pH 8) der Systeme von ADH97L, GDH 105, NOX34 denkbar (siehe Tabelle 5).

Auf Basis der hohen Stabilität ohne Begasung von ~94 h wird die Proteinoxidation durch Begasung mit Luft und Stickstoff repräsentativ am Beispiel der Zn^{2+} enthaltenen ADH97L untersucht. In Abb. 41 ist die Inkubation der ADH97L bei Makroblasenbegasung (5 mm offenes Rohr) für eine Begasung mit Luft und Stickstoff dargestellt.

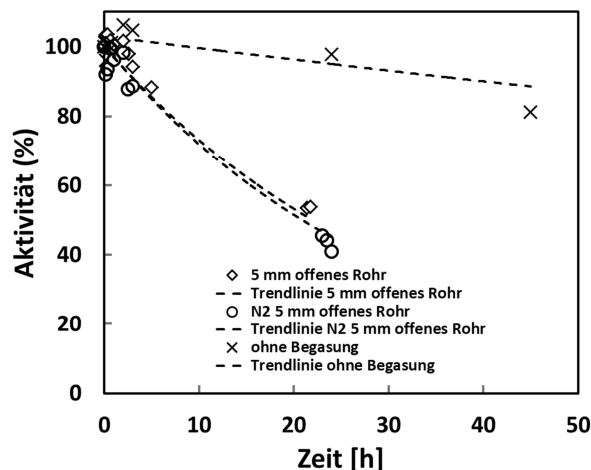


Abb. 41: Vergleich der Enzymstabilitäten der ADH97L mit Luft/N₂ (Inkubationsbedingungen, ADH97L: T = 20°C, 0,03 mg/mL ADH97L, 10 mM Tris-HCL Puffer, pH = 8, 16,67 vvm, V_{Medium} = 0,3 L, Schrägblattrührer 440 rpm)

Auf Grund der Abwesenheit einer sauerstoffkonsumierenden Reaktion während der Inkubation kann durch die hohe Begasungsrate von 16,67 vvm bei der Begasung mit Stickstoff mit einer relativen Sauerstoffkonzentration nahe ~0%, sowie bei der Begasung mit Luft von einer Sauerstoffsättigung von nahezu ~100% ausgegangen werden. Für die Begasung mit Luft-Makroblasen ($t_{1/2, \text{Luft}} = 24,39 \pm 1,16$ h) im Vergleich zu Stickstoff-Makroblasen ($t_{1/2, \text{Stickstoff}} = 22,08 \pm 2,44$ h) kann kein Einfluss der Oxidation durch gelösten Sauerstoff festgestellt werden ($n = 1$ Einzelexperiment). Colombie *et al.* berichtet von einem Stabilitätsverlust des Enzyms Lysozyme bei Begasung mit Luft und Stickstoff, welches mit den Ergebnissen in Abb. 41 in guter Übereinstimmung ist (Colombié *et al.* 2001). In Anbetracht der zuvor diskutierten Parameter wie pH und Übergangsmetalle (als Teile des Enzyms), wie auch der Tatsache, dass alle Stabilitäten ohne Begasung in mit Sauerstoff gesättigtem Puffer (100%O₂) durchgeführt wurden, kann von einem geringen bis nicht signifikanten Effekt durch Oxidation des Enzyms ausgegangen werden.

Auf der Grundlage der experimentellen Daten in dieser Arbeit kann nur für die GOx VII und die ADH97L eine Oxidation ausgeschlossen werden. Im Gegensatz dazu wird für eine ähnliche NOX (NAD(P)H-Oxidase) eine erhöhte Sensitivität gegenüber der Oxidation durch gelösten Sauerstoff beschrieben (Dias Gomes *et al.* 2019b). Für alle anderen Enzyme wie Cytochrom P450, NOX34 etc. kann auf Grund der Stabilitätsexperimente (Abschnitt 3.4.1) bei konstanter O₂-Sättigungskonzentration der Effekt der Oxidation auf die Enzymstabilität als systematischer Fehler angenommen werden, welcher bei allen Experimenten eines Enzyms gleich stark ausgeprägt ist. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen Clarkson *et al.*, welche berichten, dass die Oxidation des Proteins einen nicht signifikanten Einfluss auf die Denaturierung von BSA und Pepsin hat (Clarkson *et al.* 1999). Zur Quantifizierung dieses Effektes könnte die Stabilität im unbegasteten System mit zuvor durch Argon oder Stickstoff begastem Puffer bestimmt werden.

3.4.3.2 Einfluss des Schereintrags und der durch Dispersion erzeugten Grenzfläche auf die Enzymstabilität

Zur weiteren Beurteilung der Effekte auf die Enzymstabilität wird in diesem Abschnitt auf die Scherkräfte eingegangen. Es wird untersucht und diskutiert, wie sich Scherkräfte, induziert durch

Rühren, Begasungsimpulse, Koaleszenz und Blasenauflaufen sowie die durch Scherung von Blasen erzeugten Grenzflächen, auf die Enzymstabilität auswirken. Die Abb. 42 zeigt wie in Abhängigkeit der Generationsmethode ein deutlicher Unterschied in den Halbwertzeiten bei konstantem $k_L a$ und konstanten $P_{Rührer}/V_{Medium}$ resultiert. Unterschiede bestehen bei Fein- und Makroblasenbegasung durch den Impuls des Gasstroms, beim AMB3 durch die hohen Druckverluste (2 - 6 bar) und die Verdichtung der Enzymlösung mit einer Pumpe (Chakraborty et al. 2014).

In diesen Fall wird bei der Generationsmethode des AMB3 durch hohe Scherkräfte am Düsenaustritt und Ausgasen des gelösten Gases, eine sehr große Phasengrenzfläche erzeugt. Dies geschieht ebenfalls durch Erhöhung der Begasungsrate in den Strahlgasen-Bereich wenn $We \gg 6$ mit der Sinterfritte und $We \gg 2$ mit dem offenen Rohre erreicht werden (Räbiger et al. 2013). Durch den Gasimpuls wird die primär gebildete Blase geschert und damit eine höhere Phasengrenzfläche erzeugt (Mersmann 1977). Jedoch steigt mit Verringerung der Blasengröße die Stabilität der generierten Blasenoberfläche. In diesen Fall kann für Fein- und Sumilliblasen eine immobile Blasenoberfläche bei $We/Fr < 10$ und für Makroblasen eine mobile Blasenoberfläche bei $We/Fr > 10$ angenommen werden (Räbiger et al. 2013). Dieser Zusammenhang besitzt auch für Blasen, welche rührerinduzierten Scherkräften ausgesetzt sind, Gültigkeit. Hierbei kann die Wirkung der Scherkräfte durch die Kolmogorov-Länge η_K (μm) beschrieben werden. Die Kolmogorov-Länge beschreibt die Größe der kleinsten Wirbel (μm) siehe Gleichung (41), welche im turbulenten Regime ($Re > 10^4$) in Abhängigkeit von der kinematischen Viskosität ν (m^2/s) des Mediums und der mittleren Dissipationsrate $\bar{\epsilon}$ J/(kg*s) der durch Turbulenz eingebrachten kinetischen Energie erzeugt werden können (Clarkson et al. 1999; Pope 2000).

$$\eta_K = \left(\frac{\nu^3}{\bar{\epsilon}} \right)^{0,25} \quad (41)$$

Die mittlere Dissipationsrate $\bar{\epsilon}$ kann mit dem Flüssigkeitsvolumen V_{Medium} dem Leistungseintrag P (W) und der Dichte des Medium ρ_L (kg/m^3) wie folgt mit Gleichung (42) berechnet werden (Pope 2000).

$$\bar{\epsilon} = \frac{P_{Ges.}}{V_{Medium} \cdot \rho_L} \quad (42)$$

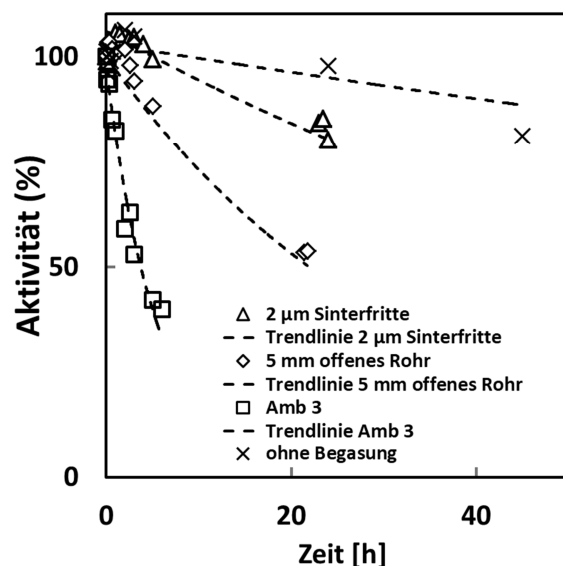
Der benötigten Leistungseintrag P/V_{Medium} (W/L) in einem STR setzt sich aus dem durch Rühren und durch die Begasungsrate V_G (L/min) induzierten Leistungseintrag zusammen (Mersmann et al. 1990; Sánchez Mirón et al. 2000).

$$\frac{P_{Ges.}}{V_{Medium}} = \frac{P_{Rührer}}{V_{Medium}} + \frac{P_{Gas}}{V_{Medium}} \quad (43)$$

Rührer	Gasstrom Begaser	Gasstrom Düse
$\frac{P_{Rührer}}{V_{Medium}} = \frac{N_e \cdot n_R^3 \cdot d_R^5 \cdot \rho_L}{V_{Medium}}$	$\frac{P_{Gas}}{V_{Medium}} = v_s \cdot \rho_L \cdot g$	$\frac{P_{Gas}}{V_{Medium}} = \frac{\dot{V}_{Gas} \cdot \Delta p}{V_{Medium} \cdot \rho_L}$

Nach Geisler *et al.* ist die Energiedissipation am Ende des Rührblattes um den Faktor 30 höher als im übrigen Medium (Geisler et al. 1991). Infolge dessen kann mit den Gleichungen (43) die Kolmogorov-Länge aus den Rührer- und dem Begasungsleistungseintrag berechnet werden (siehe Abb. 42). Es ist deutlich zu erkennen, dass der Einfluss des rührerinduzierten Leistungseintrags dem durch den Gasstroms bedingten Leistungseintrag deutlich überwiegt (Abb. 42). Daher weisen alle Begaser bei konstantem P/V auch eine vergleichbare, resultierende Kolmogorov-Länge auf. Obwohl der Gasstrom durch den Impuls beim Ablösen der Blase am Begaser Scherkräfte erzeugt, überwiegt trotzdem deutlich der Leistungseintrag durch den Rührer (Garcia-Ochoa and Gomez 2009; Mersmann 1977; Mersmann et al. 1990).

Dieses Verhalten ist in vielen Veröffentlichungen zu finden, weshalb im begasten STR häufig der Leistungseintrag durch den Begaser vernachlässigt werden kann. Es kann durch die vorliegende Berechnung lediglich die resultierende Kolmogorov-Länge des AMB3 abgeschätzt werden. Damit ist aber nicht geklärt, wie sich der Druckverlust innerhalb des AMB3 auf die Enzymstabilität auswirkt. Dennoch ist anzunehmen, dass der deutliche Unterschied der Enzymstabilität bei Einsatz des AMB3 ein Ergebnis aus der Kombination von hohen Oberflächenerneuerungsraten und Druckverlust ist (siehe Abb. 42).



Bedingungen: $T = 30^\circ\text{C}$, $k_L a = 160 \text{ 1/h}$ und
 $P_{\text{Rührer}}/V = 0,17 \text{ W/L}$

Begaser	Begasungsrate	η_k
2 µm Sinterfritte	0,667 vvm	2,27 µm
5 mm offenes Rohr	16,67 vvm	2,23 µm
Amb3	0,025 vvm	2,25 µm

Abb. 42: Enzymstabilität der ADH97L bei unterschiedlicher Scherbeanspruchung im begasten Rührkessel (Inkubationsbedingungen $V_{\text{Medium}} = 0,3 \text{ L}$, Schrägblattrührer 430 rpm, ADH97L: $T = 20^\circ\text{C}$, $0,03 \text{ mg/mL}$ ADH97L, 10 mM Tris-HCL Puffer mit 2 mM MgCl $\text{pH} = 8$)

In den Enzymstabilitätsexperimenten wurde der Leistungseintrag durch den Rührer mit $0,17 \text{ W/L}$ (Schrägblattrührer) konstant gehalten. Im Vergleich hierzu berichten Matthes et al. von einem Leistungseintrag von $\sim 0,16 \text{ W/L} - 1,29 \text{ W/L}$ (Scheibenrührer). Die durch Energiedissipation erzeugten kleinsten Wirbel (Kolmogorov Länge) befinden sich im Bereich von $19 - 11 \text{ µm}$ mit einem mittleren Durchmesser (geometrisch) von $d = 38 \text{ µm}$ (Matthes et al. 2020). Folglich ist der Einfluss von rührerinduzierten Scherkräften bei Feinblasen mit $d < 100 \text{ µm}$ relativ gering. Auch ist die Scherung des Enzyms selbst nicht sehr wahrscheinlich, da sich z.B. die GOx mit einer Größe von $\approx 7 - 14 \times 10^{-10} \text{ m}$ (Baszkin et al. 1997; Libertino et al. 2008; Wong et al. 2008) weit unterhalb der

Größenskala des kleinsten, durch Rührer oder AMB3 induzierten Wirbels, befindet. Dadurch ist die Scherung des Enzyms unwahrscheinlich.

Um ein tieferes Verständnis der komplexen Vorgänge zwischen Protein und Phasengrenzfläche zu erlangen, ist die Untersuchung der lokalen Wechselwirkungen von großem Interesse, welche nicht in dieser Arbeit untersucht wurden (Graham and Phillips 1980; Maa and Hsu 1997). In Bahagia *et al.* werden Proteine wie BSA (*Bovines Serumalbumin*) als amphiphile Additive zusätzlich zum Enzym eingesetzt, wodurch der Umsatz einer Cellulosehydrolyse gesteigert werden konnte (Bahagia *et al.* 2018; Johnson and Wangersky 1987; Maa and Hsu 1997). Vergleichbar sind die Wechselwirkungen von Protein und Phasengrenzfläche, welche in Matthes *et al.* beobachtet wurden. Hier erfolgte durch Zugabe von 68,5 mg/L BSA in begastem Wasser eine Stabilisierung der Feinblasen im System, wodurch die Blasengrößenverteilung (BSD) vom Submilli- in den Mikroblasenbereich überführt wurde (Matthes *et al.* 2020).

Die zuvor beobachtete, erhöhte Enzymstabilität der mit Feinblasen begasten Enzymlösungen kann auf eine Kombination verschiedener blasengrößenabhängiger Effekte zurückgeführt werden, welche Gegenstand der folgenden Diskussion sind. Donaldson *et al.* berichteten, dass der Verlust der Restaktivität von Enzymen in begastem STR mit der Gas-Flüssigkeits-Grenzfläche zusammenhängt (Donaldson *et al.* 1980). Graham *et al.* beschreibt, dass ein BSA-Protein durch Adsorption auf Gas-Flüssigkeits-Interphasen eine Struktur- und Entfaltungsänderung erfährt (Graham and Phillips 1979a, 1979b). Dies beruht auf der Hydrophobizität von Proteinen, die zu einer hohen Affinität zur geladenen Blasengrenzfläche der Gas-Flüssigkeits-Interphase führt (Graham and Phillips 1979a; Prins and van't Riet 1987). Als Maß für die Hydrophobizität eines Proteins kann der Gravy Wert („grand average of hydropathy“) berechnet werden. Auf Basis der Aminosäuresequenz wird mit nach Kyte und Doolittle die mittlere Hydrophobizität des Proteins berechnet (Kyte and Doolittle 1982). Der Gravy-Wert beträgt hierbei für hydrophile Proteine von -2 bis 0 und für hydrophobe Proteine (z.B. Membranproteine) 0 bis 2 (Kyte and Doolittle 1982; Magdeldin *et al.* 2012). Für alle in dieser Arbeit enthaltenen Enzyme wurden die Gravy-Werte nach Kyte und Doolittle mit einem online verfügbaren Berechnungsprogramm (*Sequence Manipulation Suite*, abgerufen am 14.06.2020) bestimmt, welche in Tabelle 13 aufgelistet sind (Kyte and Doolittle 1982; Sequence Manipulation Suite 2020).

Tabelle 13: Gravy-Wert der verwendeten Enzyme aufgelistet mit ansteigender Hydrophobizität (Aminosäuresequenzen wurden aus der uniprot.org-Datenbank entnommen für GOx aus *A. niger*, NOx aus *Streptococcus mitis*, Tyrosinase aus *Agaricus bisporus*, ADH aus *Lactobacillus brevis* GDH aus *Bacillus subtilis*, Cytochrom P450 BM3 (CYP102A1) aus *Bacillus megaterium*

	ADH	NOX	GDH	GOx	BSA	Tyrosinase	P450	Katalase
Gravy	-0,015	-0,077	-0,122	-0,189	-0,428	-0,435	-0,440	-0,625
$t_{1/2}$ Feinblase (h)	78,6	1,17	59,04	33,4	-----	15	0,07	----

Im Vergleich zu BSA (Gravy-Wert von -0,428) zeigt die GOx eine geringere Hydrophobizität mit einem Gravy-hydrophobizitätsindex von -0,189. Gleichfalls zeigen alle in Tabelle 13 aufgelisteten Enzyme einen hydrophilen Charakter mit negativem Gravy Wert. Zur Einschätzung des hydrophilen Charakters der Enzyme dieser Studie kann ein Vergleich mit Magdeldin *et al.* angestellt werden. Alle Proteine in Tabelle 13 (Gravy von -2 bis 0) gehören der Gruppe mit den geringsten hydrophilen Proteinen (25 -30%) an (Magdeldin *et al.* 2012). Dennoch kann direkt aus der Hydrophobizität keine

eindeutige Schlussfolgerung auf die Enzymstabilität gezogen werden. Die in Tabelle 13 aufgelistete Gravy-Werte zeigen, dass eine Affinität der Enzyme zur geladenen Blasenoberfläche besteht, welches sich in Matthes *et al.* in der Verringerung der Blasengröße durch Zugabe des Proteins BSA darstellt (Matthes *et al.* 2020). Diese Effekte deuten auf die von Graham und Phillips beschriebene Interaktion der Adsorption von Protein an die geladene Blasenoberfläche (Graham and Phillips 1979a) hin. Somit kann die Abhängigkeit der Enzymstabilität von der eingebrachten Gasphasengrenzfläche hypothetisch angenommen werden. Es bleibt aber weiter unklar, ob hohe lokale Scherkräfte, wie sie beim Aufplatzen von Blasen entstehen, die Enzymstabilität beeinflussen. Wie für Fermentationsprozesse berichtet, hängt die Zellschädigung dort normalerweise mit hohen lokalen Scherkräften zusammen, welche durch Aufplatzen von Blasen (Cherry and Hulle 1992) und Koaleszenz (Kazakis *et al.* 2008a, 2008b) verursacht werden. Wird eine teilweise Adsorption des Enzyms an der Gasflüssigkeitsgrenzfläche angenommen, kann eine scherbedingte Enzymdeaktivierung nach Ma und Hsu theoretisch durch folgende Vorgänge ausgelöst werden: Aufsteigen der Blase im Medium, Aufplatzen und Koaleszenz von Blasen im Medium oder in einer Schaumschicht (inklusive Austrocknung des Blasenfilms im Schaum) (Maa and Hsu 1996, 1997). Ma und Hsu berechnen auf Basis der Bilanzierung von Auftriebs- und Reibungskraft, welche auf eine Blase mit immobilisierter Oberfläche wirkt, eine Oberflächenschubspannung für eine Makroblase mit $d_b = 50$ mm beim Aufsteigen im Medium (Wasser) von $0,8 \text{ N/m}^2$ (Maa and Hsu 1997).

Es konnte bei allen Begasungsexperimenten die Bildung eines geringen instabilen Schaumfilmes von ca. 1 - 3 mm an der Flüssigkeitsoberfläche beobachtet werden. Deshalb kann die Berechnung von Clarkson *et al.* für den lokalen Schereintrag von aufplatzenden Blasen in Schaum und an der Flüssigkeitsoberfläche herangezogen werden (Clarkson *et al.* 1999). Clarkson *et al.* berichten, dass durch Evaporation bedingtes Aufplatzen von Blasen in Schaum mit der Größe von $d = 0,5$ cm (Makroblase) ein maximaler Schereintrag von $0,011 \text{ N/m}^2$ erfolgt. Des Weiteren berechnet Clarkson *et al.*, dass der lokale Schereintrag einer aufplatzenden Blase mit $d = 0,5$ cm mindestens 270 N/m^2 bis maximal 7350 N/m^2 beträgt. Diese Werte wirken auf den ersten Blick relativ hoch. Für die Interpretation des Einflusses des durch Blasen aufplatzen bedingten Schereintrags, ist die in Gleichung (41) dargestellte Kolmogorov-Länge entscheidend. Hierbei beschreibt die Kolmogorov-Länge die Größenordnung in welcher Scherkräfte effektiv wirken.

In Bezug darauf berichten Montero *et al.*, beim Aufplatzen einer $d = 0,5$ cm Blase von einer maximalen Dissipationsenergie von $\varepsilon = 54 \times 10^6 \text{ J/(kg*s)}$ (Montero *et al.* 1993). Mit dieser Energiedissipation ε resultiert gemäß Gleichung (41) eine Kolmogorov-Länge durch Platzen der Makroblase von $1,9 \mu\text{m}$ (Clarkson *et al.* 1999). Damit ein Protein durch Scherkräfte deaktiviert wird, sollte die Größe des Proteins auf einer Skala der Kolmogorov-Länge liegen. Die Größe des Proteins BSA $\leq 3,5 \times 10^{-3} \mu\text{m}$ und GOx mit $\leq 7 - 14 \times 10^{-4} \mu\text{m}$ sind 100 – 1000-fach kleiner als die Kolmogorov-Länge (Baszkin *et al.* 1997; Libertino *et al.* 2008; Wong *et al.* 2008). Dadurch kann auch durch Aufplatzen der Blasen keine Scherung des Enzyms erfolgen.

Folglich ist der direkte Einfluss auf die Enzymstabilität der Scherkräfte durch Aufplatzen, Koaleszenz, Gasimpuls und Rühren im Vergleich zur Wechselwirkung von Proteinen mit der eingebrachten Phasengrenzfläche gering. Diese Aussage ist in Übereinstimmung mit den von Clarkson *et al.* sowie Ma und Hsu veröffentlichten Daten (Clarkson *et al.* 1999; Maa and Hsu 1996, 1997). In der beschriebenen Literatur zeigt die Wirkung von Scherkräften jedoch nur einen Einfluss auf die Denaturierung von Proteinen in Gegenwart einer Gas-Flüssigkeits-Grenzfläche. Wie von Ma und Hsu

beschrieben, hängt die Zunahme der Deaktivierung nicht direkt mit den eingebrachten lokalen Scherkräften zusammen, die auf das Protein wirken, sondern auch mit der Zunahme der scherbedingten Oberflächenerneuerungsrate (Maa and Hsu 1997). Diese Oberflächenerneuerungsrate führt zur Erhöhung der Wechselwirkungen, welche z.B. höhere Adsorptionsraten des Proteins an der Blasenoberfläche ermöglichen (Maa and Hsu 1997). Feinblasen zeichnen sich durch eine höhere eingebrachte, effektive Oberfläche von $1,4 \text{ m}^2$ im Vergleich zu Submilli- und Makroblasen aus (Tabelle 7). Diese ist bedingt durch hohe Verweilzeit, geringere Tendenz zum Blasen aufplatzen und geringen Gasverbrauch. Demnach kann auf eine geringere resultierende Oberflächenerneuerungsrate bei der Begasung mit Feinblasen im Vergleich zu Makroblasen geschlossen werden. Eine mögliche Erklärung für die geringere Enzymstabilität (Abschnitt 3.4.2) bei Submilli- und Makroblasenbegasung ist die höhere Oberflächenerneuerungsrate bedingt durch scherinduzierte Vergrößerung der Oberfläche. Vergleichbare Ergebnisse werden auch von Dias Gomes *et al.*, D'Imprima *et al.*, Bhagia *et al.* und Bommarius *et al.* berichtet (Bhagia *et al.* 2018; Bommarius and Karau 2005; Dias Gomes *et al.* 2019a; Dias Gomes *et al.* 2019b; D'Imprima *et al.* 2019).

3.4.4 Intermediäre Zusammenfassung zur Enzymdeaktivierung

In diesem Kapitel wurden die unterschiedlichen Faktoren beschrieben, welche einen Einfluss auf die Enzymstabilität im begasten STR haben können. Folglich wurde der Einfluss der Blasengröße, der Oxidation des Enzyms sowie der durch Scherkräfte induzierte Leistungseintrag hinsichtlich der Enzymstabilität experimentell untersucht und mit der zu dem Thema veröffentlichten Literatur diskutiert. Zum direkten Vergleich ist in Abb. 43 die relative Restaktivität der GOx, NOX34, TYR, ADH97L, GDH 105 und Cytochrom P450 bei einem konstanten k_{a} -Werten von 160 1/h aufgetragen. Als Ergebnis der Stabilitätsuntersuchungen bei Inkubation mit Fein- und Makroblasenbegasung im begasten STR wurde bei allen Enzymen eine signifikante Erhöhung der Enzymstabilität um den Faktor 1,6 - 15 in Gegenwart von Feinblasen festgestellt (siehe Abb. 43).

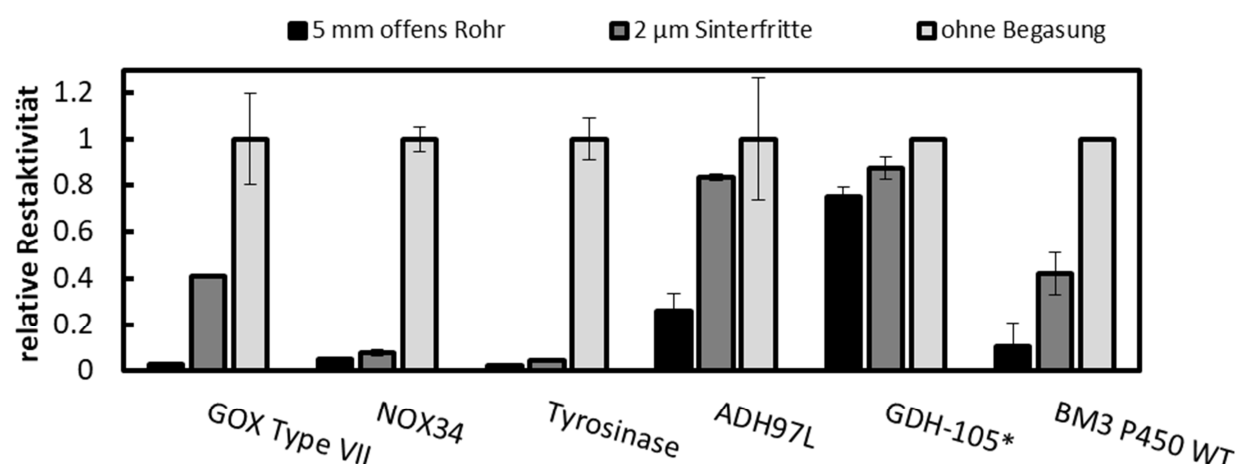


Abb. 43: Vergleich der Enzymstabilitäten im feinblasenbegasten, makroblasenbegasten und unbegasten System (Reaktionsbedingungen siehe Abb. 38 und Abb. 39, GDH 105* wurde bei $t = 6 \text{ h}$ ausgewertet)

Im Vergleich der Enzymstabilitäten zum nicht begasten System (siehe Abb. 43) wurde allerdings ein deutlicher Aktivitätsverlust festgestellt. Dieses wird durch die in der Literatur beschriebene Sensitivität von Enzymen in Gegenwart einer Gasphase bestätigt (Bhagia et al. 2018; D'Imprima et al. 2019; Maa and Hsu 1997). Der Einfluss durch die kontinuierlich eingebrachte Gasphasengrenzfläche (\dot{a}_{Air}), die Verweilzeit τ und die effektive Phasengrenze auf die Enzymstabilität wurde am Beispiel der Glucoseoxidase über den gesamten Arbeitsbereich untersucht (Abschnitt 3.4.2). Hierbei konnte eine Erhöhung der Enzymstabilität über den gesamten, einstellbaren $k_L a$ Bereich durch den Einsatz von Feinblasenbegasung im Vergleich zu Submilli- und Makroblasenbegasung festgestellt werden (siehe Abb. 40). Es resultierte für die Luft-Makroblasenbegasung ($t_{1/2, Luft} = 24,39 \pm 1,16$ h) im Vergleich zur Stickstoff-Makroblasenbegasung ($t_{1/2, Stickstoff} = 22,08 \pm 2,44$ h) kein Unterschied in der Enzymstabilität, welcher auf eine Oxidation durch gelösten Sauerstoff der ADH97L hindeuten würde. Um die Sensitivität gegenüber der Oxidation der Enzyme in dieser Arbeit zumindest abzuschätzen, wurden die Einflussfaktoren wie pH und Übergangsmetalle (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} etc.) als Teile der Enzyme diskutiert. Als Ergebnis dieser Diskussion wurde festgestellt, dass Oxidation durch gelösten Sauerstoff nur bei neutralen bis alkalischen pH, durch vermehrte Dissoziation von Wasser zu OH^- , stattfindet. Da alle Stabilitätsuntersuchungen bei nahezu Luftsauerstoffsättigung durchgeführt wurden, kann von einem geringen, vernachlässigbaren Effekt durch Oxidation des Enzyms ausgegangen werden. Der Einfluss der Oxidation kann sich unterschiedlich für jede Präparation auswirken. In dieser Arbeit wurde lediglich die Oxidation der ADH97L experimentell untersucht.

Im weiteren Verlauf wurde der Einfluss des Leistungseintrags als Kombination von Scherkräften, sowie der durch Scherkräfte erzeugten zusätzlichen Phasengrenzfläche diskutiert. Es konnte festgestellt werden, dass Scherkräfte, welche durch Rühren, Gasimpuls, Koeleszenz sowie Blasen aufplatzen auf das Enzym wirken, durch die Bestimmung der kleinsten durch Energiedissipation erzeugten Wirbel (Kolmogorov-Länge) nicht beeinflusst werden. Beispielsweise GOx mit einer Größe von $\leq 7 - 14 \times 10^{-4}$ μm ist um den Faktor 100 -1000 kleiner als die Kolmogorov-Länge, welche durch den Leistungseintrag erzeugt werden kann (Baszkin et al. 1997; Libertino et al. 2008; Wong et al. 2008). Folglich ist der direkte Einfluss auf die Enzymstabilität der eingebrachten Scherkräfte durch Aufplatzen, Koaleszenz, Gasimpuls und Rühren im Vergleich der durch Scherkräfte erzeugten Grenzfläche und der Wechselwirkung von Proteinen mit der Phasengrenzfläche vernachlässigbar. Diese Schlussfolgerung ist in guter Übereinstimmung mit den in Thomas *et al.* berichteten Effekten zur Proteinstabilität und zum Scherkrafteintrag (Thomas and Geer 2011).

Auf Grund der oben diskutierten Proteindenaturierung, ist eine Verringerung der Phasenerneuerung für die Enzymstabilität vorteilhaft. Daher führt die Abnahme der Blasengröße zu stabileren Blasen und einer geringeren Erneuerung der Grenzfläche. Diese identifizierten Vorteile der Feinblasenbegasung sind vielversprechend für die Optimierung biokatalytischer und chemischer Reaktionen in Mehrphasensystemen.

3.5 Anwendung von verschiedenen Begasungssystemen in präparativen Biotransformationen

Die Anwendung der Feinblasentechnologie in begasten Reaktionen steht im Fokus dieses Kapitels. Hierzu werden die Produktivität, die Sauerstoff-Ökonomie und der Umsatz der enzymatischen

katalysierten Reaktionen bei der Anwendung von verschiedenen Begasungssystemen verglichen. Eine hohe enzymmengenspezifische Sauerstoffverbrauchsrate ist Voraussetzung für den Vergleich des Reaktionsumsatzes und der Produktivität. Diese Voraussetzung wird für die Enzyme GOx und Tyrosinase erfüllt und eine Stofftransportlimitierung $Da^* > 1$ kann eingestellt werden. Die positiven Effekte hinsichtlich hoher Stofftransportraten, geringem Gaseinsatz (Kapitel 3.2) und erhöhter Enzymstabilität (Kapitel 3.4) bei Feinblasenbegasung sollen in der enzymatischen katalysierten Reaktion getestet werden. Hierfür ist die Kenntnis der Reaktionsparameter wie z.B. der Michaelis-Menten Konstante, der enzymmengenspezifischen Sauerstoffverbrauchsrate (siehe Kapitel 3.1) und die $k_L a$ -Kurve des Begasers eine Voraussetzung für den Vergleich von Begasung mit verschiedenen Blasengrößen in enzymatischen Reaktionen. Ziel war es, die Eignung der Feinblasenbegasung in der enzymatischen Reaktion zu untersuchen. Es wurde das Konzept der Steigerung des Stofftransports und der Enzymstabilität durch Feinblasenbegasung mit den klassischen Konzepten der Erhöhung des Leistungseintrags bei Makroblasenbegasung verglichen.

3.5.1 Untersuchung des Rührer-Leistungseintrags auf die Produktivität einer enzymatischen Himbeerketonsynthese

Im Unterabschnitt 3.4.3.2 wurde festgestellt, dass der Einfluss des Rührers auf die erzeugte Grenzfläche im Vergleich zur Begasung auch bei hohen Begasungsraten von 16,67 vvm überwiegt, was einen negativen Einfluss auf die Stabilität des Biokatalysators hat. Am Beispiel der ADH97L in Kombination mit der NOX34 (NADH-Oxidase) wird der Leistungseintrag bei konstanter Begasungsrate von 0,04 vvm, variiert. Zusätzlich werden ein axial und ein radial mischender Rührer in der Reaktion eingesetzt.

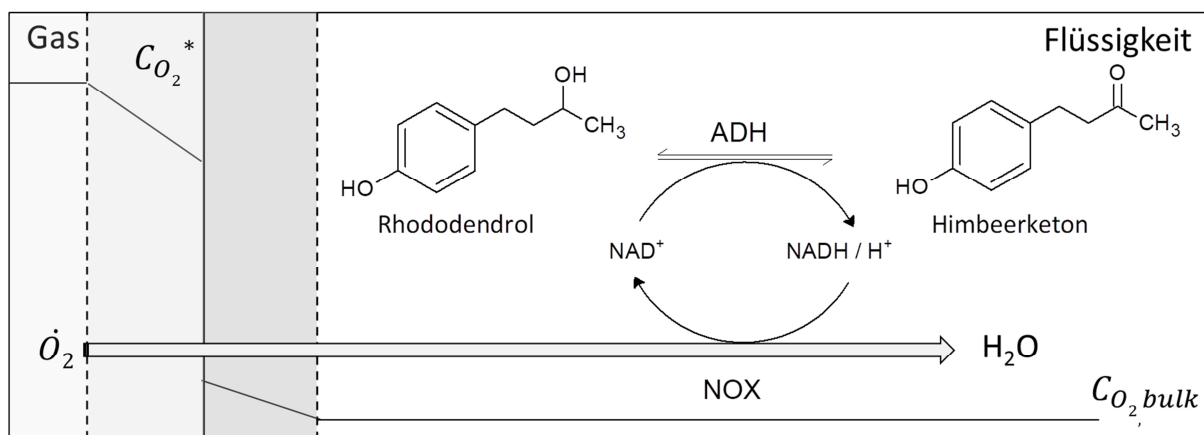


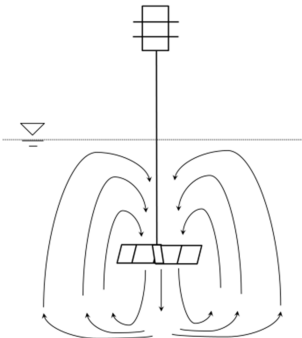
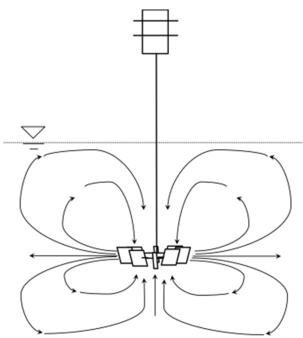
Abb. 44: Reaktionsschema und Konzept der Himbeerketonsynthese

Basierend auf der Berechnung und Messung der Blasengröße in Abschnitt 3.2.2 werden Makroblasen mit dem 5 mm offenen Rohr, Submilliblasen mit der 10 μm Sinterfritte und Mikroblasen mit der 0,5 μm Sinterfritte verglichen. Wird die $k_L a$ -Kurve in 3.2.1 berücksichtigt, kann angenommen werden, dass die 0,5 μm und die 2 μm Sinterfritte vergleichbare Blasengrößenverteilungen generieren. Daher wurde in diesem Abschnitt der Feinblasenbegaser 0,5 μm Sinterfritte eingesetzt. Zusätzlich sollte durch eine geringe Begasungsrate die Feinblasengeneration sichergestellt und dadurch

Sekundärblasenbildung, sowie Bildung von Blasen über mehrere Poren, vermieden oder verringert werden.

Auf Grund des zuvor beschriebenen geringen Einflusses des Leistungseintrags auf die Desintegration von Feinblasen ($We/Fr < 10$) und dem zu erwartenden geringen Einfluss auf die Begasung mit Submilliblasen ($We/Fr < 10$ oder $We/Fr < 16$) (Mersmann 1977) wird am Beispiel der Makroblasenbegasung ($We/Fr > 16$) der Einfluss der Desintegration von Blasen durch den Leistungseintrag des Rührers untersucht und diskutiert. Um nun die zuvor beschriebenen Effekte, besonders die Kombination aus der Erhöhung der Phasengrenzfläche durch Feinblasentechnologie einerseits und dem Leistungseintrag durch den Rührer andererseits, zu untersuchen, wird ein Scheibenrührer (RT) und ein Schrägblattrührer (PB) mit radialen, sowie axialen Strömungsprofil eingesetzt (siehe Tabelle 14). Mit der zuvor in Abschnitt 1.1.2 beschriebenen Rührercharakteristik kann auf Basis der Scherkonstante K_s die Fördereffizienz des Rührers, bezogen auf die Flüssigkeit, berechnet werden (siehe Tabelle 14).

Wie in Tabelle 14 im direkten Vergleich dargestellt, wird bei radial mischenden Rührern (Scheibenrührer) ein sehr hoher lokaler Leistungseintrag direkt am Rührerblatt erzeugt (Geisler et al. 1991; Parthasarathy and Ahmed 1994). Dies ist zwar auch der Fall bei axial mischenden Rührern, jedoch ist hier der lokale Leistungseintrag durch die geringere Umlegung des Mediums am Rührerblatt nicht so stark ausgeprägt (siehe Tabelle 14) (Machado et al. 2012). Dieser Effekt wird im Vergleich der Scherkonstanten von 5,4 (PB) zu 11,5 (RT) deutlich. Die höhere Effektivität des axial mischenden Rührers im Vergleich zum Scheibenrührer kann berechnet und dargestellt werden (Tabelle 14) (Fořt et al. 2002).

Axial Schräglattrührer (PB)		Tabelle 14: Rührercharakterisierung anhand dimensionsloser Kennzahlen (Berechnung wie in Abschnitt 1.1.2 beschrieben in reinem Wasser bei 25°C)* (Torrez and André 1998)		Radial Scheibenrührer (RT)	
		PB	RT		
	Reynoldszahl	Re	$> 10^4$	$> 10^4$	
	Newtonzahl	Ne	1,36	5	
	Scherkonstante	K_s	5,4*	11,5*	
	Flow-Zahl	F_l	0,77	0,82	
	Effektivität	(F_l/Ne)	0,56	0,16	

In der Literatur ist ein ähnlicher Schräglattrührer mit nur 4 Blättern mit einer F_l von 0,76 und einer Effektivität (F_l/Ne) von 0,1 beschrieben. Jedoch werden in der Effektivitätsberechnung die Reaktorgeometrie, die Bodenform und der Abstand des Rührers zum Reaktorboden vernachlässigt. Diese Faktoren haben allerdings einen erheblichen Einfluss auf die Mischleistung des Rührers (Fořt et al. 2002). Weiter werden in der Literatur auch aufwärts fördernde Schräglattrührer beschrieben, welche einen besseren Stofftransport und höhere Gaskapazitäten als abwärts fördernde Rührer bieten (Sardegna et al. 2004). Für die Desintegration von Blasen ist die aus dem Rührerleistungseintrag resultierende Kolmogorov-Länge entscheidend. Bei Makroblasen, wie bei den

Blasen der 5 mm Rohrbegasung (d_{32} von 5 mm) ist mit $We/Fr > 16$ eine geringere Stabilität der Blasenoberfläche als im Vergleich zu den Submilli- und Feinblasen mit $We/Fr < 10$ gegeben (Mersmann 1977). Feinblasen verhalten sich auf Grund der immobilen Blasenoberfläche ähnlich wie Feststoffpartikel (Räbiger et al. 2013; Tsuge 2014). Daher ist für Submilliblasen nur ein geringer, und für Feinblasen kein Effekt des Leistungseintrags auf die Phasengrenzfläche zu erwarten. Die Stabilisierung von Submilliblasen durch Erhöhung des Leistungseintrags führt zu längeren Verweilzeiten.

Daher werden in dieser Untersuchung zwei unterschiedliche Strategien zur Überprüfung der zuvor genannten Hypothesen verfolgt. Die erste Strategie ist die Desintegration von Makroblasen durch radialen (Scheibenrührer) und axialen (Schrägblattrührer) Leistungseintrag, wofür eine Stofftransportlimitierung der NOX34 Voraussetzung ist. Die zweite Strategie ist die Untersuchung des Einflusses von erhöhtem Leistungseintrag auf die Grenzflächenerneuerungsrate (Enzymstabilität) bei nicht stofftransportlimitierten Bedingungen. Dabei wird erwartet, dass durch Erhöhung der Grenzfläche auch eine vermehrte Deaktivierung auftritt und dieser Effekt zu einer Abweichung in der Ausbeute der Reaktion führt. Mit der eingesetzten Enzymmenge von 75 U (5,83 mg) NOX34 mit einer enzymmengenspezifischen Sauerstoffverbrauchsrate von $3,21 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}_{\text{Enzym}}$ sowie einem enzymmengenspezifischen $k_L a$ von $2,95 \text{ 1}/\text{h}/\text{mg}_{\text{Enzym}}$ (keine Sauerstofftransportlimitierung) wird zunächst die Stofftransportlimitierung für alle Begaser überprüft (Tabelle 15). In Tabelle 15 ist dieser Vergleich dargestellt, welcher bei der gegebenen Begasungsrate, wie vorgesehen, nur bei der Makroblasenbegasung eine Stofftransportlimitierung und bei Submilli- und Mikroblasenbegasung keine Stofftransportlimitierung aufweist.

Tabelle 15: Berechnung der Sauerstofflimitierung für ADH97L/NOX34 Reaktionen ($V = 250 \text{ mL}$, $C_{\text{Rhododendrol}} = 10 \text{ mM}$, ADH97L ($0,3 \text{ U}/\text{mL}$), NOX34 ($0,3 \text{ U}/\text{mL}$), $C_{\text{NAD}^+} = 0,2 \text{ mM}$, 25°C , $0,04 \text{ vvm}$, $10 \text{ mM Tris-HCl pH} = 8$)

Parameter	5 mm offenes Rohr Makroblasen	10 μm Sinterfritte Submilliblasen	0,5 und 2 μm Sinterfritte Feinblasen
$k_L a$	10 1/h	31,4 1/h	40,9 1/h
OTR	0,0107 mmol/min	0,0335 mmol/min	0,0436 mmol/min
Da^*	2,27	0,72	0,56
O₂-Limitierung	limitiert	nicht limitiert	nicht limitiert

Die Ergebnisse der Untersuchung in der Reaktion sind in Abb. 45 dargestellt. Im Vergleich der Makroblasenbegasung ist deutlich zu erkennen, dass Makroblasen durch den Scheibenrührer ($Ne = 5$) desintegriert werden, wodurch der Stofftransport und die Ausbeute gesteigert werden.

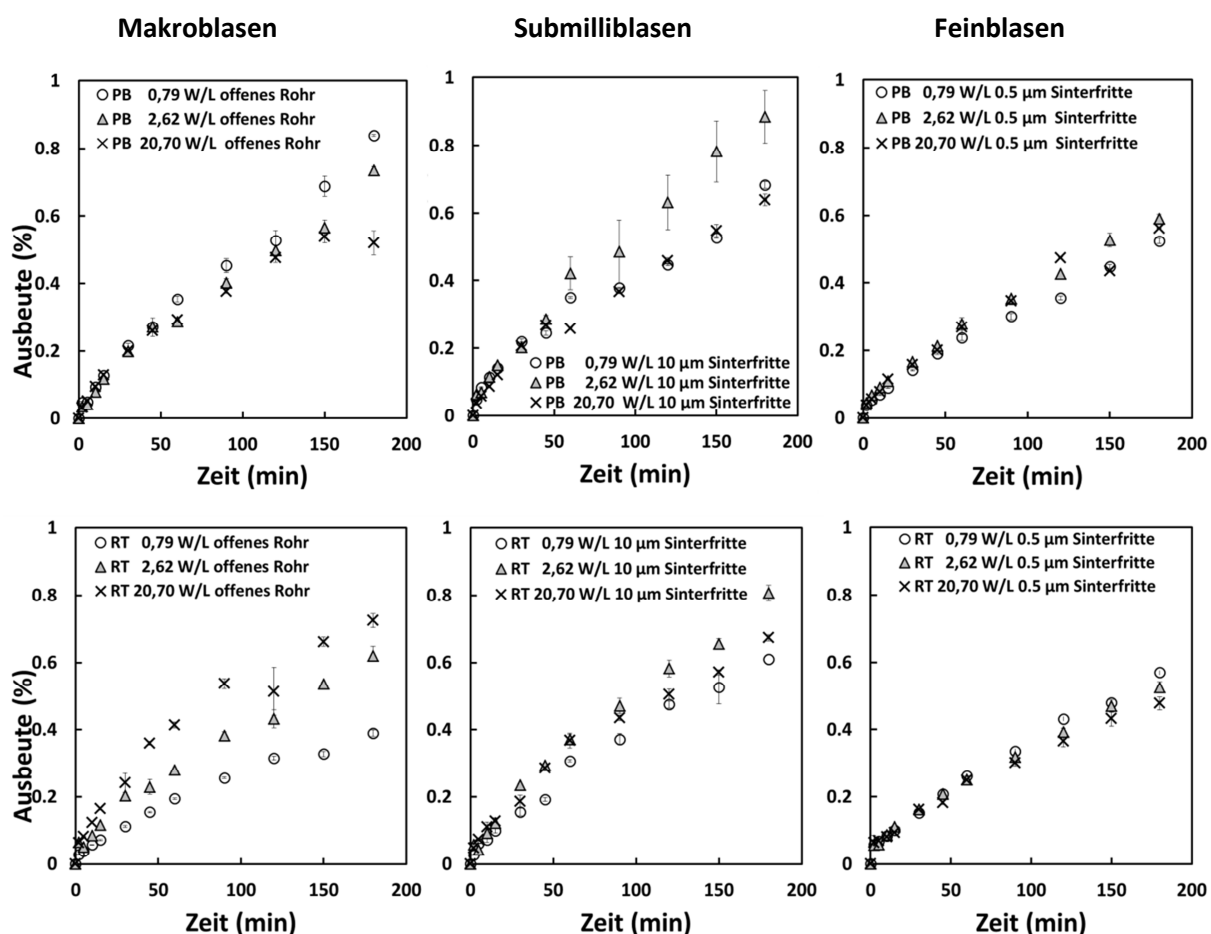


Abb. 45: Untersuchung der Ausbeute einer Himbeerketon-Synthese bei Variation des Leistungseintrags, des Strömungsprofils und der eingebrachten Blasengröße (PB axialer und RT radiales Strömungsregime, Bedingungen: $V = 0,25 \text{ L}$, $C_{\text{Rhododendrol}} = 10 \text{ mM}$, $\text{ADH97L } 0,3 \text{ U/mL}$, $\text{NOX34 } 0,3 \text{ U/mL}$, $C_{\text{NAD}^+} = 0,2 \text{ mM}$, 25°C , $0,04 \text{ vvm}$, 10 mM Tris-HCl mit 2 mM MgCl $\text{pH} = 8$)

Dennoch erweist sich hier der Schrägblattrührer mit geringerer $Ne = 1,36$, axialem Strömungsprofil und einer deutlich höheren Mischeffizienz von $(F/Ne) = 0,56$ als deutlich besser geeignet. Bereits bei geringem Leistungseintrag von $0,79 \text{ W/L}$ werden vergleichbare Ausbeuten wie beim Scheibenrührer mit $20,7 \text{ W/L}$ erreicht. (Abb. 45). Das bedeutet, dass auch bei Makroblasen ein geringerer Leistungseintrag in Kombination mit einem Schrägblattrührer eine effiziente Methode ist, um hohe Grenzflächen, Verweilzeiten und Stofftransportraten sicherzustellen.

Im Vergleich der Submili- und Mikroblasen (Abb. 45) kann keine signifikante Änderung der Ausbeute durch Erhöhung des Leistungseintrags oder durch die unterschiedlichen Strömungs- und Scherprofile der Rührer festgestellt werden. Dennoch wird eine höhere Ausbeute mit der Submilliblasenbegasung $\sim Y 60\%$ im Vergleich zur Feinblasenbegasung mit $Y \sim 50\%$ erreicht. Eine mögliche Begründung für dieses Verhalten ist die durch den Begaser eingebrachte Phasengrenzfläche, welche in Tabelle 16 aufgelistet ist. Die Grenzfläche der Feinblasen ist $10,4$ -fach höher als die der Makroblasenbegasung und $2,5$ -fach höher als bei der Submilliblasenbegasung (Tabelle 16). Eine mögliche Erklärung ist, dass das Enzym durch erhöhte Wechselwirkung deaktivieren kann, weshalb die deutlich höhere Grenzfläche (\dot{a}) der Feinblasenbegasung zu einer verringerten Ausbeute im Vergleich zu Makro- und

Submillibegasung führt. Dies bestätigt die zuvor in Kapitel 3.4 dargelegte Hypothese der erhöhten Deaktivierung bei vergrößerter Grenzfläche im Sinne eines indirekten Nachweises.

Tabelle 16: Begaserspezifische, eingebrachte Oberfläche ohne Variation des Leistungseintrags (Reaktionsbedingungen siehe Abb. 45)

Parameter	5 mm offenes Rohr Makroblasen	10 µm Sinterfritte Submilliblasen	0,5 und 2 µm Sinterfritte Feinblasen
d_{32}	5 mm	0,768 mm	0,320 mm
$\dot{\alpha}$	0,018 m ² /min	0,0763 m ² /min	0,1875 m ² /min
SV	1800 1/m	7633,6 1/m	18750 1/m
α_{Effektiv}	$1,32 \cdot 10^{-5} \text{ m}^2$	$2,36 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2$	$3,4 \cdot 10^{-2} \text{ m}^2$

Mit den dargestellten Ergebnissen in Tabelle 16 und Abb. 45 kann die Hypothese bestätigt werden, dass die Erhöhung des Leistungseintrags keinen oder lediglich einen geringen Effekt auf die Ausbeute und die Desintegration von Fein- sowie Submilliblasen (generiert mit 0,5 µm, 2 µm und 10 µm Sinterfritte) hat. Jedoch ist bei kleinen Begasungsraten von $v_{vm} = 0,04$ im Vergleich zu Begasungsraten von 0,67, 1,33 und 16,67 v_{vm} (Tabelle 7) der Unterschied in der generierten Phasengrenzfläche $\dot{\alpha}$ auf Basis des Begasers bei Feinblasen um den Faktor 10 höher.

3.5.2 Anwendung der Feinblasentechnologie am Beispiel der Gluconolactonsynthese

Im Fokus dieses Abschnitts steht der direkte Vergleich von Feinblasen- mit Submilliblasen- und Makroblasen bezüglich der Anwendung in der Biokatalyse. Die zuvor einzeln untersuchten Effekte, welche eine Erhöhung des Stofftransports und der Enzymstabilität durch den Einsatz der Feinblasentechnologie bedingen, werden in Kombination und am Beispiel der Produktivität einer Modellreaktion verglichen. Um die Vorteile der Feinblasentechnologie zu demonstrieren, und zu untersuchen, wurde die sauerstofflimitierte Biotransformation von Glucose mit Sauerstoff zu Gluconolacton und Wasserstoffperoxid gewählt. Sie wird durch das Enzym Glucoseoxidase (GOx) aus *A. niger* katalysiert (siehe Abb. 46). Mit $Da^* = 1,38/\text{mg}_{\text{Enzym}}$ weist die GOx katalysierte Gluconolactonsynthese (siehe Abb. 46) ein hohes Potenzial auf, um eine Stofftransportlimitierung einzustellen. Für die Betrachtung des Stofftransports verschiedener Blasengrößen als Funktion des Reaktionsumsatzes, ist die Annahme einer Stofftransportlimitierung eine Voraussetzung. Am Beispiel der GOx katalysierten Reaktion wurde mit einer eingesetzten Aktivität von $\sim 12000 \text{ U} (\mu\text{mol}/\text{min})$ GOx in $V_{\text{Medium}} = 0,3 \text{ L}$ bei 35°C gearbeitet. Hieraus ergab sich ein theoretischer $k_L a$ -Wert von 5518 1/h (Da^* von 33,75, limitiert), welcher durch eine Begasung nicht erreicht werden konnte. In Bezug auf den $k_L a$ Bereich von 20 - 160 1/h für das offene Rohr und 20 - 340 1/h für die 1 µm SPG Membran und 2 µm Sinterfritte (siehe Abb. 27, Abschnitt 3.2.1) kann unter Laborbedingungen auch bei hohen Begasungsraten von einer Stofftransportlimitierung ausgegangen werden. Weiterhin konnte für die GOx in Abschnitt 3.4.2 ein deutlicher Unterschied zwischen der Begasung mit Fein-, Submilli- und Makroblasen bei der Enzymstabilität festgestellt werden.

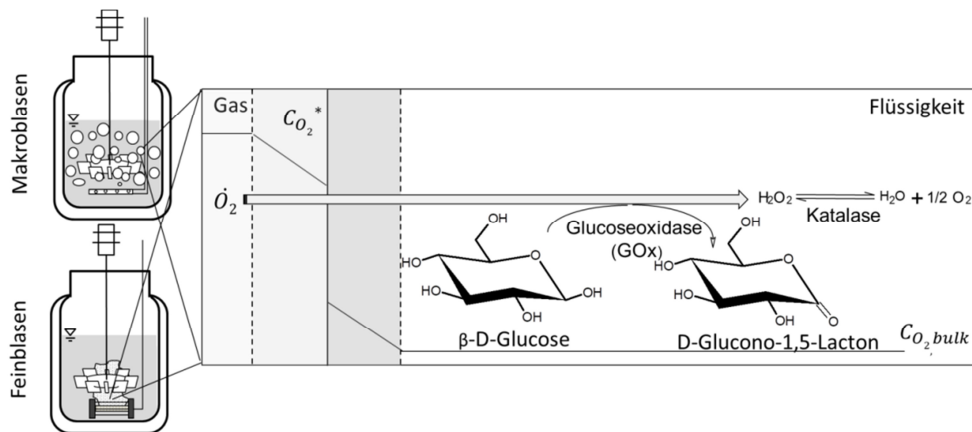


Abb. 46: Reaktionsschema und Konzept des Begaservergleichs am Beispiel der GOx katalysierten Umsetzung von Glucose zu Gluconolacton

Zum Vergleich der Begasungssysteme können verschiedene Strategien, wie eine konstante Begasungsrate ($v_{vm} = \text{konstant}$) und eine konstante Stofftransportrate ($k_L a = \text{konst}$) gewählt werden. Zur Quantifizierung und zum Vergleich wurde ein operativer Zeiteffektivitätsfaktor η_{op} in Gleichung (44) eingeführt. Dieser Faktor ist definiert als das Verhältnis der Reaktionszeit, welche erforderlich ist, um eine analytische Ausbeute von 40% für das offene Rohr oder die verschiedenen Sinterfritten zu berechnen.

$$\eta_{op} = \frac{t_{y=40\%,\text{Begaser}}}{t_{y=40\%,\text{SPG}}} \quad (44)$$

Wie in Abb. 47 demonstriert wird, resultieren bei konstanter Begasungsrate $v_{vm} = 0,667$ durch die verschiedenen Blasenbildungscharakteristiken (3.2) unterschiedliche $k_L a$ -Werte und Ausbeutekurven.

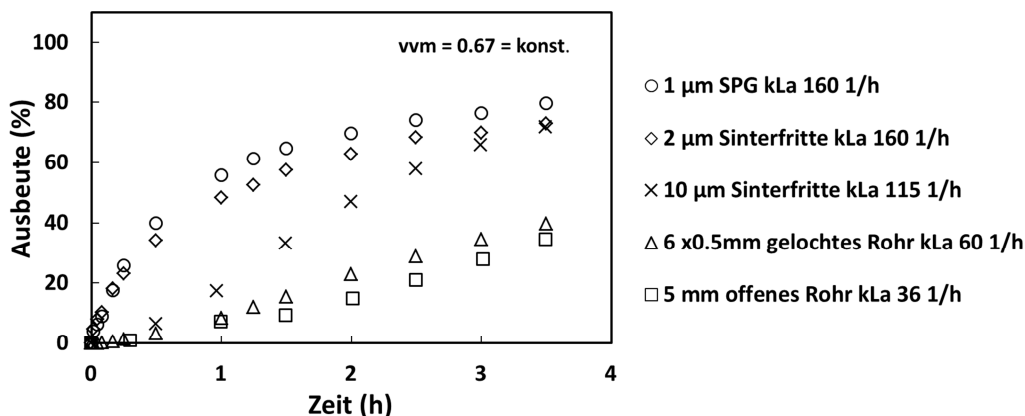


Abb. 47: Begaservergleich bezüglich der Ausbeute einer GOx katalysierten Gluconolactonsynthese bei konstanter Begasungsrate (Reaktionsbedingungen: $T = 35^\circ\text{C}$, $V = 0,3 \text{ mL}$, $87,6 \text{ mM D-Glucose}$, 11865 U GOx , 12320 U Katalase , $10 \text{ mM Na-Acetatpuffer pH} = 5,3$, Schrägblattrührer 440 rpm , Titration mit 1 M NaOH in Wasser, $n = 1$).

In Abb. 48 ist der mittels Gleichung (44) berechnete Zeiteffektivitätsfaktor η_{op} für die in Abb. 47 gezeigten Begasungsexperimente bei konstantem $v_{vm} = 0,67$ aufgetragen. Es ergab sich in Relation zur $1 \mu\text{m SPG}$ Membran ein η_{op} (längere Reaktionszeit) von $7,65$ für das $5 \text{ mm offenes Rohr}$, $7,01$ für

das gelochte Rohr, 3,4 für die 10 μm Sinterfritte und 1,2 für die 2 μm Sinterfritte (Abb. 47). Diese Ergebnisse bestätigen, dass die zuvor in Kapitel 3.2 festgestellte hohe Gasnutzung, bei gleichzeitig hohem Stofftransport der Feinblasenbegasung, auch zu einer Steigerung der Ausbeute in der enzymatisch katalysierten Reaktion führt.

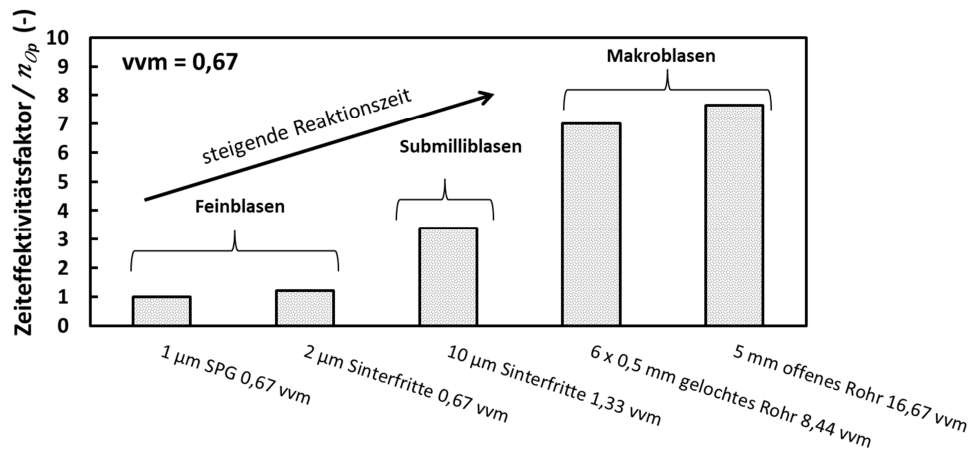


Abb. 48: Zeiteffektivitätsfaktor η_{op} bei konstantem $\text{vvm} = 0,67$ ($T = 35^\circ\text{C}$, $V = 0,3 \text{ mL}$, $87,6 \text{ mM D-Glucose}$, 11865 U GOx , 12320 U Katalase , $10 \text{ mM Na-Acetatpuffer pH} = 5,3$, Schräglattrührer 440 rpm , Titration mit 1 M NaOH in Wasser, $n = 1$, ausgewertet bei $Y = 40\%$)

Im Vergleich der Ausbeutekurve des 5 mm offenen mit dem 6 x 0,5 mm gelochten Rohrs, wurde bei einer Verdopplung des $k_L a$ nur ein geringer Unterschied im Zeiteffektivitätsfaktor von $\Delta\eta_{op} 0,64$ festgestellt. Eine mögliche Begründung ist die erhöhte Enzymdeaktivierung bei Makroblasenbegasung (wie in Abschnitt 3.4.2 gezeigt). Daher wurde, trotz höherer $k_L a$ -Werte der Begasung mit dem gelochten Rohr, keine deutliche Erhöhung der Ausbeute in Bezug auf die Begasung mit dem offenen Rohr gemessen (Abb. 47). Eine weitere Erklärung könnte das Auftreten von Sekundärblasenbildung (Räbiger et al. 2013) sein.

Die zweite Strategie war, einen konstanten $k_L a$ von 160 1/h einzustellen, und die Ausbeutekurven der Gluconolactonsynthese zu vergleichen (Abb. 49). Der gewählte $k_L a$ von 160 1/h entsprach einer Begasungsrate von $16,67 \text{ vvm}$ für das offene Rohr, $8,44 \text{ vvm}$ für das gelochte Rohr, $1,33 \text{ vvm}$ für die $10 \mu\text{m}$ Sinterfritte, $0,67 \text{ vvm}$ für die $1 \mu\text{m}$ SPG Membran und die $2 \mu\text{m}$ Sinterfritte. Im Fall der Makroblasenbegaser resultierten bei einem $k_L a$ von 160 1/h sehr hohe Begasungsraten (vvm Werte). Diese hohen Begasungsraten sind bei der Maßstabsvergrößerung nicht zu realisieren (Garcia-Ochoa and Gomez 2009; Nauha et al. 2015). Wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, resultierten aus einem geringeren $k_L a$ von 60 1/h im Labormaßstab deutlich geringere Begasungsraten für alle Begaser, welche eine Maßstabsvergrößerung auch für die Makroblasenbegaser ermöglichen würden (Nauha et al. 2015). Die Eigenschaften von Feinblasen wie schnelles Einlösen, lange Verweilzeiten, geringe Scheranfälligkeit und eine hohe Gasausnutzung, behalten auch in größerem Maßstab ihre Gültigkeit. Daher erlaubt die Feinblasentechnologie die Steigerung der Ausbeute und der Gasausnutzung in viel größerem Maßstab, als in dieser Arbeit untersucht. Dieser Sachverhalt verdeutlicht anschaulich (siehe Abb. 49) den großen Unterschied im Gasverbrauch zwischen Fein- und Makroblasenbegasung.

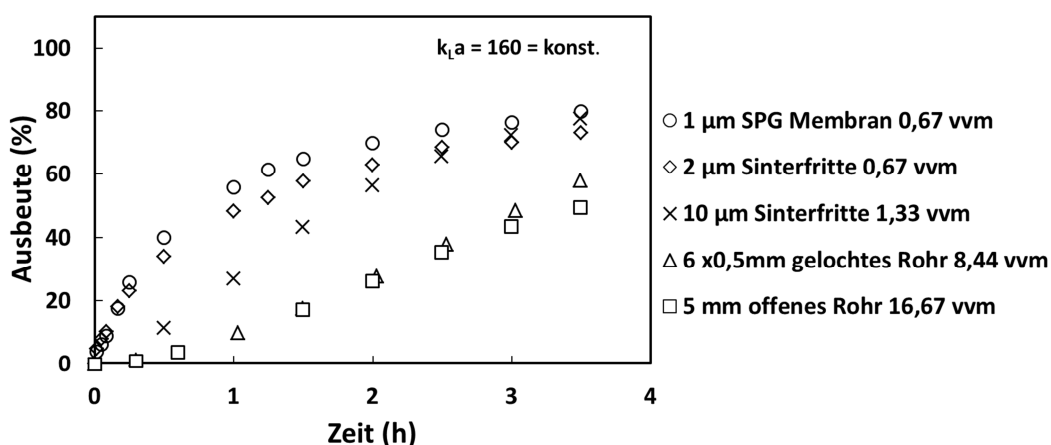


Abb. 49: Begaservergleich bezüglich der Ausbeute einer GOx katalysierten Gluconolactonsynthese bei konstanter Stofftransportrate ($k_L a$) (Reaktionsbedingungen: $T = 35^\circ\text{C}$, $V = 0,3$ mL, 87,6 mM D-Glucose, 11865 U GOx, 12320 U Katalase, 10 mM Na-Acetatpuffer, $\text{pH} = 5,3$, Schrägblattrührer 440 rpm, Titration mit 1 M NaOH in Wasser, $n = 1$).

Wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben, ist neben der Erhöhung des Stofftransports auch die Auswirkung der Begasung auf die Enzymstabilität von entscheidender Bedeutung. Bei der Ausbeute von $Y = 40\%$ der Gluconolactonsynthese (Abb. 49) resultiert, bei konstantem $k_L a = 160$ 1/h, eine um den Zeiteffektivitätsfaktor η_{op} längere Reaktionszeit. Der Zeiteffektivitätsfaktor η_{op} nach Gleichung (44) ist in Abb. 50 dargestellt. Bezogen auf die Begasung mit der 1 μm SPG Membran bei konstantem $k_L a = 160$ 1/h wurde ein η_{op} berechnet von 5,71 für das 5 mm offene Rohr, 5,22, für das gelochte Rohr, 2,5, für die 10 μm Sinterfritte und 1,2 für die 2 μm Sinterfritte (Abb. 50).

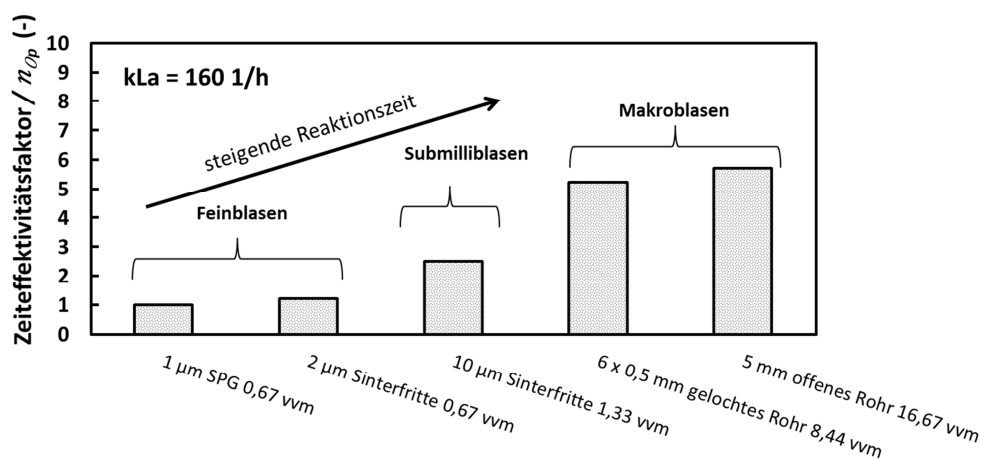


Abb. 50: Vergleich der Zeiteffektivitätsfaktor η_{op} ($T = 35^\circ\text{C}$, $V = 0,3$ mL, 87,6 mM D-Glucose, 11865 U GOx, 12320 U Katalase, 10 mM Na-Acetatpuffer $\text{pH} = 5,3$, Schrägblattrührer 440 rpm, Titration mit 1 M NaOH in Wasser, $n = 1$, ausgewertet bei $Y = 40\%$)

Im direkten Vergleich konnte eine deutlich schnellere Reaktion bei der Begasung mit Feinblasen festgestellt werden. Dieser Effekt bestätigt den in Abschnitt 3.4.2 beschriebenen Zusammenhang, dass neben der Stofftransportoptimierung auch die Enzymstabilität, in Abhängigkeit von der generierten Blasengröße, einen signifikanten Einfluss auf die Ausbeute der Reaktion hat. Da nur die Begasungssysteme variiert wurden, sollte der Unterschied zwischen Fein- Submilli- und Makroblasenbegasung mit den begasungsgekoppelten Effekten zusammenhängen. Die Blasengröße

beeinflusst hierbei die Wechselwirkung zwischen Enzym und Gas-Flüssigkeits-Grenzfläche, welche eine Deaktivierung des Enzyms verursachen kann (Bhagia et al. 2018; Dias Gomes et al. 2019a; D'Imprima et al. 2019). Dadurch resultieren die Abweichungen in den Ausbeutekurven (Abb. 47).

Für eine weitere Interpretation der Begasungsergebnisse wurden die Produktivitäten nach der Reaktionszeit von 3,5 h bei $k_L a = 160 \text{ 1/h}$ = konstant ausgewertet (Abb. 49). Nach 3,5 h wurden folgende Produktivitäten erreicht: 12,7 g/L für das offene Rohr, 15,1 g/L für das gelochte Rohr, 20,4 g/L für die 10 μm Sinterfritte, 19,4 g/L für die 2 μm Sinterfritte und 21,2 g/L mit der 1 μm SPG Membran (siehe Abb. 49). Die Untersuchung der Produktivität in Abhängigkeit von der Blasengröße mit dem Kriterium eines konstanten Stofftransports ($k_L a = \text{konstant}$) ermöglichte die Untersuchung anderer Parameter, welche die Produktivität der Modellreaktion beeinflussen. Mit der Annahme einer idealen thermodynamischen Reaktion führen konstante Stoffübergangsleistungen zu identischen Gleichgewichtsausbeuten. Hingegen sind, im Vergleich von Fein-, Submilli- und Makroblasenbegasung, deutliche Abweichungen der Ausbeutekurven gemessen worden (wie in Abb. 49 dargestellt). Insgesamt wurde eine signifikante Steigerung der Produktivität durch Anwendung von Feinblasen im Vergleich zur Begasung mit Makroblasen bei $k_L a = \text{konstant}$ erreicht. Vor allem die erhöhte Wechselwirkung zwischen Enzym und Gas-Flüssigkeits-Grenzfläche in Folge hoher Begasungsraten, kann zu einer beschleunigten Deaktivierung des Enzyms beitragen (Bhagia et al. 2018; Dias Gomes et al. 2019a; D'Imprima et al. 2019)

Um die Effekte der Gasausnutzung und der Enzymdeaktivierung zu betrachten, kann die im Produkt gebundene, mit der dem System zugeführten Sauerstoffmenge, in Bezug gesetzt werden. Mit der Atombilanz wurde die im Produkt gebundene, zu der eingetragenen Sauerstoffmenge in Relation gesetzt. Somit ergibt sich für die Sauerstoffatomökonomie $\eta_{O_2 \text{ economy}}$ folgende Gleichung (45):

$$\eta_{O_2 \text{ economy}}(\%) = \frac{n_{\text{Gluconsäure}}}{2 \cdot t \cdot \dot{n}_{O_2 \text{ Total}}} \quad (45)$$

Folglich kann der Prozentsatz des gebundenen Sauerstoffs als Verhältnis der in der Gluconsäure gebundenen Sauerstoffmenge ($n_{\text{Gluconsäure}}/2$) zum molaren Sauerstoffstrom $\dot{n}_{O_2, \text{Total}}$ der durch die Begasungsrate in das System pro Zeiteingeführt t eingeführt wird, ausgedrückt werden. Wie in Abb. 51 dargestellt, wird die Sauerstoffatomökonomie durch Begasung mit Verringerung der generierten Blasengröße in den Submilli- und Feinblasenbereich gesteigert. Im Vergleich zur Begasung mit dem offenen Rohr wurde eine erhöhte Sauerstoffatomökonomie um den Faktor 2,3 für das gelochte Rohr, Faktor 20 für die 10 μm Sinterfritte, Faktor 38 für die 10 μm Sinterfritte und Faktor 41 für die 1 μm SPG Membran erreicht. Die Sauerstoffatomökonomie der Begasung mit Feinblasen betrug 5% für 1 μm SPG Membran und 4,7% für die 2 μm Sinterfritte, was die Effizienz dieser Begasungssysteme veranschaulicht. Im Gegensatz dazu wurden nur geringe Stoffmengen von 0,14% des eingebrachten Sauerstoffs bei Begasung mit Makroblasen (5 mm offenes Rohr) in dem Produkt Gluconsäure gebunden. Zusätzlich konnte durch die geringeren Begasungsraten mit Feinblasenbegasung, bei gleichen Stofftransportraten, eine verringerte Deaktivierung der GOx durch Reduktion der Phasengrenzflächenenergie, wie zuvor in Abschnitt 3.4.3.2 beschrieben, erreicht werden.

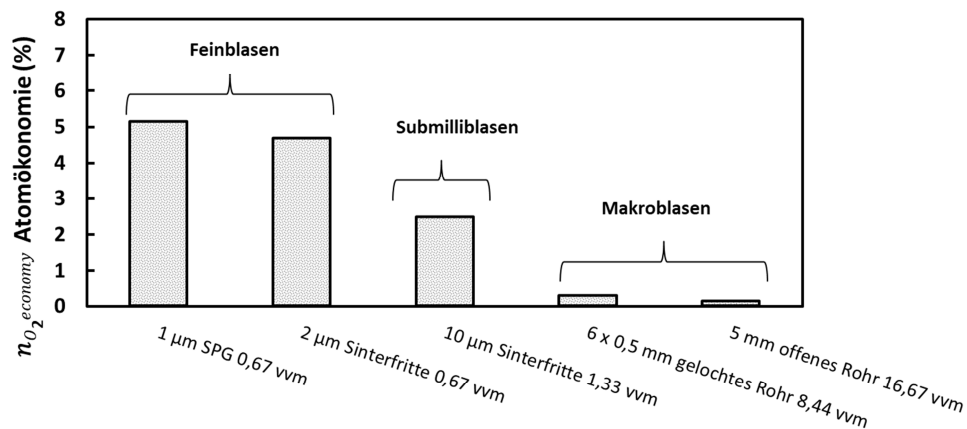


Abb. 51: Vergleich der Sauerstoffatomökonomie bei konstantem $k_L a$ (Reaktionsbedingungen: $T = 35^\circ\text{C}$, $V = 0,3 \text{ mL}$, $87,6 \text{ mM D-Glucose}$, 11865 U GOx , 12320 U Katalase , $10 \text{ mM Na-Acetatpuffer pH} = 5,3$, Schrägblattrührer 440 rpm , Titration mit 1 M KOH in Wasser, $n = 1$)

Dies unterstreicht die hohe Effizienz der Feinblasenbegasung im Hinblick auf die Gasnutzung, ihr enormes Potenzial zur Reduzierung des Gasdurchsatzes, die Verringerung der Enzymdeaktivierung und der Optimierung von begasten Prozessen in der Biokatalyse. Dennoch steht die exakte experimentelle Untersuchung der lokalen Wechselwirkungen, welche zu einer Denaturierung des Proteins an der Phasengrenzfläche führen, noch aus. Die Reproduktion der Ergebnisse bei konstantem $k_L a = 160 \text{ 1/h}$ sind für ein weiteres Reaktionssystem, katalysiert durch ein anderes Enzym, erforderlich, um auszuschließen, dass die hier beobachteten und beschriebenen Effekte nicht rein GOx typisch sind.

Eine Möglichkeit zur weiteren Erhöhung der Sauerstoffatomökonomie ist die Beaufschlagung des GOx- Reaktionssystems mit Druck, wodurch die Löslichkeit von Sauerstoff deutlich gesteigert werden kann. Mit Gleichung (45) und den Werten von Bolivar *et al.* kann durch Begasung mit reinem Sauerstoff und Systemdrücken von $17 - 34 \text{ bar}$ in einen Festbettreaktor mit immobilisierter GOx eine theoretische Sauerstoffökonomie von $23 - 93\%$ erreicht werden (Bolivar *et al.* 2019). Auch die Begasung mit reinem Sauerstoff oder mit Sauerstoff angereicherter Luft kann eine Erhöhung der Sauerstoffökonomie bewirken (Bolivar *et al.* 2019; Lee 2020b). Eine weitere Möglichkeit die Deaktivierung durch Interaktion des Enzyms mit der Gas/Flüssigphasengrenzfläche zu reduzieren, ist die Immobilisierung der GOx. Jedoch wird durch eine Immobilisierung eine zusätzliche Diffusionsbarriere geschaffen, welche den Stofftransport erheblich einschränken kann.

3.5.3 Anwendung der Feinblasentechnologie am Beispiel einer L-DOPA

Synthese sowie Selektivitätsoptimierung

Als zweites Anwendungsbeispiel wurde die Oxidation von L-Tyrosin, katalysiert durch eine Tyrosinase (TYR), untersucht. Wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben, eignet sich die TYR als Referenzsystem zur GOx. Besonders bieten die hohe enzymmengenspezifische Sauerstoffverbrauchsrate von $3750 \mu\text{mol/min/mg}$ und die $Da^* = 17,24$ ein großes Potenzial für die Anwendung der Feinblasenbegasung.

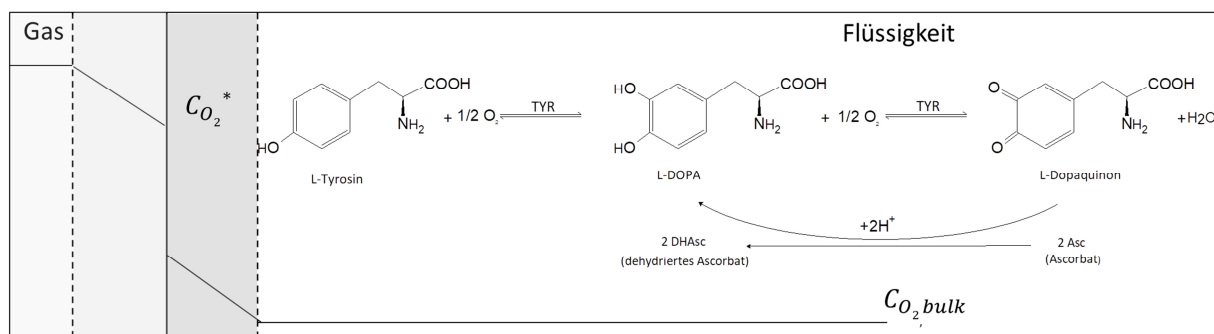


Abb. 52: Reaktionsschema der chemo-enzymatischen L-DOPA Synthese mit enzymatischer Oxidation von L-Tyrosin durch Tyrosinase (TYR) und chemischer Reduktion des Folgeproduktes zum Produkt L-DOPA durch Ascorbat (Asc).

In der Oxidationsreaktion von L-Tyrosin entsteht in einem ersten Schritt L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA), welches in einer wiederum durch Tyrosinase katalysierten Folgereaktion weiter zu L-Dopachinone oxidiert wird. Diese Dopachinone reagieren autokatalytisch weiter, wodurch Polymere entstehen. Zur Unterdrückung der Folgereaktion und Identifizierung optimaler Reaktionsbedingungen wurden der pH, das Puffersalz und der Einsatz von neutralisierter Ascorbinsäure (Na-Ascorbat) in Abschnitt 3.1.2, untersucht. Lediglich durch den Einsatz von 40 mM Ascorbat konnte eine zeitweise Unterdrückung der Folgereaktion, sowie der Polymerbildung herbeigeführt werden. Wie in Abb. 52 dargestellt, stellt sich durch den Einsatz von Ascorbat ein Gleichgewicht zwischen enzymatischer Oxidation und chemischer Reduktion ein. Hierbei ist die Selektivität S der Anteil des umgesetzten Ausgangsstoffes X (Umsatz), welcher in das gewünschte Produkt Y (Ausbeute) unter Berücksichtigung der Stöchiometrie umgesetzt wurde. Für die L-DOPA Synthese kann S als das Verhältnis aus Ausbeute an L-DOPA zu Umsatz an L-Tyrosin Y verstanden werden. Im Gegensatz zur GOx katalysierten Gluconsäure Synthese, welche selektiv mit $S = 1$ abläuft, ist die Selektivität der L-DOPA Synthese vom Verhältnis der eingesetzten Enzymmenge zur Konzentration des Ascorbats abhängig. Somit kann die Sauerstoffökonomie nicht analog zur GOx Reaktion betrachtet werden, sondern wird zusätzlich durch die Folgereaktion (sinkende Selektivität) beeinflusst.

Um die Auswirkung einer Feinblasenbegasung auf den Umsatz und die Ausbeute zu untersuchen, sollte die Selektivität der L-DOPA Synthese in die Diskussion einbezogen werden. Basierend auf den Enzymstabilitätsuntersuchungen in Abschnitt 3.4.1 konnte eine hohe Deaktivierung für TYR bei Makroblasenbegasung ($k_L a = 160$ 1/h) festgestellt werden. Daher wurde eine Deaktivierung und damit eine Reduktion der aktiven Enzymmenge mit Makroblasenbegasung im Vergleich zu Feinblasenbegasung auch in der L-DOPA Synthese erwartet. Im Umsatzverlauf (siehe Abb. 53 A) bezogen auf L-Tyrosin zeigte sich, dass bei konstantem $k_L a$ von 160 1/h mit Feinblasenbegasung nach 45 min nahezu Vollumsatz erreicht wurde. Wurde die Reaktion hingegen mit Makroblasen begast, erreichte der Umsatz nur 72%. Dieses Experiment weist auf eine vergleichbare Tendenz zu den Begasungsversuchen mit dem Enzym GOx hin (Abschnitt 3.5.2). Somit konnte erfolgreich mit einem unabhängigen zweiten Reaktionssystem der positive Effekt auf den Reaktionsfortschritt bei konstantem $k_L a$ Wert reproduziert werden. Wie zuvor beschrieben (Abschnitt 3.4.2), ist auch hier eine erhöhte Enzymdeaktivierung als Resultat der Makroblasenbegasung ein Grund für geringere Umsätze an L-Tyrosin in der Makroblasenbegasung.

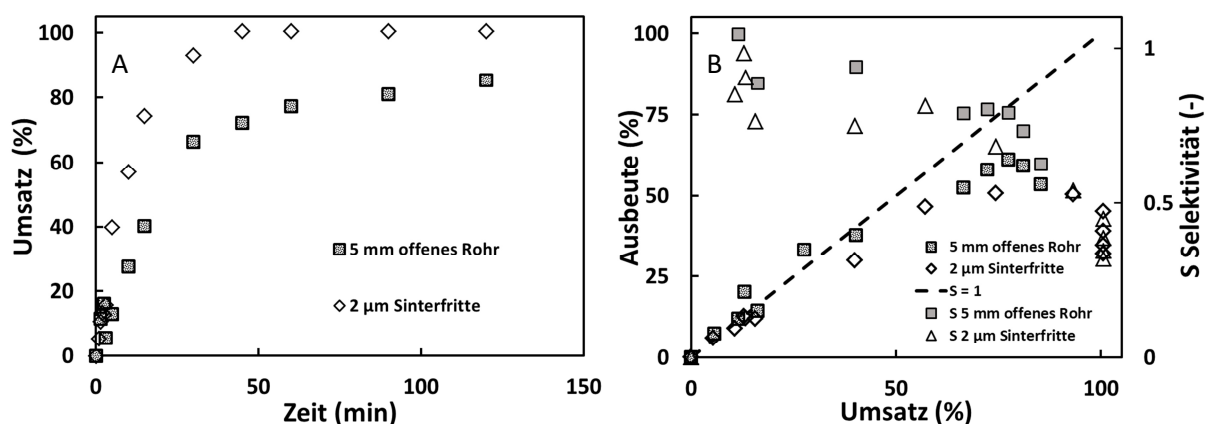


Abb. 53: Vergleich der Fein- und Makroblasenbegasung mit 0,05 mg/mL Tyrosinase, A: Umsatz und B: Selektivität (S) der L-DOPA-Synthese (Reaktionsbedingungen: 15 mg Tyrosinase auf 0,3 L Reaktionsansatz mit 1 mM L-Tyrosin, 40 mM Ascorbat und 50 mM KP_i Puffer, pH 6,5 bei 15°C, Begasung mit 0,67 vvm mit 2 µm Sinterfritte und 16,67 vvm mit 5 mm offenem Rohr, Schrägblattrührer 430 rpm, n = 1).

Jedoch sinkt die Selektivität der L-Tyrosin Umsetzung (Abb. 53, B). In Anbetracht des Reaktionsgleichgewichts aus enzymatischer Oxidation und chemischer Reduktion mit Ascorbat ist folglich eine weitere Optimierung der Ausbeute an L-DOPA, durch die Reduktion der eingesetzten Enzymmenge zu erreichen. Dieser Zusammenhang, konnte durch die Reduktion der vorgelegten Tyrosinasemenge von 0,05 mg/mL auf 0,025 mg/mL beobachtet werden, siehe dazu Abb. 54. Eine weitere Möglichkeit, die Selektivität zu steigern, stellt die Erhöhung der Ascorbatkonzentration dar. Jedoch kann Ascorbat in höheren Konzentrationen einen negativen Effekt auf die Enzymaktivität haben. Auch bei einer Halbierung der Enzymmenge konnte die Folgereaktion durch die eingesetzte Ascorbatkonzentration von 40 mM bei Feinblasenbegasung nicht vollständig unterdrückt werden. Es war eine deutlich Steigerung der Selektivität und der Ausbeute im Vergleich zur Enzymkonzentration von 0,05 mg/mL zu beobachten.

In der mit Makroblasen begasten Reaktion, siehe Abb. 54, konnte, als Folge der hohen Deaktivierung der TYR, die Selektivität zu $S = 1$ gesteigert werden. Dennoch war sie nicht zielführend. Ziel sollte die Optimierung des Verhältnisses von eingesetzter Enzymmenge zu Ascorbat sein. Hierbei wird das Gleichgewicht zwischen der enzymatischen Oxidation und der chemischen Reduktion durch die Enzymmenge und die Ascorbat-Konzentration beeinflusst. Wenn das beschriebene Gleichgewicht zugunsten der L-DOPA Synthese verschoben wird, kann ein direkter Vergleich der Ausbeuten mit der GOx Reaktion durchgeführt werden. Dennoch konnte auch in der L-DOPA Synthese (Abb. 54) der Effekt der geringen Enzymdeaktivierung durch Feinblasenbegasung beobachtet werden. Weiterhin konnten die im GOx System beobachteten Effekte auch mit dem Tyrosinase System reproduziert werden. Diese Effekte wurden insbesondere durch die Feinblasenbegasung mit folgender Optimierung des Enzymeinsatzes, bei gleichzeitiger Verringerung des benötigten Prozessgasstroms, verdeutlicht.

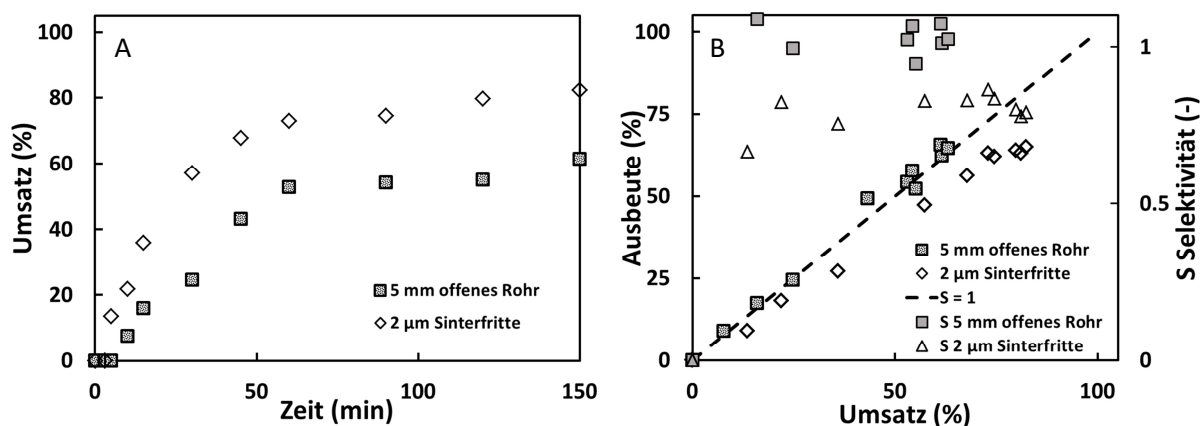


Abb. 54: Vergleich der Fein- und Makroblasenbegasung mit 0,013 mg/mL Tyrosinase, A: Umsatz und B: Selektivität (S) der L-DOPA-Synthese (Reaktionsbedingungen: 15 mg Tyrosinase auf 0,3 L Reaktionsansatz mit 1 mM L-Tyrosin, 40 mM Ascorbat und 50 mM KP_i Puffer, pH 6,5 bei 15°C, Begasung mit 0,67 vvm mit 2 µm Sinterfritte und 16,67 vvm mit 5 mm offenem Rohr, Schrägblattrührer 430 rpm, n = 1).

Nachfolgend wird auf die weiteren Optimierungsansätze und die Limitierungen bei der Erhöhung der L-DOPA Ausbeute kurz eingegangen, welche für weitere Experimente mit TYR eingesetzt werden könnten. Neben der geringen Löslichkeit von Sauerstoff besteht eine weitere Limitation durch die geringe Löslichkeit des Substrats L-Tyrosin mit lediglich 0,38 g/L in Wasser bei 20°C (Datenblatt Merck 2020). Hingegen weist L-DOPA eine Löslichkeit von 1,65 g/L (Datenblatt Thermo Fisher Scientific 2019) auf.

Ein weiter Lösungsansatz kann der Einsatz von Lösungsvermittlern wie Dimethylsulfoxid (DMSO) zur Erhöhung der Löslichkeit von L-Tyrosin sein. Seo *et al.* berichtet, dass manche Tyrosinasen aus Pilzen wie *Agaricus bisporus* durch DMSO kompetitiv inhibiert werden (Seo et al. 2003). Weiter wird für Tyrosinasen aus Pilzen berichtet, dass schon geringe DMSO-Konzentrationen zu einer reversiblen Inaktivierung der Tyrosinase führen, wobei ein Aktivitätsverlust (IC_{50}) von 50% bei einer DMSO Konzentration von 2,45 M im wässrigen Medium stattfindet (Chen et al. 2003). Eine Erhöhung der L-Tyrosinlöslichkeit mittels Lösungsvermittlern wie DMSO kann zur erhöhten Bildung von L-DOPA und infolge des Reaktionsgleichgewichts auch von Dopaquinon führen. Die Ascorbat-Konzentration müsste dann erhöht werden (Ros et al. 1993). Hierbei könnte durch das Ascorbat ein erhöhter Aktivitätsverlust der TYR auftreten, welcher in weiteren Experimenten untersucht werden sollte.

Durch Extraktion des L-DOPA in eine zweite organische Phase „*in situ* product removal“ könnte die Ausbeute gesteigert werden, was zukünftig überprüft werden sollte. Zusätzlich besteht die Möglichkeit der Immobilisierung der TYR und Integration in einen kontinuierlichen Prozess, wie in einem Festbettreaktor (Guan et al. 2016; Lasmi et al. 2018). Hierbei könnte die Deaktivierung der TYR oder GOx durch räumliche Trennung des Enzyms von der eingebrachten Grenzphase reduziert werden. Zur Differenzierung werden im nächsten Abschnitt die Anwendung der GOx und TYR im gelösten und immobilisierten Zustand verglichen.

3.5.4 Immobilisierung von Glucoseoxidase (GOx) und Tyrosinase (TYR)

Im Gegensatz zur Anwendung von gelösten Enzymen, verspricht deren Immobilisierung die Etablierung von kontinuierlichen Prozessen mit einer erhöhten Enzymstabilität, mit vereinfachter Wiederverwendung und erleichterter Abtrennung des Katalysators vom Produktstrom (DiCosimo et al. 2013; Liese and Hilterhaus 2013). Wie in den vorherigen Abschnitten angeführt, besteht die Möglichkeit die GOx, sowie die TYR durch Anbindung an ein Trägermaterial zu immobilisieren, und damit eine Wiederverwendung des Enzyms, sowie den Einfluss der Begasung auf die Enzymstabilität, zu reduzieren. Folglich wurden, in einem ersten Anwendungstest der Umsatz und die Ausbeute von gelöstem und immobilisiertem Enzym im feinblasenbegasteten STR bei konstantem Stofftransport von $k_L a = 160 \text{ 1/h}$, untersucht. In der Literatur ist eine Vielzahl an Immobilisierungsmethoden für die adsorptive und kovalente Anbindung von GOx, sowie TYR zu finden. In Bolivar *et al.* wurde eine GOx aus *A. niger* und Katalase adsorptiv an ein poröses Polymethylmethacrylat -(PMMA) co-immobilisiert und erfolgreich in Festbettreaktoren unter Druck eingesetzt (Bolivar et al. 2019). Weiter konnte Lasmi *et al.*, mittels Succinimidylester die Oberfläche von porösen Siliconpartikeln funktionalisieren und eine Tyrosinase kovalent anbinden (Lasmi et al. 2018). Bayramoglu *et al.* beschreibt die kovalente Anbindung einer Tyrosinase auf Silikapartikeln mittels Glutaraldehyd (Bayramoglu et al. 2013). Diese Anbindungsmethode konnte auch erfolgreich für die Immobilisierung der TYR an Polyamid 12 (PA12) etabliert werden (Pahujani et al. 2008). Deshalb wurden dieses Trägermaterial und die Immobilisierungsmethode für die Experimente mit TYR und GOx im begasteten Rührkessel im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt. Um eine Vergleichbarkeit von TYR und GOx sicherzustellen, wurden beide Enzyme auf, mit Glutaraldehyd funktionalisierten Polyamid 12(PA12)- Partikeln, immobilisiert. Hierzu konnte jeweils die gleiche Enzymmenge, welche für die Versuche mit dem freien Enzym eingesetzt wurde, auch für die Immobilisierung an die PA12-Träger verwendet werden. Dabei konnten der Umsatz und die relative Restaktivität für TYR und GOx im begasteten Rührkessel verglichen werden. Beginnend mit der TYR war nach 3 h ein deutlich geringerer Umsatz von 18,5% (erster Batch) mit immobilisierter TYR im Vergleich zu gelöster TYR mit 81% messbar (Abb. 55 A).

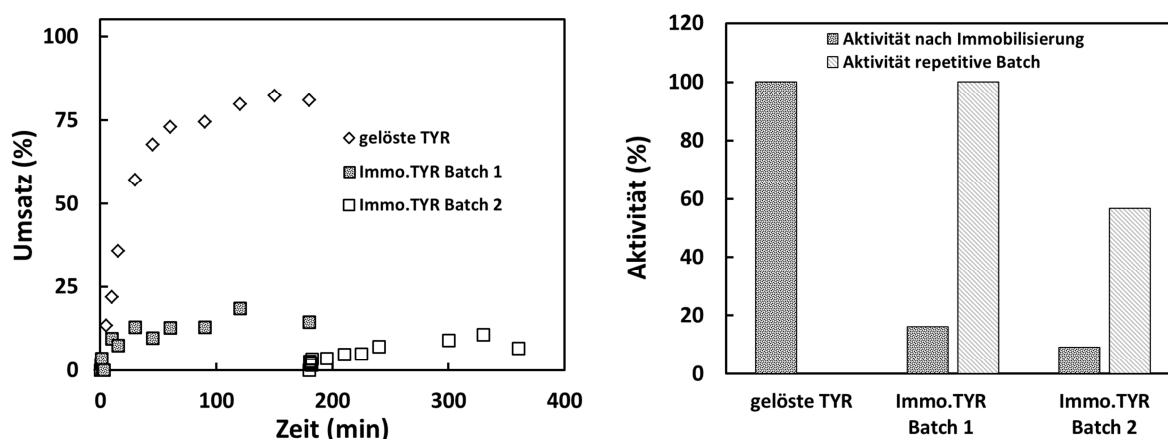


Abb. 55: Wiederholte Batchversuche der immobilisierten Tyrosinase am Beispiel der L-DOPA Synthese (6 g PA12, immobilisiert mit Enzymlösung 1 mg/mL/0,4g_{Träger} Tyrosinase auf 0,3 L Reaktionsansatz mit 1 mM L-Tyrosin, 40 mM Ascorbat und 50 mM KP_i Puffer, pH 6,5 bei 15°C,

Begasung mit 0,67 vvm mit 2 μ m Sinterfritte und 16,67 vvm mit 5 mm offenes Rohr, Schrägblattrührer 430 rpm, n = 1)

Wird nun aus den Umsatzverläufen die Anfangsaktivität bestimmt, so kann eine Reaktivität bezogen, auf die eingesetzte Enzymmenge bei der Immobilisierung berechnet werden. Es resultierte ein Verlust an Aktivität durch Immobilisierung zur freien TYR von 84% im ersten Batch und 91% im zweiten Batch (Abb. 55). Infolge der Wiederverwendung der immobilisierten TYR wurde eine Restaktivität von 57% im Vergleich zum ersten Batch, geringe Umsätze sowie eine Selektivität nahe $S = 1$ festgestellt (Abb. 56). Obwohl die Anbindung mittels Glutaraldehyd als kovalente Immobilisierungsmethode bekannt war, wurde für die verwendete Methode beschrieben, dass das Enzym auch zu großen Teilen adsorptiv an den Träger gebunden wird (Bayramoglu et al. 2013; Pahujani et al. 2008; Sheldon 2007).

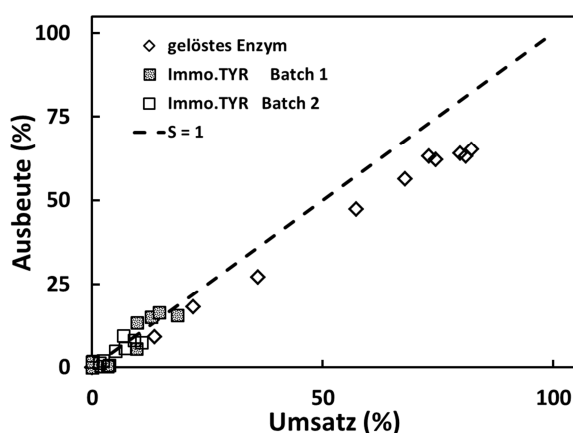


Abb. 56: Vergleich der Reaktionsselektivität von gelöster und immobilisierter Tyrosinase (TYR) (Reaktionsbedingungen : 6 g PA12, immobilisiert mit Enzymlösung 1 mg/mL/0,4g_{Träger} Tyrosinase auf 0,3 L Reaktionsansatz mit 1 mM L-Tyrosin, 40 mM Ascorbat und 50 mM KP_i Puffer, pH 6,5 bei 15°C, Begasung mit 0,67 vvm mit 2 μ m Sinterfritte und 16,67 vvm mit 5 mm offenem Rohr, Schrägblattrührer 430 rpm, n = 1)

Bei gelöster TYR war eine größere Aktivität, und somit eine höhere Nebenproduktbildung bei hohen Umsätzen zu beobachten (Abb. 56). Folglich kann der Waschschrift zu einer Reduktion des immobilisierten Enzyms führen. Diese Reduktion an TYR Aktivität, führte zur Verringerung der Konzentration von TYR zur Konzentration des eingesetzten Ascorbat. In der Folge geringer TYR Konzentrationen wurden lediglich kleine Umsätze mit einer Selektivität von $S = 1$ erreicht (siehe Abb. 56). Weiter könnte durch die langen Zeitabstände beim Abfiltrieren der Träger (bei Raumtemperatur ca. 2 h), die Inkubationszeit von 24 h bei 4°C bei der Immobilisation, sowie durch den Waschschrift ein zusätzlicher Aktivitätsverlust verursacht worden sein. Dementsprechend sollte in weiteren Experimenten die eingesetzte Menge an Immobilisat erhöht werden. Verschiedene Trägermaterialien mit größerer Oberfläche als PA12 und andere Immobilisierungsmethoden mit höherer Ausbeute könnten zukünftig getestet werden. Zusätzlich zu den genannten Effekten können sich die sehr kleinen PA12 Partikel mit $d = 50 \mu$ m auch durch Flotation im oberen Teil des Reaktors akkumulieren, welches zu geringeren Umsätzen führen würde (Farrokhpay et al. 2020; Li et al. 2016; Tao 2005). Der hohe Aktivitätsverlust durch Immobilisierung im vorliegenden Experiment steht in keinem Verhältnis zur Wiederverwendung des Immobilisats. Somit ist diese Methode als wenig geeignet zu betrachten.

Neben der TYR konnte die GOx erfolgreich an PA12 immobilisiert und im begasten STR getestet werden. Der Katalysator wurde dem Reaktionsmedium auch in gelöster Form zugesetzt. Im Gegensatz zur chemo-enzymatischen Reaktion der TYR wurde D-Glucose selektiv ($S = 1$) durch die GOx zu Gluconolacton umgesetzt ($X = Y$). Im Vergleich zur TYR wurde die Reaktionszeit von 3 auf 6 h verlängert. Das Vorgehen in der Immobilisierung erfolgte analog zur TYR. Wie in Abb. 57 dargestellt konnte mit einer Aktivität von 11840 U gelösten GOx nach 6 h eine Ausbeute von 87% erzielt werden.

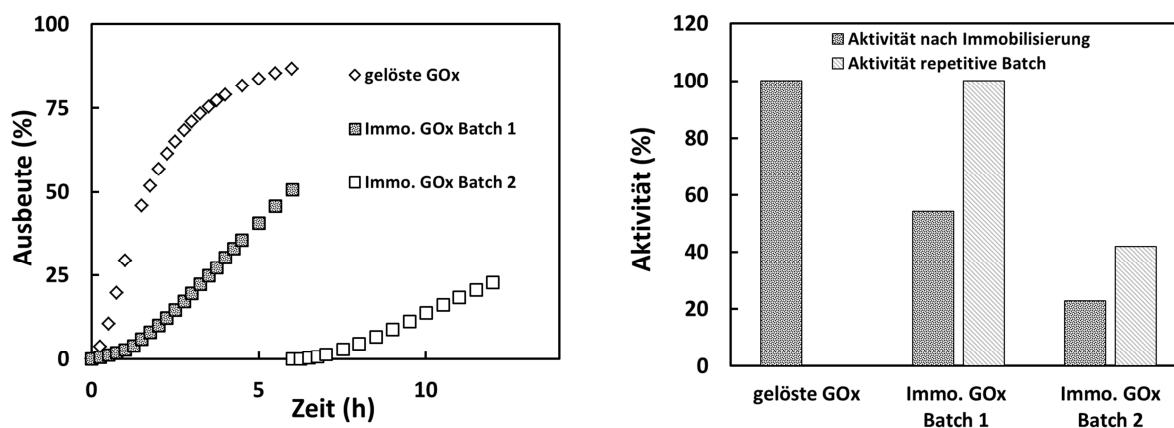


Abb. 57: Wiederholte Batchversuch der immobilisierten Tyrosinase am Beispiel der L-DOPA Synthese (11840 U GOx, GOx Aktivität ~ 450 U/mg, 6 g PA12, immobilisiert mit Enzymlösung 1,2 mg/mL/0,4g_{Träger}, $T = 35^\circ\text{C}$, $V = 0,3$ L, 87,6 mM D-Glucose, 11865 U GOx, 12320 U Katalase, 10 mM Na-Acetatpuffer pH = 5,3, Schrägblattrührer 440 rpm, Titration mit 1 M NaOH in Wasser, $n = 1$)

Im Gegensatz dazu betrug die Ausbeute nach dem ersten Batch (nach 6 h) mit der Immobilisierung, lediglich 51%. Der deutliche lineare Verlauf der Ausbeutekurven kann auf eine Stofftransportlimitierung am Trägermaterial hindeuten. Dennoch zeigte die GOx eine höhere Aktivität nach Anbindung an die funktionalisierten PA12 Träger. Der wiederholte Einsatz des GOx Immobilisats führte zu einem ähnlichen Aktivitätsverlust von 58% im Vergleich zum ersten Batch und zu den Versuchen mit TYR.

Die Immobilisierung der GOx ist deutlich vielversprechender, als die der TYR. Dieses wird durch die zahlreichen etablierten Prozesse in der Industrie bestätigt (Godjevargova et al. 2004; Mafra et al. 2015). Der Aktivitätsverlust durch die Immobilisierung von TYR und GOx, sowie die scheinbare Halbierung der Aktivität von Batch zu Batch mit beiden Enzymen ist allerdings höher, als der Aktivitätsverlust durch den direkten Gasphasenkontakt. Aus der Abwägung des Aktivitätsverlustes, ist die Feinblasenbegasung mit gelöstem Enzym, der Immobilisierung mit der verwendeten Methode im begasten STR vorzuziehen. Die Immobilisierung ist jedoch sehr vorteilhaft in Hinblick auf die kontinuierliche Produktion. Hier könnte durch Optimierung der Immobilisierungsmethoden, andere Trägermaterialien, Enzyme-Engineering der TYR und GOx die Produktivität deutlich gesteigert werden.

3.5.5 Fazit

Mit einfachen mikroporösen Sinterfritten können zuverlässig Feinblasen erzeugt werden. Sie können erfolgreich zur Steigerung des Umsatzes und der Ausbeute in enzymatischen Reaktionen eingesetzt werden. Folgende Vorteile der Begasung mit Feinblasen konnten in dieser Arbeit identifiziert werden:

- Hohes Potenzial der Feinblasenbegasung zur Optimierung von Oxidationsreaktionen
- Gesteigerte Gasnutzungseffizienz und Stofftransport ($k_L a$)
- Einführung eines Optimierungparameter der Da^* für die enzymatische Reaktion
- Verringerte Enzymdeaktivierung durch Feinblasenbegasung
- Steigerung der Ausbeute und des Umsatzes enzymatischer Reaktionen
- UFB zeigen keinen Einfluss auf die Aktivität und Ausbeute einer Gluconolactonsynthese

In dieser Arbeit konnte ein positiver Effekt durch Feinblasenbegasung auf die Produktivität, Gasnutzung (Stofftransport) und Sauerstoffatomökonomie festgestellt werden. Die Anwendung von Feinblasen ist eine effektive Methode zur Steigerung der Ausbeuten und zur Verringerung der Enzymdeaktivierung in begasten Enzymlösungen.

4 Übergeordnete Diskussion und Ausblick

Dieses Kapitel dient der Zusammenfassung und übergreifenden Diskussion der im Kapitel 3 dargelegten Ergebnisse, sowie dem Ausblick. Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war es, die Eignung und Anwendbarkeit der Feinblasentechnologie in der Biokatalyse zu untersuchen. Es wurden Limitierungen und Vorteile der Feinblasenbegasung mit etablierten Begasungsmethoden zur Erzeugung von Submilli- und Makroblasenbegasung untersucht und verglichen.

Der Einsatz von Gasen mit geringer Löslichkeit wie Sauerstoff stellt häufig eine Limitierung der Reaktionsgeschwindigkeit dar. Um diese Limitierung zu reduzieren, ist eine kontinuierliche Zufuhr von Sauerstoff durch Begasung notwendig. Daher steigt der Bedarf an effizienten Begasungstechnologien stetig. Sie sollten sich durch einen hohen Stofftransport, geringen Gasverbrauch, geringen Druckverlust und verringerte Schaumbildung auszeichnen (Terasaka and Tsuge 1993; Tsuge 2014). In Folge einer Verkleinerung der Blasengröße durch feinporige Begaser oder spezielle Begasungstechniken, kann mit einem geringeren Gasstrom eine hohe volumenspezifische Grenzfläche bereitgestellt werden. Basierend auf diesem Prinzip, kann die Anwendung der Feinblasentechnologie mit d kleiner 100 μm diesen Anforderungen gerecht werden. Dabei ist die Integration der Feinblasenbegasung in scherarmen Reaktortypen, wie der Blasensäule, durch die niedrige Auftriebsgeschwindigkeit und den geringen Gasstrom (schwacher Impuls des Gasstroms) limitiert. Der Rührkesselreaktor bietet durch den kontrollierten Rührerleistungseintrag eine nahezu homogene Durchmischung des Reaktionsmediums bei gleichzeitig erhöhter Dispersion der Gasblasen. Am Beispiel der ADH/NOX Reaktionssysteme konnten diese Effekte des Rührers und des Strömungsprofils auf die Ausbeute untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Experimente bestätigten die Hypothese, dass die Erhöhung des Leistungseintrags keinen oder lediglich einen geringen Effekt auf die Ausbeute des ADH/NOX Systems hat. Gleiches gilt auch für die Desintegration von Fein- sowie Submilliblasen (generiert mit 0,5 μm , 2 μm und 10 μm Sinterfritte). Mit einem Schrägblattrührer wurden vergleichbare Ausbeuten wie mit einem Scheibenrührer, bei deutlich geringerem Leistungseintrag, erzielt. Um eine gute Durchmischung für die Anwendungen in hochviskösen Flüssigkeiten oder in der Blasensäule zu gewährleisten, sollte keine Feinblasenbegasung, sondern eine Submilli- oder Makroblasenbegasung wegen des größeren Gasimpulses und der höheren Auftriebsgeschwindigkeit, genutzt werden. Daher wurde in dieser Arbeit ausschließlich die Feinblasentechnologie zur Integration in Rührkesselreaktoren untersucht.

Im direkten Vergleich der volumenspezifischen Stofftransportrate ($k_L a$) der Begaser in Abb. 27 ist über den gesamten Bereich von 0,006 - 16,67 vvm der deutliche Vorteil der Begasung mit Feinblasen im Vergleich zu Submilli- und Makroblasen dargestellt. Durch Einführen des Gasverbrauchseffizienzfaktors $\eta_{O_2 \text{ Eff}}$ in Abb. 28, konnte bei konstantem $k_L a$ von 160 1/h ein direkter Vergleich der Makro-, Submilli- und Mikroblasenbegasung, zunächst ohne Reaktion, realisiert werden. Für die Makroblasenbegasung wurde ein 25-mal höherer und für die Submilliblasenbegasung ein 12-mal höherer Gasverbrauch im Gegensatz zur Begasung mit Feinblasen ermittelt. Am Beispiel der Gluconolactonsynthese mit $Da^*/m_{\text{Enzym}} = 1,38/\text{mg}_{\text{Enzym}}$ konnte, bei konstanter Begasungsrate von 0,67 vvm, eine Steigerung der Ausbeute um ~40% im Vergleich zur Makroblasenbegasung erzielt werden. Diese Ergebnisse unterstreichen das große Potenzial der Feinblasenbegasung für die Anwendung in enzymatischen Reaktionen im Rührkessel.

Die Sekundärblasenbildung an feinporösen Materialien ab $We \geq 2$ und $We^2/Fr = 675$ ist limitierend für die Bildung von Feinblasen und somit für den Stofftransport des Begasers. Daher sind für eine Maßstabsvergrößerung die poröse Begaseroberfläche zu erhöhen, oder mehrere Sinterfritten parallel zu installieren, um einen möglichst hohen Stofftransport zu gewährleisten. Allerdings sind auch bei auftretender Sekundärblasenbildung im Rahmen der Feinblasenbegasung geringere Begasungsraten im Bereich $\leq 1-2$ vvm (Nauha et al. 2015) festgestellt worden. Daher kann die Feinblasenbegasung bei gleichem $k_L a$ deutlich besser in den größeren Maßstab überführt werden, als die Makroblasenbegasung. Weitere Experimente im Pilot- oder größeren Maßstäben sind aber erforderlich.

Die genannten Ergebnisse unterstreichen das hohe Potenzial der Feinblasenbegasung bezüglich des Stofftransports. Um dieses Potenzial auch in enzymatischen Reaktionen nutzen zu können, ist die Verknüpfung des Stofftransports (*OTR*) mit der enzymmengenspezifischen Sauerstoffverbrauchsrate notwendig. Durch die Definition der modifizierten Damköhlerzahl Da^* in Abschnitt 3.2.3 konnte ein Ausdruck für die Beurteilung der Stofftransportphänomene unter Einbeziehung des enzymmengenspezifischen Sauerstoffverbrauchs gefunden werden. Mittels dieser Größe kann für ein beliebiges gasverbrauchendes Reaktionssystem die Annahme der Stofftransportlimitierung überprüft werden. Die Da^* kann auch als Optimierungskriterium $Da^* = 1$ eines bestehenden Prozesses, bezüglich des Enzymeinsatzes und der Optimierung des Stofftransports, in weiterführenden Experimenten verwendet werden. Dieses Vorgehen eignet sich ebenso zur Überprüfung der Stofftransportlimitierung einer Reaktion mit anderen Enzymen oder anderen Substraten wie z.B. H_2 oder CO_2 . Durch Anpassung der Enzymmenge, wie im Fall der GOx mit $Da^*/m_{\text{Enzym}} = 1,38/\text{mg}_{\text{Enzym}}$, konnte mit dem Einsatz von 25 mg (~ 12000 U) eine Stofftransportlimitierung bei $Da^* \geq 1$ sichergestellt und demonstriert werden.

Wie zuvor dargestellt, ist die Einstellung der Stofftransportlimitierung von der eingesetzten Enzymaktivität abhängig. Neben dem Stofftransport ist die Enzymstabilität im begasten System von entscheidender Bedeutung, um hohe Reaktionsgeschwindigkeiten aufrecht zu erhalten. In einer Vielzahl von Studien konnte gezeigt werden, dass eine Gas-Flüssigphasengrenzfläche zu einer erhöhten Enzymdeaktivierung durch Proteinfaltung führt (Bhagia et al. 2018; Dias Gomes et al. 2019a; D'Imprima et al. 2019; Donaldson et al. 1980). Diese Aussage wurde am Beispiel der GOx erfolgreich demonstriert. Die Feinblasenbegasung führte über den gesamten Arbeitsbereich zu einem geringeren Aktivitätsverlust im Vergleich zur Submilli- und Makroblasenbegasung. Vor allem durch die geringe Phasengrenzflächenenergie, als Resultat der hohen Verweilzeiten von Feinblasen, konnte ein deutlicher Enzymstabilitätszugewinn im Vergleich zur Submilli- und Makroblasenbegasung erzielt werden. Der qualitative Effekt der erhöhten Enzymstabilität durch Feinblasenbegasung wurde am Beispiel von sechs verschiedenen Enzymen (GOx, NOX, TYR, GDH, ADH und P450) im Vergleich zur Makroblasenbegasung bei einem $k_L a$ von 160 1/h gezeigt. Hierbei konnte kein direkter Einfluss des Leistungseintrags und der Oxidation durch gelösten Sauerstoff auf die Enzymstabilität festgestellt werden. Es zeigte sich, dass Scherkräfte, welche durch Rühren, Gasimpulse, Koealeszenz sowie Blasen aufplatzen auf das Enzym wirken, durch die Bestimmung der kleinsten (durch Energiedissipation) erzeugten Wirbel (Kolmogorov-Länge), nicht beeinflusst werden können. Am Beispiel der GOx mit einer Größe von $\leq 7-14 \times 10^{-4}$ μm wurde demonstriert, dass die Kolmogorov-Länge um den Faktor 100-1000 größer ist, als der hydrodynamische Durchmesser der GOx. Dabei ist der Anteil der Scherkräfte zur Erzeugung oder Stabilisierung der Grenzfläche zu berücksichtigen und

sollte in weiteren Experimenten durch Blasengrößenmessung und Enzymstabilitätsmessung untersucht werden. Da alle Stabilitätsuntersuchungen ohne Begasung in mit sauerstoffgesättigten Puffern durchgeführt wurden, kann von einem geringen bis nicht signifikanten Effekt durch Oxidation des Enzyms ausgegangen werden. Der Einfluss der Oxidation kann sich unterschiedlich für jede Mutante und jede Präparation auswirken und wurde nur für ADH experimentell untersucht. Hierbei resultierte bei Luft-Makroblasenbegasung ($t_{1/2, Luft} = 24,4 \pm 1,2$ h) im Vergleich zu Stickstoff-Makroblasenbegasung ($t_{1/2, Stickstoff} = 22,1 \pm 2,4$ h) kein signifikanter Unterschied in der Enzymstabilität. Die Enzymfaltung könnte durch weiterführende Experimente unter Verwendung von fluoreszenzspektrophotometrischen Methoden in Abhängigkeit von der Phasengrenzfläche untersucht werden. Diese Methode ist geeignet, um die zeitaufgelöste kinetische Entfaltung durch Inline-Messung der Änderungen des Tryptophan-Fluoreszenzspektrums bei einer Anregungswellenlänge von 290 nm, zu verfolgen (Donaldson et al. 1980; Maa and Hsu 1997). Die Enzymdenaturierung als Funktion der Konzentration des hydrophoben Tryptophanrests in einer Lösung kann zu einer Abnahme der gemessenen Fluoreszenzintensität führen.

In den Messungen zeigte sich, dass die Blasengröße einen deutlichen Einfluss auf die Enzymstabilität hatte. In der Gluconolactonsynthese wurden die zuvor beschriebenen Effekte weitergehend untersucht. Bei konstantem Stofftransport von 160 l/h bestätigte sich der zuvor beobachtete, entscheidende Einfluss der Blasengröße auf die Enzymstabilität. Es konnte eine Steigerung der Ausbeute um 30% mit der Feinblasenbegasung realisiert werden. Unter der Bedingung eines konstanten Stofftransports sind lediglich die Blasengröße und die Phasengrenzflächenenergie unterschiedlich. Es konnte festgestellt werden, dass dadurch die Enzymstabilität im Vergleich zum Stofftransport einen größeren Einfluss hat. Eine Erhöhung der Sauerstoffatomökonomie durch Feinblasen führte, im Vergleich zur Makroblasenbegasung, zu einer Steigerung um den Faktor 45. Eine andere Möglichkeit ist die Beaufschlagung mit Druck, wodurch die Löslichkeit von Sauerstoff deutlich gesteigert werden konnte. Auch die Begasung mit reinem Sauerstoff oder mit Sauerstoff angereicherter Luft kann eine Erhöhung der Sauerstoffökonomie bewirken (Bolivar et al. 2019; Lee 2020b).

Mittels des TYR Systems, welches mit $Da^*/m_{Enzym} = 17,24$ /mg ein hohes Potenzial für den Einsatz der Feinblasentechnologie bietet, konnten erfolgreich die zuvor mit GOx beobachteten Effekte auf die Enzymstabilität und den erhöhten Umsatz bestätigt werden. Im Umsatzverlauf (siehe Abb. 53) bezogen auf L-Tyrosin zeigt sich, dass bei konstantem $k_L a$ von 160 l/h mit Feinblasenbegasung nach 45 min nahezu ein Vollumsatz erreicht wurde. Erfolgte die Reaktion hingegen mit Makroblasen, erreichte der Umsatz lediglich 72%. Dieses Experiment weist eine vergleichbare Tendenz zu den Begasungsversuchen mit GOx (Abschnitt 3.5.2) auf. Somit konnte der positive Effekt auf den Reaktionsfortschritt erfolgreich mit einem zweiten, unabhängigen Reaktionssystem, reproduziert werden. Die Hypothese, eine Reduktion der Deaktivierung durch Immobilisierung der TYR und GOx zu erreichen, wurde nicht bestätigt. Es konnten die TYR und die GOx erfolgreich kovalent mittels Glutaraldehyd an einen PA12 Träger angebunden und im begasten Rührkessel getestet werden. Die Immobilisierung der GOx erscheint dabei deutlich vielversprechender, als die der TYR. Bei einmaliger Wiederverwendung resultierte ein deutlicher Aktivitätsverlust von 50%. Deshalb ist die Feinblasenbegasung mit gelöstem Enzym der Immobilisierung mit der verwendeten Methode im begasten STR überlegen. Vorteilhaft ist sie allerdings in Hinsicht auf die kontinuierliche Produktion. Hier könnte durch weitere Optimierung der Immobilisierungsmethoden (passende

Trägermaterialien, Enzyme-Engineering der TYR und GOx) die Produktivität deutlich gesteigert werden.

Nachdem die Anwendbarkeit und die positiven Effekte der Begasung mit Feinblasen erfolgreich dargestellt werden konnten, wurde die Anwendung von Ultrafeinblasen in einer Gluconolactonsynthese untersucht. Ultrafeinblasen sind nach ISO/TC 281, Fine bubble technology, Feinblasen mit einem volumenäquivalenten Durchmesser von weniger als $1\ \mu\text{m}$ (Tsuge 2014). In den NanoSight-Messungen konnten eine hohe Stabilität von 62 d, sowie eine Konzentration von $1,99 \times 10^8\ \text{n/mL}$ ermittelt werden. Die theoretisch verfügbare Oberfläche, im Vergleich zur Begasung, wurde als zu gering eingestuft, um einen Effekt auf die Reaktion zu haben. Wie in der Literatur beschrieben, konnte auch im Rahmen dieser Arbeit kein positiver Nachweis für die Existenz von Ultrafeinblasen (Nanoblasen), generiert durch den AMB3, erbracht werden. Es ist noch nicht abschließend geklärt, ob mit deutlich kleineren UFBs und mit höheren UFB-Dichten ein Effekt auf die Gluconolactonsynthese feststellbar wäre. Weiter konnte kein Effekt durch die UFBs bezüglich der Ausbeutekurve und Anfangsaktivität der GOx beobachtet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte der positive Effekt der Begasung mit Feinblasen in enzymatischen Oxidationsreaktionen erfolgreich demonstriert und reproduziert werden. Die Vorteile sind der hohe Stofftransport, die gesteigerte Gasnutzung und der Zugewinn an Enzymstabilität im Vergleich zur Begasung mit Submilli- und Makroblasen. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass in der Anwendung der Feinblasentechnologie ein großes Potenzial zur Optimierung von Prozessen in der Biokatalyse besteht.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung und Einordnung der Eignung der Feinblasentechnologie in der Biokatalyse. Hierzu wurden Untersuchungen zur Einlösung von Gasen in Flüssigkeiten unter Atmosphärendruck durchgeführt. Es erfolgte ein detaillierter Begaservergleich bezüglich der erzeugten Blasengröße von Fein-, Submilli- und Makroblasen. Um die Anwendung für die Biokatalyse beurteilen zu können wurden die optimalen Reaktionsbedingungen, sowie ein Modellreaktionssystem hinsichtlich des Sauerstoffverbrauchs charakterisiert. Auf der Basis dieser Charakterisierung konnten die Einzeleffekte bezüglich Stofftransport, Rührerleistungseintrag und Enzymstabilität untersucht werden. Die identifizierten Effekte und Abhängigkeiten wurden am Beispiel mehrerer unterschiedlicher enzymatischer Modellreaktionen demonstriert. Weiterhin erfolgte die Untersuchung der Anwendung der Feinblasenbegasung bezüglich der Produktivität, Sauerstoffatomökonomie und Enzymstabilität im begasten System.

- **Gasnutzungseffizienz und Stofftransportcharakterisierung ($k_L a$) der Begaser**

Im direkten Vergleich der volumenspezifischen Stofftransportrate ($k_L a$) der Begaser wurde über den gesamten Bereich von 0,006 - 16,67 vvm ein deutlicher Vorteil der Begasung mit Feinblasen im Vergleich zur Begasung mit Submilli- und Makroblasen gemessen. Mittels des Gasverbrauchseffizienzfaktors $\eta_{O_2 \text{ Effizienz}}$ konnte bei konstantem $k_L a$ von 160 1/h ein Vergleich der Makro-, Submilli- und Mikrobegasung, zunächst ohne Reaktion, durchgeführt werden. Hierbei wurde für die Makroblasenbegasung ein 25-mal höherer und für die Submilliblasenbegasung ein 12,25-mal höherer Gasverbrauch im Vergleich zur Begasung mit Feinblasen festgestellt. Das hohe Stofftransportpotenzial und die Optimierung des Gasverbrauchs wurden in dieser Arbeit im Detail demonstriert.

- **Potenzial der Oxidasen bezüglich Stofftransportlimitierung im begasten Rührkessel**

Um die Begasungssysteme bezüglich ihres Stofftransports für eine enzymatische Reaktion mittels Ausbeute und Umsatz vergleichen zu können, ist die Annahme einer Stofftransportlimitierung der Reaktion eine Voraussetzung. Daher wurden die Oxidasen hinsichtlich ihrer enzymengen spezifischen Sauerstoffverbrauchsrate (basierend auf dem gemessenen v_{max}) als Hauptauswahlkriterium verglichen. Die Einführung der modifizierten Damköhlerzahl Da^* ermöglichte einen Vergleich der Oxidasen bezüglich der Stofftransportphänomene unter Einbeziehung des enzymengen spezifischen Sauerstoffverbrauchs. Mit dieser Größe kann für ein beliebiges gasverbrauchendes Reaktionssystem die Stofftransportlimitierung überprüft werden. Die Da^*/m_{Enzym} für GOx mit 1,38/mg_{Enzym}, TYR 17,24/mg_{Enzym} zeigte ein hohes Potenzial bezüglich der Stofftransportlimitierung ($Da^* \geq 1$) für die Anwendung der Feinblasenbegasung. Durch Anpassung der Enzymmenge, wie im Fall der GOx mit $Da^*/m_{\text{Enzym}} = 1,38/\text{mg}_{\text{Enzym}}$, kann mit dem Einsatz von 25 mg (~12000 U) eine $Da^* \geq 1$ (Stofftransportlimitierung) eingestellt und ein Begaservergleich ermöglicht werden.

- **Enzymstabilität im mit Fein-, Submilli- und Makroblasen begasten Rührkessel (STR)**

Als Ergebnis der Stabilitätsuntersuchungen bei Inkubation mit Fein- und Makroblasenbegasung im begasten STR, konnte bei allen Enzymen eine signifikante Erhöhung der Enzymstabilität mit Feinblasen erzielt werden. Dieser Effekt wurde am Beispiel von sechs verschiedenen Enzymen (GOx,

NOX34, TYR, GDH 105, ADH97L und Cytochrom P450) im Vergleich zur Makroblasenbegasung bei einem $k_L a$ von 160 1/h untersucht. Es zeigte sich, dass Scherkräfte welche durch Rühren, Gasimpuls, Koaleszenz sowie Blasen aufplatzen, auf das Enzym wirken, durch die Bestimmung der kleinsten (durch Energiedissipation) erzeugten Wirbels (Kolmogorov-Länge), nicht beeinflusst werden können. Am Beispiel der GOx konnte demonstriert werden, dass die Kolmogorov-Länge um den Faktor 100 - 1000 größer ist, als der hydrodynamische Durchmesser der GOx. Die Feinblasenbegasung führte über den gesamten Arbeitsbereich zu einem geringeren Aktivitätsverlust im Vergleich zu Submilli- und Makrobegasung. Hierbei konnte kein direkter Einfluss des Leistungseintrags und der Oxidation durch gelösten Sauerstoff auf die Enzymstabilität der ADH97L nachgewiesen werden. In der Untersuchung des Leistungseintrags und der Oxidation durch gelösten Sauerstoff auf die Enzymstabilität zeigte sich kein messbarer Effekt.

- **Anwendung von Feinblasentechnologie in der Biokatalyse**

Es wurden der Einfluss des Rührers und des Strömungsprofils auf die Ausbeute des ADH97L/NOX34 Modellsystems untersucht. Die Ergebnisse dieser Experimente bestätigten die Hypothese, dass die Erhöhung des Leistungseintrags keinen oder lediglich einen geringen Effekt auf die Ausbeute der ADH97L/NOX34 Systeme hat. Ebenso verhält es sich bei der Betrachtung der Desintegrierung von Fein- und Submilliblasen (generiert mit 0,5 μm , 2 μm und 10 μm Sinterfritte). Weiter konnte gezeigt werden, dass beim Einsatz eines Schrägblattrührers die gleichen Ausbeuten bei geringerem Leistungseintrag erreicht werden als bei Verwendung eines Scheibenrührers.

Am Beispiel der Gluconolactonsynthese mit $Da^*/m_{\text{Enzym}} = 1,38/\text{mg}_{\text{Enzym}}$ konnte bei konstanter Begasungsrate von 0,67 vvm eine Erhöhung der Ausbeute um ~40% im Vergleich mit der Makroblasenbegasung erzielt werden. Weitere Versuche bei konstantem Stofftransport von 160 1/h bestätigten den zuvor beobachteten hohen Einfluss der Blasengröße auf die Enzymstabilität. Hier wurde eine Erhöhung der Ausbeute um 30% mittels Feinblasenbegasung erreicht. Durch dieses Ergebnis konnte gezeigt werden, dass der Einfluss auf die Ausbeute hauptsächlich von der Enzymstabilität abhängt. Weiterhin konnte eine Steigerung der Sauerstoffatomökonomie der Feinblasenbegasung um den Faktor 45 gegenüber der Begasung mit Makroblasen festgestellt werden.

Mittels des TYR Systems welches mit $Da^*/m_{\text{Enzym}} = 17,24/\text{mg}_{\text{Enzym}}$ ein hohes Potenzial für den Einsatz der Feinblasentechnologie bietet, konnten die zuvor mit GOx beobachteten Effekte auf Enzymstabilität und gesteigerten Umsatz bestätigt werden. Im Umsatzverlauf bezogen auf L-Tyrosin zeigt sich, dass bei konstantem $k_L a$ von 160 1/h mit Feinblasenbegasung nach 45 min nahezu ein Vollumsatz erreicht wird. Wird die Reaktion hingegen mit Makroblasen begast, erreicht der Umsatz nur 72%. Weiter konnte die Selektivität der L-DOPA Bildung durch Anpassung der Enzymmenge für $Da^* = 1$ optimiert werden.

Die TYR und GOx wurde erfolgreich kovalent mittels Glutaraldehyd an einen PA12 Träger gebunden und im begasten Rührkessel eingesetzt. Im Test der Immobilisate zeigte die TYR und GOx hohe Aktivitätsverluste von ~50% bei einmaliger Wiederverwendung, was deutlich höher ist, als in der Reaktion mit gelöstem Enzym. Es konnte kein Vorteil der Immobilisierung von TYR und GOx mit der verwendeten Methode im begasten STR festgestellt werden.

Es wurde die Anwendung von Ultrafeinblasen in einer der Gluconolactonsynthese untersucht. In den NanoSight Messungen konnten eine hohe Stabilität von 62 d, sowie eine Konzentration von

$1,99 \times 10^8$ n/mL festgestellt werden. Ein Effekt der UFBs auf die Ausbeutekurve und die Anfangsaktivität in der Gluconolactonsynthese war nicht nachweisbar. Vielmehr wurde festgestellt, dass die durch UFB bereitgestellte Oberfläche im Vergleich zur Begasung mit Mikroblasen sehr gering ist.

Zusammenfassend konnte erfolgreich die erhöhte Stofftransportkapazität und die Erhöhung der Enzymstabilität durch den Einsatz der Feinblasentechnologie in der enzymatischen Reaktion demonstriert und reproduziert werden. Hierbei sind vor allem der hohe Stofftransport, die gesteigerte Gasnutzung und der Zugewinn an Enzymstabilität im Vergleich zur Begasung mit Submilli- und Makroblasen vielversprechend und sollten in weiteren Experimenten im größeren Maßstab untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass sich durch die Anwendung der Feinblasentechnologie ein großes Potenzial zur Optimierung von Prozessen in der Biokatalyse erschließt. Die weiterführende Untersuchung der Protein/ Grenzflächen-Wechselwirkung ist der Schlüssel für die Optimierung der Enzymstabilität und die Durchführbarkeit von vielen neuen Anwendungen in der Biokatalyse.

6 Anhang

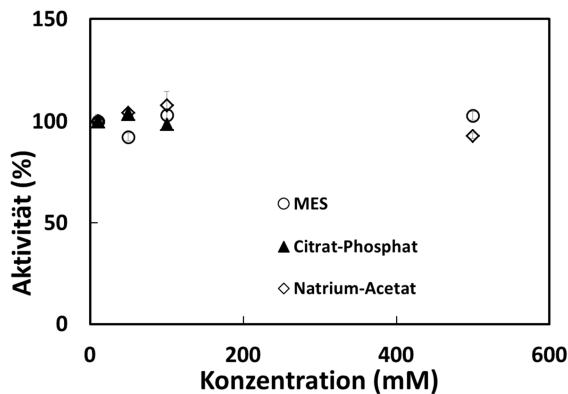


Abb. 58: Aktivitätsbestimmung einer Glucoseoxidase bei Variation der Pufferkonzentration (Photometerassay: 1 Gew.-% D-Glucose, $\lambda = 520 \text{ nm}$, $T = 35^\circ\text{C}$, 20 U/mL GOx, 20 U/mL Katalyse, $n = 3$, MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure), Citrat-Phosphat, Na-Acetat, KPi , pH 5,3)

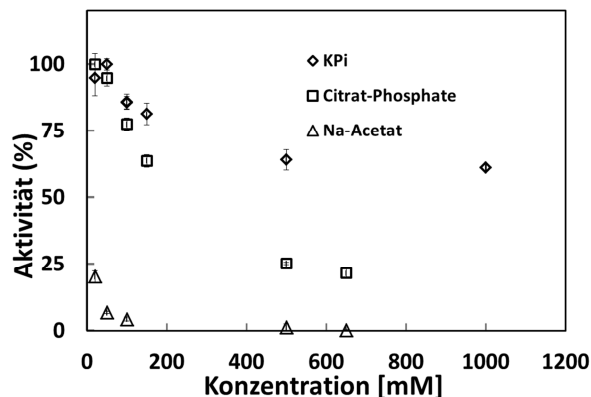


Abb. 59: Aktivitätsbestimmung einer Tyrosinase bei Variation der Pufferkonzentration (Photometerassay: 0,05 mg/mL Tyrosinase, 1 mM L-Tyrosin, Citrat-Phosphat, Na-Acetat, KPi , pH 6,5 bei 20°C , $\lambda = 280 \text{ nm}$)

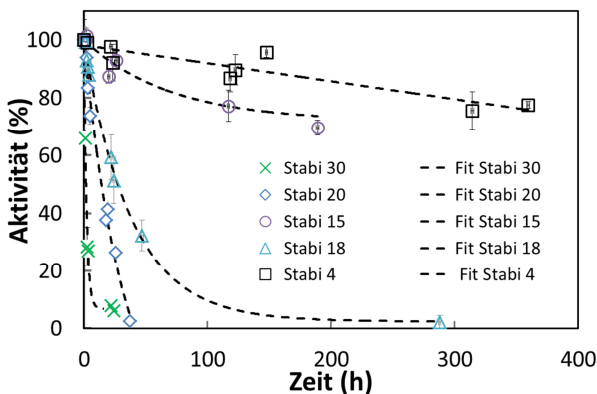


Abb. 60: Bestimmung der Halbwertzeit bei Variation der Temperatur für eine Tyrosinase (Photometerassay: 0,05 mg/mL Tyrosinase, 1 mM L-Tyrosin, 50 mM KPi pH 6,5 bei 20°C , $\lambda = 280 \text{ nm}$, Regression (Fit. Srabi) mit Gleichung (26))

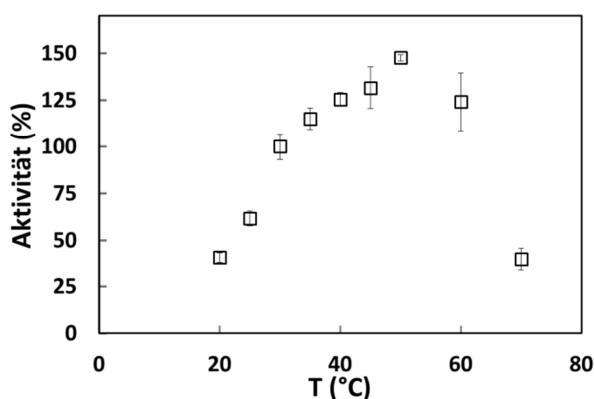


Abb. 61: Bestimmung der Aktivität bei Variation des pH und der Temperatur einer Tyrosinase (Photometerassay: 0,05 mg/mL Tyrosinase, 1 mM L-Tyrosin, $\lambda = 280$ nm, 50 mM KP_i pH 6,5)

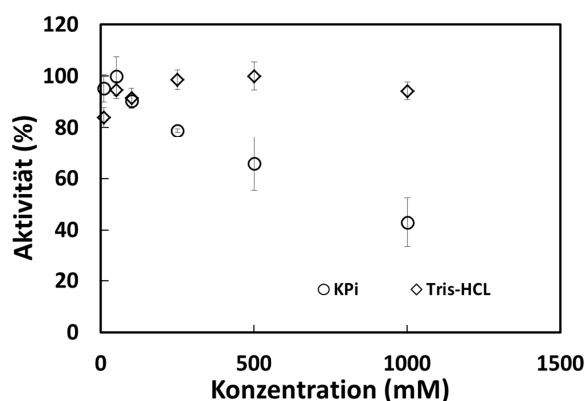


Abb. 62: Aktivitätsbestimmung einer Alkoholdehydrogenase (ADH) bei Variation der Pufferkonzentration (Photometerassay: $\lambda = 340$ nm, $d = 1$ cm, $V = 1$ mL $T = 25^\circ\text{C}$, Puffer pH 8, Tris-HCL mit 2 mM MgCl, 0,1 mM NAD^+ , $n = 3$)

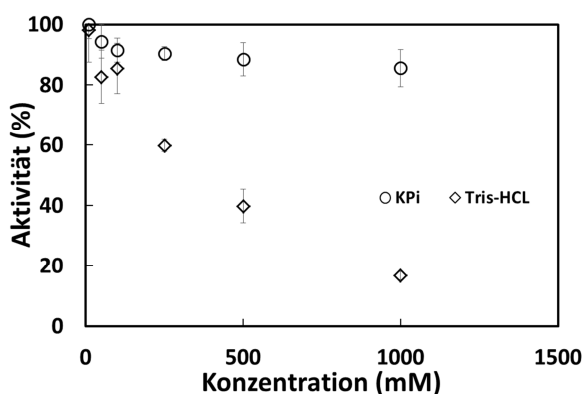


Abb. 63: Aktivitätsbestimmung einer NADH-Oxidase (NOX34) bei Variation der Pufferkonzentration (Reaktionsbedingungen: $\lambda = 340$ nm, $d = 1$ cm, $V = 1$ ml $T = 25^\circ\text{C}$, 100 mM Tris-HCL Puffer (pH = 7), 0,1 mM NADH, Sauerstoffsättigung)

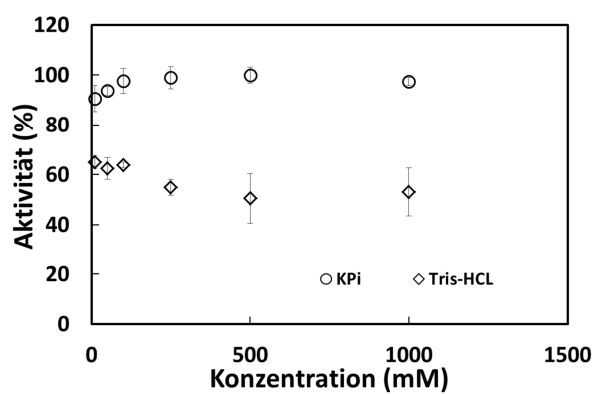


Abb. 64: Aktivitätsbestimmung einer NADH-Oxidase (NOX-Opp.) bei Variation der Pufferkonzentration (Reaktionsbedingungen: $\lambda = 340 \text{ nm}$, $d = 1 \text{ cm}$, $V = 1 \text{ ml}$ $T = 25^\circ\text{C}$, 100 mM Tris-HCL Puffer ($\text{pH} = 7$), $0,1 \text{ mM}$ NADH, Sauerstoffsättigung)

7 Literatur

- Bateman, R. C., & Evans, J. A. (1995). Using the Glucose Oxidase/Peroxidase System in Enzyme Kinetics. *Journal of Chemical Education*, 72(12), A240. <https://doi.org/10.1021/ed072pA240>
- Bolivar, J. M., Mannsberger, A., Thomsen, M. S., Tekautz, G., & Nidetzky, B. (2019). Process intensification for O₂-dependent enzymatic transformations in continuous single-phase pressurized flow. *Biotechnology and Bioengineering*, 116(3), 503–514. <https://doi.org/10.1002/bit.26886>
- Chapman, M. R., Cosgrove, S. C., Turner, N. J., Kapur, N., & Blacker, A. J. (2018). Highly Productive Oxidative Biocatalysis in Continuous Flow by Enhancing the Aqueous Equilibrium Solubility of Oxygen. *Angewandte Chemie (International Ed. In English)*, 57(33), 10535–10539. <https://doi.org/10.1002/anie.201803675>
- Cherry, R. S., & Hulle, C. T. (1992). Cell death in the thin films of bursting bubbles. *Biotechnology Progress*, 8(1), 11–18. <https://doi.org/10.1021/bp00013a003>
- Clarkson, Cui, & Darton (1999). Protein Denaturation in Foam. *Journal of Colloid and Interface Science*, 215(2), 323–332. <https://doi.org/10.1006/jcis.1999.6255>
- Di Wang, Yang, X., Tian, C., Lei, Z., Kobayashi, N., Kobayashi, M., . . . Zhang, Z. (2019). Characteristics of ultra-fine bubble water and its trials on enhanced methane production from waste activated sludge. *Bioresource Technology*, 273, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.10.077>
- Donaldson, T. L., Boonstra, E. F., & Hammond, J. M. (1980). Kinetics of protein denaturation at gas—liquid interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 74(2), 441–450. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(80\)90213-1](https://doi.org/10.1016/0021-9797(80)90213-1)
- Duval, E., Adichtchev, S., Sirotkin, S., & Mermet, A. (2012). Long-lived submicrometric bubbles in very diluted alkali halide water solutions. *Physical Chemistry Chemical Physics : PCCP*, 14(12), 4125–4132. <https://doi.org/10.1039/c2cp22858k>

- Garcia-Ochoa, F., & Gomez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances*, 27(2), 153–176.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.10.006>
- Graham, D.E., & Phillips, M.C. (1979). Proteins at liquid interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 70(3), 403–414. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(79\)90048-1](https://doi.org/10.1016/0021-9797(79)90048-1)
- Hone, C. A., & Kappe, C. O. (2018). The Use of Molecular Oxygen for Liquid Phase Aerobic Oxidations in Continuous Flow. *Topics in Current Chemistry (Cham)*, 377(1), 2.
<https://doi.org/10.1007/s41061-018-0226-z>
- Iwakiri, M., Terasaka, K., Fujioka, S., Schluter, M., Kastens, S., & Tanaka, S. (2017). Mass Transfer from a Shrinking Single Microbubble Rising in Water. *Japanese Journal of Multiphase Flow* 30, No. 5 (2017): 529-535. Advance online publication. <https://doi.org/10.3811/jjmf.30.529>
- Kaufhold, D., Kopf, F., Wolff, C., Beutel, S., Hilterhaus, L., Hoffmann, M., . . . Liese, A. (2012). Generation of Dean vortices and enhancement of oxygen transfer rates in membrane contactors for different hollow fiber geometries. *Journal of Membrane Science*, 423-424, 342–347.
<https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.08.035>
- Kazakis, N. A., Mouza, A. A., & Paras, S. V. (2008). Coalescence during bubble formation at two neighbouring pores: An experimental study in microscopic scale. *Chemical Engineering Science*, 63(21), 5160–5178. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2008.07.006>
- Kell, G. S. (1975). Density, thermal expansivity, and compressibility of liquid water from 0.deg. to 150.deg. Correlations and tables for atmospheric pressure and saturation reviewed and expressed on 1968 temperature scale. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 20(1), 97–105.
<https://doi.org/10.1021/je60064a005>
- Khuntia, S., Majumder, S. K., & Ghosh, P. (2012). Microbubble-aided water and wastewater purification: a review. *Reviews in Chemical Engineering*, 28(4-6). <https://doi.org/10.1515/revce-2012-0007>
- Kulkarni, A. A., & Joshi, J. B. (2005). Bubble Formation and Bubble Rise Velocity in Gas–Liquid Systems: A Review. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 44(16), 5873–5931.
<https://doi.org/10.1021/ie049131p>
- Maa, Y.-F., & Hsu, C. C. (1997). Protein denaturation by combined effect of shear and air-liquid interface. *Biotechnology and Bioengineering*, 54(6), 503–512. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19970620\)54:6<503::AID-BIT1>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970620)54:6<503::AID-BIT1>3.0.CO;2-N)

- Matthes, S., Thomas, B., Ohde, D., Hoffmann, M., Bubenheim, P., Liese, A., . . . Schlüter, M. (2020). Hydrodynamic and Mass Transfer Correlation in a Microbubble Aerated Stirred Tank Reactor. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, .
- Mersmann, A. (1977). Auslegung und Maßstabsvergrößerung von Blasen- und Tropfensäulen. *Chemie Ingenieur Technik*, 49(9), 679–691. <https://doi.org/10.1002/cite.330490902>
- Montero, G. A., Kirschner, T. F., & Tanner, R. d. (1993). Bubble and foam concentration of cellulase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 39-40(1), 467–475. <https://doi.org/10.1007/BF02919011>
- Muñoz-Muñoz, J. L., García-Molina, F., García-Ruiz, P. A., Molina-Alarcón, M., Tudela, J., García-Cánovas, F., & Rodríguez-López, J. N. (2008). Phenolic substrates and suicide inactivation of tyrosinase: Kinetics and mechanism. *The Biochemical Journal*, 416(3), 431–440. <https://doi.org/10.1042/BJ20080892>
- Ohde, D., Thomas, B., Matthes, S., Percin, Z., Engelmann, C., Bubenheim, P., . . . Liese, A. (2019). Fine Bubble-based CO₂ Capture Mediated by Triethanolamine Coupled to Whole Cell Biotransformation. *Chemie Ingenieur Technik*, 91(12), 1822–1826. <https://doi.org/10.1002/cite.201900113>
- Parkinson, L., Sedev, R., Fornasiero, D., & Ralston, J. (2008). The terminal rise velocity of 10-100 microm diameter bubbles in water. *Journal of Colloid and Interface Science*, 322(1), 168–172. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.02.072>
- Rissom, S., Schwarz-Linek, U., Vogel, M., Tishkov, V. I., & Kragl, U. (1997). Synthesis of chiral ϵ -lactones in a two-enzyme system of cyclohexanone mono-oxygenase and formate dehydrogenase with integrated bubble-free aeration. *Tetrahedron: Asymmetry*, 8(15), 2523–2526. [https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(97\)00311-X](https://doi.org/10.1016/S0957-4166(97)00311-X)
- Sigma-Aldrich Corp. (2018). Tyrosinase (T3824) - Product Information Sheet.
- Stieß, M. (2005). *Mechanische Verfahrenstechnik* (2. Aufl.). Berlin, Heidelberg, New York: Springer.
- Straub, J., Rosner, N., & Grigull, U. (1980). Oberflächenspannung von leichtem und schwerem Wasser. *Wärme - Und Stoffübertragung*, 13(4), 241–252. <https://doi.org/10.1007/BF01002412>
- Tao, D. (2005). Role of Bubble Size in Flotation of Coarse and Fine Particles—A Review. *Separation Science and Technology*, 39(4), 741–760. <https://doi.org/10.1081/SS-120028444>
- Temesgen, T., Bui, T. T., Han, M., Kim, T.-I., & Park, H. (2017). Micro and nanobubble technologies as a new horizon for water-treatment techniques: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 246, 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.06.011>

- Terasaka, & Tsuge (1993). Bubble formation under constant-flow conditions. *Chemical Engineering Science*, 48(19), 3417–3422. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(93\)80159-N](https://doi.org/10.1016/0009-2509(93)80159-N)
- Terasaka, K. Hirabayashi, Ai, Nishino, T., Fujioka, S., & Kobayashi, D. (2011). Development of microbubble aerator for waste water treatment using aerobic activated sludge. *Chemical Engineering Science*, 66(14), 3172–3179. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2011.02.043>
- Thomas, B., Ohde, D., Matthes, S., Engelmann, C., Bubenheim, P., Terasaka, K., . . . Liese, A. (2020). Comparative Investigation of Fine Bubble and Macrobubble Aeration on Gas Utility and Biotransformation Productivity. *Biotechnology and Bioengineering*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1002/bit.27556>
- Tribe, L. A., Briens, C. L., & Margaritis, A. (1995). Determination of the volumetric mass transfer coefficient ($k(L)a$) using the dynamic "gas out-gas in" method: Analysis of errors caused by dissolved oxygen probes. *Biotechnology and Bioengineering*, 46(4), 388–392. <https://doi.org/10.1002/bit.260460412>
- Tsuge (Ed.) (2014). *Micro- and nanobubbles: Fundamentals and applications*. Singapore: Pan Stanford Publishing.
- Wagner, M., & Johannes Pöpel, H. (1996). Surface active agents and their influence on oxygen transfer: Water Quality International '96 Part 2. *Water Science and Technology*, 34(3), 249–256. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(96\)00580-X](https://doi.org/10.1016/0273-1223(96)00580-X)
- Wang, L., Wang, Y., Yan, X., Wang, A., & Cao, Y. (2017). A numerical study on efficient recovery of fine-grained minerals with vortex generators in pipe flow unit of a cyclonic-static micro bubble flotation column. *Chemical Engineering Science*, 158, 304–313. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2016.10.037>
- Welty, J. R., Rorrer, G. L., & Foster, D. G. (2015). *Fundamentals of momentum, heat and mass transfer* (6. ed., internat. student version). Hoboken, NJ: Wiley.
- Woodley, J. M. (2019). Reaction Engineering for the Industrial Implementation of Biocatalysis. *Topics in Catalysis*, 62(17-20), 1202–1207. <https://doi.org/10.1007/s11244-019-01154-5>
- Xing, W., Yin, M., Lv, Q., Hu, Y., Liu, C., & Zhang, J. (2014). Oxygen Solubility, Diffusion Coefficient, and Solution Viscosity. In W. Xing, G. Yin, & J. Zhang (Eds.), *Rotating electrode methods and oxygen reduction electrocatalysts* (pp. 1–31). Amsterdam: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63278-4.00001-X>