

**Gewinnung von Ethanol aus wäßriger Lösung durch  
Membranextraktion und enzymatischer Esterbildung mit langkettigen  
Carbonsäuren**

**Vom Fachbereich Chemie  
der Universität Hannover**

**zur Erlangung des Grades eines**

**DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN**

**- Dr. rer. nat. -**

**genehmigte Dissertation**

von

**Dipl.- Chem. Jens Burfeind**  
geboren am 02. 05. 1966 in Bremervörde

Hannover, im April 1998

Referent:

Prof. Dr. Dr. K. Schügerl

Korreferent:

Priv. Doz. Dr. Gerlinde Kretzmer

Tag der mündlichen Prüfung:

25. 05. 1998

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 1995 bis April 1998 im Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. hc. Karl Schügerl angefertigt. Hiermit möchte ich Ihnen für die Arbeitsmöglichkeiten, das Interesse und die Unterstützung danken.

Frau PD Dr. Gerlinde Kretzmer danke ich für die Übernahme des Korreferates, insbesondere möchte ich Ihnen noch zu der Geburt Ihres Sohnes Hauke gratulieren.

Den Mitarbeiter des Institutes, die durch Ihre Unterstützung das Fertigstellen der Arbeit ermöglicht haben gilt mein Dank. Die Reste der „BT“-Gruppe, und die „TZL-ler“, für die eine Infektion das Schlimmste darstellt und die mich stets abgelenkt haben, sollen nicht unerwähnt bleiben.

Die Werkstatt, Elektronikwerkstatt und besonders Herr Cochansky haben mich beim Aufbau der Extraktionsanlage mit Kreativität und Einfallsreichtum unterstützt.

Ohne Martina Weiß wäre die Arbeit in dieser Form und Zeit nicht entstanden (danke für den Fernseher).

Das „Biotechnologieseminar“ auf Ibiza mit Herrn Dr. Buch (Herr der Zellen) und Herrn Dipl.-Chem. Oliver Christel bleibt unvergessen und sollte als „Pflichtseminar“ eingeführt werden, wenn nichts mehr läuft.

Herr Dr. Hesse, Meister im Dauerfermentieren, ist immer mit Rat und Tat für die Kollegen zur Stelle gewesen und hat einen Großteil der Korrekturen in dieser Arbeit übernommen.

Frau Dr. Kasper und Herr Dipl.-Chem. Marco Rieseberg haben die Arbeitsatmosphäre allein durch Ihre Anwesenheit aufgelockert und bereichert.

Den „Neuen“ Georg, Alexander, und Petra wünsche ich „Hohe Effizienz“ bei Ihrer Arbeit.

Besonders hat mich Herr Joachim Ryll im Rahmen eines Schwerpunktpraktikums bei der „Hohen Kunst“ der Enzymimmobilisierung unterstützt.

Allen, die mir bei der Anfertigung der Arbeit geholfen haben - in guten wie in schlechten „Phasen“ - haben einen Teil zum Gelingen beigetragen.

„Das Haus inmitten der Stadt“ Große Pfahlstr. 2 ist besser als jede Soap und hat mir immer wieder gezeigt, es gibt noch ein Leben nach der Forschung ....

.....meinen Mitbewohner Andrej Fedorowski, der mich ertragen hat und wir festgestellt haben, daß der Weg von der Neuropathologie zur Technischen Chemie gar nicht so weit ist.

Meinem Bruder, der die Arbeit Korrektur gelesen hat, und in der Endphase dafür gesorgt hat, daß die Nahrungsaufnahme bei mir nicht ganz zum Erliegen gekommen ist.

Meinen Eltern und der Familie, die mich immer unterstützt haben.

# Abstract

**Burfeind, Jens**

**Recovery of ethanol from aqueous solution by membrane extraction coupled with enzymatic esterification with long chain carboxylic acids**

**Keywords:** Membrane extraction, lipase, esterification

The use of enzymatic methods in biotechnology is getting more important. Enzymatically catalysed reactions can be realized under mild conditions without product degradation. Lipases are often used in non-aqueous systems for ester production. In organic solvents these enzymes show high stability. A combination of membrane techniques coupled with enzymatic reactions give rise to an extractive esterification out of the aqueous solution.

For the reactive ethanol extraction out of the aqueous phase by esterification with the help of the lipase *mucor miehei* a special technique was established and optimized. The lipase is immobilized onto a carrier Accurel EP 100 and is covered with dimethylsiloxane to optimize the use in organic solvents. The use of a hollow-fibre module for extraction facilitates the esterification out of a two-phase system. In a technical setup production rates up to 0.05 mol/h (8.6 g/h) caprylic acid ethyl ester could be achieved.

For product purification an extraction technique was developed to extract non esterified caprylic acid out of the organic phase to produce the ethyl ester as a pure product. The esterification is a continuous process, that takes place in a Mixer-Settler equipment. The extraction solvent is 1,2-butanediol.

# Abstract

**Burfeind, Jens**

## **Gewinnung von Ethanol aus wäßriger Lösung durch Membranextraktion und enzymatischer Esterbildung mit langkettigen Carbonsäuren**

**Keywords:** Membranextraktion, Lipase, Veresterung

Der Einsatz von enzymatischen Methoden in der Biotechnologie gewinnt immer mehr an Bedeutung. Enzymatisch katalysierte Reaktionen können unter sehr schonenden Bedingungen durchgeführt werden, so daß nur eine geringe Produktbelastung entsteht. Lipasen werden vermehrt in nicht wäßrigen Systemen zur Produktion von Estern eingesetzt. Sie besitzen in organischen Lösungsmitteln eine hohe Stabilität. Durch eine Kombination von geeigneten Membranverfahren mit enzymatischen Umsetzungen lassen sich extraktive Veresterungen aus wäßriger Phase durchführen.

Für die Reaktivextraktion von Ethanol aus wäßriger Phase durch Veresterung mittels einer Lipase aus *Mucor miehei* wurde ein Verfahrenskonzept entwickelt und optimiert. Die Lipase wurde auf dem Trägermaterial Accurel EP 100 immobilisiert und durch die Beschichtung mit Dimethylsiloxan für den Einsatz im organischen Lösungsmittel optimiert. Der Einsatz eines Hohlfasermoduls zur Extraktion ermöglicht eine Veresterung aus einem Zweiphasensystem heraus. In der Laboranlage können Produktbildungsraten von bis zu 0,05 mol/h (8,6 g/h) Caprylsäureethylester erzielt werden.

Zur Produktaufreinigung wurde ein Extraktionsverfahren entwickelt, das es ermöglicht, nicht umgesetzte Caprylsäure aus der organischen Phase zu extrahieren, um den Ethylester als reines Produkt zu gewinnen. Die Aufreinigung wird kontinuierlich in einer Mixer-Settler-Anlage durchgeführt. Als Extraktionsmittel wird 1,2-Butandiol eingesetzt.

<b>1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG .....</b>	<b>7</b>
<b>2 THEORIE .....</b>	<b>9</b>
2.1 FLÜSSIG/FLÜSSIG-EXTRAKTION.....	9
2.1.1 <i>Physikalische Extraktion</i> .....	9
2.1.2 <i>Reaktivextraktion</i> .....	10
2.1.3 <i>Membrangestützte Lösungsmittlextraktion</i> .....	12
2.1.4 <i>Membranreaktoren</i> .....	13
2.1.5 <i>Lösungsmittelauswahl</i> .....	13
2.1.6 <i>Membrantrennverfahren</i> .....	14
2.2 ENZYME .....	17
2.2.1 <i>Wirkungsweise</i> .....	17
2.2.2 <i>Aufbau der Enzyme</i> .....	18
2.2.3 <i>Spezifität der Enzyme</i> .....	19
2.2.4 <i>Enzymaktivität und -stabilität</i> .....	20
2.2.5 <i>Enzymhemmungen</i> .....	21
2.3 IMMOBILISIERUNG VON ENZYMEN .....	22
2.3.1 <i>Definition</i> .....	22
2.3.2 <i>Trägermaterialien</i> .....	24
2.3.3 <i>Lösungsmittel für enzymatische Reaktionen</i> .....	24
2.4 LIPASEN, ESTERASEN .....	25
2.4.1 <i>Veresterungsreaktion</i> .....	28
2.5 ENZYMMIMMOBILISIERUNGEN.....	29
2.5.1 <i>Kovalente Bindung durch Aktivierung eines Trägers mit 3-Aminopropyl-</i> <i>trimethoxy-silan</i> .....	29
2.5.2 <i>Enzymimmobilisierung in Sol-Gel-Matrix</i> .....	30
<b>3 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>31</b>
3.1 ANALYTIK .....	31
3.1.1 <i>Proteinbestimmung</i> .....	31
3.1.2 <i>HPLC-Analytik</i> .....	32

3.1.3 Kalibrierung .....	33
3.1.4 On-line-Analytik .....	34
3.1.5 Aktivitätsbestimmung (pH-Stat).....	36
3.2 IMMOBILISIERUNGSMETHODEN .....	37
3.2.1 Immobilisierung auf Anionenaustauscher Dowex MWA-1 .....	37
3.2.2 Veresterungsansatz.....	38
3.2.3 Immobilisierung aus organischer Phase .....	38
3.2.4 Immobilisierung durch kovalente Bindung .....	39
3.2.5 Immobilisierung in einer Sol-Gel-Matrix.....	40
3.2.6 Adsorption auf Polypropylenträger.....	41
3.2.7 Veresterung in reinem Hexan und einem Hexan/Wasser-Gemisch.....	41
3.2.8 Polypropylen mit Silikonbeschichtung .....	42
3.2.9 Kontinuierlicher Betrieb im Miniaturreaktor.....	42
3.3 REAKTIVEXTRAKTION IM HOHLFASER-FESTBETTREAKTOR .....	43
3.3.1 Technische Daten des Hohlfaserextraktionsmoduls.....	43
3.3.2 Technische Daten des Accurel EP 100 Trägermaterials.....	45
3.4 REAKTIVEXTRAKTION IM SYSTEM HOHLFASERMODUL/FESTBETTREAKTOR .....	47
3.5 RÜCKEXTRAKTION.....	48
3.5.1 Messung der Gleichgewichtseinstellung .....	48
3.5.2 Rückgewinnung der extrahierten Bestandteile aus der 1,2-Butandiolphase.....	49
3.5.3 Durchführung der Rückextraktion in einer Mixer-Settler-Anlage .....	49
<b>4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>52</b>
4.1 AKTIVITÄT DER NATIVEN LIPASEN.....	52
4.2 IMMOBILISIERUNG DER LIPASEN AUF EINEM ANIONENAUSTAUSCHER.....	54
4.2.1 Adsorption aus wässriger Phase .....	54
4.2.2 Immobilisierung aus organischer Phase.....	56
4.3 IMMOBILISIERUNG DURCH KOVALENTE BINDUNG .....	57
4.4 ENZYMIMMOBILISIERUNG IN SOL-GEL-MATRIX .....	58
4.4.1 Strukturverbesserungen.....	62
4.5 ADSORPTION DER <i>MUCOR MIEHEI</i> -LIPASE AUF EINEM POLYPROPYLENTRÄGER.....	62
4.5.1 Adsorption der Lipase 200L ( <i>Mucor miehei</i> ) auf Accurel EP 100.....	63
4.5.2 Vergleich der Proteinadsorption und der Lipaseaktivität.....	65



4.5.3 Vergleich der Veresterungsaktivität in Hexan und in einem Hexan/Wasser-Gemisch.....	66
4.6 POLYPROPYLENTRÄGER MIT SILIKONBESCHICHTUNG .....	66
4.6.1 Vergleich der Stabilität des mit Silikon beschichteten und des unbeschichteten Trägermaterials Accurel EP 100 .....	67
4.6.2 Vergleich der Veresterungsaktivität von Accurel EP 100 mit und ohne Silikonbeschichtung.....	69
4.7 KONTINUIERLICHE VERESTERUNG IM MINIATUR-FESTBETTREAKTOR .....	70
4.8 REAKTIVE EXTRAKTION VON ETHANOL MIT EINEM HOHLFASERMODUL UND MIT IMMOBILISIRTER LIPASE IM FESTBETTREAKTOR.....	71
4.8.1 Einfluß der Produktesterkonzentration auf die Reaktion .....	72
4.8.2 Langzeitstabilität der auf Accurel EP 100 immobilisierten Lipase .....	73
4.8.3 Regenerierung des Trägermaterials im Reaktor mit neuer Lipaselösung.....	74
4.8.4 Proteinadsorption im Hohlfaser-Festbettreaktorsystem .....	76
4.8.5 Oenanthsäure (Heptansäure) als Substrat .....	76
4.8.6 Stabilität des Systems nach der Esterbildung mit Oenanthsäure.....	77
4.8.7 Der Einsatz von Ölsäure als Substrat .....	78
4.8.8 Vergleich der Veresterungsgeschwindigkeiten der eingesetzten Substrate.....	79
4.9 PRODUKTAUFREINIGUNG .....	80
4.9.1 Rückextraktion der organischen Säure mit 1,2-Butandiol .....	80
4.9.2 Vollständige Entfernung von Caprylsäure aus der Modellösung .....	81
4.9.3 Rückgewinnung der extrahierten Bestandteile aus der 1,2-Butandiolphase.....	82
4.10 KONTINUIERLICHE EXTRAKTION DER FREIEN SÄURE AUS DER OKTANPHASE MIT 1,2-BUTANDIOL IN EINER TECHNIKUMS-MIXER-SETTLER-ANLAGE IM GEGENSTROMVERFAHREN.....	84
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....</b>	<b>86</b>
5.1 ZUSAMMENFASSUNG .....	86
5.2 AUSBLICK.....	87
<b>6 ANHANG .....</b>	<b>88</b>
6.1 VORSCHLAG ZUR VERFAHRENSFÜHRUNG FÜR DIE KONTINUIERLICHE PRODUKTION VON CARBONSÄUREETHYLESTERN.....	88

6.2 GERÄTE .....	88
6.3 CHEMIKALIEN.....	90
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>91</b>
<b>8 LEBENSLAUF .....</b>	<b>97</b>

## 1 Einleitung und Zielsetzung

In neuerer Zeit gewinnt der Einsatz biotechnologischer Verfahren zunehmend an Bedeutung. Zu den seit alters her bekannten Aufgaben in der Lebensmittelproduktion, z. B. der Brot- und Käseherstellung oder der Produktion von Wein und Bier, werden weitere biotechnische Verfahren eingesetzt. Zu diesen klassischen Verfahren kamen nach dem 2. Weltkrieg die Produktion von Penicillin und anderer Antibiotika.

Für die Herstellung von medizinisch relevanten Molekülen kann auf biotechnische Methoden nicht verzichtet werden. Durch die Möglichkeit, genetische Veränderungen gezielt an Mikroorganismen durchzuführen, ergibt sich im medizinischen Bereich eine Erweiterung für die Arzneimittelproduktion [1,2].

Die Fortschritte in der Fermentationstechnik in Verbindung mit genetisch veränderten Mikroorganismen ermöglicht es heute, Enzyme im technischen Maßstab zu günstigen Preisen herzustellen [3]. Als Beispiel sei der Einsatz von Lipasen angeführt. Dadurch, daß die Enzyme in großen Mengen günstig zur Verfügung stehen, ergeben sich für die klassischen biotechnologischen Verfahren neue Perspektiven.

Ein Problem bei einem der ältesten biotechnologischen Verfahren, der Ethanolproduktion, ist die toxische Wirkung des Ethanols auf die Mikroorganismen. Es sind viele Versuche durchgeführt worden, um eine Produktinhibierung zu verhindern, zum Beispiel durch Gasstripping oder Pervaporation [4,5,6]. Allerdings sind noch keine befriedigenden Resultate erzielt worden.

Die Kombination des Einsatzes von Membranen mit klassischen biotechnischen Verfahren wird seit den '80er Jahren verstärkt untersucht [7]. Der Einsatz der Membranextraktion zur Entfernung von Ethanol aus wäßriger Phase scheint vielversprechend zu sein, denn durch die Anwendung von Membranen läßt sich das Fermentationsmedium vom Extraktionsmedium trennen. Für die Abtrennung von Ethanol aus wäßriger Phase ist es schwierig, ein geeignetes Extraktionsmittel zu finden. Es sind Versuche mit Oleylalkohol und Dibutylphthalat als Extraktionsmittel durchgeführt worden, diese Versuche führten nicht zu den gewünschten Ergebnissen [8,9].

Unser Vorhaben war, Membranextraktion und enzymatische Umsetzung in einem Vorgang zu kombinieren. Die enzymatische Veresterung mittels einer Lipase, gekoppelt an den Extraktionsvorgang, ermöglicht es, das hydrophile Ethanol in ein hydrophobes Produkt, den Ethylester einer langkettigen Carbonsäure umzuwandeln. Dies stellt eine Erweiterung des Konzeptes von Cabral et. al. dar [10,11,12].

Dieses Verfahren hat den Vorteil, daß Ethanol aus der wäßrigen Phase extrahiert und gleichzeitig die wichtigen Carbonsäureethylester als Produkt gewonnen werden können. Je nach Kettenlänge der Carbonsäure können die Ester entweder als Geschmackstoffe oder als wichtige reaktive Zwischenprodukte in der Fettchemie, insbesondere bei der Produktion von Emulgatoren dienen [13,14,15].

Eine weitere Einsatzmöglichkeit liegt in der Herstellung von Biodiesel. Dieser Treibstoff ist nichts anderes als ein Fettsäuremethylester, auch die entsprechenden Ethylester sind als Treibstoffe denkbar.

In dieser Arbeit sollten Methoden erarbeitet werden, um eine membrangestützte enzymatische Veresterung zur Gewinnung von Carbonsäureethylestern aufzubauen. Hierzu mußte eine geeignete Lipase gefunden werden, die unter den gegebenen Bedingungen eine Veresterung durchführen kann. Desweiteren wurden Verfahren zur Enzymimmobilisierung erarbeitet, um einen dauerhaften Einsatz der Lipase zu ermöglichen.

Ein weiterer Aspekt der Arbeit beschäftigt sich mit der Produktaufreinigung. In einem Zweiphasensystem ist durch eine kontinuierliche enzymatische Veresterung kein vollständiger Umsatz zu erzielen. Zur Produktaufreinigung ist ein Verfahren entwickelt worden, den Ester aus dem organischen Lösungsmittel als reines Produkt zu gewinnen. Dies geschieht durch die Rückextraktion der Carbonsäure aus dem Produktgemisch.

## 2 Theorie

### 2.1 Flüssig/Flüssig-Extraktion

#### 2.1.1 Physikalische Extraktion

Die Flüssig/Flüssig-Extraktion ist eine verfahrenstechnische Grundoperation. Sie wird zur Abtrennung einer oder mehrerer Komponenten aus einem flüssigen Ausgangsgemisch herangezogen. Der Vorteil der Flüssig/Flüssig-Extraktion gegenüber der rektifikativen Stofftrennung liegt in der Möglichkeit, auch temperaturempfindliche bzw. nichtflüchtige Substanzen (anorganische Salze) zu trennen.

Als Extraktionsmittel (Solventien) dienen Lösungsmittel, die mit der Abgeberphase eine Mischungslücke bilden. Es ist notwendig, daß eine ausreichend große Dichtedifferenz zwischen den beiden Phasen vorhanden ist, damit eine schnelle Phasentrennung gewährleistet wird. Ferner sollte die Toxizität der Extraktionsmittel in einem vertretbaren Rahmen gehalten werden. Wenn die Aufnehmerphase ein chemisch einheitliches System darstellt und mit dem zu extrahierenden Stoff nicht reagiert, beruht die Triebkraft des Prozesses auf der Differenz des chemischen Potentials des Extraktstoffes in den beiden Phasen. In diesem Fall handelt es sich um die klassische physikalische Extraktion.

Es sind mehrere Theorien über den Stofftransport durch die Phasengrenzfläche entwickelt worden. Zu erwähnen ist die Zweifilmtheorie, die von der Annahme laminarer Grenzschichten ausgeht [16], und die Penetrationstheorie, deren Annahme auf einer ständigen Erneuerung der Oberfläche durch An- bzw. Abtransport von Fluidelementen beruht [17]. Diese Theorie wurde von Danckwerts weiterentwickelt [18].

Die physikalische Verteilung des Extraktstoffes im Gleichgewichtszustand wird von dem druck- und temperaturabhängigen Nernst'schen Verteilungskoeffizienten  $K$  beschrieben:

$$K(p, T) = \frac{[A]_{org,eq} \cdot V_{org}}{[A]_{aq,eq} \cdot V_{aq}}$$

$K$	Verteilungskoeffizient der physikalischen Extraktion
$[A]_{org,eq}$	Gleichgewichtskonzentration von A in der organischen Phase
$[A]_{aq,eq}$	Gleichgewichtskonzentration von A in der wässrigen Phase
$V_{org}$	Volumen der organischen Phase
$V_{aq}$	Volumen der wässrigen Phase

Die Verteilung eines Stoffes in der organischen und der wässrigen Phase im gleichen Molekularzustand wird durch das Nernst'sche Gesetz beschrieben werden. Korrekterweise müssen die Konzentrationen durch die Aktivitäten ersetzt werden. Nur bei der Betrachtung von verdünnten Lösungen ist der Gebrauch von Konzentrationen gerechtfertigt. Das Verteilungsgesetz beschreibt, daß bei vorgegebener Temperatur und Druck das Verhältnis der Extraktstoffkonzentration  $[A]_{org,eq}$  und  $[A]_{aq,eq}$  konstant ist.

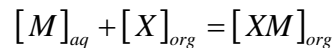
### 2.1.2 Reaktivextraktion

Eine Reaktivextraktion ist eine mit einer Gleichgewichtsreaktion gekoppelte Extraktion [19]. Hierunter fallen Komplexbildungsreaktionen mit Carriern, die nur in einer Phase löslich sind und chemische Reaktionen, die dazu führen, daß das gebildete Produkt nur in einer Phase löslich ist.

Das Verhältnis der Gesamtkonzentrationen ist nicht mehr durch das Nernst'sche Gesetz gegeben. Es tritt ein neuer Verteilungskoeffizient  $K_D$  auf, der sowohl von Druck und Temperatur, als auch von der chemischen Reaktion abhängig ist (Stöchiometrie, Nebenreaktionen usw.). Der Verteilungskoeffizient ist stets höher als bei der physikalischen Extraktion. Durch geeignete Reaktionsbedingungen, verschiedene

Carrier, pH-Wert oder gekoppelte enzymatische Reaktionen ist es möglich, die Verteilungskoeffizienten und Selektivitäten zu variieren.

Dies wird deutlich, wenn die Komplexbildungsreaktion für eine reaktive Extraktion formuliert wird:



$[M]_{aq}$	Konzentration des Extraktstoffes in der wäßrigen Phase
$[X]_{org}$	Konzentration des Carriers in der organischen Phase
$[XM]_{org}$	Komplexkonzentration im Extrakt

mit dem Massenwirkungsgesetz ergibt sich folgendes Gleichgewicht:

$$K_{XM} = \frac{[XM]_{org}}{([M]_{aq} \cdot [X]_{org})}$$

$K_{XM}$             Komplexbildungskonstante

wobei der reaktive Verteilungskoeffizient  $K_D$  folgendermaßen definiert ist:

$$K_D = \frac{[M]_{org}}{[M]_{aq}} = K_{XM} \cdot [X]_{org}$$

$K_D$             Verteilungskoeffizient (reaktiv)

Die Reaktivextraktion kommt hauptsächlich in der Hydrometallurgie zum Einsatz. Der Purex-Prozeß zur Urangewinnung erlangte in den '50er Jahren große Bedeutung [20]. Zur Kupfergewinnung werden in erster Linie flüssige Ionenaustauscher eingesetzt. Der Anteil an der Weltproduktion an Kupfer durch Reaktivextraktion liegt heute bei ca. 30 % [21].

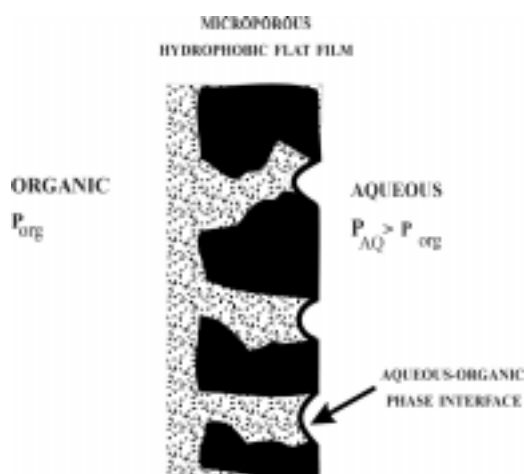
Ein neues Gebiet und zugleich eine Herausforderung für den Einsatz der Reaktivextraktion stellt die Biotechnologie dar. In der Biotechnologie sind milde Reaktionsbedingungen und ungiftige Chemikalien notwendig. Der Einsatz von

enzymatischen Methoden in der Extraktionstechnik, wie in dieser Arbeit vorgestellt, ermöglicht eine hohe Flexibilität und bietet für die Zukunft große Möglichkeiten.

### 2.1.3 Membrangestützte Lösungsmittelextraktion

Um eine schnelle und effiziente Extraktion zu gewährleisten, ist eine hohe Austauschfläche zwischen den nicht mischbaren Phasen anzustreben. In der klassischen Extraktion wird das durch ein starkes Vermischen der beiden Phasen mit anschließender Koaleszenz erreicht. Man spricht dann von einem Mixer-Settler-System. Schwierig wird es, wenn sich Emulsionen bilden oder die Koaleszenz der Phasen sehr langsam abläuft. Der Betrieb einer Mixer-Settler-Anlage im Gegenstromverfahren ist nicht beliebig erweiterbar. Ein weiterer Nachteil ist, daß die Phasen eine ausreichend hohe Dichtedifferenz aufweisen müssen, dieses Aussage gilt für alle Extraktionsverfahren mit Ausnahme der Zentrifugalextraktionen und der Zentrifugalseparatoren.

Werden Membranen für die Extraktion eingesetzt, können viele der oben geschilderten Schwierigkeiten vermieden werden. Als Beispiel ist hier der Mechanismus der Extraktion für den Einsatz einer mikroporösen hydrophoben Membran beschrieben. Die organische Phase ist von der wäßrigen durch eine Membran getrennt. In Abbildung 2-1 ist eine schematische Darstellung gegeben. Die organische Phase kann ohne Schwierigkeiten die Membran benetzen und durch die Poren hindurchtreten. Dieses kann dadurch



**Abbildung 2-1:** Immobilisierung der Phasengrenzfläche organische - wäßrige Phase in den Poren einer hydrophoben Membran [24]

verhindert werden, daß auf der gegenüberliegenden Membranseite eine andere nicht mischbare Phase mit gleichem oder höherem Druck gegenübergestellt wird [22]. In jeder Pore bildet sich eine Grenzschicht zwischen der wäßrigen Phase und der organischen Phase aus. Diese Phasengrenzschicht bleibt in jeder Pore immobilisiert, solange der Druck der wäßrigen Phase nicht über den kritischen Druck  $\Delta p_{cr}$  ansteigt. Der Druck  $\Delta p_{cr}$  wird „break-through pressure“ genannt. Wenn der kritische Druck nicht überschritten wird, kommt es zur Ausbildung einer Phasengrenzfläche in jeder Pore.



Damit ist die Voraussetzung für eine Extraktion gegeben, ohne daß die Nachteile der klassischen Extraktion auftreten [23]. Diese Art der Extraktion wird dispersionsfreie, membrangestützte Extraktion genannt. Eine sehr gute Einführung der zugrunde liegenden Theorie ist bei Ho und Sirkar gegeben [24].

#### **2.1.4 Membranreaktoren**

In der Literatur taucht der Begriff Membranreaktor seit Beginn der '80er Jahre auf. Der Begriff Membranreaktor beinhaltet mehr als nur die Bereitstellung einer reaktiven Membran, wie sie zur Katalysatorimmobilisierung eingesetzt wird [25]. Die meisten dieser Membranreaktoren sind Bioreaktoren mit Enzymen oder ganzen Zellen. Sehr viele dieser Reaktoren verwenden synthetische Polymere. Das Immobilisieren der Enzyme auf der Membran ist nicht mehr das limitierende Problem. Stand der Forschung ist, die gewünschte Reaktion mit einer Produktaufreinigung zu verknüpfen. Das kann durch eine Sandwich-Membran erreicht werden, die aus zwei Schichten aufgebaut ist. Die erste Schicht trägt die katalytisch aktiven Enzyme, auf diese wird eine weitere, selektive Schicht aufgebracht, die in der Lage ist, nur das gewünschte Produkt freizusetzen.

#### **2.1.5 Lösungsmittelauswahl**

In der klassischen Reaktivextraktion entstehen durch den Einsatz von Carriern oft hochviskose Flüssigkeiten, die in einem organischen Lösungsmittel gelöst werden müssen. Mit Modifiern wird die Löslichkeit des Solute-Carrier-Komplexes erhöht. Dies erfolgt durch die Erhöhung der Polarität der organischen Phase. Die organische Phase kann sehr komplex zusammengesetzt sein und wird deshalb häufig als Extraktionssystem bezeichnet.

Häufig werden technische Mineralölverschnitte mit einem Siedebereich um 220 °C und einem Flammpunkt von ca. 60 °C verwendet [21].

Wichtige Kriterien für die Lösungsmittelwahl bei der Flüssig/Flüssig-Extraktion sowie physikalische Größen verschiedener Extraktionssysteme sind von Hampe aufgeführt worden [26].

Soll die Reaktivextraktion direkt an biotechnologische Verfahrensschritte zur Produktaufreinigung gekoppelt werden, sind hohe Anforderungen an die Lösungsmittel zu stellen, vor allem hinsichtlich ihrer Biokompatibilität. Die Polarität des Lösungsmittels ist hierbei von entscheidender Bedeutung.

### **2.1.6 Membrantrennverfahren**

Seit Beginn der '70er Jahre gewinnt der Einsatz von synthetischen Membranen zur Stofftrennung im industriellen Maßstab an Bedeutung. Die Membransysteme werden dabei hauptsächlich zur Aufarbeitung von wäßrigen Systemen eingesetzt. Wichtige Einsatzgebiete sind die Meerwasserentsalzung und die Reinstwassergewinnung. Zur Auftrennung von azeotropen Gemischen wird die Pervaporation immer wichtiger [5]. Die Aufarbeitung von Deponiesickerwässern wird zum Teil durch Umkehrosmose gewährleistet [27].

Der Einsatz der Membranen in der Trenntechnik bietet eine Reihe von Vorteilen gegenüber herkömmlichen Prozessen [28]:

- Hohe Raum-Zeit-Ausbeuten möglich
- Trennung ohne hohe thermische Belastung
- Sterile Prozeßführung möglich
- Kein Zusatz von zusätzlichen Chemikalien (Schleppmitteln)
- Geringe Scherkräfte

In den letzten Jahren hat sich die Membrantechnik zur Stofftrennung in der Biotechnologie zu einer verfahrenstechnischen Unit Operation entwickelt.

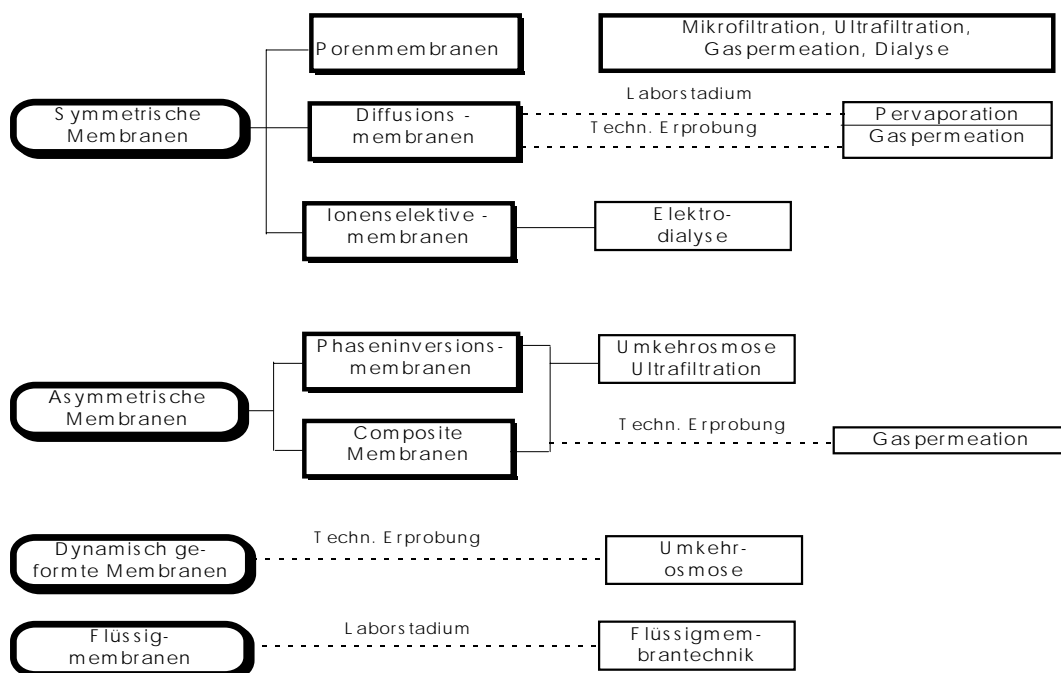
Eine Membran bildet eine permeable Barriere, durch die zwei Phasen voneinander getrennt werden. Sie ist jedoch für bestimmte Stoffkomponenten aus einem flüssigen

oder gasförmigen Ausgangsgemisch durchlässig. Die Triebkraft für die Reaktion, d. h. der Aufbau eines Gradienten im chemischen Potential ist im Normalfall durch einen Druckgradienten gegeben. In bestimmten Fällen wird jedoch auch ein Temperatur- oder Konzentrationsgradient aufgebaut. In der Elektrodialyse wird eine elektrische Potentialdifferenz eingesetzt.

Damit synthetische Membranen ein weites Einsatzfeld erlangen, müssen folgende Eigenschaften optimiert werden:

- Permeatfluß
- Festigkeit
- Temperaturbeständigkeit
- Herstellungskosten
- Sterilisierbarkeit
- Chemische und bakterielle Resistenz

Es sind eine Vielzahl verschiedener Membrantypen entwickelt worden, deren Eigenschaften für das jeweilige Einsatzgebiet optimiert worden sind. Eine Übersicht ist in Abbildung 2-2 gegeben. Als Membranmaterialien werden häufig Naturprodukte bzw. deren Derivate (z. B. Celluloseacetat), organische Materialien, wie synthetische



**Abbildung 2-2:** Klassifizierung der Membranstrukturen und deren Einsatzmöglichkeiten [29]

Polymere sowie anorganische Stoffe wie poröse Gläser, Kohlenstoff und Zirkondioxid verwendet.

Die Membranen können in Gruppen eingeteilt werden, die einen symmetrischen bzw. asymmetrischen Aufbau haben [29]. Asymmetrische Membranen werden aus zwei Komponenten aufgebaut. Die Membranen besitzen ein hochporöses Trägergerüst (Dicke 0,1 bis 1 mm). Auf diese Stützschiicht wird die eigentliche selektive Trennschiicht (Dicke 0,2 bis 2  $\mu\text{m}$ ) aufgebracht. In neuerer Zeit werden verstärkt Composite-Membranen entwickelt, die aus drei Schichten aufgebaut sind [30]. Hier kann die selektive Trennschiicht unabhängig von der Stützschiicht optimiert werden. Asymmetrische Membranen werden im Allgemeinen zur Ultrafiltration und Umkehrosrose eingesetzt. Symmetrische Membranen werden häufig für die Mikrofiltration verwendet. Sie haben den Nachteil, daß sie zum Verstopfen neigen. Die Membranen werden häufig zu größeren Modulen zusammengefaßt. Es sind Platten-, Wickel-, Rohr-, Kapillar- und Hohlfasermodule entwickelt worden. In Tabelle 2-1 sind die bekanntesten Membranprozesse und ihre Einsatzmöglichkeiten aufgeführt.

**Tabelle 2-1:** Übersicht über technisch relevante Membranprozesse und deren Einsatzgebiete [29]

Membranprozeß	treibende Kraft für den Stofftransport	Membrantyp	Anwendung
Mikrofiltration	hydrostatische Druckdifferenz 50 - 500 kPa	symmetrische Porenmembran mit Porenradien von 0,1 bis 20 $\mu\text{m}$	Abtrennen von suspendierten Stoffen
Ultrafiltration	hydrostatische Druckdifferenz 100 - 1000 kPa	asymmetrische Porenmembran mit Porenradien von 1 - 10 nm	Konzentrieren, Fraktionieren und Reinigen von makromolekularen Lösungen
Umkehrosrose	hydrostatische Druckdifferenz 1000 - 10000 kPa	asymmetrische Löslichkeitsmembran aus homogenem Polymer	Konzentrieren von Stoffen mit niedriger Molmasse
Dialyse	Konzentrationsdifferenz	symmetrische Porenmembran	Abtrennen von Stoffen mit niedriger Molmasse aus makromolekularen Lösungen und Suspensionen
Elektrodialyse	elektrische Potentialdifferenz	Ionenaustauschermembran	Entsalzen und Entsäuern von Lösungen mit neutralen Stoffen geringer Molmasse
Gastrengung	hydrostatische Druckdifferenz 1000 - 150000 kPa	asymmetrische Löslichkeitsmembran aus homogenem Polymer	Trennung von Gasen und Dämpfen
Pervaporation	Partialdruckdifferenz 0 bis 100 kPa	asymmetrische Löslichkeitsmembran aus homogenem Polymer	Trennung von Lösungsmitteln und azeotropen Gemischen
Membrandestillation	Temperaturdifferenz	symmetrische, hydrophobe, mikroporöse Membran	Wasserentsalzung, Konzentrierung von Lösungen

Ein guter Überblick über die Einsatzmöglichkeiten von technischen Membranen in der Biotechnologie ist in dem Buch „Technische Membranen in der Biotechnologie“ gegeben [7].

## 2.2 Enzyme

### 2.2.1 Wirkungsweise

Enzyme sind Biokatalysatoren. Die in einem lebenden Organismus ablaufenden Stoffumwandlungen würden ohne die Anwesenheit von Enzymen mit unmeßbar kleiner Geschwindigkeit vor sich gehen [31,32]. Die Aufgabe der Enzyme ist es, die benötigte Aktivierungsenergie herabzusetzen, um dadurch die Reaktionsgeschwindigkeit zu erhöhen. Bemerkenswert ist, daß Enzyme in der Lage sind, komplexe Reaktionen unter physiologischen Bedingungen zu katalysieren.

Charakteristisch für ein Enzym ist seine hohe Substratspezifität, zu der gegebenenfalls eine Stereospezifität kommen kann. Diese Eigenschaften sind für die Synthese von Natur- und Arzneistoffen von höchster Bedeutung. Jedes Enzym zeichnet sich durch ein bestimmtes aktives Zentrum aus. An dieses Zentrum wird das jeweilige Substrat gebunden, vergleichbar mit dem „Schlüssel-Schloß-Prinzip“. D. h., die sterischen Verhältnisse und die Verteilung der Ladungen sind so beschaffen, daß nur ein Substrat oder eine Substratklasse umgesetzt werden. Hierin ist die ausgesprochen hohe Substratspezifität der Enzyme begründet.

Enzyme beschleunigen die Einstellung eines Reaktionsgleichgewichtes, aber sie verschieben die Lage des Gleichgewichtes nicht. Für die zu katalysierende Reaktion zwischen einem Enzym **E** und einem Substrat **S**, die zur Bildung des Produktes **P** führt, läßt sich das folgende allgemeine Reaktionsschema aufstellen:



Das Enzym bindet sich zuerst an das Substrat unter Ausbildung eines Enzym-Substratkomplexes **ES**. Dieser Komplex reagiert, und in einem zweiten Reaktionsschritt dissoziiert der Komplex zum Produkt und zum freien Enzym. Diese Art der Sichtweise

eines unmittelbar nach seiner Bildung abdissoziierenden Produkts liegt der Theorie von *Michaelis Menten* zugrunde. Nach der Theorie von *Menten* läßt sich für die beschriebene Reaktion folgende Gleichgewichtskonstante, die sogenannte *Michaelis-Menten-Konstante*  $K_M$  formulieren:

$$K_M = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]}$$

Durch diese Konstante kann die Affinität eines Enzyms zum Substrat ausgedrückt werden. Besitzt  $K_M$  einen hohen Wert, liegt der Enzym-Substratkomplex weitgehend dissoziiert vor. Das Enzym besitzt nur eine geringe Substrataffinität.

### 2.2.2 Aufbau der Enzyme

Enzyme werden in die Stoffklasse der Proteine eingeordnet. Sie bestehen aus einer Sequenz von Aminosäuren, die durch Peptidbindungen untereinander verknüpft sind. Die Sequenz dieser Aminosäuren im Protein wird als Primärstruktur bezeichnet. Die einzelnen funktionellen Gruppen der Aminosäuresequenz können auf vielfache Art und Weise untereinander in Wechselwirkung treten. Somit kommt es zur Ausbildung einer räumlichen Struktur. Durch Bildung von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen bildet sich beispielsweise eine  $\alpha$ -Helix als Sekundärstruktur. Werden auch noch die Seitenketten der Aminosäuren in die Wechselwirkungen einbezogen, z.B. durch Disulfidbindungen, Ionenbeziehungen oder hydrophobe Reste (längerkettige Alkylreste in wäßriger Umgebung), so bildet sich eine Tertiärstruktur heraus. Durch Zusammenlagern mehrerer dieser Peptidketten zu größeren Aggregaten entsteht eine Quartärstruktur.

Viele Enzyme besitzen neben der Proteinkomponente noch weitere, nicht proteinartige Moleküle. Wenn beide Bestandteile fest miteinander verbunden sind, wird der nicht zum Protein gehörende Bestandteil als **prothetische Gruppe** bezeichnet. Ist dieser sogenannte **Cofaktor** nicht fest an das Protein gebunden, wird er als **Coenzym** und das entsprechende Enzym als **Apoenzym** bezeichnet. Coenzyme übernehmen für das Enzym oftmals spezifische Aufgaben wie Wasserstoffübertragung, Kohlendioxidabspaltung, Acetylgruppentransfer oder Transphosphorylierung.

**Tabelle 2-2:** Häufig auftretende Coenzyme

<b>Abkürzung</b>	<b>Coenzym</b>	<b>Apoenzym</b>	<b>Funktion</b>
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat	Transferasen, Kinasen	Transphosphorylierung
<b>CoA</b>	Coenzym A	Acetyltransferasen, Thioligasen	Acetylgruppentransfer
<b>NAD</b>	Nicotin-adenin- dinucleotid	Dehydrogenasen	Wasserstofftransfer
<b>FAD</b>	Flavin-adenin- dinucleotid	Oxidasen	Wasserstofftransfer

### 2.2.3 Spezifität der Enzyme

Im Gegensatz zu anderen Proteinen zeichnet sich ein Enzym dadurch aus, daß es ein aktives Zentrum besitzt. Das aktive Zentrum entsteht durch die charakteristische Faltung eines Teiles der Aminosäurekette. Im Verhältnis zur Gesamtgröße des Enzyms umfaßt das aktive Zentrum nur einen Bruchteil des Enzyms. Das aktive Zentrum liegt immer in einer Spalte oder Furche der dreidimensionalen Enzymstruktur. An dieser Stelle wird das Substratmolekül gebunden und kann in einer für die Reaktion günstigen Konformation fixiert werden. Durch partielle Ladungsübertragung und durch die Lockerung von Bindungen kommt es zu einer Aktivierung des Substratmoleküls.

Der Aufbau des aktiven Zentrums ist nicht völlig starr. Innerhalb gewisser Grenzen sind Konformationsänderungen möglich. Diese Flexibilität ist für die Substratbindung und für die Wirksamkeit des katalytischen Mechanismus von großer Bedeutung.

Eine Einteilung der Spezifität von Enzymen kann nach folgendem Schema durchgeführt werden.

Enzyme sind:

- **Wirkungsspezifisch**  
Falls mehrere Reaktionen des Substrates grundsätzlich möglich sind, wird nur eine einzige selektiv katalysiert.
  
- **Stereospezifisch**  
Nur ein Enantiomer eines Enantiomerenpaares wird umgesetzt.
  
- **Substratspezifisch**  
Eine Reaktion findet nur mit einem bestimmten Substratmolekül statt, ähnliche Moleküle reagieren nicht.
  
- **Gruppenspezifisch**  
Es können verschiedene Substrate umgesetzt werden, die über die gleiche funktionelle Gruppe verfügen.

Diese hohe Spezialisierung ist für die Zelle von großer Bedeutung. Es entstehen nur wenig Nebenprodukte. Eine nahezu optimale Stoff- und Energieausnutzung ist gegeben. Eben diese Eigenschaften machen enzymkatalysierte Reaktionen auch für die Technik und Analytik interessant. Durch enzymatische Reaktionen lassen sich aus Substanzgemischen, ohne aufwendige Trennmethode, gezielt die gesuchten Analyten bestimmen.

#### 2.2.4 Enzymaktivität und -stabilität

Die Enzymaktivität wird nach der *International Union of Biochemistry* folgendermaßen definiert: Ein **Unit (U)** ist die Enzymmenge, die unter optimalen Bedingungen den Umsatz von einem  $\mu\text{mol}$  Substrat pro Minute bewirkt [33]. Die gesetzliche Einheit, die sich aus den SI-Einheiten ableitet, wird als **Katal** ( $1 \text{ kat} = 6 \cdot 10^{-7} \text{ U}$ ) bezeichnet. Der Gebrauch des Katal hat sich in der Praxis bisher



jedoch nicht durchgesetzt. Ein Katal entspricht der Umsetzung von einem Mol pro Sekunde.

Bei der Aktivitätsangabe muß berücksichtigt werden, daß Enzyme unterschiedliche Temperatur- und pH-Optima besitzen, welche experimentell zu bestimmen sind und als Bezugsgröße mit aufgeführt werden müssen. Die **spezifische Aktivität** eines Enzyms stellt ein Maß für die Reinheit des Enzyms dar. Angegeben wird die spezifische Aktivität bezogen auf ein Milligramm des Proteins.

Durch Einwirkung von extremen Umgebungsparametern, z. B. starke Säuren und Laugen, hohe Salzkonzentrationen, Schwermetallkationen, Hitze, Detergenzien (Triton X), Komplexbildner (EDTA) oder Zellgifte wie z. B. Natriumazid, kann es zu einer Denaturierung der Enzymstruktur und somit zum Verlust der katalytischen Wirkung kommen.

### 2.2.5 Enzymhemmungen

Durch unterschiedliche Arten von Enzymhemmungen besitzt der Organismus eine Vielzahl an Möglichkeiten, Stoffwechselprozesse zu regulieren. Aber auch zahlreiche Gifte entfalten ihre Wirksamkeit durch die reversible oder auch irreversible Hemmung bestimmter Enzyme.

Die Enzymhemmungen können in verschiedene **Hemmtypen** eingeteilt werden:

- **Irreversibel**

Der Inhibitor lagert sich durch Ausbildung einer kovalenten Bindung dauerhaft an eine funktionelle Gruppe des Enzyms.

- **Kompetitiv**

Ein substratähnliches Molekül (**Inhibitor**) konkurriert mit dem Substrat um die Bindung an das aktive Zentrum. Bei der kompetitiven Hemmung handelt es sich um eine reversible Hemmung. Es sind auch Beispiele bekannt, in denen das Produkt selbst als Inhibitor wirkt (**Produkthemmung**).

- **Nicht-kompetitiv**

Der Inhibitor blockiert nicht das aktive Zentrum, sondern lagert sich reversibel an das Enzym oder den Enzym-Substratkomplex an. Komplexbildner wie EDTA

oder Cyanid, welche Metallionen komplexieren, hemmen auf diese Weise, da gerade die für Enzyme wichtigen Kationen maskiert werden. Das Enzym verliert somit einen Teil seiner Aktivität.

## 2.3 Immobilisierung von Enzymen

### 2.3.1 Definition

Als immobilisiert werden Enzyme bezeichnet, welche durch physikalische oder chemische Methoden in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt sind. Die Enzyme können z. B. untereinander vernetzt, an Trägerstoffe gebunden, in eine polymere Matrix oder in eine Membran eingeschlossen werden. Der große Vorteil all dieser Methoden gegenüber dem Einsatz eines nativen Enzyms liegt in der leichten Trennbarkeit des Immobilisates vom Reaktionsgemisch. Die teuren Enzyme lassen sich somit leicht mehrfach verwenden.

Die große Zahl an Immobilisierungsmöglichkeiten läßt sich prinzipiell in vier verschiedene Methoden unterteilen [34]:

- **Immobilisierung durch Matriceinhüllung**

Die Einbindung des Enzyms erfolgt entweder in eine natürliche oder in eine aus synthetischen Polymeren hergestellte Matrix. Bei dieser Methode ist es schwer zu realisieren, daß Substrate und Produkte leicht durch die das Enzym umschließende Matrix hindurchdiffundieren können, ohne daß das Enzym aus der Matrix ausgewaschen wird.

- **Immobilisierung durch Membranabtrennung**

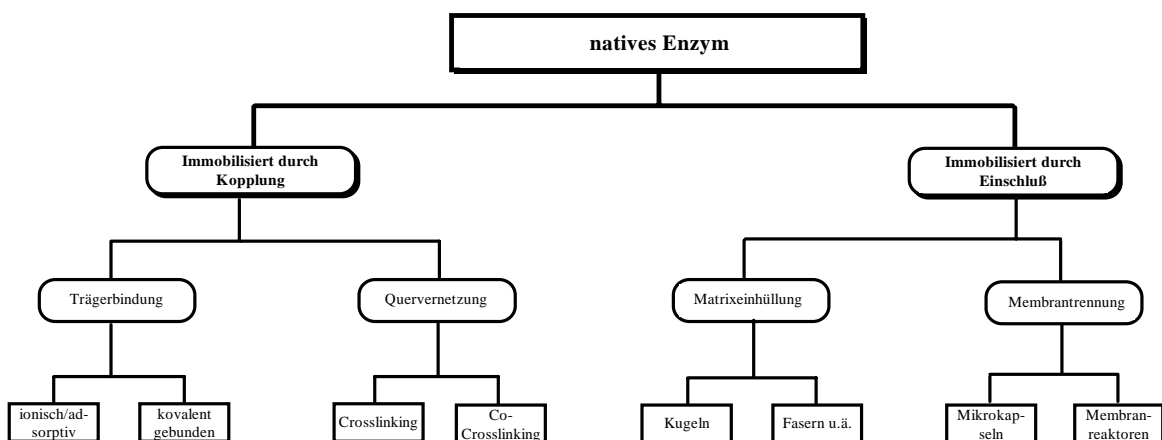
Bei dieser Methode wird versucht, das Enzym durch eine semipermeable Membran einzuschließen. Der Einschluß des Enzyms erfolgt durch eine Art künstliche Zellwand. Die Enzyme können mit einer Lipid-Doppelschicht umhüllt oder durch eine polymere Membran mikroverkapselt werden.

### - Immobilisierung durch Quervernetzung

Quervernetzung bedeutet, daß die Enzyme untereinander verbunden werden. Es entstehen hochkomplexe Aggregate, die nicht wasserlöslich sind. Die Enzyme können direkt untereinander vernetzt werden (Crosslinking) oder das gebildete Netz kann durch den Einbau anderer Moleküle eine weitere Struktur bekommen (Co-Crosslinking). Durch diese Technik erreicht man eine Variation der Enzymdichte.

### - Immobilisierung durch Trägerbindung

Die Enzyme werden entweder durch Adsorption oder durch Ausbildung von kovalenten Bindungen an das Trägermaterial gebunden. Der Vorteil der reinen Bindung durch Adsorption besteht darin, daß die Konformation des Enzyms nicht verändert wird und somit auch kaum Aktivitätsverluste auftreten. Ein großer Nachteil liegt jedoch in der geringen Stabilität des Immobilisates. Der aktivitätsmindernde Einfluß einer kovalenten Bindung auf die Struktur des Enzyms läßt sich durch Einführen von Spacer-Gruppen teilweise aufheben. Durch Einführen längerer Kohlenstoffketten zwischen Enzym und Trägeroberfläche kann gerade bei großen Enzymen eine höhere Beweglichkeit und daraus resultierend auch eine höhere Aktivität erreicht werden.



**Abbildung 2-3:** Übersicht über die Immobilisierungsmöglichkeiten

Die Gliederung in Abbildung 2-3 gibt nur einen Überblick über die gängigen Immobilisierungsmethoden. In neueren Techniken werden oft auch Kombinationen unterschiedlicher Immobilisierungsarten eingesetzt.

### 2.3.2 Trägermaterialien

Folgende Trägermaterialien haben sich in der Praxis bewährt.

**Tabelle 2-3:** Überblick über verschiedene Trägermaterialien [34]

Methoden	Trägermaterialien
Matrixeinhüllung	Epoxydharze, Polyurethane, Gelatine, Agar
ionische Bindung	DEAE-Cellulose, Sepharose, Sephadex, Amberlite
adsorptive Bindung	Aktivkohle, Aluminiumoxid, Glas, synthetische Harze, Cellulose
kovalente Bindung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• anorganische Träger: Glas, Kieselerde</li> <li>• natürliche Polymere: Sepharose, Cellulose, Dextran, Agarose</li> <li>• synthetische Polymere: Methacrylate, Polyacrylate, Nylonderivate</li> </ul>

### 2.3.3 Lösungsmittel für enzymatische Reaktionen

Da natürliche Stoffwechselprozesse weitgehend in wässrigen Systemen ablaufen, wurde dies lange als ideales Medium angesehen. Enzymatische Reaktionen in organischen Lösungsmitteln wurden sogar als nicht für möglich betrachtet, da Wasser für die Konformation des Enzyms unerlässlich ist. Dabei laufen auch in der Natur enzymkatalysierte Prozesse in Emulsionen und innerhalb unpolarer Membranen ab.

Seit den grundlegenden Arbeiten von Klibanov [35] gibt es viele Veröffentlichungen über Reaktionen in unpolaren organischen Medien, die eine Reihe von Vorteilen aufzeigen [36,37,38,39,40,41]:

- Reaktionen sind auch bei höheren Temperaturen (bis 100 °C) möglich.
- Enzyme sind in organischen Medien vielfach stabiler.
- Die Rückgewinnung der in organischen Lösungsmitteln unlöslichen Enzyme ist relativ einfach.
- Unerwünschte Nebenreaktionen durch Wasser (z.B. Hydrolyse bei Veresterungen) werden vermieden.
- Synthesen mit hydrophoben Substraten werden erleichtert bzw. erst möglich.
- Wasserempfindliche Substanzen, wie z.B. Anhydride und Säurechloride können eingesetzt werden.

In Tabelle 2-4 ist ein kurzer Überblick über Enzym katalysierte Reaktionen in organischen Lösungsmitteln gegeben. Ausführliche Literatur und Synthesebeispiele finden sich bei Xie [42].

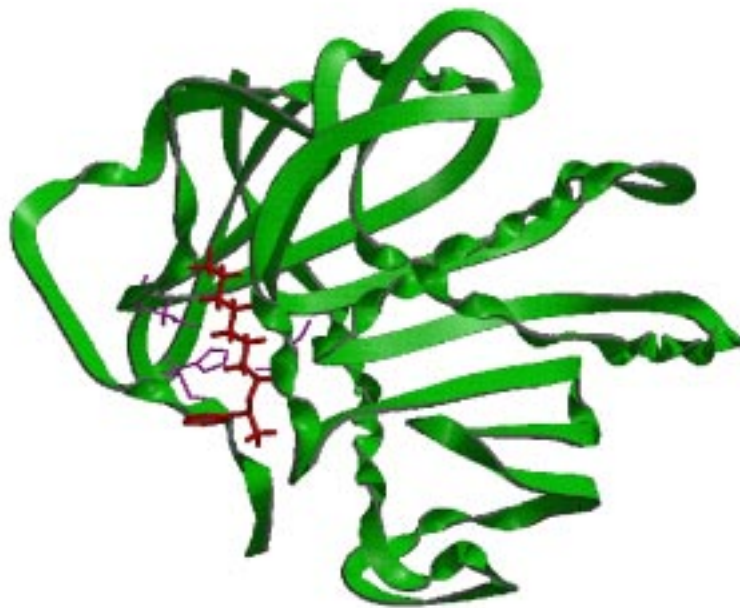
**Tabelle 2-4:** Ausgewählte Beispiele für Enzym katalysierte Reaktionen in organischen Lösungsmitteln [44].

Enzym	Lösungsmittel	Katalysierte Reaktion
Lipasen (ungereinigtes Pulver)	Unpolare Lösungsmittel	Veresterung, Umesterung, Peptidsynthese, Bildung makrocyclischer Lactone
Proteasen (Thermolysin, Subtilisin, $\alpha$ -Chymotrypsin)	Ethylacetat, Amylalkohol usw.	Peptidsynthese
Immobilisierte Carboxyesterase	Methylpropionat	Enantioselektive Acylierung racemischer Alkohole
Immobilisierte Alkoholdehydrogenase	Isopropylalkohol	Asymmetrische Reduktion von Ketonen
Immobilisierte Polyphenoloxidase	Chloroform	Oxidative Umwandlung von Phenolen in o-Chinone
Immobilisierte Mandelonitrilase	Ethylacetat	Synthese optisch aktiver (R)- Cyanhydrine
Cholesterin-Oxidase	Heptan, Tetrachlorkohlenstoff, Butylacetat	Oxidation von 3-Hydroxysteroiden

## 2.4 Lipasen, Esterasen

Die lipolytischen Enzyme sind schon seit etwa 150 Jahren als Bestandteile im Pankreassaft bekannt, dementsprechend viel Literatur gibt es auf diesem Gebiet [43,44,45]. In den letzten Jahren ist es jedoch gelungen Röntgenstrukturanalysen von den Lipasen aus

*Mucor miehei* und Zellen der Bauchspeicheldrüse des Schweines anzufertigen, so daß für diese beiden Enzyme die Struktur genau festgelegt ist. In Abbildung 2-4 ist ein Bändermodell des Enzyms aus *Mucor miehei* mit dem Substrat Phenylloktanoat im aktiven Zentrum dargestellt.

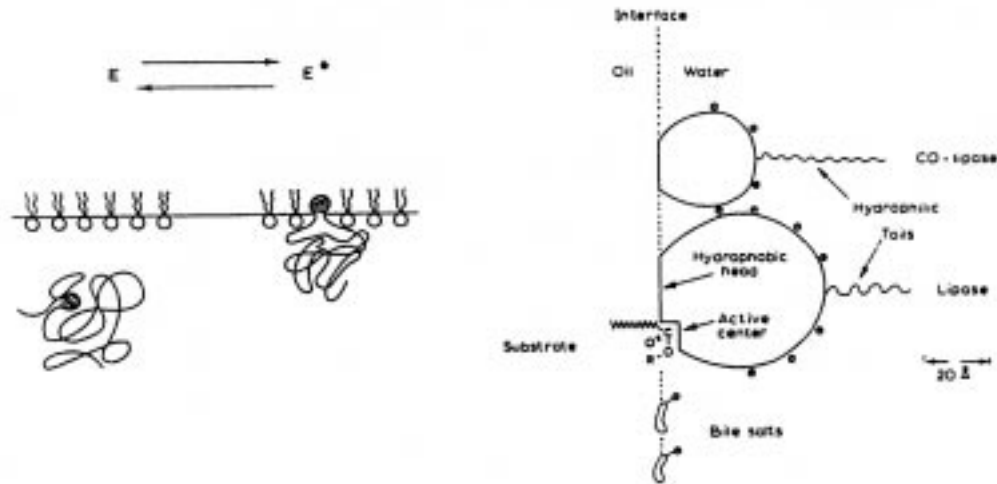


**Abbildung 2-4:** Bändermodell der Lipase aus *Mucor miehei* basierend auf einer Röntgenstrukturanalyse mit Phenylloktanoat im aktiven Zentrum [<http://www.kluyver.stm.tudelft.nl/enzymohp/mucor.htm>]

Lipasen und Esterasen werden in die Klasse der Hydrolasen eingeordnet. Lipasen hydrolysieren in erster Linie Fette, Esterasen spalten wasserlösliche Ester. Lipasen entfalten ihre katalytische Aktivität, ohne daß ein Coenzym vorhanden ist.

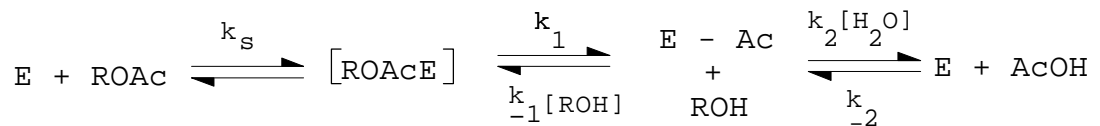
Die katalytische Reaktion, die durch diese Enzyme durchgeführt wird, besteht in der reversiblen Übertragung von Acylresten ( $\text{O}=\text{C}-\text{R}$ ), unter Bildung von kovalenten Enzym-Acylrest-Intermediaten, auf ein Nukleophil, wobei auch Alkohole und Ester als Nukleophile eingesetzt werden können (Ver- bzw. Umesterung). Lipasen sind besonders an hydrophoben Grenzflächen aktiv. Esterasen hingegen entfalten ihre Aktivität in homogener Lösung.

Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 2-5 gegeben. Im Organismus spielen die Lipasen eine bedeutende Rolle im Fettstoffwechsel. Sie dienen als Verdauungsenzyme und sorgen für den Aufbau und die Aktivierung der Fettreserven. Weiterhin sind sie am gesamten Membranstoffwechsel beteiligt [46].



**Abbildung 2-5:** Mechanismus der Fettsplaltung [46].

Ein kinetisches Modellschema für die Hydrolyse schlägt Laumen vor [47]:



Die Reaktion findet auf der Oberfläche des Enzyms im aktiven Zentrum statt. Jedes Molekül besitzt nur ein aktives Zentrum, dessen Struktur Ziel vieler Untersuchungen ist. Durch Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse konnten für einige Lipasen (u. a. *Mucor miehei*) Modelle entwickelt werden, in dem die Aminosäuren Serin, Histidin und Asparagin für die Substratbindung im aktiven Zentrum verantwortlich sind.

Damit scheint ein ähnlicher Mechanismus wie in der Protease Trypsin vorzuliegen.

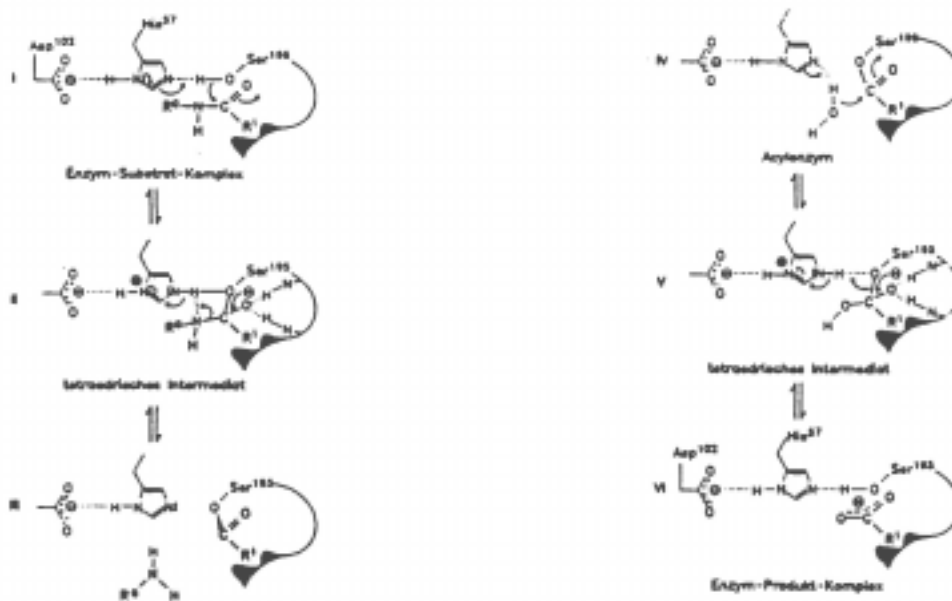
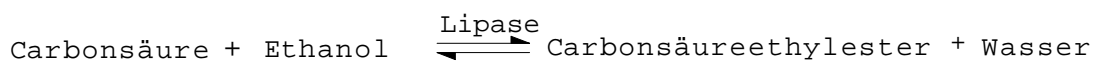


Abbildung 2-6: Mechanismus der Proteinspaltung durch Trypsin [48].

### 2.4.1 Veresterungsreaktion

Die Veresterung kann enzymatisch mit Lipasen erreicht werden, die an der Grenzfläche zwischen Fett und Wasser aktiv werden und den Abbau von Triglyceriden bewirken. In einem organischen Medium verschiebt sich das Reaktionsgleichgewicht in Richtung der Estersynthese.



Im Falle der vorliegenden Arbeit wird hauptsächlich Oktansäure als Substrat eingesetzt. Die enzymatische Reaktion findet im organischen Lösungsmittel statt. Das zweite Edukt Ethanol wird extraktiv in die organische Phase überführt.



Hohe Wasserkonzentrationen können sich in dieser Situation nicht nur auf das Reaktionsgleichgewicht auswirken, sondern auch die Denaturierung der Lipasen bewirken.



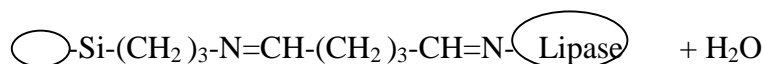
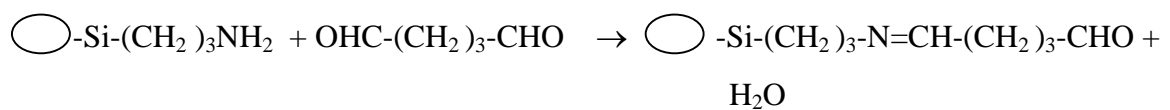
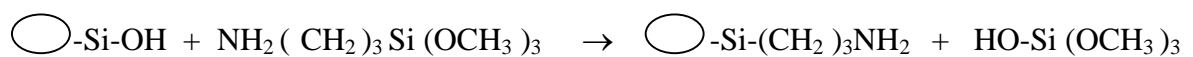
Üblicherweise wird mit Wasserkonzentrationen unter 1 % gearbeitet, da ein vollständig wasserfreies Medium meist zu hohen Aktivitätsverlusten bzw. Denaturierung führt.

Ein Mindestgehalt an Wasser hat sich für die biologische Aktivität als unerlässlich erwiesen. Vermutlich sorgt eine Wasserschicht auf dem Enzymmolekül durch Wasserstoffbrücken, hydrophobe Wechselwirkungen und van der Waals-Kräfte für die katalytisch aktive Konformation.

## 2.5 Enzymimmobilisierungen

### 2.5.1 Kovalente Bindung durch Aktivierung eines Trägers mit 3-Aminopropyl-trimethoxy-silan

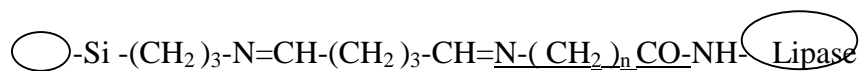
Silikate besitzen auf ihrer Oberfläche freie OH-Gruppen, deren Anzahl durch Anätzen mit Salpetersäure noch erhöht werden kann. Mit 3-Aminopropyl-trimethoxy-silan läßt sich der Aminopropylrest an das Silikat binden. Die Aminogruppe reagiert im nächsten Schritt mit einer Aldehydgruppe von Glutardialdehyd unter Bildung einer Schiff'schen Base. Nach dem gleichen Mechanismus reagiert die zweite Aldehydgruppe mit einer freien Aminogruppe der Lipase [38].



Bevor das Enzym an den Träger gebunden wird, können noch zusätzliche Spacer eingebunden werden, um die Beweglichkeit und die Substratzugänglichkeit des Enzyms zu erhöhen [38].

Zu diesem Zweck werden  $\omega$ -Amino-alkyl-carbonsäuren über die Aminogruppe an die zweite Aldehydfunktion gebunden. Anstelle des Carbonsäureprotons wird ein Carbodiimid eingeführt, das im leicht sauren Milieu (pH 4) wiederum mit einer protonierten Aminogruppe des Enzyms reagiert und eine Peptidbindung zwischen der Carboxyl- und der Aminogruppe erzeugt.

Durch Einfügen der Alkylketten als Spacer wird die Umgebung der Lipase hydrophober. Dieses kann die Enzymaktivität in organischem Medium verbessern.

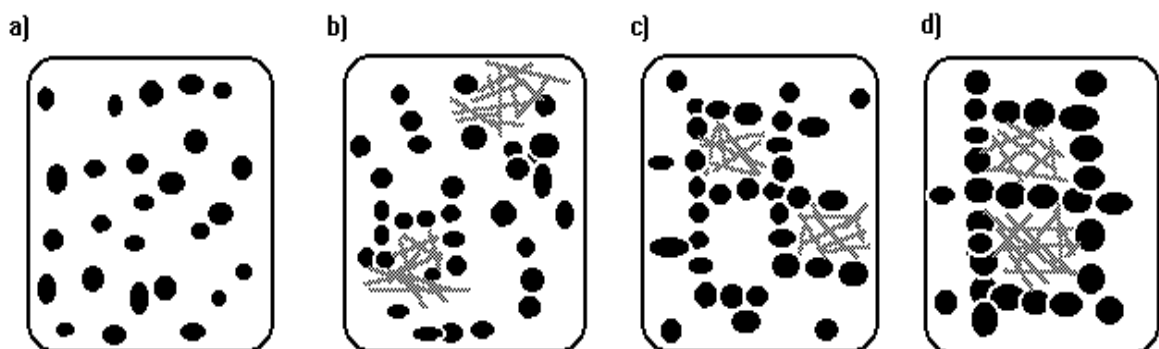


### 2.5.2 Enzymimmobilisierung in Sol-Gel-Matrix

Bei der Hydrolyse und anschließender Kondensation von Alkylsilanen wie z.B. Tetramethoxysilan, entsteht ein Netzwerk aus Silicium-Sauerstoff-Brücken, das eine Käfigstruktur ausbildet. In diese können Enzymmoleküle eingekapselt werden, ohne ihre Struktur zu verändern oder den Substratzugang zu behindern.

Nach dem Aushärten bildet das Gel eine glasharte Masse, die zerstoßen und gemahlen werden kann, ohne an Aktivität zu verlieren. Durch Zusatz von makromolekularen Substanzen wie z. B. Polyvinylalkohol läßt sich die Aktivität zusätzlich steigern.

Ebenso wichtig ist die stöchiometrische Zusammensetzung der Reaktionsmischung. Ein Verhältnis Wasser / Silan von 8:1 hat sich als ideal erwiesen [49,50].



**Abbildung 2-7:** Einschluss des Enzyms in die Silikatmatrix während der Polymerisation. a) Beginnende Hydrolyse und Polykondensation. b) Zugabe des Enzyms. c) das wachsende Netzwerk umschließt die Enzymmoleküle. d) Immobilisiertes Enzym.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Analytik

#### 3.1.1 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Gelöstproteinkonzentration erfolgt nach einer modifizierten Methode von Bradford [51] bzw. nach der von Sedmark und Grossberg [52]. Wie auch bei anderen Verfahren der Proteinbestimmung (z.B. Lowry [53] oder Goa [54]) wird die Bildung eines farbigen Komplexes zur quantitativen photometrischen Bestimmung herangezogen.

Die Methode ist einfach durchzuführen, und der Test besitzt eine hohe Empfindlichkeit. Bei der Methode nach Bradford wird Coomasie Brilliant Blue-G250 als Farbstoff eingesetzt. Durch Anlagerung eines Farbstoffmoleküls an ein Proteinstickstoffatom verschiebt sich die Wellenlänge des Absorptionsmaximums  $\lambda_{\max}$  von 465 nm auf 595 nm. Da der sich bildende Protein-Farbstoffkomplex eine geringe Bildungsgeschwindigkeit und Stabilität besitzt, muß die Messung der Absorption [A] stets nach einer definierten Zeitspanne erfolgen.

Die Durchführung des Testes erfolgt in Halbmikroküvetten (Schichtdicke 10 mm). Zu 800  $\mu$ l Reagenzlösung wird 200  $\mu$ l Probe oder Standard pipettiert, gut vermischt und für 10 Minuten im dunkeln inkubiert. Die Absorption wird in einem Zweistrahl-Photometer (Typ KONTRON UVIKON 922) bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen einen Blindwert (800  $\mu$ l Reagenz und 200  $\mu$ l 0,9 %-ige NaCl-Lösung) gemessen. Der Test wird in Einwegküvetten durchgeführt, da sowohl der Farbstoff als auch das Protein an den Küvettenwandungen merklich haften bleibt.

Die Reagenzlösung besitzt folgende Zusammensetzung: 100 mg Coomasie Brilliant Blue-G250, 50 ml Methanol und 100 ml konz.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  werden vermischt und mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

Die Kalibrationskurve wird mit BSA (Bovine Serum Albumin) durchgeführt. Die Standards werden in destilliertem Wasser angesetzt.

### 3.1.2 HPLC-Analytik

Für die Analytik der Fettsäuren und der korrespondierenden Ethylester wird eine HPLC-Analytik (**H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography) aufgebaut, die eine schnelle und genaue Bestimmung der Konzentration an Produkt und Edukt erlaubt. Die Anlage kann auch für On-line-Messungen eingesetzt werden.

Als Trennsäule wird eine analytische, hydrophobe Säule der Firma Millipore Waters eingesetzt (reversed phase C 18, 90 Å, 5 µm, 3,9 x 150 mm). Die Trennsäule ist für die Analytik von Aminosäuren vorgesehen. Das Trägermaterial besteht aus „fused silica“, welches funktionalisiert ist. An die aktivierten Gruppen sind C 18-Alkylketten gekoppelt, wodurch die Säule einen hydrophoben Charakter bekommt.

Der Einsatz einer Reversed-Phase-Trennsäule in Verbindung mit Methanol/Wasser als Eluent erlaubt eine sehr schnelle und genaue Analytik.

Die Anlage ist mit einem Differenz-Refraktometer (ERC 7511) und einer Pumpe (Kratos Spektraflow 400) ausgestattet. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgt über einen Integrator der Firma Spectra-Physics (Mod. SP 4290). Im Falle der On-line-Analytik übernimmt der Integrator die Ansteuerung des Injektionsventils.

Die Anlage wird isokratisch mit Methanol/Wasser als Eluent betrieben. Das Mischungsverhältnis Wasser/Methanol beträgt 1:9. Die Probe wird mit Eluent gemischt und injiziert (100 µl Probe und 900 µl Eluent). Für die Off-line-Proben wird ein Probenvolumen von 20 µl injiziert. Die Durchflußrate beträgt 0,4 ml/min.

Die Substanzpeaks werden anhand der Retentionszeit  $R_t$  und der Peakweite  $W$  bzw. ihrer Fläche (Integrator) ausgewertet. Die Güte der Trennung läßt sich über den Trennfaktor  $\alpha$  ermitteln.

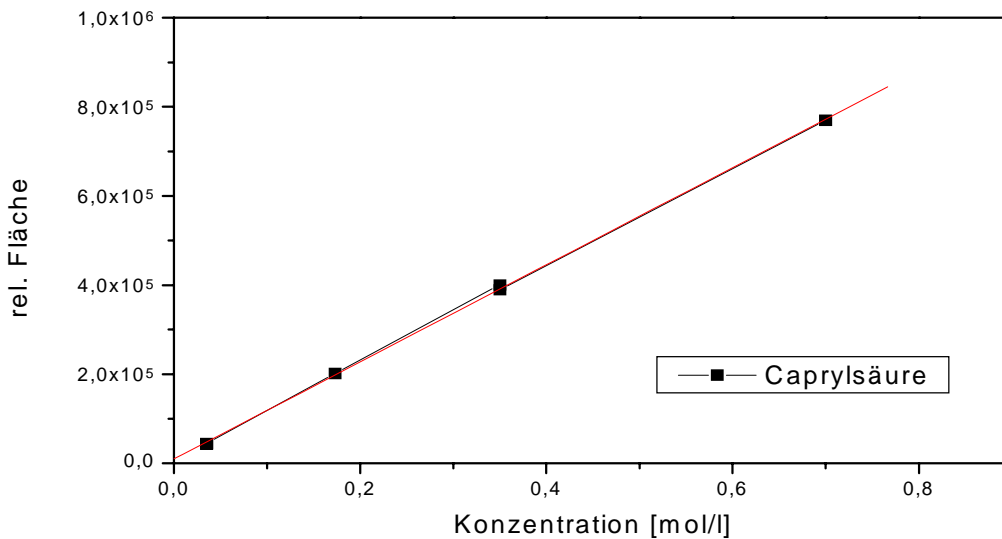
Die Peakflächen, die der Integrator berechnet, werden über die Regressionsdaten einer Kalibrierungsgeraden in Konzentrationen umgerechnet.

### 3.1.3 Kalibrierung

Die Kalibrierung der Anlage erfolgt durch Caprylsäure und Caprylsäureethylester. Es werden jeweils vier Standardkonzentrationen angesetzt (eingewogen) und mit Hexan auf 10 ml aufgefüllt. Mit jedem Standard werden zwei Messungen durchgeführt. Die Qualität der Analytik wird aus Abbildung 3-1 und Abbildung 3-2 ersichtlich.

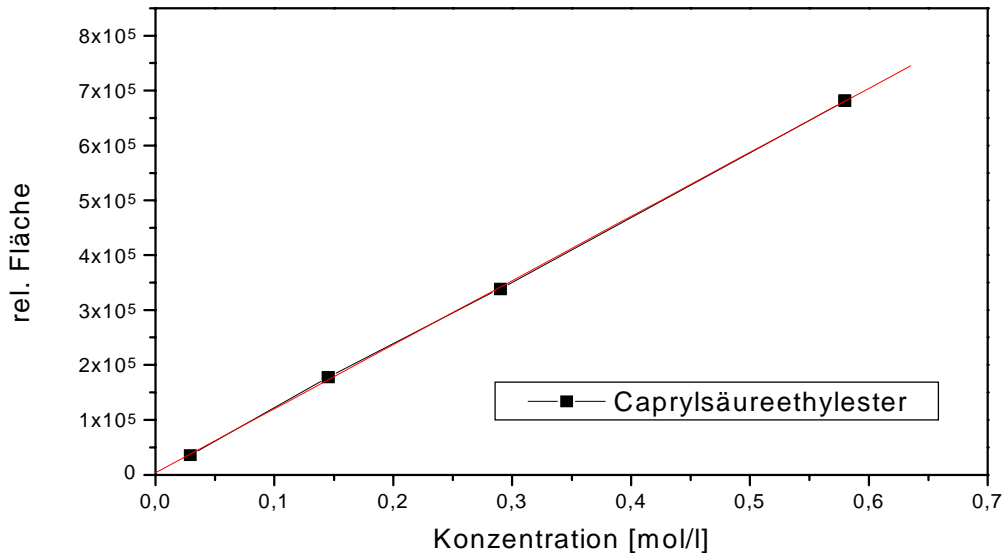
Tabelle 3-1: Kalibrationswerte für Caprylsäure und Caprylsäureethylester

Einwaage [mg]	Caprylsäure [mol/l]	Caprylsäureethylester [mol/l]
50	0,035	0,029
250	0,173	0,145
500	0,35	0,29
1000	0,69	0,58



**Abbildung 3-1:** Kalibrationsgerade für Caprylsäure bei der HPLC-Analytik zusammen mit der linearen Regression. Säule: reversed phase C 18, 90 Å, 5 µm, 3,9 x 150 mm. Der Korrelationskoeffizient beträgt  $R^2 = 0,99986$ .

Die Ergebnisse zeigen, daß der Einsatz der HPLC-Analytik für die Bestimmung von Fettsäuren bzw. der Fettsäureethylester sehr gut geeignet ist.



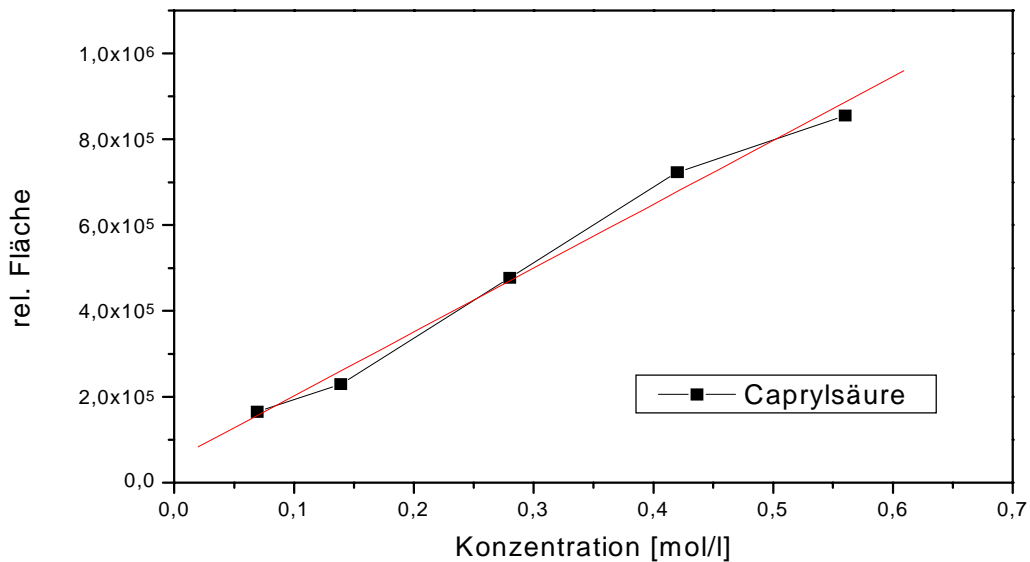
**Abbildung 3-2:** Kalibrationsgerade für Caprylsäureethylester in der HPLC-Analytik zusammen mit der linearen Regression. Säule: reversed phase C 18, 90 Å, 5 µm, 3,9 x 150 mm. Der Korrelationskoeffizient beträgt  $R^2 = 0,99991$ .

### 3.1.4 On-line-Analytik

Für die On-line-Analytik wird die gleiche HPLC-Anlage wie bei der Off-line-Analytik eingesetzt. Nur das Injektionsvolumen wird von 20 µl auf 5 µl reduziert, um eine direkte Injektion des Reaktionsgemisches zu ermöglichen. Die Probe wird durch eine zusätzliche Schlauchquetschpumpe aus dem Reaktor gezogen und kontinuierlich durch die Probenschlaufe des Injektionsventils geleitet. Vom Injektionsventil gelangt die Probe zurück zum Reaktor. Nur wenn die Probe injiziert wird, fließt sie über die Säule.

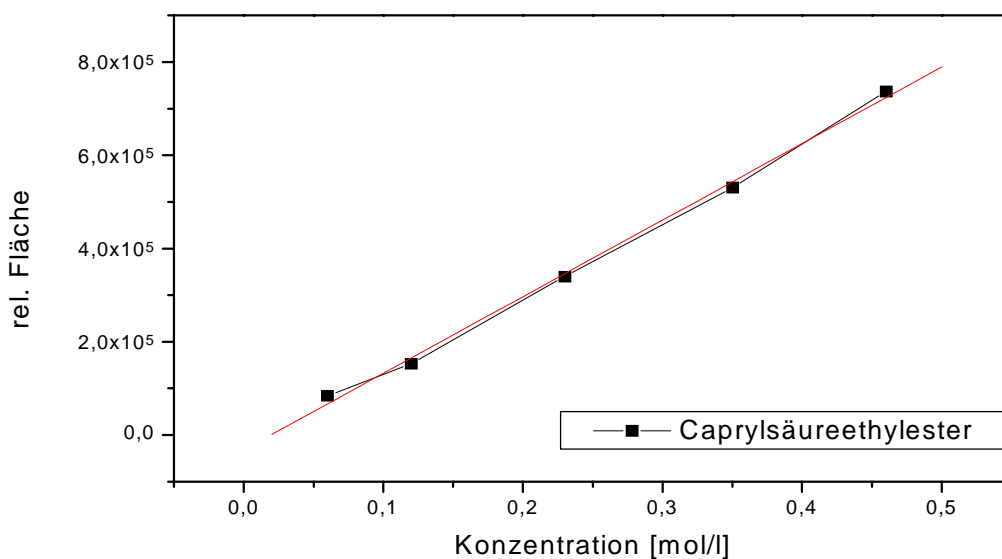
Die Injektionsfrequenz kann über den Integrator programmiert werden. In diesem Fall wird alle 30 Minuten ein Chromatogramm aufgenommen. Diese Häufigkeit ist ausreichend, um den Verlauf der Reaktion zu verfolgen.

In Abbildung 3-3 sind die Werte der Kalibrierung für Caprylsäure zusammen mit der linearen Regression dargestellt. Es ist zu erkennen, daß der Korrelationsgrad nicht so hoch liegt wie bei den offline bestimmten Werten.



**Abbildung 3-3:** Kalibrierung der HPLC-Analytik mit Caprylsäure im On-line-Betrieb. Der Korrelationskoeffizient beträgt  $R^2 = 0,9948$ .

In Abbildung 3-4 ist die Kalibrierung für Caprylsäureethylester zusammen mit der linearen Regressionsgeraden dargestellt. Es zeigt sich, daß der Caprylsäureethylester



**Abbildung 3-4:** Kalibrierung der HPLC-Analytik mit Caprylsäureethylester im On-line-Betrieb. Der Korrelationskoeffizient beträgt  $R^2 = 0,9986$ .

online besser analysiert werden kann als die entsprechende Säure. Die On-line-Analytik soll in erster Linie den Verlauf der Reaktion automatisch aufzeichnen können. Für diesen Zweck ist die Anlage gut geeignet.

### 3.1.5 Aktivitätsbestimmung (pH-Stat)

Die Messungen der Enzymaktivität werden mit einem Dosimaten (Metrohm) mit angeschlossenen Schreiber durchgeführt. In einem thermostatisierten Reaktionsgefäß (25 °C) befinden sich 50 ml Kalium-Phosphatpuffer (0,05 M), dessen pH-Wert (7,5) über ein pH-Meter ständig überprüft und durch automatische Zugabe von 0,1 N Natronlauge konstant gehalten werden kann.

Als Substrat wird für alle Aktivitätsbestimmungen 3 ml Tricaprylin zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird mit einem Magnetrührer gerührt, so daß eine Emulsion entsteht. Das Enzym spaltet die Esterbindung, so daß über die entsprechenden Mono- und Diester schließlich Caprylsäure und Glycerin gebildet werden. Die entstehende Caprylsäure führt zum Absinken des pH-Wertes.

Das pH-Meter ist mit einem Dosimaten gekoppelt, der automatisch mit 0,1 N Natronlauge gegentitriert, wenn der pH-Wert unter den Sollwert von 7,5 absinkt. Die Zugabe der Natronlauge wird mit einem x/t-Schreiber gegen die Zeit aufgezeichnet, so daß über den Verbrauch an Natronlauge die entstandene Menge Caprylsäure berechnet werden kann.

Die Aktivität der Enzyme wird in Unit angegeben. Ein Unit bedeutet, daß ein Gramm Enzym pro Minute ein  $\mu\text{mol}$  Substrat (bezogen auf die entstehende Caprylsäure) umsetzt.

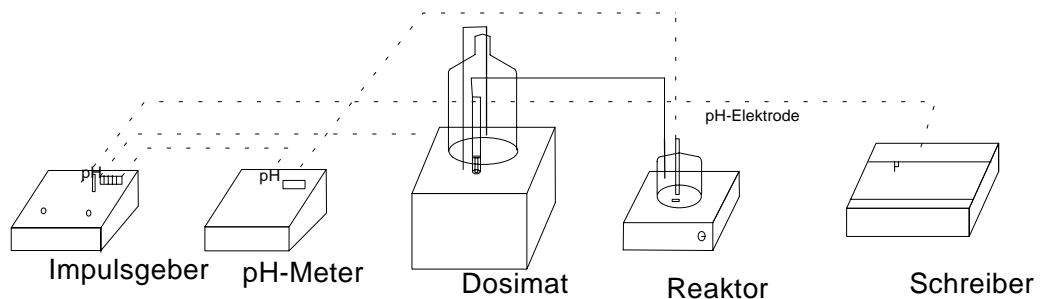
$$U = \frac{\mu\text{mol}}{\text{g} \cdot \text{min}}$$

In geringem Umfang zerfällt das Tricaprylin auch ohne Enzymzugabe (Einstellung des Estergleichgewichts). Bei den hohen gemessenen Aktivitäten ist dieser Eigenzerfall jedoch vernachlässigbar gering.



Für die Aktivitätsbestimmungen der nativen Lipasen werden jeweils 20 mg der Lyophilisate und 300  $\mu$ l (360 mg) der Suspension eingesetzt.

Der Aufbau der pH-Stat-Apparatur ist in Abbildung 3-5 dargestellt. Zur Bestimmung der Aktivität der immobilisierten Enzyme wird der gleiche Aufbau verwendet, nur daß anstelle der nativen Enzyme jeweils ein Gramm des immobilisierten Enzyms eingesetzt wird.



**Abbildung 3-5:** Schematischer Aufbau der pH-Stat-Meßapparatur zur Bestimmung der Lipaseaktivitäten.

## 3.2 Immobilisierungsmethoden

Im folgenden werden die in dieser Arbeit eingesetzten Immobilisierungsmethoden vorgestellt und beschrieben.

### 3.2.1 Immobilisierung auf Anionenaustauscher Dowex MWA-1

In diesem Versuch wird ein schwach basischer Anionenaustauscher (Dowex MWA-1) verwendet. Dabei handelt es sich um ein Copolymer aus Divinylbenzol und Styrol mit tertiären Aminen als Austauscherguppen [55].

Untersucht werden die Lipasen aus *Candida rugosa* und *Pseudomonas cepacia*, die lyophilisiert vorliegen, sowie eine Suspension der *Mucor miehei*-Lipaselösung.

**Darstellung:**

Das Trägermaterial wird in 0,05 molarem Kalium-Phosphatpuffer (pH 7,5) gewaschen. Jeweils 3 g des feuchten Trägers werden mit einem Meßgefäß in ein 20 ml Rollrandgläschen überführt. Zugesezt werden jeweils 100 mg Lipase bzw. 300 µl der *Mucor miehei*-Suspension. Die Ansätze werden 36 h im Kühlraum mit Hilfe von Magnetrührern vermischt, anschließend filtriert und mit Pufferlösung gespült.

Die Immobilisate werden nach der Aktivitätsbestimmung in der pH-Stat-Apparatur (Kap. 3.1.5) wiedergewonnen. Da noch anhaftendes Tricaprylin mit der Pufferlösung nicht entfernt werden kann, besteht die Gefahr, daß noch vorhandenes Substrat weiter gespalten wird und deshalb der pH-Wert so weit absinkt, bis das Enzym denaturiert. Um dies zu umgehen, wird das Material mit Hexan gewaschen und nochmals mit Pufferlösung gespült. Das feuchte Immobilisat wird in Rollrandgläsern verschlossen und bei Raumtemperatur gelagert. Nach einer Woche werden erneut Messungen durchgeführt, welche die vorherigen Meßwerte bestätigen.

**3.2.2 Veresterungsansatz**

Die Immobilisate werden nach der Messung erneut eingesetzt. Sie werden mit n-Hexan und Pufferlösung gewaschen und in der Veresterung eingesetzt. Als Substrat dient eine Lösung von 145 µl Ethanol (250 mmol) und 354 µl Heptansäure (250 mmol), die im Meßkolben mit n-Hexan auf 10 ml aufgefüllt wird.

Jeweils ein Gramm der Immobilisate sowie ein Gramm der nativen *Mucor miehei*-Lösung werden zu je 10 ml Substratlösung gegeben und über zwei Stunden gerührt. Die Ansätze mit *Candida*- und *Pseudomonas*-Lipase zeigen keine und der mit *Mucor miehei* nur geringe Veresterungsaktivitäten.

**3.2.3 Immobilisierung aus organischer Phase**

Als Träger wird Dowex MWA-1 eingesetzt. Es gilt zu prüfen, ob die Adsorption des Enzyms in organischer Phase zu einer festeren Bindung führt. Da die eingesetzten Lipasen wasserlöslich sind, sollten sie sich im organischen Medium bevorzugt an der Oberfläche des Anionentauschers anlagern.

Dazu werden jeweils 50 mg Lipase bzw. 500 µl *Mucor miehei*-Lösung mit 500 mg Trägermaterial 12 h bei Raumtemperatur in 10 ml Hexan geschüttelt und anschließend auf Filterpapier getrocknet.

### 3.2.4 Immobilisierung durch kovalente Bindung

Üblicherweise werden Lipasen adsorptiv auf Trägerstoffe immobilisiert, wodurch sie verhältnismäßig leicht ausgewaschen werden können. Eine chemische (kovalente) Bindung des Enzyms auf dem Trägermaterial kann die Anwendungszeit des Immobilisates deutlich erhöhen [56,57,58,59].

Eine in der Literatur [38] beschriebene Methode zur kovalenten Bindung speziell von Lipasen auf Silikaten, wie z. B. Florisil (pulverförmiges Magnesiumsilikat für die Chromatographie), schien für den Verwendungszweck durchaus geeignet.

#### **Herstellung :**

Das Trägermaterial wird 60 Minuten mit 30 %-iger Salpetersäure behandelt, mit destilliertem Wasser gewaschen und getrocknet. Zu 2 g des Trägermaterials werden 30 ml einer Lösung von 2 Vol. % 3-Aminopropyl-trimethoxy-silan in Aceton gegeben. Das Lösungsmittel wird bei 40 °C vorsichtig abgedampft.

Anschließend werden 20 ml 2,5 %-ige Glutardialdehyd-Lösung zugesetzt und bei Raumtemperatur 60 Minuten gerührt. Das Material nimmt durch Bildung einer Schiff'schen Base eine intensive rote Färbung an.

Nach Filtration und gründlichem Waschen mit destilliertem Wasser werden 20 mg *Pseudomonas*-Lipase in 20 ml 0,05 molarem Kalium-Phosphatpuffer (pH 7,5) gelöst und zugesetzt. Die Mischung wird 2 Stunden gerührt, anschließend filtriert, mit dest. Wasser gespült und an der Luft getrocknet.

Das so vorbereitete Trägermaterial kann für die Messungen in der pH-Stat-Apparatur eingesetzt werden.

### 3.2.5 Immobilisierung in einer Sol-Gel-Matrix

#### Herstellung:

12,5 mg der *Pseudomonas*-Lipase werden in 1 ml Wasser gelöst und der Überstand wird abdekantiert. Es werden 400 µl von dem Überstand, 100 µl 1 M Natriumfluorid-Lösung (saurer Katalysator), 200 µl wäßrige Polyvinylalkohol Lösung (4 %) und 160 µl Wasser gemischt. Daraus ergeben sich 860 µl wäßriger Lösung (48 mmol), die mit 6 mmol des Alkylsilans vermischt und kräftig geschüttelt werden. Die zunächst zweiphasige Mischung erwärmt sich und wird klar.

Das verschlossene Gefäß wird einige Minuten im Eisbad gekühlt und für 12 h zum Aushärten stehengelassen. Das Material wird zerstoßen (gemahlen) und an der Luft getrocknet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Methyltrimethoxysilan (MTMS), sowie mit einer Mischung aus Tetramethoxysilan (TMOS) und Propyltrimethoxysilan (PTMS) im Verhältnis 1:5 gearbeitet. Dies entspricht 6 mmol MTMS (857 µl) bzw. 1 mmol TMOS (148 µl) und 5 mmol PTMS (875 µl).

Die Reaktion im reinen MTMS verläuft deutlich schneller als in der Mischung, wobei sich die Lösung sehr schnell erwärmt und die Gefahr der Denaturierung der Lipase besteht. Daher werden die Vergleichsansätze mit der TMOS/PTMS-Mischung durchgeführt.

Für eine Vergleichsmessung zwischen der Veresterungsaktivität von *Mucor miehei* und *Pseudomonas*-Lipase wird mit dem doppelten Ansatz ohne Polyvinylalkohol (aber mit der entsprechenden Menge Wasser) gearbeitet. Für die *Mucor miehei*-Lösung ergeben sich als Ansatz 840 µl (1008 mg) mit 200 µl NaF-Lösung und 688 µl Wasser, die mit 296 µl TMOS und 1714 µl PTMS vermischt werden. Ein Gramm der *Mucor miehei*-Lösung entspricht in ihrer Esterspaltungsaktivität (pH-Stat) 25 mg der *Pseudomonas*-Lipase, so daß die Ansätze vergleichbar sind.

Die Sol-Gel-Ansätze werden nach dem Trocknen zerstoßen und in Rollrandgläsern mit 10 ml Substratlösung gerührt. Diese besteht aus 150 µl (947 µmol) Caprylsäure und 150 µmol Ethanol im Überschuß (2,6 mmol), die mit Hexan auf 10 ml aufgefüllt werden.

Im Verlauf der Tests im organischen Medium quillt das Material auf und verliert die körnige Struktur. Es entsteht eine amorphe Masse, die sich fein im Gefäß verteilt und nach Abschalten der Rührer nur langsam absetzt.

### 3.2.6 Adsorption auf Polypropylenträger

Nachdem die bisherigen Trägermaterialien für den gewünschten Einsatz in mit Wasser gesättigtem organischen Medium als ungeeignet bzw. zu teuer erschienen, wird ein Polypropylenmaterial (PP) untersucht, das als Granulat (Accurel EG 100) und als Pulver (EP 100) erhältlich ist [60].

#### **Herstellung:**

Auf 1 g Trägersubstanz werden 3 ml *Mucor miehei*-Lipaselösung gegeben und 12 h bei Raumtemperatur getrocknet. Das Material wird auf Filterpapier überführt, um noch vorhandene Feuchtigkeit zu entfernen. Das Trägermaterial mit der adsorbierten Lipase besitzt immer noch einen restlichen Feuchtigkeitsgehalt. Das erhaltene Material besitzt nun eine Masse von 1,6 g.

### 3.2.7 Veresterung in reinem Hexan und einem Hexan/Wasser-Gemisch

Um das Auswaschen und die Aktivität in Kontakt mit Wasser zu überprüfen, werden jeweils 0,5 g des Immobilisates mit 10 ml Substrat (100 µl Caprylsäure und 100 µl Ethanol in 10 ml Hexan) aufgefüllt und zur Reaktion gebracht. Zu dem Vergleichsansatz werden zusätzlich 2 ml Wasser gegeben.

Dieser Ansatz reagiert kaum langsamer als die Veresterung in reinem Hexan. Nach vollständigem Umsatz wird das Immobilisat abfiltriert, nur mit Hexan bzw. Hexan und anschließend Wasser gespült und erneut mit Substratlösung angesetzt.

### 3.2.8 Polypropylen mit Silikonbeschichtung

Um die „Wasserfestigkeit“ zu erhöhen, wird das Material nach dem Trocknen mit Silikon beschichtet (Polydimethylsiloxan, G E Silicones). Die Silikonschicht ist für das organische Medium durchlässig aber nicht für Wasser, so daß dieses Material eine höhere oder längeranhaltende Aktivität unter den Versuchsbedingungen erreichen sollte. Das aus dem vorangegangenen Versuch verbliebene Immobilisat (0,6 g) wird geteilt, so daß zwei Ansätze mit jeweils 0,29 g Material entstehen.

#### **Beschichtung mit Silikon:**

Ein Gramm Silikon wird in 4 ml Hexan gelöst und in eine Petrischale aus Glas gefüllt. In diese Silikonlösung wird nun der Polypropylenträger mit adsorbierter Lipase gegeben und verrührt. Das Material wird 12 h getrocknet und wie die Vergleichsprobe zur Veresterung eingesetzt.

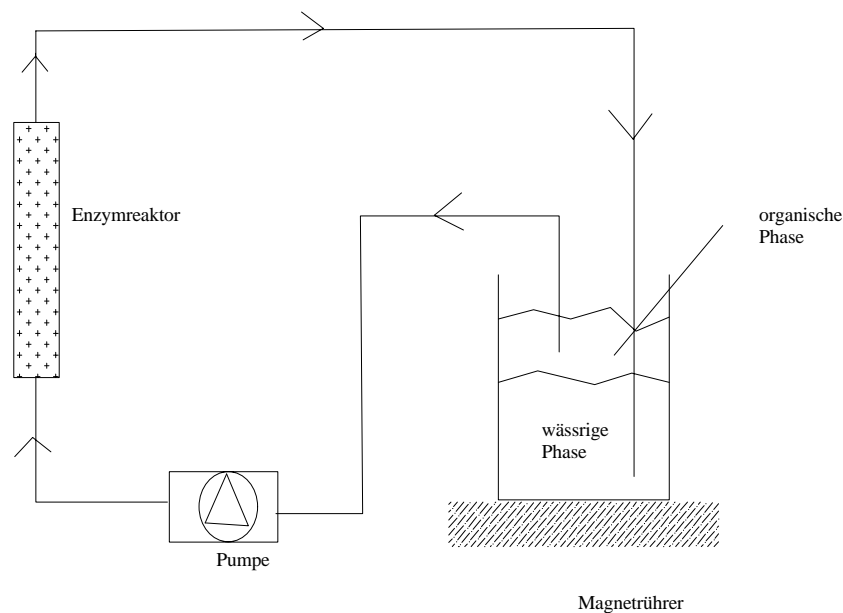
### 3.2.9 Kontinuierlicher Betrieb im Miniaturreaktor

In einem Miniaturreaktor wird das Immobilisat der *Mucor miehei*-Lipase auf seine Tauglichkeit für den kontinuierlichen Einsatz getestet.

Der Reaktor besteht aus einem 10 cm langen Kunststoffrohr ( $\varnothing$  1 cm), das über Kunststoffzuleitungen mit einem 250 ml Vorratsgefäß und einer Eppendorf Schlauchquetschpumpe verbunden ist. In dem Vorratsglas werden 100 ml einer wäßrigen Ethanol-Lösung (10 Vol. %) vorgelegt, die mit 100 ml Oktan überschichtet sind. Durch einen Rührer wird die Flüssigkeit bewegt, um sie zu durchmischen. Dadurch ist die Möglichkeit zur physikalischen Extraktion des Ethanols in die organische Phase gegeben. Die Pumpe zieht über eine Kanüle die organische Phase ohne in die darunterliegende wäßrige Phase einzutauchen und pump die organische Phase durch den Miniaturreaktor. Es liegt eine mit Wasser gesättigte organische Phase vor.

Der Reaktor wird mit 0,68 g, des wie unter Kapitel 3.2.8 beschrieben vorbereiteten Trägermaterials, befüllt.

In der Oktanphase befinden sich 4 ml Caprylsäure (0,24 mol/l). Die Reaktion wird mit dem Starten der Pumpe in Gang gesetzt. Die Konzentration der Säure beträgt nach einem Tag 0,09 mol/l, die des Caprylsäureethylesters 0,14 mol/l.



**Abbildung 3-6:** Schematischer Aufbau für die extraktive, enzymatische Veresterung in einem Miniaturreaktor.

### 3.3 Reaktivextraktion im Hohlfaser-Festbettreaktor

Im folgenden werden der technische Aufbau der Anlage und die Betriebsbedingungen beschrieben. Als Extraktionseinheit kommt ein Liqui-Cel Extra-Flow-Membranextraktor der Firma Hoechst Celanese zum Einsatz. Es handelt sich hierbei um einen speziell entwickelten Hohlfaser Extraktor für den Produktionsmaßstab. Der Aufbau der Anlage und die Integration des Festbettreaktors ist mit der Werkstatt des Institutes für Technische Chemie durchgeführt worden.

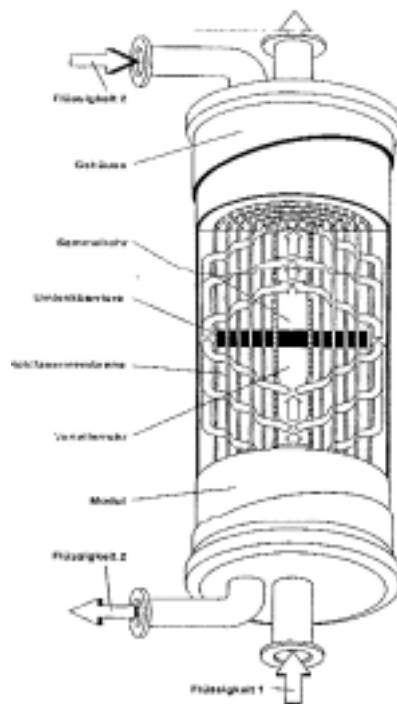
#### 3.3.1 Technische Daten des Hohlfaserextraktionsmoduls

Es handelt sich um ein in ein Edelstahlgehäuse eingebettetes Hohlfasermodule. Der schematische Aufbau des Moduls ist in Abbildung 3-7 dargestellt. Die Hohlfasern bestehen aus Polypropylen und haben hydrophoben Charakter. In Tabelle 3-2 sind die technischen Daten für das eingesetzte Hohlfasermodule aufgeführt.

**Tabelle 3-2:** Technische Daten des Hohlfaserextraktionsmoduls [61]

Hohlfaser Modul	Celgard X-10: Microporöse Polypropylenhohlfaser
Faserinnendurchmesser	240 $\mu\text{m}$
Faservergußmaterial	Epoxidharz
Faserwanddicke	30 $\mu\text{m}$
Effektive Porengröße	0,05 $\mu\text{m}$
Porösität	30 %
Modulmantel-Material	V4A (316) Stahl
Moduldaten	
Modullänge	33 cm
Effektive Faserlänge	25 cm
Effektive Oberfläche	7 $\text{m}^2$
Effektive Fläche pro Volumen	2700 $\text{m}^2/\text{m}^3$
Betriebsparameter	
Max. transmembrane Druckdifferenz	4,1 bar
Max. Temperatur	60 $^{\circ}\text{C}$
Max. Betriebsdruck	6,9 bar





**Abbildung 3-7:** Schematischer Aufbau des Hohlfasereextraktionsmoduls

### 3.3.2 Technische Daten des Accurel EP 100 Trägermaterials

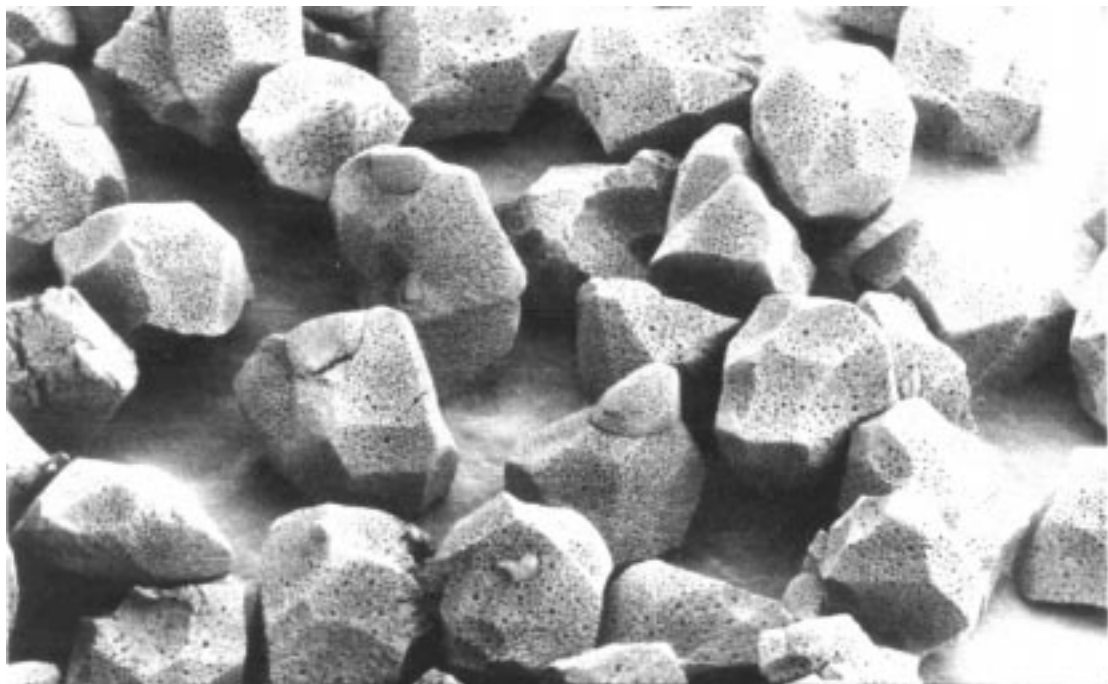
Das Trägermaterial wurde von der Firma Akzo Nobel Faser AG Accurel Systems zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um ein mikroporöses Polypropylenpolymer mit offener Struktur. Die Strukturen werden als Trägermaterial für flüssige bis hochviskose Additive in der Kunststoffverarbeitung eingesetzt. Das Trägermaterial besitzt eine hohe Beladbarkeit von 60 % [60].

Die Materialien werden als Matrix-Systeme zur Duftstofffreisetzung verwendet. Es stehen verschiedene Polymere zur Verfügung (Polypropylen, Polyethylen, Polymilchsäure). In dieser Arbeit kommen jedoch ausschließlich Polypropylenpulver zum Einsatz. In der Tabelle 3-3 sind die technischen Daten des Polypropylenpulvers Accurel EP 100 aufgeführt.

**Tabelle 3-3:** Technische Daten des Trägermaterials Accurel EP 100 [60].

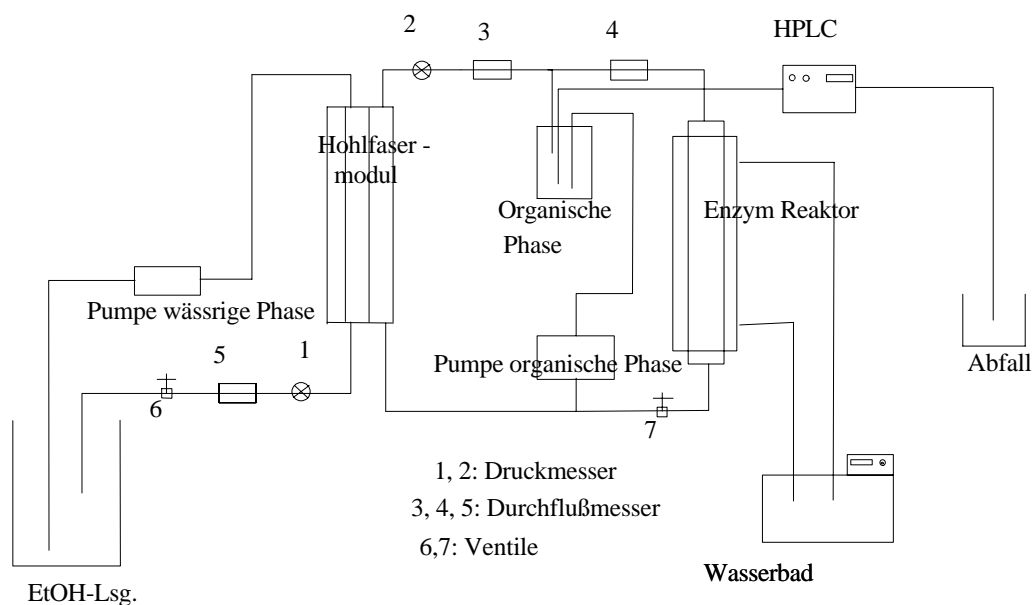
Polymer	Polypropylen PP (homo-)
Dichte	0,902 g/ccm
MFI 230/5 (meltflow index)	10 - 30
Schmelzpunkt	160 -165 °C
Hohlraumanteil	75 %
Teilchengröße	1000 - 1500 µm
Zellgröße	0,5 - 5 µm
Porengröße	0,05 - 0,5 µm
Restextrakt	< 0,1 %

In Abbildung 3-8 ist eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Polypropylenmaterials dargestellt.

**Abbildung 3-8:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Accurel-Polypropylenpulvers [60]

### 3.4 Reaktivextraktion im System Hohlfasermodule/Festbettreaktor

Für die Reaktivextraktion wird ausschließlich Octan als organisches Lösungsmittel eingesetzt. Die Apparatur wurde in Zusammenarbeit mit der Werkstatt des TCI-Hannover aufgebaut. Abbildung 3-9 zeigt den schematischen Aufbau. Der Festbettreaktor ist über einen Wassermantel temperierbar. Es sind zwei unabhängige Kreisläufe vorhanden, einer für die wässrige Phase und einer für die organische Phase. In der wässrigen Phase wird Ethanol vorgelegt. Das Ethanol wird über ein Hohlfasermodule in die organische Phase extrahiert. In der organischen Phase reagiert das Ethanol - katalysiert durch eine Lipase - mit einer in dem Lösungsmittel gelösten langkettigen Carbonsäure. Der entstehende Fettsäureethylester ist hydrophob und bleibt in der organischen Phase gelöst.



**Abbildung 3-9:** Schematischer Aufbau des Extraktionssystems mit integriertem Enzym-Festbettreaktor

Die Konzentrationen an Edukt und Produkt werden online durch eine HPLC-Anlage verfolgt. Der Reaktor besitzt ein Arbeitsvolumen von 1,1 l und wird mit dem immobilisierten Katalysatormaterial befüllt. Die Immobilisierung und Vorbereitung des Trägermaterials erfolgt wie unter Kapitel 3.2.8 beschrieben. Für die Füllung des Festbettreaktors werden insgesamt 100.000 U (500 ml) Lipase eingesetzt. In der wässrigen Phase wird eine 9,6 %-ige Ethanol-Lösung vorgelegt. Das Ethanol liegt in

großem molaren Überschuß vor (4,7 mol in 3 Litern wäßriger Phase). Die Anfangskonzentration der organischen Säuren beträgt 0,65 mol/l. Das Gesamtvolumen der organischen Phase umfaßt 2 Liter.

Die Reaktivextraktion wird dadurch gestartet, daß die wäßrige Phase eingefüllt wird und mittels einer Pumpe mit geringer Geschwindigkeit über das Hohlfasermodule gepumpt wird. Dabei wird ein Überdruck von 0,3 bar mit Hilfe eines Ventils eingestellt. Erst wenn die Zirkulation der wäßrigen Phase stabil auf 120 l/h eingestellt ist, kann das Fördern der organischen Phase gestartet werden. Hierbei wird ein Volumenstrom von 40 l/h über das Hohlfasermodule und von 100 l/h über den Festbettreaktor eingeregelt. Der Überdruck der wäßrigen Phase beträgt 0,3 bar.

Der Festbettreaktor und die vorgelegte wäßrige Phase werden auf 24 °C temperiert. Diese Vorgehensweise wird in allen Reaktivextraktionen, die mit dem Hohlfasermodule durchgeführt wurden, eingehalten.

Abweichungen von der standardisierten Prozedur sind für die unterschiedlichen Substrate im Ergebnisteil unter den entsprechenden Punkten aufgeführt.

### **3.5 Rückextraktion**

Für die Gewinnung des Esters als Produkt ist es notwendig, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem es möglich ist, die Fettsäure von dem entsprechenden Ester zu trennen. In dieser Arbeit wird die Rückextraktion der Fettsäure aus dem Produktgemisch angestrebt. Hierzu wird als Extraktionsmittel 1,2-Butandiol verwendet [62]. Es werden zunächst Versuche im Schüttelkolben durchgeführt, deren Ergebnisse auf den Einsatz einer dreistufigen Mixer-Settler-Anlage übertragen werden.

#### **3.5.1 Messung der Gleichgewichtseinstellung**

In einem 100 ml Erlenmeyerkolben werden 20 ml Oktanphase und 20 ml 1,2-Butandiolphase vorgelegt. Die Anfangskonzentration der Säure beträgt 0,35 mol/l

(49,9 g/l), die des Esters 0,31 mol/l (54,0 g/l). Die Vermischung der Phasen erfolgt durch einen Magnetrührer bei 500 rpm. Die Temperatur wird auf 25 °C eingestellt. Aus der Oktanphase werden Proben genommen und offline analysiert.

### **3.5.2 Rückgewinnung der extrahierten Bestandteile aus der 1,2-Butandiolphase**

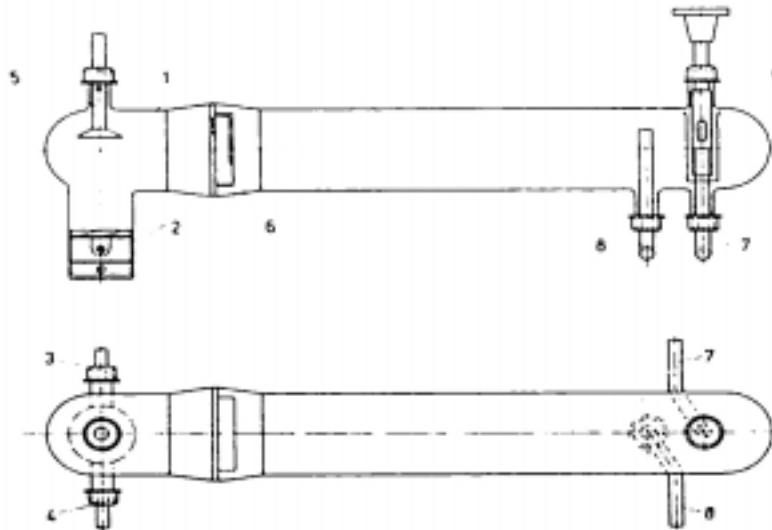
Zu dem 1,2-Butandiol, welches zur Extraktion eingesetzt wurde, d. h. das mit Oktan, organischer Säure und Ester gesättigt ist, werden unterschiedliche Mengen an Wasser zugesetzt.

50 ml der 1,2-Butandiolphase werden in einem 250 ml Schüttelkolben vorgelegt und in verschiedenen Versuchen werden 20 ml, 40 ml, 60 ml, 80 ml und 100 ml Wasser zugefügt. Der Schüttelkolben wird 5 Minuten lang heftig geschüttelt und danach für 10 Minuten stengelassen, so daß sich die entstandenen Phasen trennen können. Die Konzentrationen an Säure und Ester in der entstehenden Oktanphase werden offline in der HPLC-Analytik bestimmt.

### **3.5.3 Durchführung der Rückextraktion in einer Mixer-Settler-Anlage**

Es wird eine dreistufige Mixer-Settler-Anlage der Firma QFV, welche im Gegenstrombetrieb betrieben wird, eingesetzt [63,64]. 2 Liter Oktanphase und 4 Liter 1,2-Butandiolphase werden vorgelegt. Die Konzentrationen an Säure und Ester werden eingestellt, wie sie bei der enzymatischen Veresterung auftreten (0,34 mol/l Caprylsäure bzw. Ester).

Der schematische Aufbau einer Mixer-Settler-Stufe QFV DN 80 ist in Abbildung 3-10 gezeigt.



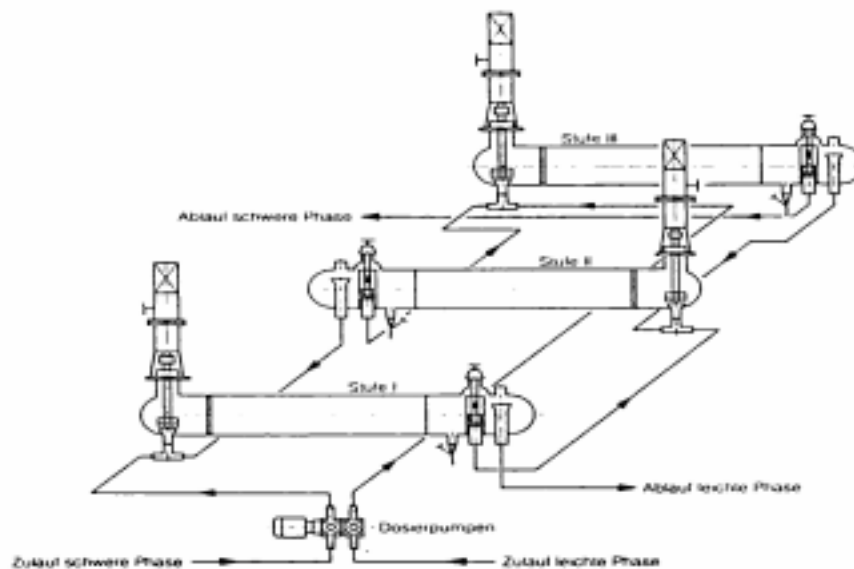
**Abbildung 3-10:** Einzelstufe in Schnitt und Grundriß (QFV 1985)

- 1 Mixerstufe aus einem zylindrischen Teil mit kugelförmigem Abschluß
- 2 Rühr- und Förderorgan
- 3,4 seitliche Stutzen der beiden zulaufenden Phasen
- 5 Glasrohr zur Belüftung des Mixers
- 6 Doppelwehr aus PTFE
- 7 Ablauf der schweren Phase
- 8 Ablauf der leichten Phase
- 9 Überlaufwehr zur Phasentrennung

Ein Mixer-Settler besteht aus einem Rührgefäß (Mixer), an dem ein Abscheidegefäß angekoppelt ist. Die Vermischung (Dispersion) der Phasen geschieht durch ein Rührwerk, welches durch einen Magnetrührer angetrieben wird. So sind variable Dispersionsgrade der Phasen einstellbar. Im angeschlossenen Settler haben die Phasen die Möglichkeit zu koaleszieren, um eine vollständige Phasentrennung zu gewährleisten.

Die Einstellung des Phasentrennspiegels in den Settlern erfolgt nach dem Prinzip der „Florentiner Flasche“. Die leichte Phase kann frei ablaufen. Die schwere Phase wird am tiefsten Punkt abgezogen und fließt über ein höhenverstellbares Überlaufventil ab. Die Wehrhöhe wird so eingestellt, daß das Gewicht der schweren Phase genauso groß ist wie das Gewicht von leichter und schwerer Phase im Settler.

In Abbildung 3-11 ist die schematische Darstellung einer dreistufigen Mixer-Settler-Anlage gezeigt.



**Abbildung 3-11:** Mehrstufige Extraktion mit Gegenstromführung der Phasen

Die Extraktionseinheiten sind im Gegenstrom geschaltet. Sie sind auf einem Gestell zusammen mit zwei korrosionsbeständigen Kreiselpumpen, zwei Strömungsmessern und vier Vorratsgefäßen montiert.

Das flüssige Extraktionsgut und das Solvent werden im Gegenstrom durch die drei Extraktionseinheiten geführt. Es wird ein Raffinat und ein Extrakt erhalten. Der mehrstufige Phasenkontakt bei Gegenstromführung führt zu einer hohen Extraktbeladung, wodurch hohe Extraktstoffausbeuten erreicht werden.

Für die Oktanphase wird ein Volumenstrom von 1,9 l/h und für die 1,2-Butandiolphase von 3,5 l/h eingestellt. Als Anfangskonzentrationen für die Säure bzw. für den Ester werden jeweils 0,34 mol/l vorgelegt.

Nach dem Durchlaufen einer Mixer-Settler-Stufe wird jeweils eine Probe aus der Oktanphase genommen und die Zusammensetzung offline analysiert.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Aktivität der nativen Lipasen

Es stehen mehrere Lipasen aus unterschiedlichen Organismen zur Verfügung. Um die Lipasen miteinander vergleichen zu können, wird zunächst die Aktivität der Lipasen in Bezug auf ihre Fähigkeit Ester zu spalten, untersucht. Als Substrat wird Tricaprylin eingesetzt. Die Bestimmung der Aktivität erfolgt wie unter 3.1.5 beschrieben. Die Messungen werden mit einem Dosimat (Metrohm) mit angeschlossenem Schreiber durchgeführt.

Die Aktivität folgender Lipasen wird untersucht:

- *Pseudomonas cepacia* (PS Amano)
- *Candida rugosa* (Sigma)
- *Mucor miehei* (Palatase 1000L, Novo Nordisk)

Die aus *Pseudomonas cepacia* und *Candida rugosa* gewonnenen Lipasen sind als Lyophilisat erhältlich, welches zusätzlich Stabilisatoren und Extender enthält. Für die Lipase aus *Candida rugosa* gibt der Hersteller eine Aktivität von 58 % gegenüber der reinen Lipase an.



Die Palatase 1000L aus *Mucor miehei* hingegen ist eine wässrige Suspension (d: 1,2 g/ml), die neben Glycerin noch weitere Bestandteile zum Stabilisieren enthält. Der tatsächliche Enzymgehalt ist hier nicht angegeben.

Die gemessenen Aktivitäten beziehen sich auf die Substanzeinwaagen und erlauben so einen Vergleich der Aktivitäten in Bezug auf die eingesetzte Substanzmenge. Auch die Herstellerangaben geben keine direkte Vergleichsmöglichkeit, da sowohl unterschiedliche Substrate (Olivenöl, Tributyrin), als auch herstellerspezifische Aktivitätstests durchgeführt worden sind.

Deshalb werden im Rahmen dieser Arbeit die Aktivitäten der Lipasen und Immobilisate in der pH-Stat-Apparatur bestimmt, um so definierte Bedingungen zu erhalten. Als Substrat dient Tricaprylin.

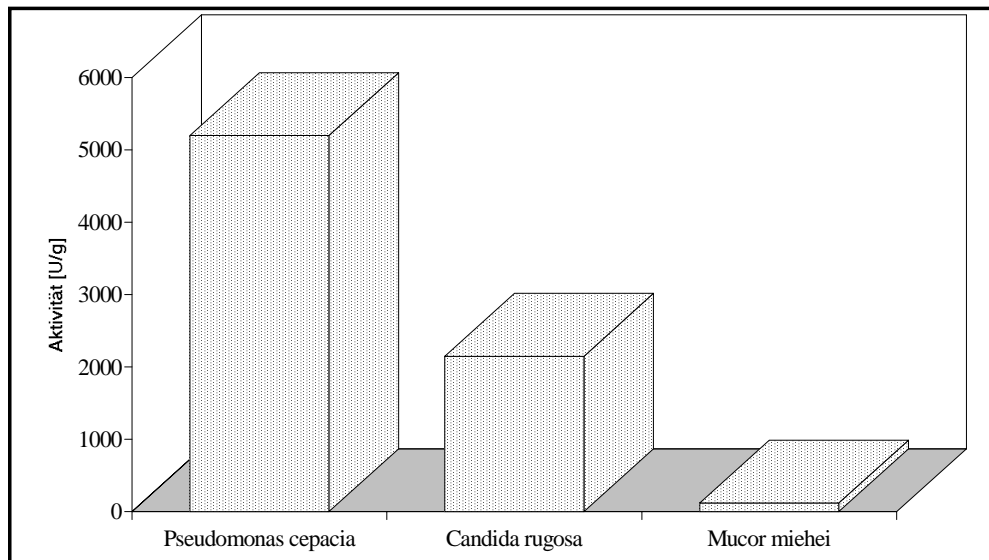
Für die Messungen werden jeweils 20 mg der Lyophilisate und 300 µl der Suspension eingesetzt. Eine genaue Beschreibung der Aktivitätsbestimmung ist in Kapitel 3.1.5 aufgeführt.

In Tabelle 4-1 sind die gemessenen Aktivitäten der nativen Lipasen in Bezug auf das Substrat Tricaprylin angeführt.

**Tabelle 4-1:** Aktivitäten der nativen Lipasen

<b>Lipase</b>	<b>Aktivität</b>
<i>Pseudomonas cepacia</i>	5200 U/g
<i>Candida rugosa</i>	2150 U/g
<i>Mucor miehei</i>	120 U/g

Die Aktivität der Lipase aus *Mucor miehei* bezogen auf ein Gramm Substanzeinwaage ist deutlich geringer als bei den beiden lyophilisierten Enzymen. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 4-1 gut zu erkennen.



**Abbildung 4-1:** Vergleich der Aktivitäten der nativen Lipasen in Bezug auf die Spaltung von Tricaprylin. Die Reaktionsbedingungen sind in Kapitel 3.1.5 aufgeführt.

## 4.2 Immobilisierung der Lipasen auf einem Anionenaustauscher

### 4.2.1 Adsorption aus wässriger Phase

Für diesen Versuch wird ein schwach basischer Anionenaustauscher (Dowex MWA-1) eingesetzt. Dabei handelt es sich um ein Copolymer aus Divinylbenzol und Styrol mit tertiären Aminen als Austauscherguppen. Schwach basische Anionenaustauscher werden auch kommerziell zur Immobilisierung von Lipasen herangezogen. Untersucht werden die Lipasen aus *Pseudomonas cepacia*, *Candida rugosa* und *Mucor miehei*. Die Immobilisierung erfolgt unter sehr schonenden Bedingungen, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben.

In Tabelle 4-2 sind die Ergebnisse des Immobilisierungsversuches aufgeführt.

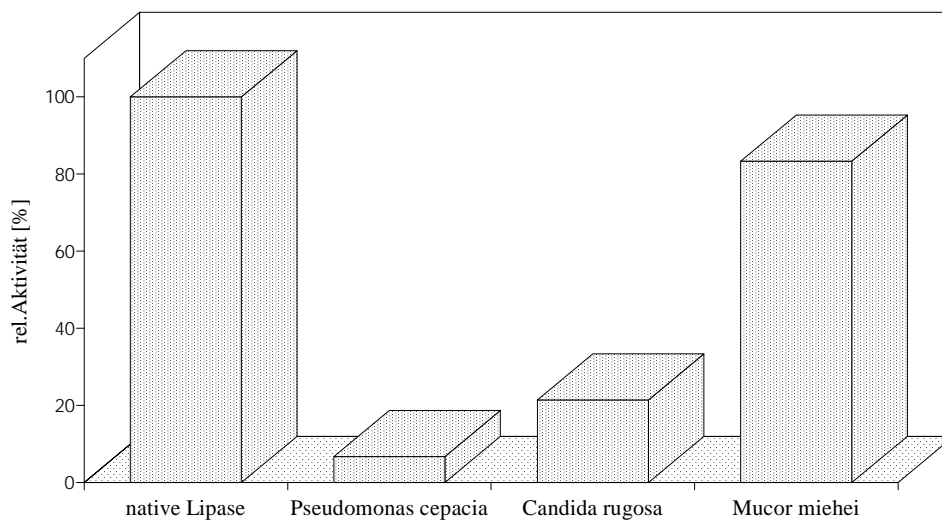
**Tabelle 4-2:** Aktivität der auf Dowex MWA-1 immobilisierten Lipasen bezogen auf 1 g Feststoff.

Lipase	Aktivität
<i>Pseudomonas cepacia</i>	350 U/g
<i>Candida rugosa</i>	460 U/g
<i>Mucor miehei</i>	100 U/g

Die immobilisierte Lipase aus *Candida rugosa* liefert die höchste Aktivität. Als nachteilig bei der Immobilisierung auf Dowex MWA-1 hat sich die geringe mechanische Stabilität erwiesen. Obwohl bei der Durchführung der Versuche mit geringer Rührerdrehzahl im Reaktor gearbeitet wurde, ist ein deutlicher Materialabrieb festzustellen.

Das Immobilisat wird nach der Messung abfiltriert und wiedergewonnen. Die Versuche werden mehrmals wiederholt. Nach einer Woche sind keine Aktivitätsverluste festzustellen. Das Enzym wird stabil auf das Trägermaterial gebunden und das Immobilisat hat eine hohe Aktivität in Bezug auf die Esterspaltung.

Um die Effizienz der Immobilisierung beurteilen zu können, wird in Abbildung 4-2 die Aktivität des nativen Enzyms mit der des immobilisierten verglichen. Um einen Vergleich durchführen zu können, wird die Aktivität des nativen Enzyms, wie sie in Tabelle 4-2 aufgeführt ist, jeweils gleich 100 % gesetzt und den ermittelten Aktivitäten für die Immobilisate gegenübergestellt. So kann die Effizienz der Immobilisierung für die verschiedenen Lipasen verglichen werden.



**Abbildung 4-2:** Vergleich der Effizienz der Immobilisierungsmethode für die Lipasen aus *Pseudomonas cepacia*, *Candida rugosa* und *Mucor miehei*.

Es ist gut zu erkennen, daß eine Immobilisierung für die *Mucor miehei* Lipase auf Dowex MWA-1 am effektivsten ist. Durch die Adsorption auf dem Anionenaustauscher wird die Aktivität der Lipasen aus *Candida rugosa* und *Pseudomonas cepacia* erheblich stärker vermindert als die der *Mucor miehei* Lipase. Die Lipase aus *Mucor miehei* wird kommerziell auf schwach basischen Anionentauschern immobilisiert.

Die Immobilisate werden, wie unter Kapitel 3.2.2 beschrieben, auf ihre Veresterungsaktivität untersucht. Erstaunlicherweise zeigen die Immobilisate aus *Pseudomonas cepacia* und *Candida rugosa* keine Veresterungsaktivitäten. Das Immobilisat der *Mucor miehei* Lipase hingegen zeigt nur geringe Aktivität.

Die nativen Enzyme aus *Pseudomonas Cepacia* und *Mucor miehei* sind in der Lage, den Ansatz vollständig zu verestern. Die Immobilisierung auf Dowex MWA-1 ist somit gut geeignet, um Lipasen zu immobilisieren, die zur Fettspaltung eingesetzt werden sollen. Eine Immobilisierung auf diesem Trägermaterial ist jedoch für eine Veresterungsreaktion nicht geeignet.

#### 4.2.2 Immobilisierung aus organischer Phase

In diesem Versuch wird getestet, ob eine Adsorption des Enzyms aus der organischen Phase auf das Trägermaterial möglich ist. Als Träger wird Dowex MWA-1 eingesetzt.

Der Versuch wird wie unter Kapitel 3.2.3 beschrieben durchgeführt. In Tabelle 4-3 sind die Ergebnisse aufgeführt.

**Tabelle 4-3:** Vergleich der Enzymaktivitäten der Lipasen, die aus organischer Phase auf dem Träger Dowex MWA-1 adsorbiert werden.

Lipase	Aktivität
<i>Pseudomonas cepacia</i>	1880 U/g
<i>Candida rugosa</i>	1320 U/g
<i>Mucor miehei</i>	-

Die Enzymaktivitäten liegen deutlich höher als diejenigen, die durch Immobilisierung aus wäßriger Phase erhalten werden (Kapitel 4.2.1). Allerdings lassen sich die Lipasen nicht stabil auf dem Trägermaterial fixieren. Schon nach einmaligem Waschen mit Puffer zeigen alle Immobilisate für einen erneuten Einsatz in der Esterspaltung keinerlei Aktivität.

Für einen Einsatz in mit Wasser gesättigtem organischem Medium ist die Methode völlig ungeeignet.

### 4.3 Immobilisierung durch kovalente Bindung

Die rein adsorptive Bindung und der Einsatz von Anionenaustauschern haben den Vorteil, daß sie sehr schonend sind. Sie üben nur geringe Kräfte auf das Enzym aus, so daß die Tertiärstruktur des Enzyms und somit auch das aktive Zentrum nur wenig beeinflusst werden. Dadurch kann eine hohe Aktivität des Enzyms aufrechterhalten werden. Die Bindung durch relativ schwache Wechselwirkungen ist aber auch gleichzeitig ein Nachteil. Die Enzyme können verhältnismäßig leicht ausgewaschen werden. Eine geeignete chemische (kovalente) Bindung des Enzyms an das Trägermaterial würde die Langzeitstabilität des Immobilisates deutlich verbessern. Die größte Schwierigkeit besteht darin, dafür zu sorgen, daß durch die kovalente Bindung die Struktur des Enzyms nicht zerstört wird und somit die Aktivität weitgehend erhalten bleibt.

Es wird Florisil als Trägermaterial eingesetzt. Es handelt sich um ein pulverförmiges Magnesiumsilikat für die Chromatographie. Eine genaue Beschreibung der theoretischen Grundlagen ist in Kapitel 2.5.1 gegeben.

Die anfänglich sehr erfolgversprechenden Versuche konnten im weiteren Verlauf der Arbeit nicht reproduziert werden. Der Grund für die geringe Reproduzierbarkeit konnte nicht festgestellt werden, wobei die wahrscheinlichste Ursache eine unterschiedlich ausfallende Enzyminaktivierung durch die Besetzung der freien Aminogruppen der Lipase ist.

Auch aus Gründen des relativ hohen Zeit- und Materialaufwandes ist der Einsatz einer kovalenten Immobilisierung der Lipase in einer „product-scale“-Anlage zu kostenintensiv. Ferner handelt es sich um ein sehr feinkörniges Material, so daß es beim Einsatz in Festbettreaktoren zu hohen Druckverlusten kommen kann.

#### **4.4 Enzymimmobilisierung in Sol-Gel-Matrix**

Eine neuartige Methode der Enzymimmobilisierung besteht in einem Matrixeinschlußverfahren. Die Matrix wird dabei durch die Kondensation von Alkylsilanen wie z. B. Tetramethoxysilan aufgebaut. Die theoretischen Grundlagen finden sich in Kapitel 2.5.2. Hierbei entsteht ein Netzwerk aus Silicium-Sauerstoff-Brücken, die eine Käfigstruktur ausbilden, in der die Enzymmoleküle eingekapselt sind.

Nach dem Aushärten entsteht eine glasharte Masse, die zerstoßen und gemahlen werden kann, ohne an Aktivität zu verlieren. Durch Zusatz von makromolekularen Substanzen ist es möglich, die Matrixstruktur zu beeinflussen und die Aktivität zu steigern. Ebenso wichtig ist die stöchiometrische Zusammensetzung des Reaktionsgemisches. Die genauen Reaktionsbedingungen sind in Kapitel 3.2.5 aufgeführt.

Die Sol-Gel-Immobilisate werden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Caprylsäure mit Ethanol zu verestern. Der Standardreaktionsansatz besteht aus 150 µl (947 µmol) Caprylsäure und 150 µmol (2,6 mmol) Ethanol in 10 ml Hexan.

Da die Lipase aus *Candida rugosa* im Vergleich zu den Lipasen aus *Pseudomonas cepacia* und *Mucor miehei* nur eine sehr geringe Veresterungsaktivität zeigt, werden zur

Immobilisierung in der Sol-Gel-Matrix nur die Enzyme aus *Mucor miehei* und *Pseudomonas cepacia* eingesetzt.

Zum Vergleich der Sol-Gel-Immobilisate und der nativen Lipasen werden die gleichen Enzymmengen eingesetzt. Die Probenahme und Messung erfolgt nach 2, 4, 6 und abschließend nach 24 Stunden. In Tabelle 4-4 ist ein Vergleich der Veresterungsaktivität, der in einer Sol-Gel-Matrix immobilisierten Enzyme mit den nativen Enzymen, aufgeführt.

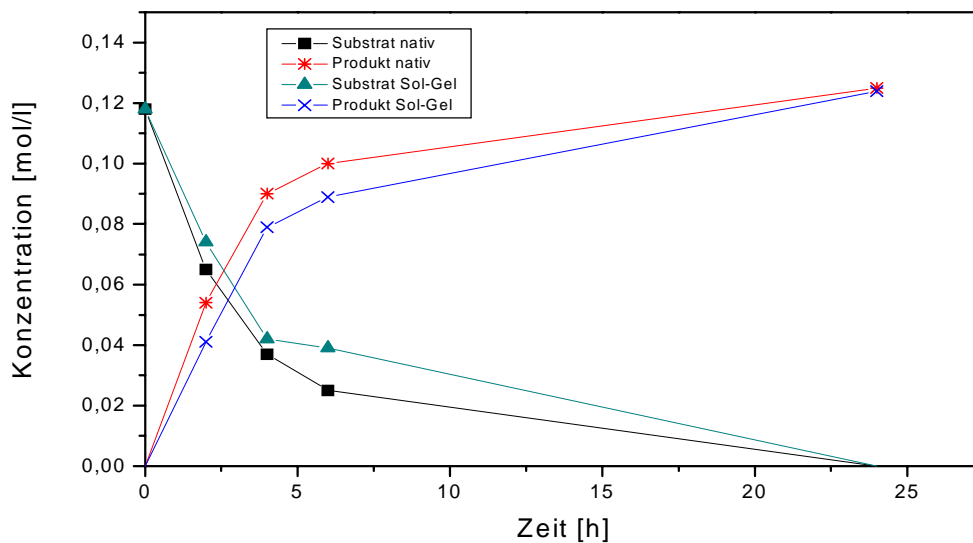
**Tabelle 4-4:** Gegenüberstellung der Veresterungsaktivitäten von nativer Lipase und der in einer Sol-Gel-Matrix immobilisierten Enzyme. Als Substrat wird Caprylsäure und Ethanol eingesetzt. Die Durchführung der Reaktion erfolgt in Hexan.

Lipase	<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>Mucor miehei</i>
nativ	180 U/g	1,8 U/g
Sol-Gel	140 U/g	1,2 U/g

Die Veresterungsaktivität der *Mucor miehei*-Lipase ist deutlich geringer als die der *Pseudomonas cepacia*-Lipase sowohl nativ als auch im Sol-Gel. Der Grund liegt wahrscheinlich darin, daß die *Mucor miehei*-Lipase in einer wäßrigen Suspension vorliegt.

Die Sol-Gel-Immobilisate besitzen einen besonderen Charakter, denn sie zeigen eine hohe Spezifität für die Esterbildung. Die hergestellten Immobilisate zeigen in der pH-Stat-Apparatur keine meßbaren Esterspaltungsaktivitäten.

Ferner ist zu erkennen, daß eine hohe Esterspaltungsaktivität gegenüber dem Triglycerid Tricaprylin nicht unbedingt auch eine hohe Syntheseaktivität zur Bildung des Caprylsäureethylesters zur Folge hat. Wie am Beispiel der Lipase *Candida rugosa* gut zu erkennen ist, die keine Syntheseaktivität zeigt. In Abbildung 4-3 und Abbildung 4-4 ist der zeitliche Verlauf der Veresterung für die Lipase aus *Pseudomonas cepacia* und *Mucor miehei* dargestellt.



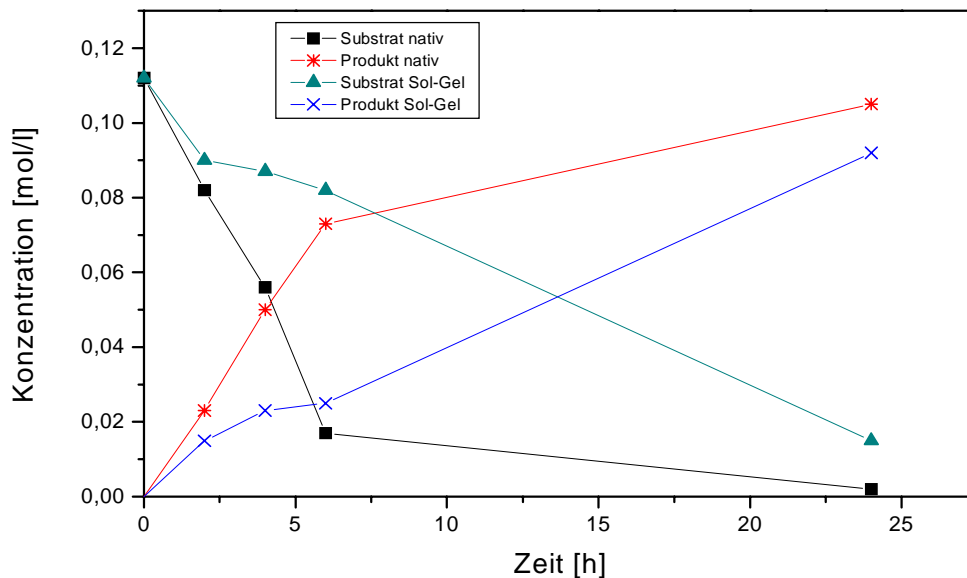
**Abbildung 4-3:** Konzentrationsverläufe für die Veresterung von Caprylsäure mit Ethanol in Hexan für eine native, und die in einer Sol-Gel-Matrix immobilisierten Lipase aus *Pseudomonas cepacia*.

Die Anfangskonzentration der Caprylsäure beträgt 0,12 mol/l. Nach 25 Stunden ist sowohl das Substrat der nativen als auch der immobilisierten Lipase vollständig aufgebraucht. Es kann also ein vollständiger Umsatz erreicht werden. Nach etwa 5 Stunden Reaktionszeit nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit ab. Bezogen auf die ersten 5 Stunden wird ein Umsatz von 20,3 mmol/h für die native und 19,0 mmol/h für die immobilisierte Lipase erreicht.

Die Ergebnisse für die Lipase aus *Mucor miehei* gestalten sich etwas anders. Nach 25 Stunden erreicht die in einer Sol-Gel-Matrix immobilisierte Lipase keinen vollständigen Umsatz. Beim Reaktionsansatz mit dem nativen Enzym wird das Substrat hingegen



vollständig zum Ester umgesetzt. Abbildung 4-4 zeigt den Reaktionsverlauf für die Veresterung von Caprylsäure mit Ethanol.



**Abbildung 4-4:** Konzentrationsverläufe für die Veresterung von Caprylsäure mit Ethanol in Hexan für eine native und eine in einer Sol-Gel-Matrix immobilisierte Lipase aus *Mucor miehei*.

Die Anfangskonzentration der Säure nimmt auch in diesem Reaktionsansatz für die native Lipase in den ersten 5 Stunden fast linear ab. Der Reaktionsverlauf der immobilisierten Lipase erfolgt hingegen sehr viel langsamer. In den ersten 4 Stunden wird für die native Lipase ein Umsatz von 11,2 mmol/h erreicht.

Die in der Sol-Gel-Matrix immobilisierte Lipase hingegen erreicht in den ersten 4 Stunden nur einen Umsatz von 5 mmol/h. Die Veresterungsaktivität nimmt durch die Immobilisierung um 45 % ab.

Im Verlauf der Versuche stellt sich heraus, daß das Material im organischen Medium stark aufquillt und seine körnige Struktur verliert. Es entsteht ein feines Pulver, welches sich im Gefäß verteilt und sich nur langsam absetzt.

Ferner wird untersucht, bei welcher Esterkonzentration kein weiterer Umsatz mehr stattfindet. Durch mehrfache Zugabe von Substrat zu den jeweiligen Ansätzen stellt sich in allen 4 Versuchen eine Esterkonzentration von 0,3 mol/l ein. Eine weitere

Substratzugabe führt nicht mehr zu einer höheren Esterkonzentration. Die Reaktion erreicht einen Gleichgewichtszustand.

#### 4.4.1 Strukturverbesserungen

Aufgrund der positiven Eigenschaften dieser neuen Immobilisierungsmethode wurden Versuche durchgeführt, um die praktische Einsatzfähigkeit des Materials zu verbessern. Insbesondere soll das feinpulvrige Material, welches zum Einsatz in einem Festbettreaktor nicht geeignet ist, in seiner Struktur verbessert werden, damit ein grobkörnigeres Material erhalten wird.

Dazu werden mehrere Trägerstoffe auf Silikatbasis eingesetzt. Es kommen Florisil, Siran und Celite zum Einsatz. Das Trägermaterial wird teilweise mit Salpetersäure aktiviert. Das Sol-Gel soll in die Porenstruktur des Trägermaterials eindringen, um ein besseres Handling des Materials zu ermöglichen.

Leider führt keiner dieser Versuche zu dauerhaften Erfolgen. Nach 24 Stunden Einsatz unter ständigem Rühren mit einem Magnetrührer löst sich in allen Fällen das Sol-Gel von der Trägermatrix.

Für die Immobilisierung der Lipasen aus *Pseudomonas cepacia* und *Mucor miehei* ist die Methode des Einschlusses in eine Sol-Gel-Matrix gut geeignet, wenn der Katalysator für die Veresteung eingesetzt werden soll.

Für die Verwendung im größeren technischen Maßstab, z. B. in einem Festbettreaktor, muß die Struktur des Immobilisates verbessert werden, damit der Druckabfall über dem Festbettreaktor möglichst gering bleibt. Auch der finanzielle und präparative Aufwand zur Herstellung des Gels ist verhältnismäßig hoch.

#### 4.5 Adsorption der *Mucor miehei*-Lipase auf einem Polypropylenträger

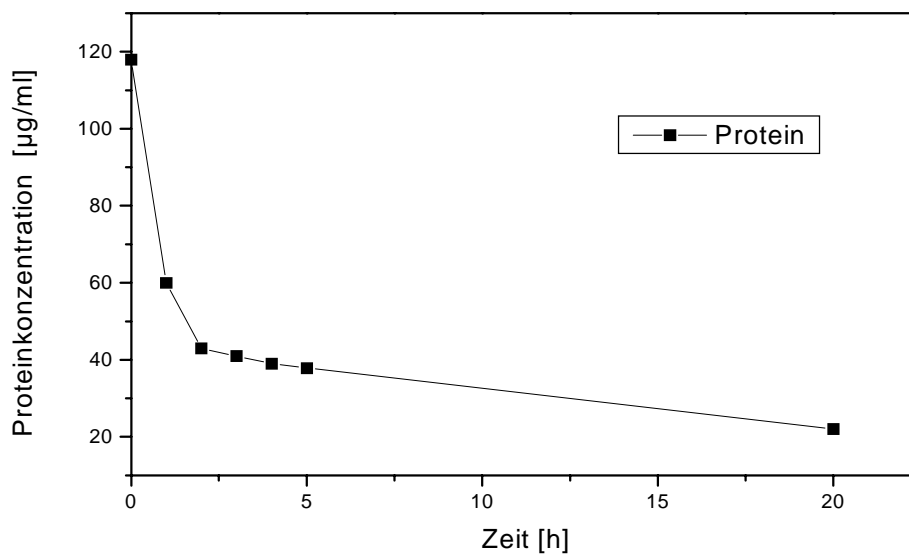
In mehreren früheren Untersuchungen wurde festgestellt, daß sich Lipasen auf hydrophoben Trägermaterialien adsorbieren, da sie selbst hydrophobe Strukturen besitzen [65,66,67,68,69]. Von der Firma Akzo Nobel stehen mehrere Polypropylenträger zur Verfügung, die sich hinsichtlich ihrer Partikelgröße und Porenweite unterscheiden. In Vorversuchen zeigt sich, daß das als Granulat vorliegende Trägermaterial Accurel

EG 100 nicht zur Immobilisierung geeignet ist. Trotz der Porenweite von  $0,05\ \mu\text{m} - 0,5\ \mu\text{m}$ , die eine Adsorption in der Struktur und nicht auf der Oberfläche erlauben sollte, ist die Aktivität des immobilisierten Enzyms auf dem Granulat sehr gering. Im weiteren wird deshalb ausschließlich mit dem Pulver Accurel EP 100 gearbeitet. Die Charakterisierung des Trägermaterials erfolgt in Kapitel 3.3.2.

Aufgrund der leichten Handhabung und des günstigen Preises werden sämtliche im folgenden beschriebenen Versuche mit dem Polypropylenträger EP 100 der Firma Akzo Nobel durchgeführt.

#### 4.5.1 Adsorption der Lipase 200L (*Mucor miehei*) auf Accurel EP 100

Die Adsorption des Enzyms erfolgt aus wässriger Phase (KPP-Puffer pH 7,5). Die genaue Immobilisierungsvorschrift ist in Kapitel 3.2.6 gegeben. Die Menge des adsorbierten Enzyms wird mit der Methode nach Bradford photometrisch bestimmt. Die Abnahme des Proteingehaltes im Überstand ist in Abbildung 4-5 dargestellt.

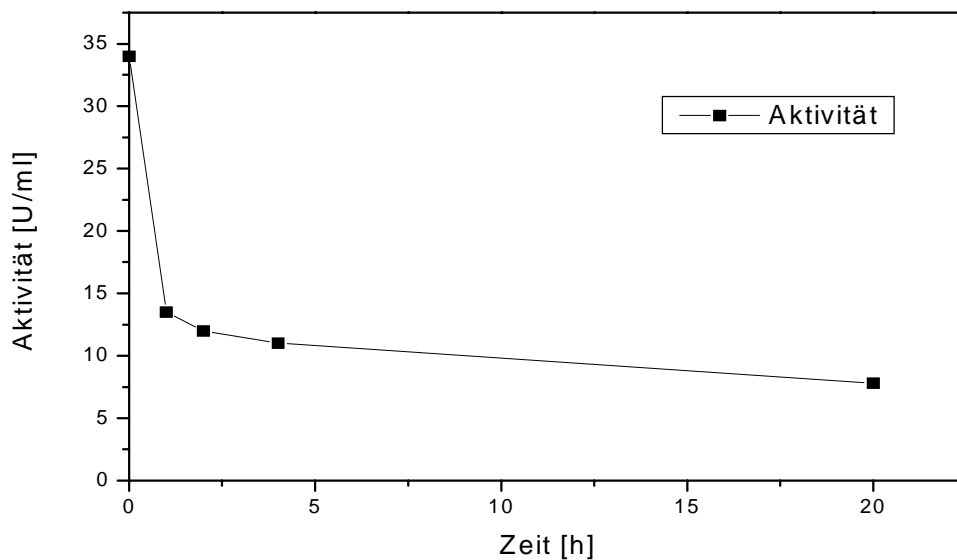


**Abbildung 4-5:** Adsorption der Lipase aus *Mucor miehei* aus wässriger Phase auf Accurel EP 100. Die Proteinkonzentration wird in der wässrigen Phase als Funktion der Zeit aufgenommen.

Es ist gut zu erkennen, daß die Adsorption auf dem Trägermaterial sehr schnell erfolgt. Nach 2,5 Stunden ist der größte Teil der in der wässrigen Phase gelösten Lipase auf dem

Trägermaterial adsorbiert. Die Anfangskonzentration an Protein beträgt 120  $\mu\text{g/ml}$ . Innerhalb von 20 h nimmt die Konzentration an Protein auf annähernd 20  $\mu\text{g/l}$  ab. In 20 h sind auf einem Gramm des Trägermaterials 2 mg des Enzyms immobilisiert.

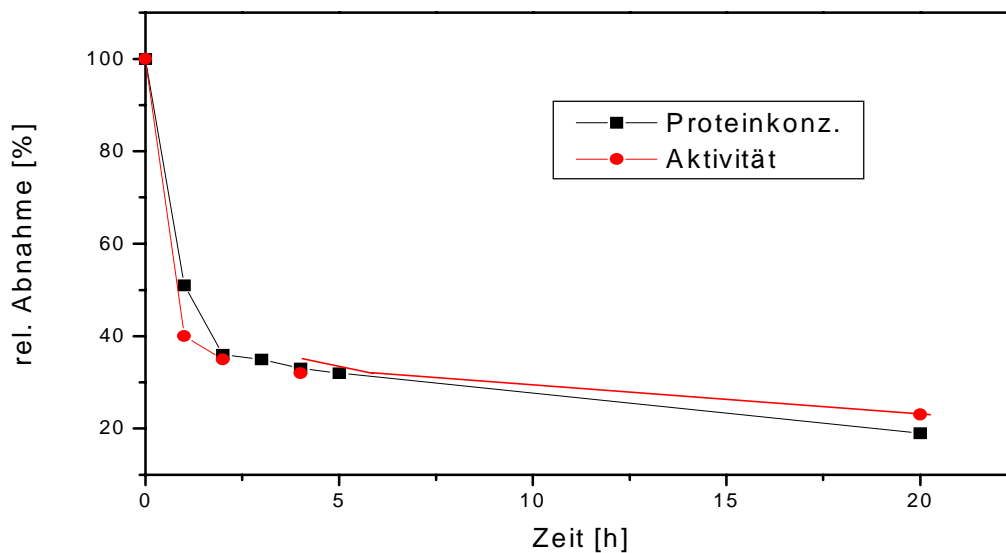
Desweiteren wird untersucht, inwieweit die Abnahme der Gesamtproteinkonzentration in der Pufferlösung mit der Abnahme der Aktivität im Überstand korreliert, denn die Lipase 200L ist ein flüssiges Produkt, welches neben der Lipase noch weitere Enzyme enthalten kann. Deshalb wird unter den gleichen Immobilisierungsbedingungen die Aktivität im Überstand bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-6 grafisch dargestellt. Die Versuchsdurchführung ist in Kapitel 3.1.5 dargelegt. Die Aktivitätsabnahme ist auch in diesem Fall nach 2,5 Stunden nahezu abgeschlossen.



**Abbildung 4-6:** Adsorption der Lipase aus *Mucor miehei* auf Accurel EP 100. Die Enzymaktivität der wässrigen Phase wird als Funktion der Zeit aufgeführt.

#### 4.5.2 Vergleich der Proteinadsorption und der Lipaseaktivität

Um einen direkten Vergleich der Proteinkonzentration und der Lipaseaktivität durchführen zu können, wird die Proteinkonzentration und die Lipaseaktivität in Prozent umgerechnet und in einer Grafik direkt gegenübergestellt.

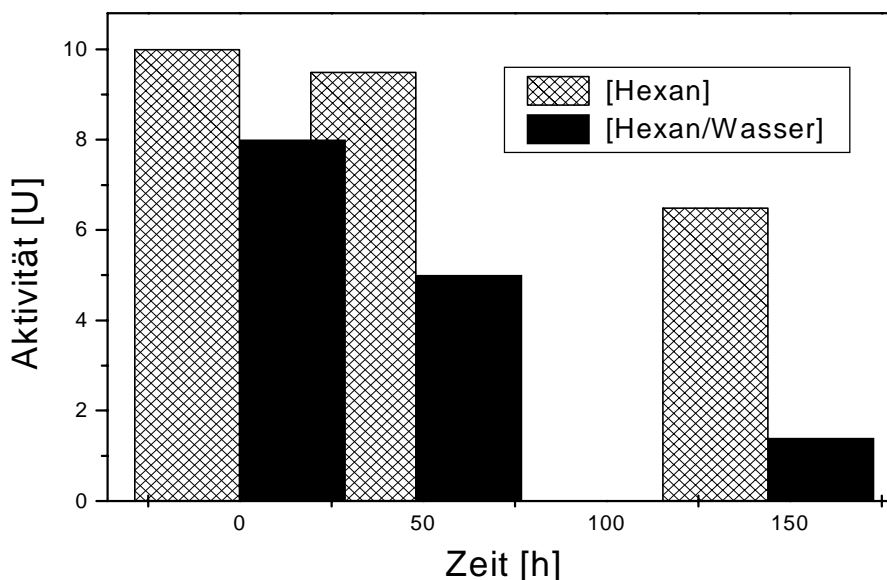


**Abbildung 4-7:** Adsorption der Lipase aus wässriger Phase auf Accurel EP 100. Vergleich der Änderung der Proteinkonzentration und Enzymaktivität als Funktion der Zeit.

Die Abnahme der Lipaseaktivität und der Proteinkonzentration stimmen sehr gut überein, so daß davon ausgegangen werden kann, daß sich fast ausschließlich Lipase als Protein in der Lösung befindet.

### 4.5.3 Vergleich der Veresterungsaktivität in Hexan und in einem Hexan/Wasser-Gemisch

Um zu überprüfen, wie sich die Lipase in einem Zweiphasensystem verhält, wird die auf Accurel EP 100 adsorbierte Lipase in reinem Hexan mit Caprylsäure und Ethanol zur Veresterung eingesetzt. Im Vergleichsansatz befindet sich 17 % Wasser als zweite Phase. Nachdem vollständiger Umsatz erreicht ist, wird der Katalysator abfiltriert, gewaschen und erneut eingesetzt. Die Aktivitätsabnahme wird als Funktion der Zeit des Kontaktes des Immobilisates mit der Hexan bzw. Hexan/Wasser-Phase aufgeführt. Diese ist in Abbildung 4-8 zu sehen.



**Abbildung 4-8:** Vergleich der Aktivitätsabnahme der auf Accurel EP 100 adsorbierten Lipase aus *Mucor miehei* bei der Veresterung in Hexan bzw. in einem Hexan/Wasser-Gemisch.

Es ist deutlich zu erkennen, daß der Einsatz der immobilisierten Lipase im Zweiphasensystem dauerhaft nicht möglich ist, da ein längerer Kontakt des Enzyms mit dem Hexan/Wasser-Gemisch zu starken Aktivitätsverlusten führt.

### 4.6 Polypropylenträger mit Silikonbeschichtung

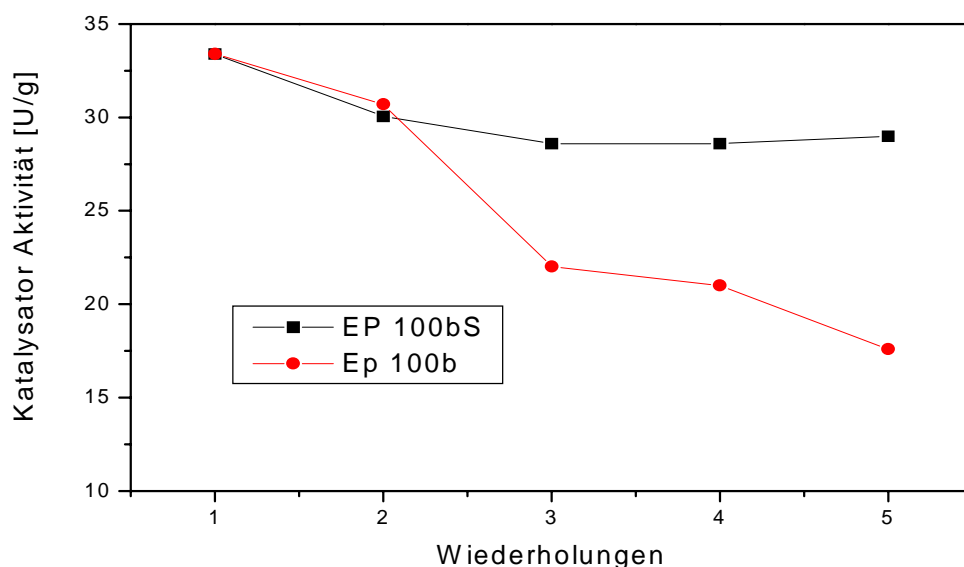
Um zu erreichen, daß die adsorbierte Lipase nicht wieder durch die wäßrige Phase ausgewaschen wird, wird der Polypropylenträger mit einer Polydimethylsiloxanschicht überzogen. Diese Silikonschicht ist für das organische Medium und die Substrate durchlässig, nicht jedoch für Wasser oder das Enzym. Die Versuchsbedingungen zur

Immobilisierung sind in Kapitel 3.2.8 beschrieben. Das Immobilisat hat die gleiche physikalische Konsistenz wie das unbeschichtete Material.

#### 4.6.1 Vergleich der Stabilität des mit Silikon beschichteten und des unbeschichteten Trägermaterials Accurel EP 100

Um einen Vergleich zwischen dem mit Silikon beschichteten Material und dem reinen Polypropylenträger herstellen zu können, wird das Enzym zunächst, wie unter Kapitel 3.2.6 beschrieben, adsorptiv auf dem Träger fixiert und getrocknet. 1 g des so vorbereiteten Trägers wird mit Silikon beschichtet, 1 g des Katalysators bleibt unbeschichtet.

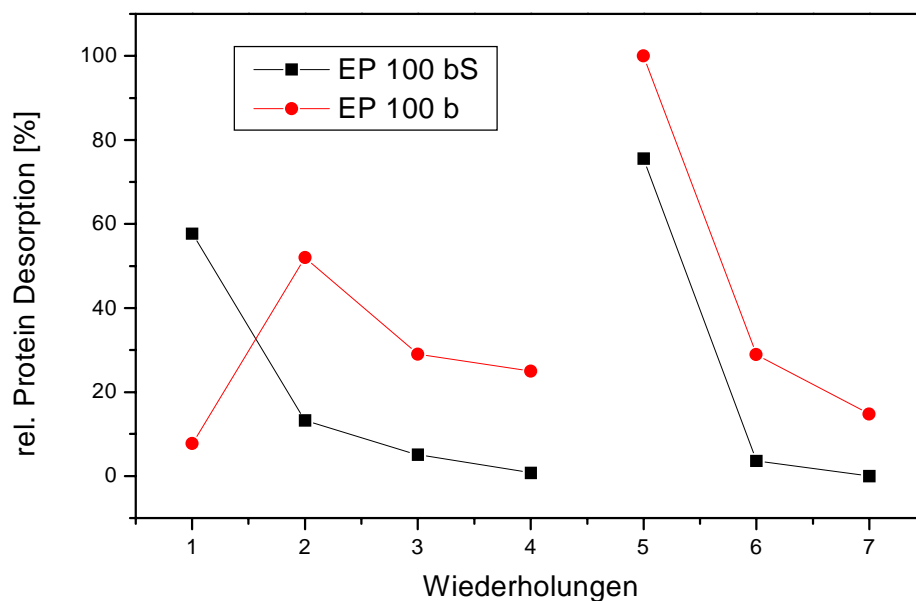
Die Untersuchungen der Enzymstabilität werden in der pH-Stat-Apparatur mit Tricaprylin als Substrat durchgeführt. 1 g des Katalysators wird zu 50 ml KPP-Puffer gegeben und der Reaktionsverlauf wird bei Raumtemperatur 30 min lang aufgezeichnet. Nach dieser Zeit wird die Reaktion abgestoppt, der Katalysator abgetrennt, gewaschen und getrocknet. Sowohl mit dem beschichteten als auch mit dem unbeschichteten Katalysator werden 4 Wiederholungen durchgeführt. Die Veränderung der Aktivitäten der immobilisierten Lipase mit und ohne Silikonbeschichtung sind in Abbildung 4-9 als Funktion der Anzahl der Wiederholungen dargestellt.



**Abbildung 4-9:** Vergleich des Aktivitätsverlustes für den mit Silikon beschichteten Katalysator (EP 100 bS) und den unbeschichteten Träger (Ep 100 b) nach fünf Reaktionsläufen.

Der Aktivitätsverlust der beschichteten Lipase beträgt nur 13 %. Die rein adsorptiv gebundene Lipase hingegen zeigt einen deutlich höheren Rückgang in der Aktivität. Nach dem fünften Einsatz im Reaktor ist ein Aktivitätsverlust von 47 % festzustellen.

Außerdem wird die desorbierte Proteinmenge für die einzelnen Ansätze bestimmt. Dazu wird nach jeweils 30 min Probe entnommen und der Proteingehalt untersucht. Nach der dritten Wiederholung wird das Trägermaterial jeweils für 24 h im KPP-Puffer gerührt und wiederum werden drei Wiederholungen durchgeführt, deren Proteingehalt bestimmt wird. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-10 grafisch gegenübergestellt. Um beide Träger direkt miteinander vergleichen zu können, wird die relative Abnahme des Proteingehaltes in Prozent angegeben, dazu wird der Proteingehalt im Überstand für Accurel EP 100 b gleich 100 % gesetzt.



**Abbildung 4-10:** Vergleich der Abnahme des Proteingehaltes im Überstand während der Desorptionsmessungen für silikonbeschichtetes und für unbeschichtetes Material.

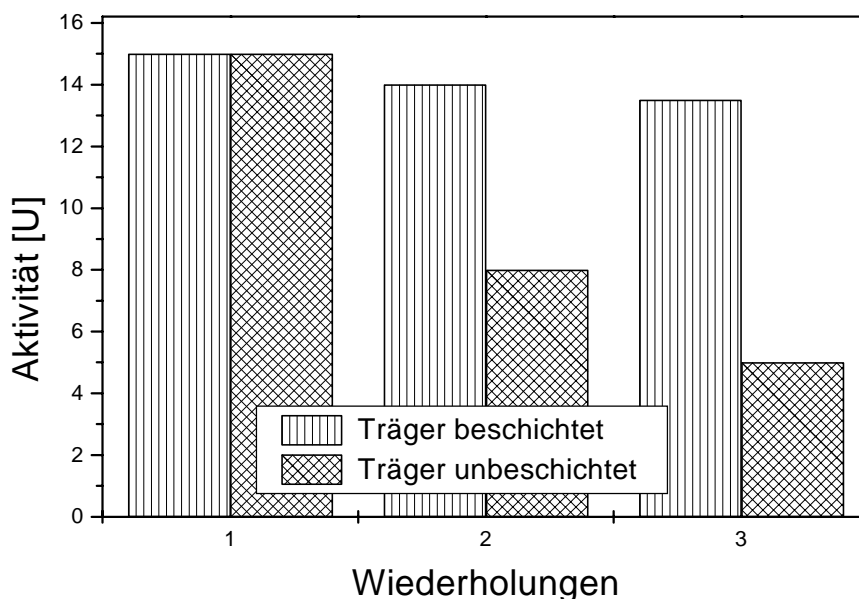
Wiederum ist festzustellen, daß die Menge an freigesetztem Protein für das mit Silikon beschichtete Material geringer ist als die des unbeschichteten Materials. Allerdings zeigen die Ergebnisse auch, daß bei dem beschichteten Material ein gewisser Anteil an Protein freigesetzt wird.



Diese Messungen zeigen, daß das mit einem Silikonfilm beschichtete Trägermaterial eine höhere Stabilität und Aktivität als das unbeschichtete Material aufweist. Daraus folgt, daß dieser Träger für den Einsatz zur Veresterung von Ethanol zu Caprylsäureethylester die besten Eigenschaften besitzt.

#### 4.6.2 Vergleich der Veresterungsaktivität von Accurel EP 100 mit und ohne Silikonbeschichtung

Es werden zwei Ansätze parallel betrieben. Der erste Ansatz wird mit unbeschichtetem Trägermaterial in Hexan durchgeführt, im zweiten Ansatz wird silikonbeschichtetes Material eingesetzt. Als Lösungsmittel wird reines Hexan verwendet. Als Substrat wird der Standardansatz wie in Kapitel 3.2.2 eingesetzt. Die Veresterung wird jeweils bis zum vollständigen Umsatz der Caprylsäure durchgeführt. Die Ergebnisse des Vergleiches sind in Abbildung 4-11 dargestellt. Nach jeder vollständigen Veresterung wird das Trägermaterial gewaschen und 12 h in 50 ml KPP-Puffer gerührt.



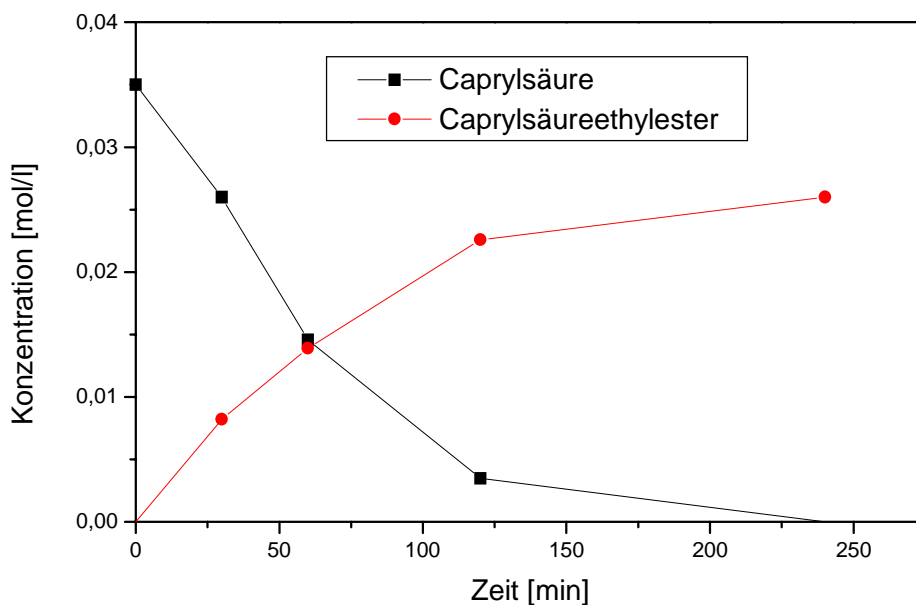
**Abbildung 4-11:** Vergleich der Aktivitäten von silikonbeschichtetem und unbeschichtetem Accurel EP 100. Nach jedem Ansatz wird 24 h mit KPP-Puffer gewaschen.

Nach der Trocknung des Materials wird es erneut zur Veresterung eingesetzt. Das unbeschichtete Material zeigt jetzt deutliche Aktivitätsverluste. Die Aktivität bezogen auf die Veresterung von Caprylsäure ist von 15 U auf 5 U, d. h. um zwei Drittel, zurückgegangen.

#### 4.7 Kontinuierliche Veresterung im Miniatur-Festbettreaktor

Die bisher erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß die auf Accurel EP 100 immobilisierte Lipase die besten Voraussetzungen für den Einsatz in einem kontinuierlich betriebenen Reaktor bietet. In diesem Versuchsreaktor werden die Bedingungen des später betriebenen Hohlfaser-Extraktions-Festbettreaktor simuliert. Besonderes Augenmerk wird darauf gelegt, daß das Ethanol, welches als Substrat zur Veresterung dient, jetzt extraktiv aus der wäßrigen Phase zugeführt wird. Die Beschreibung des Reaktors und die Versuchsbedingungen finden sich in Kapitel 3.2.9.

Im Reaktor befinden sich 0,68 g Katalysatormaterial. Als organische Phase wird Oktan eingesetzt. In der organischen Phase wird eine Startkonzentration von 0,03 mol/l Caprylsäure vorgelegt. Die wäßrige Phase besteht aus 10 Vol. %-iger Ethanollösung. Dieses ist die Ethanolkonzentration, die bei Hefefermentationen erreicht wird. In Abbildung 4-12 ist der Verlauf dieser kontinuierlichen, extraktiven Veresterung von Ethanol mit Caprylsäure dargestellt.



**Abbildung 4-12:** Kontinuierliche, extraktive Veresterung von Caprylsäure mit Ethanol im Miniatur-Festbettreaktor. Trägermaterial: Accurel EP 100 beschichtet mit Silikon; Lipase aus *Mucor miehei*.

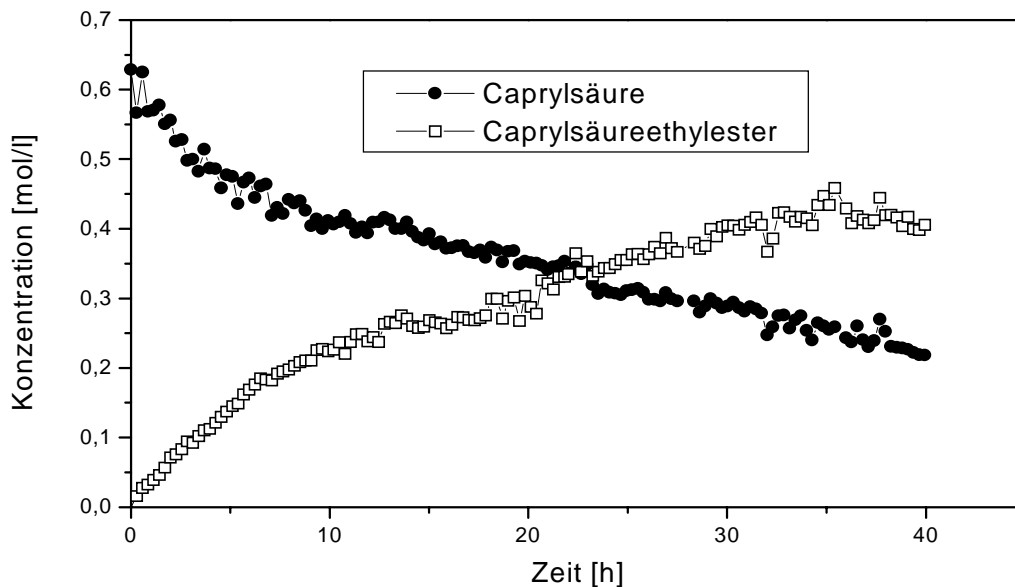
Schon nach 230 Minuten ist die Säure vollständig verestert, obwohl Ethanol nur über eine sehr kleine Phasengrenzschicht in die organische Phase gelangt. Der Einsatz dieses Trägermaterials ist somit für eine kontinuierliche, extraktive Veresterung geeignet.

#### **4.8 Reaktive Extraktion von Ethanol mit einem Hohlfasermodul und mit immobilisierter Lipase im Festbettreaktor**

Im folgenden werden die in einer Technikumsanlage gewonnenen Ergebnisse beschrieben. Zur Extraktion und um eine Phasentrennung zwischen der organischen und der wäßrigen Phase aufrecht zu erhalten, kommt ein kommerziell erhältliches Hohlfasermodul der Firma Hoechst Celanese zum Einsatz. Die Hohlfasern bestehen aus Polypropylen. Der genaue Aufbau, die technischen Daten und die Betriebsparameter des Setups sind in Kapitel 3.3.1 aufgeführt. Aus Sicherheitsgründen wird im Technikumsreaktor Octan als Lösungsmittel eingesetzt.

Die Edukt- und Produktkonzentrationen werden mit einer HPLC online verfolgt. Der Reaktor besitzt ein Arbeitsvolumen von 1,1 Litern und ist mit dem Immobilisat (Accurel EP 100) gefüllt. 500 ml der Palatase M 200L werden auf dem Trägermaterial adsorbiert, dieses entspricht 100.000 U. Als wäßrige Phase wird 9,6 %-ige Ethanollösung eingesetzt. Das Ethanol wird in großem molaren Überschuß eingesetzt (4,7 Mol in 3 Litern wäßriger Lösung). Die organische Phase besteht aus 2 Litern Octan. Die Anlage wird in Betrieb genommen, indem zuerst die wäßrige Phase langsam über das Hohlfasermodul zirkuliert wird, erst danach wird die organische Phase gepumpt. Diese Reihenfolge ist notwendig, um sicherzustellen, daß die organische Phase nicht durch die hydrophobe Membran in die wäßrige Phase gelangt. Für die organische Phase wird ein Volumenstrom von 40 l/h eingestellt, die Zirkulation der wäßrigen Phase erfolgt hingegen mit 100 l/h. Die wäßrige Phase besitzt im Hohlfasermodul einen Überdruck von 0,3 bar. Der Reaktor und die Ethanollösung werden auf 24 °C temperiert. Caprylsäure wird als Modellsubstrat eingesetzt. In Abbildung 4-13 sind die Ergebnisse dargestellt.

Die Veresterungsrate ist in den ersten 10 h am höchsten. In dieser Zeit werden 0,02 mol/h (2,9 g/h) Caprylsäure zum korrespondierenden Ester umgesetzt. Die Gleichgewichtskonzentration des Esters von 0,4 mol/l (69 g/l) wird nach 40 h erreicht.

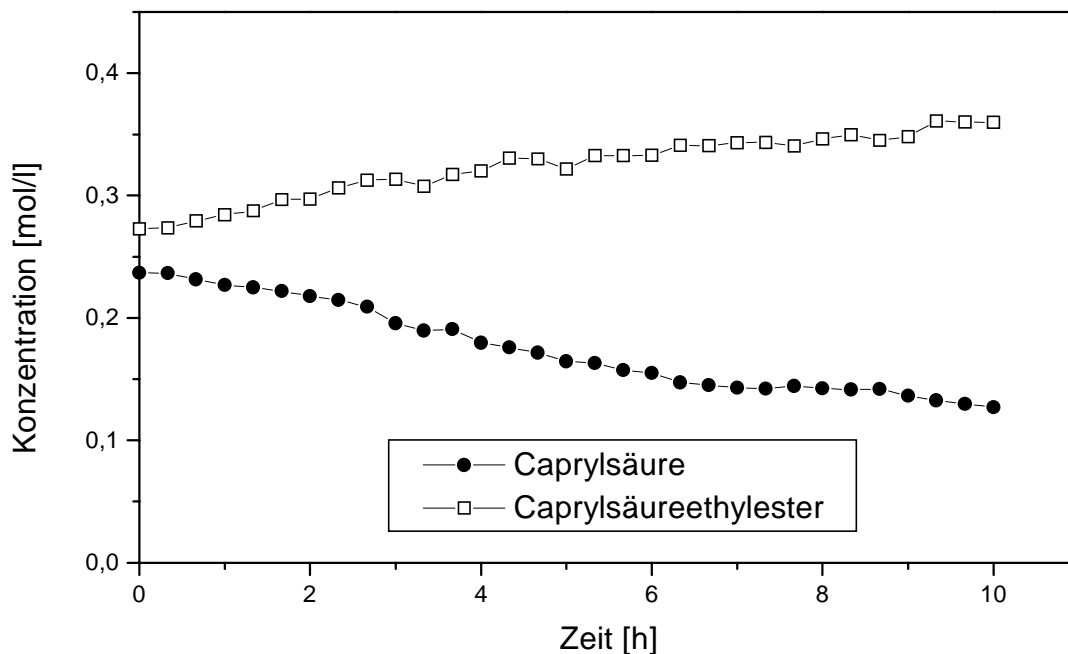


**Abbildung 4-13:** Reaktivextraktion von Ethanol mit Caprylsäure über einen Zeitraum von 40 h. 100.000 U Lipase (*Mucor miehei*) immobilisiert auf Accurel EP 100. Die Temperatur beträgt 24 °C.

#### 4.8.1 Einfluß der Produktesterkonzentration auf die Reaktion

In Vorversuchen wurde festgestellt, daß bei einer Produktesterkonzentration von ca. 0,3 mol/l (52 g/l) die Gleichgewichtskonzentration der Reaktion erreicht ist, d. h. daß die Geschwindigkeiten von Produktbildung und Esterspaltung in der gleichen Größenordnung liegen. Um zu überprüfen, ob dieser Sachverhalt auch in der Technikumsanlage gilt, wird als Startkonzentration eine Konzentration an Caprylsäureethylester von 0,27 mol/l (46,5 g/l) vorgelegt. Die Betriebsbedingungen sind die gleichen wie in Kapitel 4.8 beschrieben. Die Ergebnisse dieses Experimentes werden in Abbildung 4-14 vorgestellt. In der Gegenwart einer hohen Anfangskonzentration an Caprylsäureethylester geht die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit von 0,02 mol/h auf 0,008 mol/h zurück, d. h. es werden nur noch 40 % der anfänglichen

Reaktionsgeschwindigkeit erreicht. Es liegt hier also eine Produktinhibierung durch den Caprylsäureethylester vor.

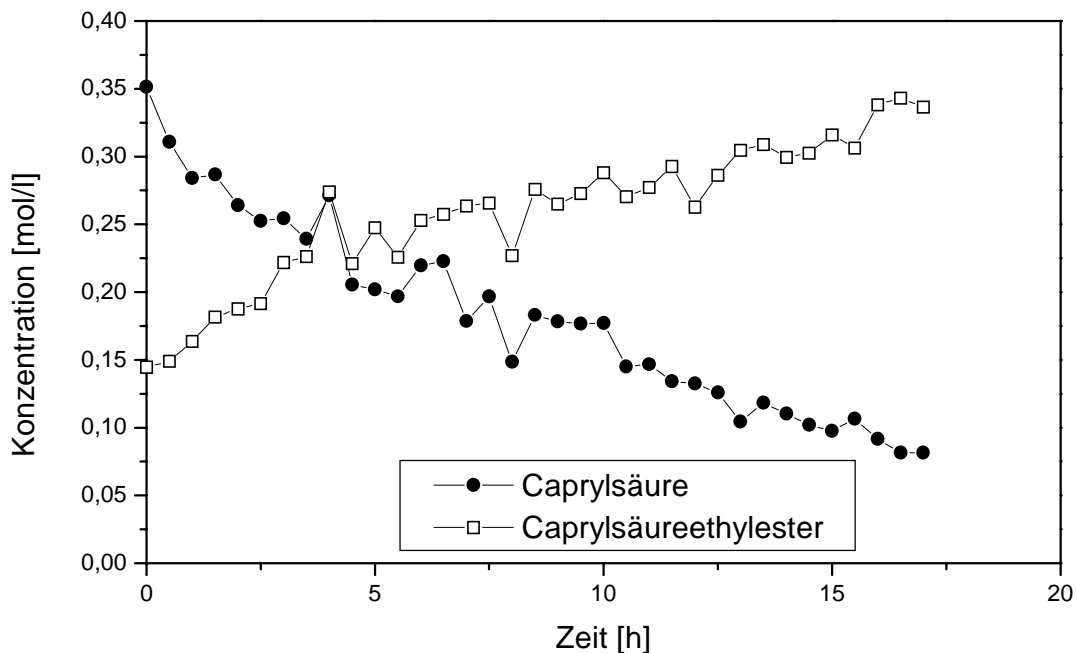


**Abbildung 4-14:** Reaktivextraktion von Ethanol mit Caprylsäure. Die Anfangskonzentration von Caprylsäureethylester beträgt 0,27 mol/l (46,5 g/l). 100.000 U Lipaseaktivität auf immobilisiertem Accurel EP 100.

#### 4.8.2 Langzeitstabilität der auf Accurel EP 100 immobilisierten Lipase

Der Aktivitätsverlust der auf dem Trägermaterial immobilisierten Lipase wird untersucht, indem die Aktivität nach vierwöchigem Einsatz in mehreren Reaktionsläufen, die durch zahlreiche Wasch- und Spülzyklen unterbrochen sind, aufgezeichnet wird. Die Esterbildungsaktivität nach mehreren Reaktionsläufen ist in Abbildung 4-15 dargestellt.

Nach dieser Langzeitnutzung geht die Esterbildungsrate auf 0,014 mol/h zurück. Es ist also noch 70 % der anfänglichen Aktivität vorhanden. Diese Ergebnisse zeigen, daß die *Mucor*-Lipase immobilisiert auf Accurel EP 100 eine ausreichend hohe Stabilität besitzt, um in einer Reaktivextraktion von Ethanol aus wäßriger Phase eingesetzt zu werden.

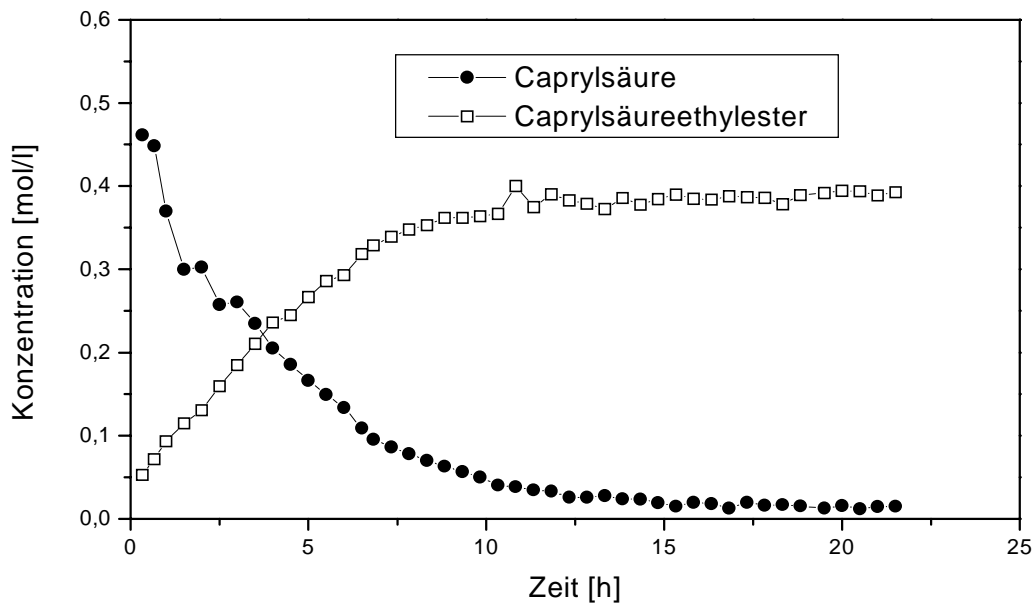


**Abbildung 4-15:** Einsatz eines vier Wochen alten, in mehreren Reaktionsläufen genutzten Immobilisates, welches ursprünglich mit einer Lipaseaktivität von 100.000 U aus *Mucor miehei* immobilisiert wurde. Der Umsatz zum Caprylsäureethylester wird bei einer Temperatur von 24 °C durchgeführt.

#### 4.8.3 Regenerierung des Trägermaterials im Reaktor mit neuer Lipaselösung

Um den Einsatz des Reaktorsystems in einer technischen Anlage zu prüfen, wird getestet, inwieweit das Trägermaterial, welches sich im Festbettreaktor befindet, durch Adsorption von frischer Lipaselösung regeneriert werden kann. Dazu werden 1000 ml Enzymlösung in 1000 ml 0,05 M KPP-Puffer (pH 7,5) gelöst. Diese Enzymlösung wird für 24 h bei 24 °C über das Reaktor-Hohlfaser-System gepumpt. Die Lipase wird auf dem Trägermaterial im Festbettreaktor sowie auf dem Hohlfasermodul adsorbiert. Der Versuch wird unter den in Kapitel 4.8 geschilderten Standardbedingungen durchgeführt. Für diesen Ansatz werden insgesamt 200.000 U Lipase in 2 Litern Pufferlösung im Reaktorsystem zirkuliert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 4-16 dargestellt.

Die Lipase wird sowohl auf dem Accurel-Träger als auch auf der Membran des Hohlfasermoduls adsorbiert. Die Enzymaktivität der immobilisierten Lipase ist durch die vergrößerte Oberfläche erhöht. Die Produktbildungsrate liegt während der ersten 7 Stunden bei 0,05 mol/h (8,6 g/h), d. h., eine Steigerung von 250 % im Vergleich zu dem im Kapitel 4.8 beschriebenen Versuchen.

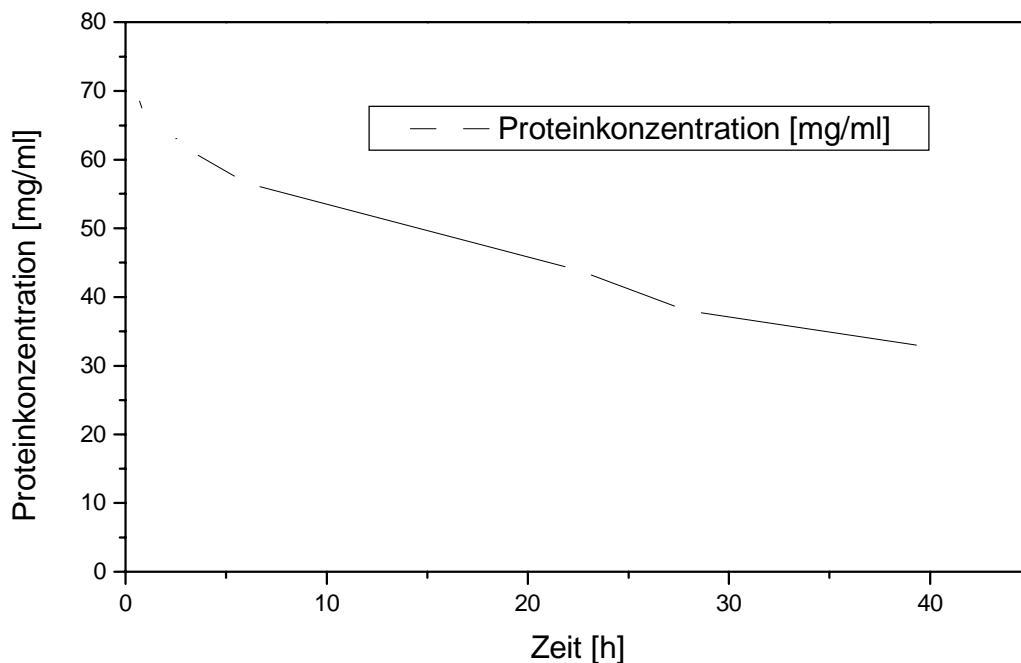


**Abbildung 4-16:** Reaktivextraktion von Ethanol mit Caprylsäure. 200.000 U Lipase sind auf Accurel EP 100 immobilisiert. Das Enzym wird adsorbiert durch Zirkulation der Lipaselösung im Reaktor und über das Hohlfasermodul für 24 h bei 24 °C.

Das Ergebnis entspricht genau den Erwartungen, denn zum einen wird die doppelte Menge an Enzym eingesetzt, zum anderen steht durch das Einbeziehen des Hohlfasermoduls zur Adsorption eine größere Oberfläche zur Verfügung. Auch in diesem Versuch stellt sich eine Gleichgewichtskonzentration von 0,4 mol/l Caprylsäureethylester ein. Eine weitere Zugabe von Caprylsäure führt nicht zu einer höheren Produktkonzentration.

#### 4.8.4 Proteinadsorption im Hohlfaser-Festbettreaktorsystem

Die Gesamtmenge an Protein, welche durch Adsorption sowohl auf dem Hohlfasermodule als auch auf dem Trägermaterial immobilisiert ist, wird bestimmt. In Abbildung 4-17 ist der zeitliche Verlauf der Adsorption über 40 Stunden dargestellt. Es ist gut zu erkennen, daß die Enzymadsorption in der Technikumsanlage deutlich langsamer verläuft, als bei den Vorversuchen (siehe Kapitel 4.5). Dieses ist dadurch zu erklären, daß die Durchmischung in den Modellansätzen in Kapitel 4.5.1 wesentlich besser ist, als sie in der Technikumsanlage erreicht werden kann. Die größte Proteinadsorption erfolgt in den ersten 10 Stunden.



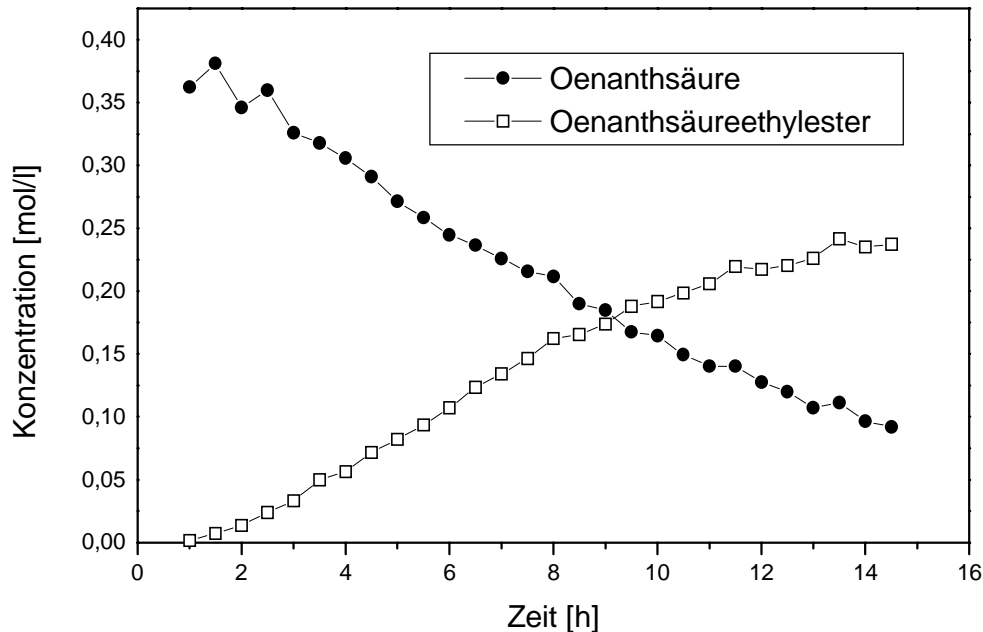
**Abbildung 4-17:** Abnahme der Proteinkonzentration im Überstand. 100.000 U Lipase in 2 Liter KPP-Puffer (pH 7,5), werden bei 24 °C 40 Stunden zur Adsorption über die Anlage zirkuliert.

#### 4.8.5 Oenanthsäure (Heptansäure) als Substrat

Um die Flexibilität der Anlage in Bezug auf unterschiedliche Substrate zu testen, wird eine weitere Säure eingesetzt, die eine um ein Kohlenstoffatom verkürzte Kette besitzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-18 dargestellt. Es werden 0,35 mol/l Oenanthsäure als Substrat vorgelegt. In den ersten 10 Stunden beträgt die Esterbildungsgeschwindigkeit 0,022 mol/h. In Bezug auf die eingesetzte Lipasemenge ist



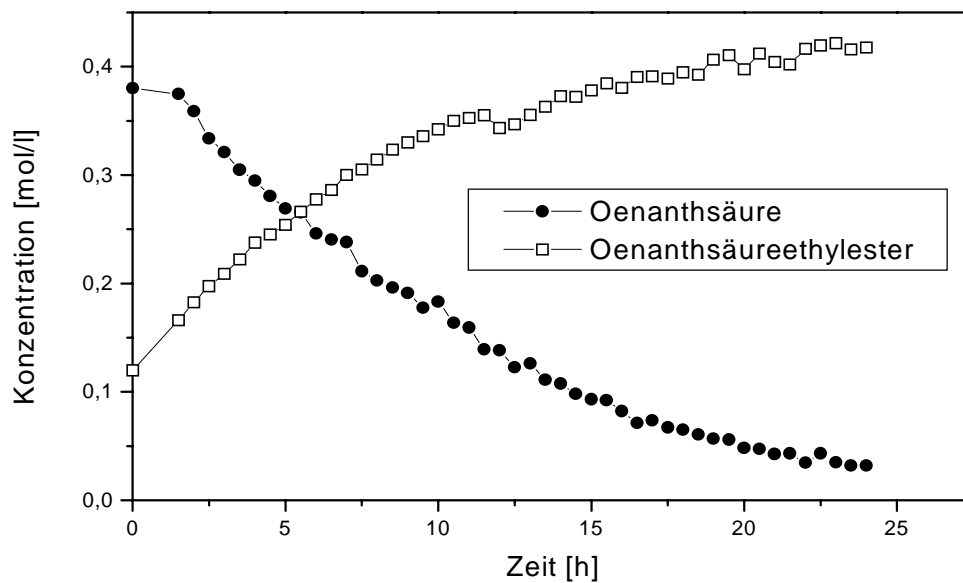
die Esterbildungsgeschwindigkeit mit Oenanthsäure als Substrat um 22 % geringer als mit Caprylsäure. Dieses entspricht den in der Literatur beschriebenen Untersuchungen.



**Abbildung 4-18:** Reaktivextraktion von Ethanol mit Oenanthsäure. Zum Einsatz kommen 100.000 U Lipase aus *Mucor miehei* immobilisiert auf Accurel EP 100. Die Temperatur beträgt 24 °C.

#### 4.8.6 Stabilität des Systems nach der Esterbildung mit Oenanthsäure

Die Aktivität des Immobilisates wird nach mehreren Einsätzen und nachdem die Anlage mehrmals mit Wasser gespült wurde, bestimmt. Die Esterbildungsrate bleibt trotzdem konstant bei 0,022 mol/h. Die vormals beobachteten starken Aktivitätsverluste können durch ein Austrocknen des Enzyms verursacht worden sein. Die Oenanthsäure hat in Oktan und in dem eingesetzten Konzentrationsbereich keine denaturierende Wirkung auf die Lipase. Der Einsatz von reiner Oenanthsäure bzw. Caprylsäure führt hingegen in kurzer Zeit zu einer Deaktivierung des Enzyms. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-19 dargestellt.



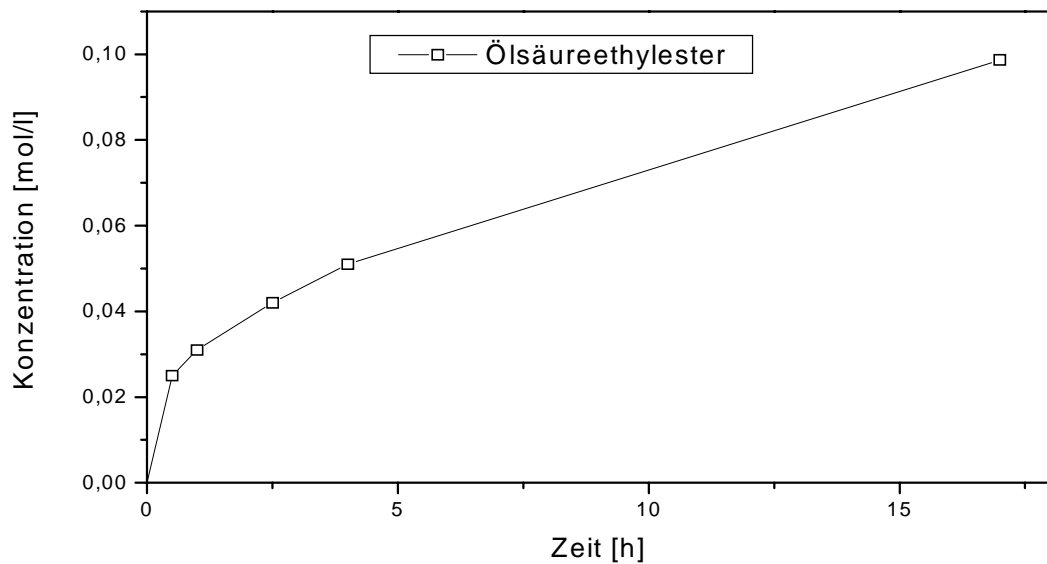
**Abbildung 4-19:** Stabilität des Systems: Veresterung von Ethanol mit Oenanthsäure. Im Reaktor befindet sich die unter 5.6 immobilisierte Lipase. Die Temperatur beträgt 24 °C.

#### 4.8.7 Der Einsatz von Ölsäure als Substrat

Als weiteres Substrat wird Ölsäure für die Veresterung eingesetzt. Das Substrat ist deshalb interessant, weil es aus natürlichen Ressourcen bezogen werden kann. Desweiteren ist der Einsatz von Ölsäure auch ohne Zusatz eines Lösungsmittels möglich, d.h. die sich anschließende Aufarbeitung wird stark vereinfacht.

Der Ansatz wird wie unter 4.8 beschrieben zunächst noch mit Octan als Lösungsmittel durchgeführt. Zur Zeit kann nur der Ester offline bestimmt werden. Die Reaktion wird mit dem bereits in Versuch 4.8.5 und 4.8.6 eingesetzten immobilisierten Enzym durchgeführt.

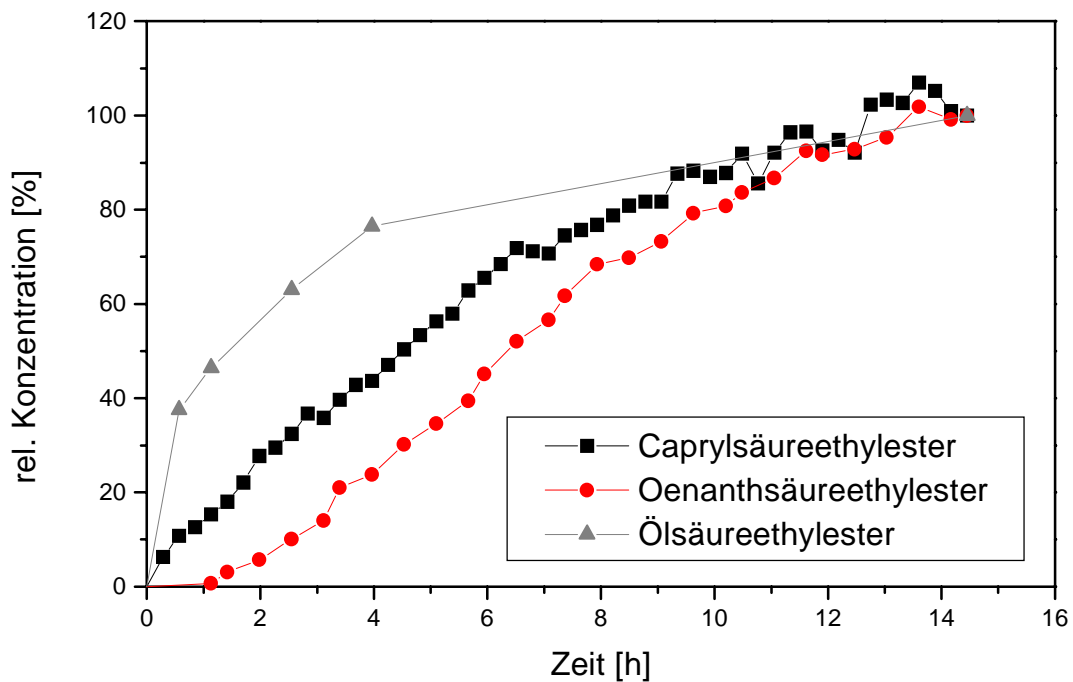
Ölsäure ist für die Lipase ein deutlich besseres Substrat als Oenanthsäure oder Caprylsäure. So beträgt die Veresterungsrate 0,03 mol/h.



**Abbildung 4-20:** Verlauf der reaktiven Veresterung von Ethanol mit Ölsäure. Trägermaterial 100.000 U Lipase auf Accurel EP 100 bei 24 °C.

#### 4.8.8 Vergleich der Veresterungsgeschwindigkeiten der eingesetzten Substrate

Um einen direkten Vergleich der Veresterungsgeschwindigkeiten von Oenanthsäure, Caprylsäure und Ölsäure zu erhalten, werden die Konzentrationen in Prozent umgerechnet. Dazu wird die Konzentration, welche nach 14,5 h erreicht ist, für jedes Substrat gleich 100 % gesetzt. In Abbildung 4-21 sind die Ergebnisse dargestellt.



**Abbildung 4-21:** Vergleich der Veresterungsgeschwindigkeiten für Oenanthensäure-, Caprylsäure- und Ölsäureethylester. Die jeweilige Konzentration, die nach 14,5 h erreicht wird, ist gleich 100 % gesetzt.

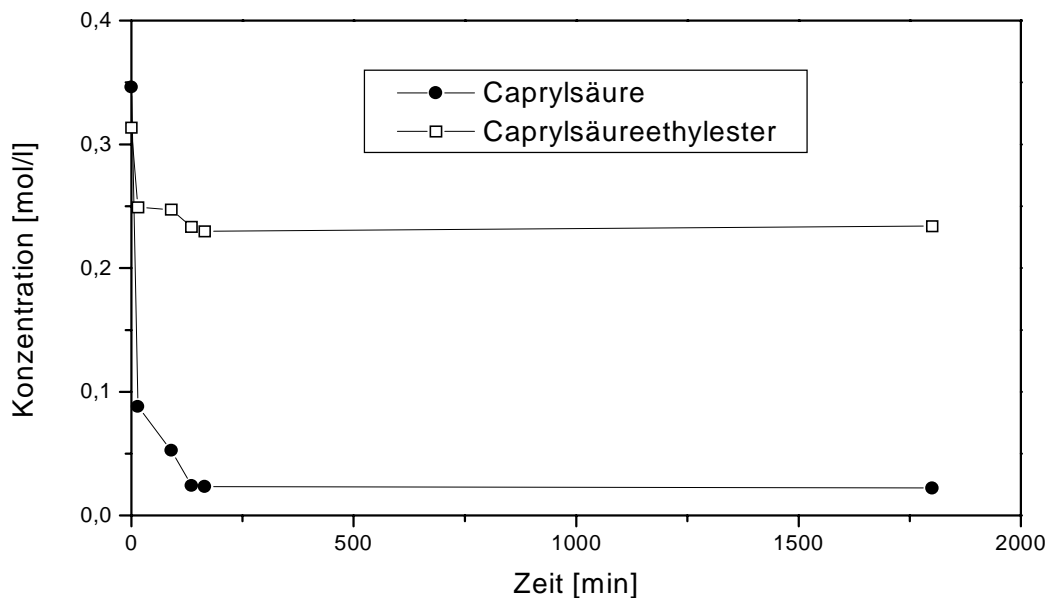
## 4.9 Produktaufreinigung

Da es bei der enzymatischen Veresterung in einem Zweiphasensystem zu einer Gleichgewichtseinstellung kommt, ist es notwendig, Methoden zu entwickeln, die es ermöglichen das gebildete Produkt kontinuierlich aus dem Reaktionsansatz zu entfernen. Dadurch wird das Reaktionsgleichgewicht ständig zur Produktbildung verschoben und es kann zu keiner Produktinhibierung kommen.

### 4.9.1 Rückextraktion der organischen Säure mit 1,2-Butandiol

Als Modellsubstrat wird eine Mischung aus Caprylsäure und Caprylsäureethylester, wie sie in der enzymatischen Veresterung anfällt, eingesetzt. Als Lösungsmittel kommt Octan zum Einsatz. Ziel dieser Untersuchungen ist es zu testen, ob es möglich ist, die nicht veresterte Säure aus dem Reaktionsgemisch zu entfernen, um somit ein leicht weiteraufzureinigendes Produkt zu erhalten.

Zu diesem Zweck wird ein zweites organisches Extraktionsmittel eingesetzt, welches jedoch mit der Oktanphase nicht mischbar ist. Es wird der Verteilung des Esters und der Säure zwischen der Oktan- und 1,2-Butandiolphase bestimmt. Die Messungen werden in einem 100 ml Kolben durchgeführt. Es werden jeweils 20 ml Oktanphase und 20 ml 1,2-Butandiolphase verwendet. Die Anfangskonzentration der Säure beträgt 0,35 mol/l (49,9 g/l), die des Esters wird auf 0,31 mol/l (54,0 g/l) eingestellt. Die Vermischung der beiden Phasen erfolgt mit einem Magnetrührer mit 500 rpm bei 25 °C. In Abbildung 4-22 sind die Konzentrationsverläufe der freien Säure und des Esters in der Oktanphase dargestellt.

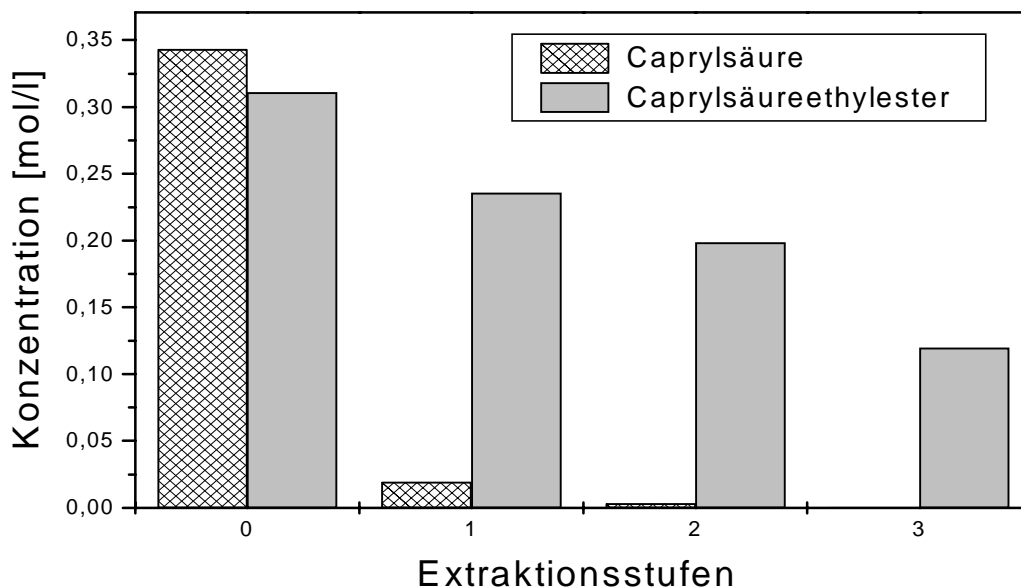


**Abbildung 4-22:** Veränderung der Konzentrationen von Caprylsäure und Caprylsäureethylester in der Oktanphase während der Extraktion mit 1,2-Butandiol bei 25 °C.

#### 4.9.2 Vollständige Entfernung von Caprylsäure aus der Modellösung

20 ml Oktan, in dem annähernd die gleichen Konzentrationen an Säure und Ester vorgelegt werden, wie sie bei den Versuchen im Reaktor entstehen, werden mit 20 ml der 1,2-Butandiolphase in Kontakt gebracht. In einem Schütteltrichter werden die beiden Phasen bei Raumtemperatur zwei Minuten lang heftig durchmischt. Nach der Phasentrennung wird der Vorgang noch zweimal mit jeweils 10 ml frischer 1,2-Butandiolphase wiederholt. Nach dem zweiten Extraktionsschritt sind bereits 99 % der Caprylsäure in die 1,2-Butandiolphase extrahiert (Abbildung 4-23).

Allerdings werden nach der zweiten Extraktionsstufe auch 36 % des Esters extrahiert.



**Abbildung 4-23:** Mehrstufige Extraktion eines Caprylsäure, Caprylsäureethylestergemisches aus der Oktanphase mittels 1,2-Butandiol. Die Konzentrationen der einzelnen Extraktionsstufen werden in der Oktanphase gemessen.

#### 4.9.3 Rückgewinnung der extrahierten Bestandteile aus der 1,2-Butandiolphase

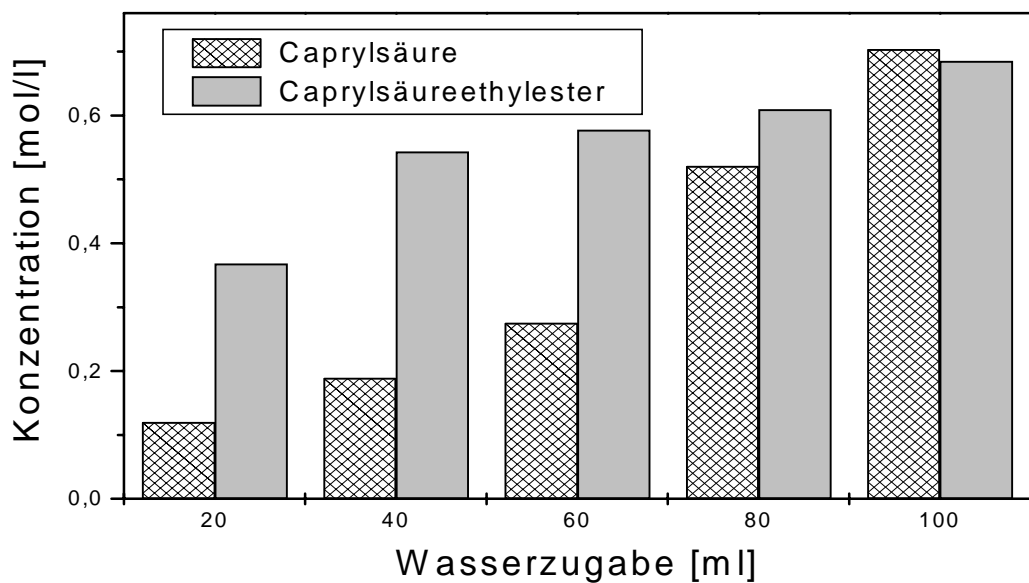
Es wird untersucht, inwieweit es möglich ist, die Säure und den Ester aus der 1,2-Butandiolphase zurückzugewinnen. Um dieses zu erreichen, wird der 1,2-Butandiolphase unterschiedliche Mengen an Wasser zugesetzt, 5 Minuten lang geschüttelt und nach 10 Minuten werden die entstandenen zwei Phasen voneinander getrennt. Die Auftrennung in zwei Phasen geschieht deshalb sehr leicht, da zusammen mit dem Ester und der Säure auch Oktan extrahiert wird. Unter den gegebenen Bedingungen (Kapitel 4.9.1) werden 40,65 ml Oktan in einem Liter 1,2-Butandiol mitextrahiert. Das zugesetzte Wasser bildet zusammen mit dem 1,2-Butandiol die wäßrige, schwere Phase, während das Oktan mit der Säure und dem Ester die leichte, organische Phase bildet.

Die Freisetzung der hydrophoben Bestandteile Oktan, Caprylsäure und Caprylsäureethylester sind in Abbildung 4-24 für unterschiedliche Mengen an zugesetztem Wasser aufgeführt. Um aus 50 ml der 1,2-Butandiolphase 100 Prozent der Säure und des Esters wieder freizusetzen, ist eine Wasserzugabe von 100 ml notwendig.

In Tabelle 4-5 sind die Konzentrationen der zurückgewonnenen Caprylsäure (CS) und des Esters (CE) aufgeführt.

**Tabelle 4-5:** Freisetzung von Caprylsäure (CS) und Caprylsäureethylester (CE) aus der 1,2-Butandiolphase nach der Wasserzugabe. Einfluß der Zugabe unterschiedlicher Volumina an Wasser, welche jeweils mit einem konstanten Volumen der 1,2-Butandiolphase vermischt werden.

1,2-Butandiol	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml
Wasser	20 ml	40 ml	60 ml	80 ml	100 ml
CS [mol/l]	0,12	0,19	0,28	0,52	0,70
CE [mol/l]	0,37	0,54	0,57	0,61	0,68



**Abbildung 4-24:** Freisetzung der Caprylsäure und des Caprylsäureethylesters aus 50 ml 1,2-Butandiolphase durch die Zugabe von unterschiedlich hohen Volumenanteilen an Wasser.

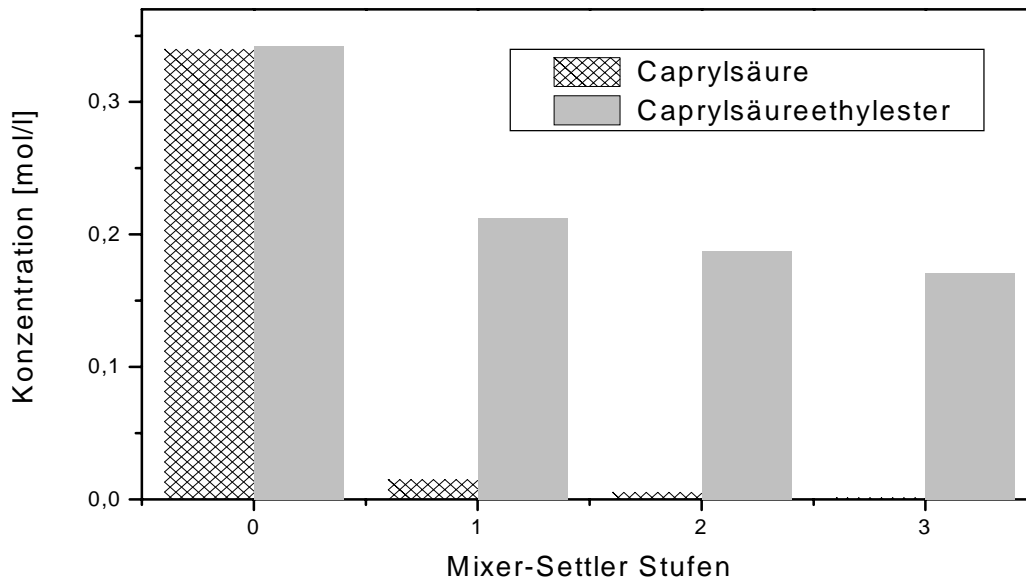
Es ist gut zu erkennen, daß die hydrophobere Komponente, nämlich der Ester, schon bei sehr viel geringeren Wasserzugaben aus dem Extraktionsmittel freigesetzt wird. Für eine vollständige Rückgewinnung der Säure aus 50 ml des Extraktionsmittels ist eine Zugabe von 100 ml Wasser notwendig. Um das Extraktionsmittel erneut einsetzen zu können, muß das Wasser aus dem Extraktionsmittel entfernt werden. Dieses kann sehr einfach destillativ geschehen, welches aber mit erheblichen Kosten verbunden ist.

#### **4.10 Kontinuierliche Extraktion der freien Säure aus der Oktanphase mit 1,2-Butandiol in einer Technikums-Mixer-Settler-Anlage im Gegenstromverfahren.**

Hierzu wird eine dreistufige Mixer-Settler-Anlage, welche im Gegenstrombetrieb betrieben wird, verwendet. Die genauen Betriebsbedingungen sind in Kapitel 3.5.3 aufgeführt. Die Durchflußraten der Oktan und der 1,2-Butandiolphase werden auf 1,9 l/h bzw. 3,5 l/h eingestellt. Als Anfangskonzentrationen werden die Konzentrationen an Säure und Ester vorgegeben, wie sie bei der enzymatischen Veresterung im Hohlfaserreaktor auftreten. Nach dem Durchlaufen der ersten Mixer-Settler-Stufe erniedrigt sich die Konzentration an Caprylsäure von anfänglich 0,34 mol/l auf 0,015 mol/l, dieses entspricht einer Abnahme um 95,6 %. Die Esterkonzentration hingegen nimmt von 0,34 mol/l auf 0,21 mol/l ab. In diesem Fall beträgt die Abnahme nur 38,2 %. In der zweiten Extraktionsstufe verringert sich die Säurekonzentration auf 0,006 mol/l und die Esterkonzentration ergibt sich zu 0,19 mol/l. Am Auslauf der dritten Extraktionsstufe wird eine Konzentration von 0,0014 mol/l bzw. 0,17 mol/l für die Säure bzw. den Ester gemessen.



In Abbildung 4-25 sind die Ergebnisse der Extraktion dargestellt.



**Abbildung 4-25:** Rückgewinnung der Caprylsäure aus der Oktanphase durch Extraktion mit 1,2-Butandiol in einer dreistufigen Mixer-Settler-Anlage. Die Konzentrationen der Säure und des Esters werden am Ausgang der ersten, zweiten und dritten Extraktionsstufe in der Oktanphase gemessen.

Die Ergebnisse zeigen, daß mit diesem System eine Trennung der Säure vom Ester möglich ist. Schon nach einer Mixer-Settler-Stufe ist die Säure fast vollständig entfernt. Um den Ester als Produkt zu gewinnen, ist es nun einfach möglich, das Lösungsmittel abzudestillieren.

Wie in Kapitel 4.9.3 angeführt, wird Oktan auch mit in die 1,2-Butandiolphase extrahiert. Aber es ist möglich, durch einfaches Hinzufügen von Wasser, die hydrophoben Bestandteile, die mit in die 1,2-Butandiolphase extrahiert worden sind, zurückzugewinnen. Die zurückgewonnenen hydrophoben Bestandteile, (Oktan, Säure und mitextrahierter Ester) können in einem zweiten Kreislauf der enzymatischen Veresterung im Hohlfaser-Reaktor wieder zugeführt werden.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

### 5.1 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Reaktorsystem entwickelt, um eine enzymatische extraktive Veresterung von Ethanol aus einem Zweiphasensystem heraus durchzuführen. Das Ethanol wird dabei mit einer langkettigen Säure zum korrespondierenden Ester umgesetzt. Als Enzym hat sich die Lipase aus *Mucor miehei* als geeignet erwiesen. Da es sich bei dieser Lipase um ein technisches Enzym handelt, welches in flüssigem wäßrigen Medium gehandelt wird, die Lipase aber im organischen Lösungsmittel eingesetzt wird, wurden geeignete Immobilisierungsmethoden für diese Lipase entwickelt. Dies führt zu einer besseren Einsatzfähigkeit des Enzyms und zu einer Erhöhung der Stabilität. Besonderes Augenmerk wurde darauf gelegt, daß die Immobilisierung auch im technischen Maßstab mit wenig Aufwand durchgeführt werden kann.

Für die Immobilisierung und den anschließenden Einsatz für eine extraktive Veresterung haben sich ein Matrix-Einschlußverfahren, basierend auf der Sol-Gel-Technik und eine Adsorption mit anschließender Silikonbeschichtung als günstig erwiesen. Aufgrund der besseren Handhabbarkeit und des günstigen Preises wurde als Methode der Wahl die Adsorption auf den Polypropylenträger Accurel EP 100 ausgewählt.

Um die Extraktion im Technikumsmaßstab durchzuführen, wurde ein Reaktivextraktionssystem entwickelt. Dieses besteht aus einem Hohlfaserextraktionsmodul, kombiniert mit einem Festbettreaktor, welcher die immobilisierte Lipase beinhaltet. Die Einsatzfähigkeit des Systems wurde mit verschiedenen Substraten unter wechselnden Bedingungen erfolgreich getestet, wobei als wäßrige Phase Modellmedien eingesetzt wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Möglichkeiten für eine kontinuierliche Produktionsführung aufgezeigt. Hierzu ist ein Mixer-Settler-System aufgebaut worden, durch dessen Hilfe eine kontinuierliche Abtrennung der Carbonsäure aus dem Produktgemisch möglich ist. Dieses ist wichtig, denn durch die Veresterung aus dem

Zweiphasensystem wird kein vollständiger Umsatz erreicht. Hierzu wird das Produktgemisch mit einem weiteren organischen Extraktionsmittel extrahiert.

Die extrahierten Bestandteile lassen sich durch Zufügen von Wasser zurückgewinnen. Ein Abdestillieren von Wasser ermöglicht es, das Extraktionsmittel zu recyceln. Somit ist es möglich, einen kontinuierlichen, geschlossenen Produktionskreislauf zu verwirklichen.

## **5.2 Ausblick**

In erster Linie sollte das Ethanol nicht aus Modellmedien vorgelegt, sondern durch Fermentationen gewonnen werden, um zu zeigen, daß die Anlage fähig ist, eine Produktinhibierung bei der biotechnologischen Ethanolproduktion zu beseitigen.

Durch den Aufbau einer Anlage, wie sie im Anhang unter Abbildung 6-1 dargestellt ist, kann eine kontinuierliche Produktion von Carbonsäureethylestern durchgeführt werden.

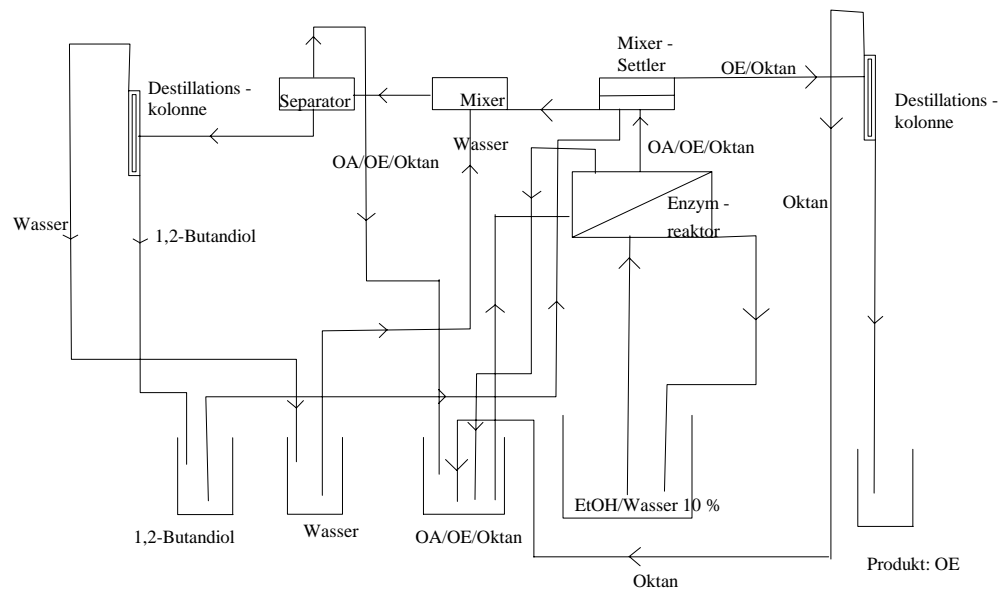
Desweiteren ist zu überprüfen, ob es möglich ist, den Carbonsäureethylester durch geeignete Membranverfahren aus dem Produktgemisch zu entfernen [70] - das würde zu einer Vereinfachung der Aufarbeitung führen.

Eine weitere Möglichkeit ist es, den reaktiven Ester enzymatisch mit Glycerin umzusetzen, um die wichtigen Monoacylglyceride zu erhalten. Hierbei würde dann das Ethanol wieder freigesetzt werden und könnte z. B. durch Pervaporation abgetrennt werden. Die entstehenden Monoacylglyceride lassen sich durch einen Temperaturshift als Feststoffe gewinnen.

Ein weites Feld bietet sich der Membrantechnologie in Kombination mit der Enzymtechnik in der Fettstoffchemie. Hierbei können zuerst die Triglyceride enzymatisch gespalten und zum Teil fraktioniert werden. Im folgenden Schritt ist es mit einer zweiten Lipase möglich, den entsprechenden Ethylester herzustellen, welcher als reaktives Zwischenprodukt benötigt wird. Der Einsatz der Membrantechnologie verhindert, daß es zur Bildung von Emulsionen kommt und erleichtert somit entscheidend die Produktaufreinigung.

## 6 Anhang

### 6.1 Vorschlag zur Verfahrensführung für die kontinuierliche Produktion von Carbonsäureethylestern



**Abbildung 6-1:** Vorschlag zur Reaktionsführung, um mit einer extraktiven, enzymatischen Veresterung kontinuierlich Carbonsäureethylester zu gewinnen.

## 6.2 Geräte

### Enzymaktivität

Dosimat 665	Metrohm
Impulsomat 614	Metrohm
pH-Meter 632	Metrohm
Thermost. Meßgefäß	Metrohm
Thermostat 5B/c	Julabo
Rührer	Metrohm

**HPLC**

Pumpe	Kratos Spectroflow 400
Detektor	ERC 7511 RI
Säule	Waters RP C18 19 Å 5 µm
Ventil	Knauer
Integrator	Spektra-Physics SP 4290

**Proteinbestimmung**

Photometer	KONTRON Instruments UVIKON 922
------------	--------------------------------

**Rückextraktion**

Mixer-Settler	QVF Mixer-Settler DN 80
---------------	-------------------------

**Reaktivextraktion**

Extraktionsmodul	Celgard X10
Wasserbad	Julabo 5B
Wasserbad	Haake F3
Pumpe	Shurflo Diaphragm Pump
Pumpe	Hyda Cell
Aufbau	TCI

**Sonstiges**

pH-Meter	Schott CG 809
Magnetrührer	IKA-Combimag
Magnetrührer	Heidolph MR 2002
Schreiber	BBC SE 420

### 6.3 Chemikalien

Palatase 1000L	Novo-Nordisk
Palatase 200L	Novo Nordisk
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Amano
<i>Candida rugosa</i>	Sigma
Heptanoic Acid Ethyl Ester	Sigma
Octanoic Acid Ethyl Ester	Sigma
Dowex MWA-1	Sigma
Methanol HPLC grade	Sigma
Florisil	Fluka
Tricaprylin	Fluka
Caprylsäure	Fluka
Ethylcaprylate	Fluka
3-Aminopropyltrimethoxysilan	Fluka
Tetramethoxysilan	Fluka
Methyltrimethoxysilan	Fluka
Propyltrimethoxysilan	Fluka
Oenanthsäure	Fluka
1,2-Butandiol	Fluka
Hexan	Fluka
Oktan Fraktion	Fluka
Ölsäure	Fluka
Accurel EP 100	Akzo Nobel
Natriumfluorid	Riedel-de Haen
Ethanol abs.	Merck

## 7 Literaturverzeichnis

1. EINSELE, A: Biotechnologie in den neunziger Jahren. *Swiss Biotech.* 7 (1989), Nr. 4, S. 19-22
2. PRIMROSE, S. B.: *Biotechnologie*. SPEKTRUM VERLAG Heidelberg: 1990
3. *Product Sheet* NOVO NORDISK Bagsvaerd Denmark: 1993
4. O'BRIEN, D. J.; CRAIG, Jr. J. C.: Ethanol production in a continuous fermentation/membrane pervaporation system. *Applied Microbiology Biotechnology* (1996), Nr. 44, S. 699-704
5. SHABTAI, Y.; CHAIMOVITZ, S.; FREEMAN, A.; KATCHALSKI-KATZIR, E.: Continuous Ethanol Production by Immobilized Yeast Reactor Coupled with Membrane Pervaporation Unit. *Biotechnology and Bioengineering* (1991), Nr. 38, S. 869-876
6. MELIN, E.; SHIEH, W. K.: Continuous ethanol production from glucose using *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on fluidized microcarriers. *The Chemical Engineering Journal* (1992), Nr. 50, S. B17-B22
7. Technische Membranen in der Biotechnologie. VCH VERLAGSGESELLSCHAFT WEINHEIM KULA, M.-R.; SCHÜGERL, K.; WANDREY, Ch.: GBF Monographien. Weinheim: VCH, 1986.
8. MORITZ, J. W.; DUFF, J. B.: Simultaneous Saccharification and Extractive Fermentation of Cellulosic Substrates. *Biotechnology and Bioengineering* (1996), Nr. 49, S. 504-511
9. KANG, W.; SHUKLA, R.; SIRKAR, K. K.: Ethanol Production in a Microporous Hollow-Fiber-Based Extractive Fermentor with immobilized Yeast. *Biotechnology and Bioengineering* (1990), Nr. 36, S. 826-833
10. OLIVERA, A. C.; CABRAL, J. M.: Production and Extractive Biocatalysis of Ethanol Using Microencapsulated Yeast Cells and Lipase System. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* (1991), Nr. 52, S. 219-225
11. SCHLATMANN, J.; AIRES-BARROS, M. R.; CABRAL, J. M.: Esterification of short chain organic acids with alcohols by a lipase microencapsulated in reversed micelles. *Biocatalysis* (1991 1991), Nr. 5, S. 137-144

12. AIRES-BARROS; M. R.; CABRAL, J. M.: Esterification-Coupled Extraction of Organic Acids: Partition Enhancement an Underlying Reaction and Distribution Equilibria. *Biotechnology and Bioengineering* (1989), Nr. 34, S. 909-915
13. VAN DER PADT, A.; EDEMA, M. J.; SEWALT, J. J.; VAN'T RIET, K.: Enzymatic Acylglycerol Synthesis in a Membrane Bioreactor. *JAOCS* (1990), Nr. 67, S. 347-352
14. BERGER, M.; LAUMEN, K.; SCHNEIDER, M. P.: Enzymatic Esterification of Glycerol I. Lipase-Catalysed Synthesis of Regioisomerically Pure 1,3-sn-Diacylglycerols. *JAOCS* (1992), Nr. 69, S. 955-960
15. BERGER, M.; SCHNEIDER, M. P.: Enzymatic Esterification of Glycerol II. Lipase-Catalysed Synthesis of Regioisomerically Pure 1(3)-rac-Monoacylglycerols. *JAOCS* (1992), Nr. 69, S. 961-965
16. LEWIS, W. K.; WHITMAN, W.G: Principles of Gas Absorption. *Ind. Eng. Chem.* (1924), Nr. 16, S. 1215
17. HIGBIE, R.: The Rate of Absorption of a Pure Gas into a Still Liquid During Short Periods of Exposure. *Ind. Eng. Chem.* (1935), Nr. 31, S. 365
18. DANCKWERTS, P. V.: Significance of Liquid-Film Coefficients in Gas Absorption. *Ind. Eng. Chem.* (1951), Nr. 43, S. 1460
19. SCHÜGERL, Karl: *Solvent Extraction in Biotechnology. Recovery of Primary and Secondary Metabolites* Heidelberg: Springer Verlag, 1994
20. RITCEY, G. M.; ASHBROOK, A. W.: Solvent Extraktion - Principles and Applications to Process Metallurgy. *Elsevier Science Publishers, Amsterdam* (1984), S. 507-509
21. BART, H. -J.: Metallsalzextraktion - Stoffaustausch und Reaktionstechnik. *Graz, Technische Universität, Habilitationsschrift* (1988)
22. KIANI, A.; BHAVE, R. R.; SIRKAR, K. K.: Solvent extraction with immobilized interfaces in a microporous hydrophobic membrane. *J. Membr. Sci.* (1984), Nr. 20, S. 125-145
23. FRANK, G. T.; SIRKAR, K. K.: An integrated bioreactor-separator: In-situ recovery or fermentation and membrane extraction. *Biotech. Bioeng. Symp. Ser.* (1986), Nr. 17, S. 303-316
24. HO, W. S.; SIRKAR, K. K.: *Membrane Handbook* VAN NOSTRAND REINHOLD New York:, 1992. S. 727 ff



25. MATSON, S. L.; QUINN, J. A.: Membrane reactors in bioprocessing. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (1986), Nr. 469, S. 152-165
26. HAMPE, M. J.: Lösungsmittel-Auswahl bei der Flüssig/Flüssig-Extraktion unter physikalisch-chemischen Aspekten. *Chem. Ing. Tech.* (1989), Nr. 57, S. 669-681
27. KIEFER, M.; MARQUARDT, K.: Aufbereitung von hochbelasteten Industrieabwässern bis zur Totalentsorgung. *ACHEMA-Vortrag, Frankfurt* (1991)
28. SCHULZ, G.: Mikrofiltration - Ein Verfahren in der Biotechnologie. *BTF-Biotech-Forum* (1986), Nr. 3, S. 136-140
29. RAUTENBACH, R.; ALBRECHT, R.: *Membrantrennverfahren* VERLAG SALLE + SAUERLÄNDER Aarau: 1981
30. EGLI, S.; RUF, A.; WIDMEIER, F.: Entwicklung und Charakterisierung von Composite-Membranen für die Nano- und Ultrafiltration. *Swiss Chem.* (1989), Nr. 11, S. 53-75
31. KARLSON, P.: *Kurzes Lehrbuch der Biochemie* THIEME VERLAG STUTTGART Stuttgart: 1994
32. VOET, D.; VOET, J.G.: *Biochemie* VERLAG WEINHEIM, 1994
33. *Ullmanns Enzyklopädie der technischen Chemie* VERLAG CHEMIE WEINHEIM Bd. 10.: 1975
34. HARTMEIER, W.: *Immobilisierte Biokatalysatoren* SPRINGER- VERLAG Berlin-Heidelberg-New York-Tokio: 1986
35. KLIBANOV, A. M.; SAMOKHIN, G. P.; MARTINEK, K.; BEREZIN, I. A.: A new approach to preparativ enzymatic synthesis. *Biotechnol. Bioeng.* (1977), Nr. 19, S. 1351-1361
36. HERTZBERG, S.; KVITTINGEN, L.; ANTHONSEN, T.; SKJAK-BRAK, G.: Alginate as immobilization matrix and stabilizing agent in a two-phase liquid system: Application in lipase-catalysed reactions. *Enzyme Microbiology Technology* (1992), Nr. 14, S. 42-47
37. GOTO, M.; KAMIYA, N. F.; NAKASHIO: Enzymatic Interesterification of Triglyceride with Surfactant-Coated Lipase in Organic Media. *Biotechnology and Bioengineering* (1995), Nr. 45, S. 27-32

38. CHO, S-W.; RHEE, J. S.: Immobilization of Lipase for Effective Interesterification of Fats and Oils in Organic Solvent. *Biotechnology and Bioengineering* (1993), Nr. 41, S. 204-210
39. MARTY, A.; DOSSAT, V.; CONDORET, J.-S.: Continuous Operation of Lipase Catalyzed Reactions in Nonaqueous Solvents: Influence of the Production of Hydrophilic Compounds. *Biotechnology and Bioengineering* (1997), Nr. 56, S. 232-237
40. BILYK, A.; BISTLINE, R. G.; HAAS, M. J.; FEAIRHELLER, S. H.: Lipase-Catalysed Triglyceride Hydrolysis in Organic Solvent. *JAOCs* (1991), Nr. 68, S. 320-323
41. PERRAUD, R.; LABORET, F.: Optimization of methyl propionate production catalysed by *mucor miehei* lipase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1995), Nr. 44, S. 321-326
42. XIE, Z. F.: *Pseudomonas fluorescens* lipase in asymmetric synthesis. *Tetrahedron: Asymmetry* (1991), Nr. 2, S. 733-750
43. BOYER, P.D.: *The Enzymes Bd. VII* ACADEMIC PRESS New York: 1972
44. CHEN, C. S.; SIH, C. J.: Enantioselektive Biokatalyse in organischen Solventien am Beispiel Lipase-katalysierter Reaktionen. *Angew. Chem.* (1982), Nr. 101, S. 711-724
45. BROCKERHOFF, H.; JENSEN, R. G.: *Lipolytic Enzymes* ACADEMIC PRESS New York: 1972
46. BORGSTRÖM, B.; BROCKMANN, H. C.: *Lipases* ELSVIER Amsterdam: 1984
47. LAUMEN, K. E.: *Esterhydrolasen - Anwendung in der organischen Synthese: Chirale Bausteine aus Estern prochiraler und racemischer Alkohole* DISSERTATION Universität Wuppertal: 1987
48. PLÜCKTHUN, A.: Wege zu neuen Enzymen: Protein Engineering und katalytische Antikörper. *Chemie in unserer Zeit* 4 (1990), Nr. 24, S. 182-198
49. REETZ, M. T.; ZONTA, A.; SIMPELKAMP, J.: Efficient Immobilization of Lipases by Entrapment in Hydrophobic Sol-Gel Materials. *Biotechnology and Bioengineering* (1996), Nr. 49, S. 527-534
50. BAKUL, C. D.; DUNN, B.; VALENTINE, J. S.; ZINK, J. I.: Sol-Gel Encapsulation Methods for Biosensoren. *Analytical Chemistry* 66 (1994), Nr. 22, S. 1120-1127

51. BRADFORD, M. M.: A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* (1976), Nr. 72, S. 248-256
52. SEDMARK, J. J.; GROSSBERG, S. E.: A Rapid, Sensitive and Versatile Assay for Protein Using Coomassie Brilliant Blue G250. *Anal. Biochem.* (1977), Nr. 79, S. 544-552
53. LOWRY, O. H.; ROSBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J.: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* (1951), Nr. 193, S. 265-275
54. GOA, J.: A Micro Biuret Method for Protein Determination. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* (1953), Nr. 5, S. 218-222
55. KOSUGI, Y.; TAKAHASCHI, K.; LOPEZ, C.: Large-Scale Immobilization of Lipase from *Pseudomonas fluorescens* Biotype I and an Application for Sardine Oil Hydrolysis. *JAOCS* 11 (1995), Nr. 72, S. 1281-1285
56. ZAIDI, A.; GAINER, J. L.; CARTA, G.: Fatty Acid Esterification Using Nylon-Immobilized Lipase. *Biotechnology and Bioengineering* (1995), Nr. 48, S. 601-605
57. CARTA, G.; GAINER, J. L.; BENTON, A. H.: Enzymatic Synthesis of Esters Using an Immobilized Lipase. *Biotechnology and Bioengineering* (1991), Nr. 37, S. 1004-1009
58. MORENO, J. M.; SINISTERRA, J. V.: Immobilization of lipase from *Candida cylindracea* on inorganic supports. *Journal of Molecular Catalysis* (1994), Nr. 93, S. 357-369
59. BASRI, M. et. al.: Synthesis of Fatty Esters by Polyethylene Glycol-Modified Lipase. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* (1995), Nr. 64, S. 10-16
60. *Product sheet* AKZO NOBEL FASER AG Obernburg: 1996
61. *Firmeninformation* HOECHST CELANESE CORPORATION Charlotte: 1993
62. KEURENTJES, J. T.; SLUIJS, J. T.; FRANSSEN, H. R.-J.; VAN'T RIET, K.: Extraction and Fractionation of Fatty Acids from Oil using an Ultrafiltration Membrane. *Ind. Eng. Chem. Res.* (1992), Nr. 31, S. 581-587
63. *Technische Information* QVF GLASTECHNIK GMBH Wiesbaden: 1985
64. *Extraktionsapparate* QVF GLASTECHNIK GMBH Wiesbaden:

65. ROSSELL, C. M.; VAIDYA, A. M.: Twin-core packed-bed reactors for organic-phase enzymatic esterification with water activity control. *App. Microbiol. Biotechnol* (1995), Nr. 44, S. 283-286
66. RUCKENSTEIN, E.; WANG, X.: Lipase Immobilized on Hydrophobic Porous Polymer Supports Prepared by Concentrated Emulsion Polymerisation and Their Activity in the Hydrolysis of Triacylglycerides. *Biotechnology and Bioengineering* (1993), Nr. 42, S. 821-828
67. MURRAY, M.; ROONEY, D.; VAN NEIKERK, M.; MONTENEGRO, A.; WEATHERLEY, L.: Immobilization of lipase onto lipophilic polymer particles and application to oil hydrolysis. *Process Biochemistry* 6 (1997), Nr. 32, S. 479-486
68. BALCAO, V. M.; VIERA, M. C.; MALCATA, F. X.: Adsorption of Protein from Several Commercial Lipase Preparations onto a Hollow-Fiber Membrane Module. *Biotechnol. Prog.* (1996), Nr. 12, S. 164-172
69. HOQ, M. M.; YAMANE, T.; SHIMIZU, S.: Continuous Synthesis of Glycerides by Lipase in a Microporous Membrane Bioreactor. *JAACS* (1984), Nr. 61, S. 776-781
70. ISONO, Y.; FUKUSHIMA, K.; KAWAKATSU, T.; NAKAJIMA, M.: Integration of Charged Membrane into Perstraction Systems for Separation of Amino Acid Derivatives. *Biotechnology and Bioengineering* (1997), Nr. 56, S. 162-167

## 8 Lebenslauf

# Lebenslauf

<b>Name:</b>	Burfeind, Jens
<b>Familienstand:</b>	ledig
<b>Telefon:</b>	0511 / 348 0 349
<b>Anschrift:</b>	Große Pfahlstr. 2, 30161 Hannover
<b>02. 05. 1966</b>	geboren als Sohn des Bauingenieurs Jürgen Burfeind und der Bürogehilfin Antje Erika Burfeind, geb. Fänger
<b>1972 - 1976</b>	Grundschule-Mitte in Bremervörde
<b>1976 - 1986</b>	neusprachlich/mathematisch-naturwissenschaftliches Gymnasium in Bremervörde
<b>Juni 1986</b>	Abitur
<b>Juli 1986 - Oktober 1987</b>	Grundwehrdienst im PiBtl 3, Stade
<b>WS 1987 - WS 1990</b>	Studium der Chemie an der Universität Hannover
<b>September 1990</b>	Vordiplom
<b>WS 1990 - SS 1995</b>	Hauptstudium bis zur Erlangung des Hochschulgrades <b>Dipl.-Chemiker</b> . Anfertigung der Diplomarbeit am <u>Inst. für Techn. Chemie</u> unter Prof. Dr. Dr. K. Schügerl. Thema: Analyse höherer Alkohole mit enzymatischen Methoden
<b>August 1995 - Dezember 1997</b>	Wissenschaftlicher Mitarbeiter für Forschung und Lehre am <u>Inst. für Techn. Chemie</u>
<b>seit Januar 1998</b>	Weiterbildung: technisches Projektmanagement am Bildungszentrum für informationsverarbeitende Berufe (b.i.b.)