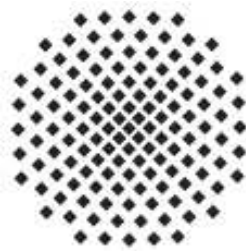


**Immobilisierung von Haloalkan-Dehalogenasen
und Prozessentwicklung der enzymatischen
Produktion von optisch aktivem
2,3-Dichlor-1-propanol**

Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines
Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)
genehmigte Abhandlung



vorgelegt von
Markus Samorski
aus Herten

Vorsitzender:	Prof. Dr.-Ing. habil. C. Merten
Hauptberichter:	Prof. Dr.-Ing. Dr. h.c. Matthias Reuss
Mitberichter:	Prof. Dr. rer. nat. Rolf D. Schmid

Tag der mündlichen Prüfung: 15. April 2008

Institut für Bioverfahrenstechnik

Stuttgart, 2008

Meinen Eltern

Danksagung

An der Verwirklichung der vorliegenden Arbeit hatte eine große Anzahl von Personen ihren Anteil, denen ich allen auf diesem Weg für ihren Beitrag und ihre Unterstützung von Herzen danken möchte. Da ich hier nicht alle aufzählen kann, möchte ich mich stellvertretend bei folgenden Personen ausführlich bedanken:

Prof. Matthias Reuss danke ich herzlich für die Überlassung dieser Arbeit, deren wissenschaftlichen Betreuung, die Freiräume bei der Bearbeitung des Themas und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Dem gesamten Team des Dehalogenase-Projektes, das u. a. aus Prof. R. Schmid und F. Villatte vom Institut für Technische Biochemie, M. Siemann-Herzberg und C. Fritz vom Institut für Bioverfahrenstechnik sowie W. Leffers, S. Resnik, P. Swanson und W. Treffenfeldt von Dow Chemical, Midland, USA bestand, möchte ich für das Engagement für den Projekterfolg sowie für den großen Spaß bei der gemeinsamen Projektarbeit meine Dankbarkeit ausdrücken.

Andreas Freund bin ich aufrichtig dankbar für sämtliche Arbeiten an der Miniplant (von den ersten Gedankenspielen bis zu Detailverbesserungen im Dauerbetrieb der Anlage), ohne die diese Arbeit nie entstanden wäre.

Wouter Berendsen sowie die anregenden und lehrreichen Diskussionen mit ihm in unserem Büro werde ich nicht vergessen.

Die Studenten Beatriz Aznar Garcia, Christian Eberl, Peter Wörn, Michael Beier, Andreas Daub und Joachim Link haben durch ihre engagierten Arbeiten maßgeblich zum Fortschreiten und zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Bei den guten Geister des Instituts (v. a. Renate Moser, Petra Schlack, Alexander Müller) möchte ich mich für die vielen kleinen unterstützenden Tätigkeiten sowie die angenehme Institutsatmosphäre bedanken.

Daß die Mittagspausen angenehme Unterbrechungen der Arbeit waren, lag eindeutig an der lustigen MPI-Truppe. Jungs, macht weiter so!

Gerhard Stadler hat den Beweis angetreten, daß Kaffeepausen erfolgreich Miniplant-Wissen übertra-

gen können. Danke schön!

Ausdrücklich möchte ich dem geilsten Club der Welt für die Zerstreuung und Ablenkung während der gesamten Promotion danken.

Meinen Eltern bin ich zu immensem Dank verpflichtet, da sie mich immer in jeder Hinsicht gefördert und unterstützt haben. Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.

Abstract

Modelling of the covalent immobilization onto the enzyme carrier Eupergit, kinetic characterization of the applied haloalkane dehalogenases, detailed fixed bed reactor modelling, design, assembly and operation of a fully-automated mini-plant, long-term activity studies of the haloalkane dehalogenases, as well as a comparative assessment of the two involved immobilization methods was undertaken in the context of this work for the enzymatic dehalogenation of 1,2,3-trichloropropane to optical active 2,3-dichloro-1-propanol.

The immobilization of haloalkane dehalogenase DhaA onto Eupergit was described by a simple single phase model which in the absence of diffusional limitations accounts for the phenomena inactivation of the soluble enzyme and immobilization reaction and which can be solved analytically. Experimental validation exhibited a sufficient prediction accuracy of this model. Due to a higher thermal activation of the immobilization reaction compared to enzyme inactivation, a decrease of immobilization temperature leads to lower enzyme yields as well as lower space time yields of the immobilization. The yield of active immobilized enzyme can effectively be increased through applying high Eupergit concentrations. The influence of the Eupergit concentration during immobilization on the reactor size of the synthesis process could be quantified.

The kinetic characterization of the haloalkane dehalogenases DhaA and DSD4, which was achieved by a temperature and pH-dependent Michaelis-Menten type of kinetics involving competitive product inhibition, revealed the different catalytic properties of the two enzymes. Haloalkane dehalogenase DhaA exhibits a strong affinity towards substrate and product of the studied dehalogenation ($K_M(30^\circ C, pH9) = 1,79 \text{ mmol/l}$, $K_I(30^\circ C, pH9) = 1,56 \text{ mmol/l}$), while the DSD4 enzyme shows a lowered affinity towards the two molecules ($K_M(30^\circ C, pH9) = 9,96 \text{ mmol/l}$, $K_I(30^\circ C, pH9) = 25,6 \text{ mmol/l}$). Based on these results the fixed-bed reactor could be identified as the ideal type of reactor for the enzymatic production of optically active 2,3-dichloro-1-propanol.

For the description of the fixed-bed reactor a detailed model was developed which distinguishes between two compartments and incorporates the phenomena convection, dispersion, mass transfer, diffusion, adsorption, and reaction. The required parameters were determined partly by experiments or were taken from empirical correlations found in the scientific literature. The concept of a loop process for the achievement of high product concentrations was also adequately modelled.

Mini-plant experiments with the immobilized haloalkane dehalogenases DhaA and DSD4 showed a good agreement of experimental observations and simulation results. The steady-state concen-

tration profiles within the fixed-bed reactor are predominantly influenced by the enzyme kinetic parameters, whereas the dynamic reactor behaviour after a stepwise alteration of the feed conditions depends mainly on the adsorption of substrate and product onto the enzyme carriers. During the experiments in the loop configuration a by-product formation was observed which severely hindered the process description by the model due to an increased consumption of base. For minor by-product formation the deviation can be tolerated and prediction of the concentration time courses by the model can be regarded as sufficient. The attained space time yield of the loop process corresponds approximately to the space time yield of the conventional fixed-bed process at the same conversion.

The inactivation of the immobilized haloalkane dehalogenases was investigated in long-term studies under continuous process condition in the mini-plant. Eupergit-immobilized enzyme DhaA exhibited an activity loss of approx. 12 % after an operation period of 14,3 days at a fixed-bed reactor temperature of 30°C. Due to the comparative high scattering of the activity data, the determined half life of 74,5 days can be regarded as doubtful. PEI-alumina immobilized haloalkane dehalogenase DhaA was evaluated for its long term stability in five experimental series at three different fixed-bed temperatures. An additional inactivation due to non-dissolved substrate during two experimental series avoided the identification of the enzyme's thermal inactivation mechanism and its model-based description. By means of the raw data, the inactivation can be qualitatively estimated. After around 100 days of mini-plant operation an decrease in activity of PEI-alumina immobilized haloalkane dehalogenase of approx. 80 % was observed. The long-term stability of PEI-alumina immobilized haloalkane dehalogenase DSD4 is not sufficient for industrial applications because during the first week of continuous mini-plant operation an activity loss of approx. 75 % occurred.

Comparing the two immobilization methods applied in this work, Eupergit is advantageous over PEI-alumina in terms of its easier immobilization procedure as well as its assumed higher protection against inactivation during continuous operation. Immobilization of haloalkane dehalogenases onto PEI-alumina benefits through conserving enzyme activity over immobilization and through enabling short dynamic transition phases after changed process conditions. Internal mass transfer considerations, which would favour Eupergit, do not play a decisive role with the used enzymes due to their low activity. It was resigned from assessing the immobilization methods conclusively since the inactivation patterns of the immobilized enzymes could not sufficiently be determined.

Linking the methods of *simultaneous engineering* and *integrated mini-plant technology* for the process development of an enzyme-catalysed haloalkane dehalogenation can be regarded successful from the overall project perspective. Revealing process relevant research and development potentials via simulation studies based on the validated process model was exemplarily demonstrated with the parameter variations of the Michaelis-Menten constant K_M , the product inhibition constant K_I , and the adsorption equilibrium constant m_i .

Zusammenfassung

Für die enzymatische Dehalogenierung von 1,2,3-Trichlorpropan zu optisch aktivem 2,3-Dichlor-1-propanol wurden im Rahmen dieser Arbeit die kovalente Immobilisierung mit dem Enzymträger Eupergit modelliert, die enzymkinetische Charakterisierung der eingesetzten Haloalkan-Dehalogenasen durchgeführt, ein detailliertes Festbettreaktormodell erarbeitet, eine vollautomatisierte Versuchsanlage zur Modellvalidierung und Prozessoptimierung entworfen, gebaut und betrieben, das Langzeitaktivitätsverhalten der beiden Haloalkan-Dehalogenasen untersucht sowie eine Bewertung der eingesetzten Immobilisierungsmethoden vorgenommen.

Die Eupergit-Immobilisierung von Haloalkan-Dehalogenase DhaA wurde durch ein kinetisches Modell beschrieben, das aufgrund der Abwesenheit diffusiver Limitierungen die Phänomene Inaktivierung des löslichen Enzyms und Immobilisierungsreaktion in einphasiger Weise beschreibt und einer analytischen Lösung zugänglich ist. Die experimentelle Überprüfung offenbarte eine ausreichende Vorhersagegüte des Modells. Aufgrund der stärkeren thermischen Aktivierung der Immobilisierungsreaktion gegenüber der Enzyminaktivierung führt eine Absenkung der Immobilisierungstemperatur zu sowohl geringeren Enzym-Ausbeuten als auch niedrigeren Raum-Zeit-Ausbeuten der Immobilisierung. Die Ausbeute an aktiv immobilisiertem Enzym kann durch den Einsatz hoher Eupergit-Konzentrationen gesteigert werden. Der Einfluss der Eupergit-Konzentrationen bei der Immobilisierung auf die Reaktorgröße des Syntheseprozesses konnte quantifiziert werden.

Die enzymkinetische Beschreibung der Haloalkan-Dehalogenasen DhaA und DSD4, die durch eine Michaelis-Menten-Kinetik mit kompetitiver Produktinhibierung sowohl temperatur- als auch pH-abhängig vorgenommen wurde, konnte die unterschiedlichen katalytischen Eigenschaften der Enzyme offen legen. Haloalkan-Dehalogenase DhaA zeichnet sich durch eine hohe Affinität zu Substrat und Produkt der betrachteten Dehalogenierung aus ($K_M(30^\circ\text{C}, \text{pH}9) = 1,79 \text{ mmol/l}$, $K_I(30^\circ\text{C}, \text{pH}9) = 1,56 \text{ mmol/l}$), während das Enzym DSD4 sowohl eine geringere Substrat- als auch Produktaffinität aufweist ($K_M(30^\circ\text{C}, \text{pH}9) = 9,96 \text{ mmol/l}$, $K_I(30^\circ\text{C}, \text{pH}9) = 25,6 \text{ mmol/l}$). Auf Basis der kinetischen Daten konnte ein Festbettreaktor als der ideale Reaktortyp für die enzymatische Produktion von optisch aktivem 2,3-Dichlor-1-propanol identifiziert werden.

Zur Beschreibung des Festbettreaktors wurde ein detailliertes Modell entwickelt, das zwei Kompartimente unterscheidet und die Phänomene Konvektion, Dispersion, Stofftransport, Diffusion, Adsorption und Reaktion berücksichtigt. Die benötigten Parameterwerte wurden teilweise experimentell bestimmt oder empirischen Korrelationen aus der wissenschaftlichen Literatur entnommen.

Das zur Erzielung höherer Produktkonzentrationen erarbeitete Konzept eines Rückführungsprozesses wurde ebenfalls adäquat modelliert.

Miniplant-Experimente der immobilisierten Haloalkan-Dehalogenasen DhaA und DSD4 zeigten eine gute Übereinstimmung der experimentellen Beobachtungen und den Simulationsergebnissen. Die Konzentrationsprofile im Festbettreaktor von Fließgleichgewichtsexperimenten werden in erster Linie von den enzymkinetischen Parametern bestimmt, während das dynamische Reaktorverhalten nach einer sprunghaften Änderung der Zulaufbedingungen erheblich von der Substrat- und Produktdesorption am Enzymträger abhängt. Bei den experimentellen Beobachtungen der Prozessvariante mit Rückführung wurde eine Nebenproduktbildung beobachtet, die die Prozessbeschreibung durch das Modell aufgrund zusätzlich verbrauchter Lauge erschwert. Im Falle geringer Nebenproduktbildung kann die Abweichung toleriert und die Vorhersage der zeitlichen Konzentrationsverläufe durch das Modell als ausreichend bezeichnet werden. Die erzielte Raum-Zeit-Ausbeute des Prozesses mit Rückführung entspricht in etwa der des kontinuierlich betriebenen Festbettreaktors bei gleichem Umsatz.

In Langzeituntersuchungen wurde das Inaktivierungsverhalten der immobilisierten Haloalkan-Dehalogenase-Enzyme unter kontinuierlichen Prozessbedingungen in der Miniplant beobachtet. Das Eupergit-immobilisierte Enzym DhaA wies einen Aktivitätsverlust von ca. 12 % über eine Betriebsdauer von 14,3 Tagen bei 30°C Festbett-Temperatur auf. Aufgrund der relativ großen Schwankung der Einzelwerte der Restaktivität ist die ermittelte Halbwertszeit der Enzymaktivität von 74,5 Tagen als unsicher anzusehen. PEI-Alumina-immobilisierte Haloalkan-Dehalogenase DhaA wurde in insgesamt fünf Versuchsreihen bei drei unterschiedlichen Festbett-Temperaturen für Stabilitätsbetrachtungen herangezogen. Eine in zwei Versuchsreihen zusätzlich aufgetretene schleichende Inaktivierung durch nicht gelöstes Substrat verhinderte eine Klärung des Inaktivierungsmechanismus und dessen modellbasierte Beschreibung. Aus den Rohdaten kann das Inaktivierungsverhalten allerdings qualitativ abgeschätzt werden. In den ungefähr 100 Tagen des Miniplant-Betriebs mit diesem Immobilisat wurde eine Abnahme der Enzymaktivität von ungefähr 80 % beobachtet. Die Langzeitstabilität von PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DSD4 ist für industrielle Anforderungen nicht ausreichend, da innerhalb der ersten Betriebswoche ein Aktivitätsverlust von ungefähr 75 % auftrat.

Vergleicht man die beiden in dieser Arbeit eingesetzten Enzymträger Eupergit C und PEI-Alumina, sprechen für Eupergit die einfache Durchführung der Immobilisierung sowie die vermutlich stärker ausgeprägtere Stabilisierung der Enzymaktivität im kontinuierlichen Betrieb. Die Immobilisierung der Haloalkan-Dehalogenasen an PEI-Alumina zeichnet sich vor allem durch den Erhalt an Enzymaktivität während der Immobilisierung und die geringere Übergangsdauer nach einer sprunghaften Änderung der Prozessbedingungen im Festbett aus. Interne Stofftransporteigenschaften der Träger, die für Eupergit C gegenüber PEI-Alumina sprechen würden, sind bei den eingesetzten Enzymen aufgrund der geringen Aktivität nicht ausschlaggebend. Auf eine abschließende vergleichende Bewertung der Träger wurde verzichtet, da deren Einfluss auf das Inaktivierungsverhalten der Enzyme nicht ausreichend beschrieben werden konnte.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass die Verknüpfung der Methoden des *simultaneous engineering* und der *integrierten Miniplant-Technologie* für die untersuchte enzymkatalysierte Haloalkan-Dehalogenierung ein sinnvolles Konzept darstellt. Prozessrelevante Forschungs- und Entwicklungspotentiale im Bereich des evolutionären bzw. rationalen Proteindesigns und der Immobilisierung konnten durch Simulationsstudien auf Basis des in der Miniplant validierten Modells anhand der Parametervariationen der Michaelis-Menten-Konstante K_M , der Produktinhibierungskonstanten K_I und den Adsorptionsgleichgewichtskonstanten m_i aufgezeigt werden.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	V
Abstract	VII
Zusammenfassung	IX
Inhaltsverzeichnis	XII
Symbolverzeichnis	XVI
Verzeichnis der Indizes	XVIII
1 Einleitung	1
1.1 Einleitung	1
1.2 Stand des Wissens	2
1.2.1 Haloalkan-Dehalogenasen	3
1.2.2 Enzymimmobilisierung	5
1.2.3 Vollautomatisierte Versuchsanlagen für die Prozessentwicklung (Miniplants)	6
1.3 Zielsetzung der Arbeit	9
2 Material und Methoden	11
2.1 Enzyme	11
2.2 Chemikalien	11
2.2.1 1,2,3-Trichlorpropan	12
2.2.2 2,3-Dichlor-1-propanol	13
2.2.3 Weitere Chemikalien	13
2.3 Trägermaterialien für die Immobilisierung	13
2.3.1 Eupergit	13
2.3.2 PEI-Alumina	14
2.4 Proteinbestimmung nach Bradford	14
2.5 Enzymimmobilisierung	15

2.5.1	Immobilisierung mit Eupergit C	15
2.5.2	Immobilisierung mit PEI-Alumina	16
2.6	Gaschromatographische Konzentrationsbestimmung der chlorierten Kohlenwasserstoffe	17
2.7	Reaktionsexperimente der enzymatischen Dehalogenierung	17
2.8	Parameterschätzung	18
2.9	Haloalkan-Dehalogenase-Miniplant	18
2.9.1	Aufbau der Haloalkan-Dehalogenase-Miniplant	20
2.9.2	Festbettreaktor	21
2.9.3	Prozessleittechnik	24
2.9.4	Realisierung des Rückführungsprozesses	24
2.10	Experimentelle Durchführung, Probennahme und -analyse von Miniplant-Versuchsreihen	25
3	Kinetische Modellierung der Eupergit-Immobilisierung von Haloalkan-Dehalogenase DhaA	27
3.1	Kinetisches Modell der Eupergit-Immobilisierung von Haloalkan-Dehalogenase DhaA	27
3.1.1	Potentielle Diffusionslimitierungen	27
3.1.2	Kinetik der Enzyminaktivierung	29
3.1.3	Kinetik der Protein-Immobilisierung	29
3.1.4	Modellgleichungen	30
3.1.5	Ausbeutefunktion	31
3.2	Vergleich experimenteller Ergebnisse mit Modellrechnungen	32
3.2.1	Inaktivierung des löslichen Enzyms	32
3.2.2	Immobilisierung des löslichen Proteins	33
3.2.3	Einfluss der Proteinausgangskonzentration	33
3.2.4	Einfluss der Eupergit-Konzentration	34
3.2.5	Einfluss der Temperatur bei der Immobilisierung	37
3.3	Auswirkungen der Immobilisierung auf die Reaktorgröße	38
3.4	Zusammenfassung	40
4	Kinetische Charakterisierung der Enzyme und Wahl der Prozessführung	43
4.1	Kinetische Beschreibung der enzymatischen Dehalogenierung von 1,2,3-Trichlorpropan	43
4.1.1	Identifikation der Kinetik der Haloalkan-Dehalogenasen DhaA und DSD4	43
4.1.2	Michaelis-Menten-Kinetik mit kompetitiver Produktinhibierung	45
4.2	Temperaturabhängigkeit der enzymkinetischen Parameter	46
4.2.1	Anwendung des Arrhenius-Ansatzes auf die kinetischen Parameter	46
4.2.2	Ergebnisse	47
4.3	pH-Abhängigkeit der enzymkinetischen Parameter	48

4.4	Reaktorauswahl für die enzymkatalysierte Dehalogenierung	50
4.5	Zusammenfassung	53
5	Modellentwicklung des Haloalkan-Dehalogenase-Prozesses	55
5.1	Herleitung der Bilanzgleichungen	55
5.1.1	Bilanzierung der Bulk-Phase	57
5.1.2	Bilanzierung der Partikelporen-Phase	58
5.1.3	pH-Modellierung	59
5.2	Abschätzung der Modellparameter	61
5.2.1	Partikeldurchmesser	62
5.2.2	Enzymbeladung der Träger	62
5.2.3	Hohlraumanteile der Festbettschüttung und der Partikel	63
5.2.4	Schüttungsdichte der Immobilisierungsträger	63
5.2.5	Effektive Diffusionskoeffizienten in den Partikelporen	63
5.2.6	Axialer Dispersionskoeffizient	65
5.2.7	Stoffübergangskoeffizient	66
5.2.8	Adsorptionsisotherme	67
5.2.9	Enzymrestaktivität	68
5.2.10	Startwerte zur Lösung des Festbettmodells	68
5.3	Modellierung des Rückführungsprozesses	69
5.3.1	Modellierung des kontinuierlich betriebenen Rührkessels	71
5.3.2	Modellierung der Rohrleitungen	72
5.3.3	Bestimmung der Volumenströme und Enzymrestaktivität	72
5.4	Simulationstool Aspen Custom Modeler	73
6	Miniplant-Experimente der enzymatischen Dehalogenierung und Modellvalidierung	75
6.1	Experimente mit Eupergit-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA	76
6.1.1	Untersuchungen des stationären Betriebs mit Eupergit-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA	77
6.1.2	Dynamische Experimente mit Eupergit-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA	78
6.2	Experimente mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA	81
6.2.1	Untersuchungen des stationären Betriebs mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA	81
6.2.2	Dynamische Experimente mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA	83
6.3	Experimente mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DSD4	85

6.3.1	Untersuchungen des stationären Betriebs mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DSD4	86
6.3.2	Dynamische Experimente mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DSD4	89
6.3.3	Rückführungsexperimente mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DSD4	90
6.3.4	Vergleich von Festbett- und Rückführungsprozess mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DSD4	94
6.4	Zusammenfassung	96
7	Langzeitstabilität von immobilisierten Haloalkan-Dehalogenasen im kontinuierlichen Miniplant-Betrieb	99
7.1	Modellbasierte Beschreibung des Inaktivierungsverlaufs	100
7.2	Langzeitstabilität der Haloalkan-Dehalogenase DhaA	102
7.2.1	Experimente mit Eupergit-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA	103
7.2.2	Experimente mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA	104
7.3	Langzeitstabilität der Haloalkan-Dehalogenase DSD4	107
7.3.1	Experimente mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DSD4	107
7.4	Zusammenfassung	109
8	Vergleich der verwendeten Immobilisierungsträger	111
8.1	Vergleich des Immobilisierungsvorgangs	111
8.1.1	Durchführung der Immobilisierung	111
8.1.2	Effizienz der Immobilisierung	112
8.2	Vergleich der reaktionstechnischen Eigenschaften der Enzymträger	114
8.2.1	Stofftransporteigenschaften der Enzymträger	114
8.2.2	Einfluss der Enzymträger auf das dynamische Reaktorverhalten	115
8.2.3	Stabilisierende Wirkung der Enzymträger	117
8.3	Zusammenfassung	118
9	Ausblick	121
	Literaturverzeichnis	123

Symbolverzeichnis

a	spezifische Enzymaktivität	[mmol/g/min]
A	Enzymaktivität	[mmol/min]
A	Frequenzfaktor	[1/min]
A	Oberfläche	[m ²]
c	Konzentration	[mmol/l] bzw. [g/l]
D	Diffusionskoeffizient	[cm ² /s]
D	Durchmesser	[mm]
ee	Enantiomerenüberschuss	[%]
E	Aktivierungsenergie	[kJ/mol]
E	Enthalpie	[kJ/mol]
k	Geschwindigkeitskonstante	[1/min]
k_f	Stofftransportkoeffizient	[mm/min]
K	Dissoziationskonstante	[mol/l]
K_{H_2O}	Ionenprodukt des Wassers	[mol ² /l ²]
K_I	Produktinhibierungskonstante	[mmol/l]
K_M	Michaelis-Menten-Konstante	[mmol/l]
L	Länge	[mm]
m	Adsorptionsgleichgewichtskonstante	[-]
M	Molekulargewicht	[g/mol]
pH	pH-Wert	[-]
Pe	Pecletzahl	[-]
q	Proteinbeladung des Enzymträgers	[mg/g]
\dot{Q}	Wärmestrom	[W]
r	radiale Koordinate	[mm]
r	Reaktionsrate	[mmol/l/min] bzw. [g/l/min]
R	Gaskonstante	[J/K/mol]
R	Radius	[mm]
RA	Enzymrestaktivität	[-]

Re	Reynoldszahl	[-]
RZA	Raumzeitausbeute	[mmol/l/h]
Sc	Schmidtzahl	[-]
Sh	Sherwoodzahl	[-]
SF	prozentualer Standardfehler	[%]
t	Zeit	[min]
ttn	<i>total turnover number</i>	[-]
T	Temperatur	[K]
V	Volumen	[cm ³]
\dot{V}	Volumenstrom	[cm ³ /h]
x	axiale Koordinate	[mm]
X	Enzymbeladung	[mol/g]
Y	Ausbeutekoeffizient	[-]
z	axiale Koordinate	[mm]
δ	Grenzschichtdicke	[mm]
δ	Umsatz	[-]
Δ	Differenz	[-]
ϵ	Hohlraumanteil	[-]
η	dynamische Viskosität	[mPa·s]
Φ	Thiele-Modulus	[-]
ρ	Dichte	[g/l]
τ	Tortuositätsfaktor	[-]
τ	Verweilzeit	[h]
ν	molares Volumen	[l/mol]
ν	kinematische Viskosität	[m ² /s]
Θ	dimensionslose Zeit	[-]

Verzeichnis der Indizes

∞	unendlich
0	Ausgangswert
0	Leerrohr
1	erste Ordnung
1/2	Halbwert
<i>ax</i>	axial
<i>Akt</i>	aktiv bzw. Aktivität
<i>b</i>	Bulk
<i>cat</i>	katalytisch
<i>cstr</i>	kontinuierlich betriebener Rührkessel
<i>DCH</i>	2,3-Dichlor-1-propanol
<i>eff</i>	effektiv
<i>E</i>	Enzym
<i>EI</i>	Enzym-Inhibitor-Komplex
<i>ES</i>	Enzym-Substrat-Komplex
<i>Enzym</i>	Enzym
<i>Eupergit</i>	Eupergit
<i>FB</i>	Festbett
<i>gesamt</i>	gesamt
<i>HCl</i>	Salzsäure
<i>H₂O</i>	Wasser
<i>i</i>	i-te Komponente
<i>I</i>	Inhibitor
<i>Inakt</i>	inaktiv bzw. Inaktivierung
<i>Inlet</i>	Zufluss
<i>Immob</i>	Immobilisierung
<i>l</i>	Flüssigkeit
<i>Lauge</i>	Lauge

<i>max</i>	maximal
<i>Masse</i>	Masse
<i>Outlet</i>	Abfluss
<i>p</i>	Partikel
<i>P</i>	Produkt
<i>Pore</i>	Pore
<i>Probe</i>	Probe
<i>Protein</i>	Protein
<i>Puffer</i>	Puffer
<i>Q</i>	Querschnitt
<i>R</i>	Reaktor
<i>Reaktion</i>	Reaktion
<i>Referenz</i>	Referenzwert
<i>Rohr</i>	Rohr
<i>spez</i>	spezifisch
<i>S</i>	Substrat
<i>tat</i>	tatsächlich
<i>TCP</i>	1,2,3-Trichlorpropan
<i>TRIS</i>	TRIS-Puffer

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Einleitung

Die industriellen Wettbewerbsbedingungen haben in den letzten Jahren dazu geführt, dass der Zeitspanne zur Markteinführung eines neuen Produktes (*time to market*) eine steigende Bedeutung zukommt. Zur Verminderung dieser Zeitspanne wurde neben anderen Maßnahmen zur Effizienzsteigerung die Organisation der notwendigen Entwicklungsarbeiten hinterfragt. Als ein Schwachpunkt konnte das sequentielle Bearbeiten der Entwicklungsschritte identifiziert werden. Lassen sich diese Arbeiten zumindest teilweise gleichzeitig durchführen, kann der gesamte Entwicklungsprozess entscheidend verkürzt und der finanzielle Entwicklungsaufwand verringert werden. Diese Parallelisierung der Entwicklung neuer Produkte oder Verfahren wird als *simultaneous engineering* oder *concurrent engineering* bezeichnet [BULLINGER, WARSCHAT, 1996; ROY ET AL., 1999]. Vorreiter der Parallelisierung von Entwicklungsaufgaben waren die Automobil- und Elektronikbranche. Durch den Erfolg dieser Umstrukturierung des Entwicklungsablaufs wurde diese Methode von anderen Industriezweigen adaptiert, wie z. B. der chemischen oder pharmazeutischen Industrie.

In Verfahrensentwicklungen von Reaktionsprozessen durchlaufen neue Ansätze mehrere Größenordnungen, bevor sie als Produktionsprozess verwirklicht werden. Eine grobe Einteilung der dabei üblicherweise verwirklichten Etappen kann wie folgt vorgenommen werden:

Labor-(Tisch-)Aufbau – Miniplant – Pilotanlage – Produktionsanlage

Im Zuge des sich verschärfenden industriellen Wettbewerbs ist in der chemischen und pharmazeutischen Industrie die Bestrebung zu beobachten, ein Verfahrenskonzept mit wenigen Zwischenschritten zeit- und kostengünstig in den Produktionsmaßstab zu bringen. Sofern vertretbar, kommt es daher zu einem Verzicht auf eine Pilotanlage, um das in der Miniplant verwirklichte und für technisch und wirtschaftlich lösbar befundene Verfahren direkt in die Großanlage zu bringen. An die Miniplant müssen bei einem solchen Vorgehen hohe Anforderungen hinsichtlich der Aussagekraft und Verlässlichkeit der zu gewinnenden Daten gestellt werden. Essentieller Bestandteil des *integrierten Miniplant-Konzeptes* ist die begleitende mechanistische Modellierung des Verfahrens, die erst

den direkten Maßstabsübertrag aus der Miniplant in die Industrieanlage ermöglicht [VOGEL, 2002]. Die beiden angeführten Methoden zur Beschleunigung und Kostenreduktion von Verfahrensentwicklungen sind sehr gut miteinander vereinbar. Es bietet sich daher an, sie miteinander zu verknüpfen, um synergetische Effekte zu erzielen.

Im Bereich der Bioprozesstechnik ist in Verfahrensentwicklungen immer noch ein sequentielles Abarbeiten der notwendigen Entwicklungsaufgaben sowie ein sehr begrenzter Einsatz von Miniplants vorherrschend. Durch eine Aufgabenparallelisierung und die Anwendung der *integrierten Miniplant-Technologie* besteht deshalb ein großes Potenzial zur Zeit- und Kosteneinsparung in diesem Teil der Bioverfahrenstechnik. In einem interdisziplinären Forschungsprojekt am Institut für Bioverfahrenstechnik (IBVT) der Universität Stuttgart in Zusammenarbeit mit dem Institut für Technische Biochemie (ITB) der Universität Stuttgart und der Firma DOW Chemical, Midland, MI, USA wurde für eine beschleunigte Prozessentwicklung die Methode des *simultaneous engineering* angewandt. Die von einer Haloalkan-Dehalogenase katalysierte Reaktion von 1,2,3-Trichlorpropan zu chiralem 2,3-Dichlor-1-propanol wurde als Modellsystem betrachtet. Die Entwicklungsarbeiten wurden in drei Hauptaufgabengebiete gebündelt, um diese parallel bearbeiten zu können. Die Optimierung der katalytischen Eigenschaften der Enzyme, insbesondere der Enantioselektivität, wurde am ITB durchgeführt. Im Rahmen einer weiteren Arbeit am IBVT [FRITZ, 2007] wurde die Herstellung der Enzyme (Expressionsoptimierung, Fermentation und Aufreinigung) vorangetrieben. Die Enzymimmobilisierung und verfahrenstechnische Prozessausarbeitung fand im Rahmen der vorliegenden Arbeit statt. Kernstück dieser integrierten Prozessentwicklung bildete eine Miniplant, in der alle unternommenen Anstrengungen zusammen liefen und aus Prozesssicht in Kombination mit Modellbildung und Simulation beurteilt wurden. Durch die in der Miniplant gewonnenen und durch Simulationen gestützten Erkenntnisse können für die weitere Forschung Richtungen zur Verbesserung des Gesamtprozesses vorgeschlagen werden. Durch diese Rückkopplung von der Miniplant in die erwähnten drei Hauptforschungsgebiete bekommt das Gesamtprojekt einen iterativen Charakter. Anhand des beschleunigten Wissenstransfer aus der Miniplant in die Forschungsbereiche und den beschleunigten Maßstabsübertrag in den Produktionsprozess wird der gewünschte synergetische Effekt der Kombination von *simultaneous engineering* und *integrierter Miniplant-Technologie* erzielt.

1.2 Stand des Wissens

In diesem Abschnitt wird ein Überblick über den Stand des Wissens auf dem Gebiet der Haloalkan-Dehalogenasen, Enzymimmobilisierung und Miniplants gegeben. Dabei wird auf die für die vorliegende Arbeit relevanten Punkte in größerer Ausführlichkeit eingegangen.

1.2.1 Haloalkan-Dehalogenasen

Haloalkan-Dehalogenasen (EC 3.8.1.5) erfahren ein grosses industrielles Interesse für die Produktion von chiralen Synthesebausteinen [SWANSON, 1999]. Dienen nicht anderweitig zu verwertende Nebenprodukte organischer Syntheseprozesse als Substrate für die enzymatische enantioselektive Haloalkan-Dehalogenierung, lassen sich beträchtliche Wertschöpfungspotentiale erschließen. Anstelle der kostspieligen Entsorgung der Nebenprodukte kann eine gewinnträchtige stoffliche Verwertung durch ein einstufiges prochirales Verfahren erreicht werden. Um die skizzierten ökonomischen Potentiale erschließen zu können, muss neben den erforderlichen Verbesserungen der Enzyme ein wettbewerbsfähiger Prozess für die enzymatische Produktion von chiralen Synthesebausteinen aus chlorierten Kohlenwasserstoffen erarbeitet werden.

Haloalkan-Dehalogenasen sind bakterielle Enzyme, die die Kohlenstoff-Halogen-Bindung halogener aliphatischer Verbindungen hydrolytisch spalten. Dabei entstehen die korrespondierenden primären Alkohole, Halogenidionen und Protonen. Als einziges Co-Substrat wird Wasser benötigt. Es gibt keine Anzeichen für die Beteiligung von Co-Faktoren [DAMBORSKY, 1999], was diese Enzymklasse für den industriellen Einsatz als isolierter Biokatalysator sehr interessant erscheinen lässt [SWANSON, 1999]. Die Haloalkan-Dehalogenasen gehören zur Familie der α/β -Hydrolasen. Sie besitzen, wie alle Enzyme dieser Klasse, eine *core domain*, in der die wesentlichen katalytischen Reste positioniert sind, und eine *cap domain*, die für die Substratspezifität entscheidend ist [NEWMAN, 1999; DAMBORSKY, 1999]. Um die Eigenschaften der Haloalkan-Dehalogenasen, wie z. B. spezifische Aktivität, Enantioselektivität, Langzeitstabilität oder Verminderung der Produktinhibierung, an die Erfordernisse des gewünschten Prozesses anzugleichen, kommen die Methoden des *enzyme engineering* zum Einsatz (z.B. *site-directed mutagenesis*, *directed evolution*, *rational design*) [JANSSEN, 2004]. Neben dem industriellen Einsatz zur Produktion von Synthesebausteinen eignen sich Haloalkan-Dehalogenasen zur Sanierung von mit Haloalkanen kontaminierter Böden (*bioremediation*) [BOSMA ET AL., 2002].

In dieser Arbeit wurden zwei Haloalkan-Dehalogenase-Enzyme eingesetzt. Dabei handelt es sich um eine von BOSMA ET AL., 2002 beschriebene aktivitätsgesteigerte Zweipunktmutante des Wildtypenzym DhaA aus *Rhodococcus rhodochrous* und eine aus Boden-Screening-Ansätzen gewonnene Variante (DSD4) [FRITZ, 2007]. Sie katalysieren die in dieser Arbeit betrachtete hydrolytische Dehalogenierung von 1,2,3-Trichlorpropan zu 2,3-Dichlor-1-propanol unter Freisetzung von Salzsäure (Abb. 1.1).

Das Enzym DhaA ist ein globuläres, monomeres Molekül [DRAVIS ET AL., 2001] mit einem Durchmesser von ca. 45 Å. Das Molekulargewicht beträgt 34,8 kDa. DhaA dehalogeniert 1-Chloralkane mit Kettenlängen von C3 bis C10 und besitzt eine geringe Aktivität gegenüber 1,2-Dichlorethan [SWISS-PROT]. Der Dehalogenierungsmechanismus beginnt mit dem nukleophilen Angriff des Asparaginsäurerestes Asp117 am α -Kohlenstoffatom des Haloalkans und führt zur Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes (Abb. 1.2). Dieser wird mit Hilfe eines Wassermoleküls

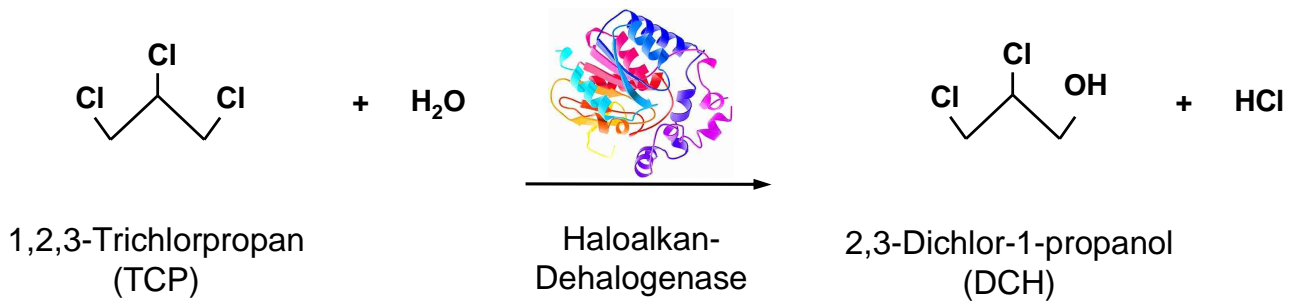


Abbildung 1.1: Reaktionsschema der von Haloalkan-Dehalogenasen katalysierten Umsetzung von 1,2,3-Trichloropropan zu 2,3-Dichlor-1-propanol.

hydrolysiert. Das Wassermolekül wird vom Histidinrest His283 unter Mitwirkung des Glutaminsäurerests Glu141 aktiviert. Die katalytische Triade von DhaA ist folglich Asp117, Glu141 und His283 [NEWMAN, 1999; DRAVIS ET AL., 2001]. Die Doppelmutation von DhaA (Cys176Tyr, Tyr273Phe) bewirkt gegenüber der Wildtyp-Dehalogenase eine 8-fach höhere Aktivität für die Umsetzung von 1,2,3-Trichloropropan [BOSMA ET AL., 2002]. Die Enantioselektivität des Enzyms bei der prochiralen Synthese von 2,3-Dichlor-1-propanol ist mäßig, der Enantiomerenüberschuss *ee* beträgt 20 %.

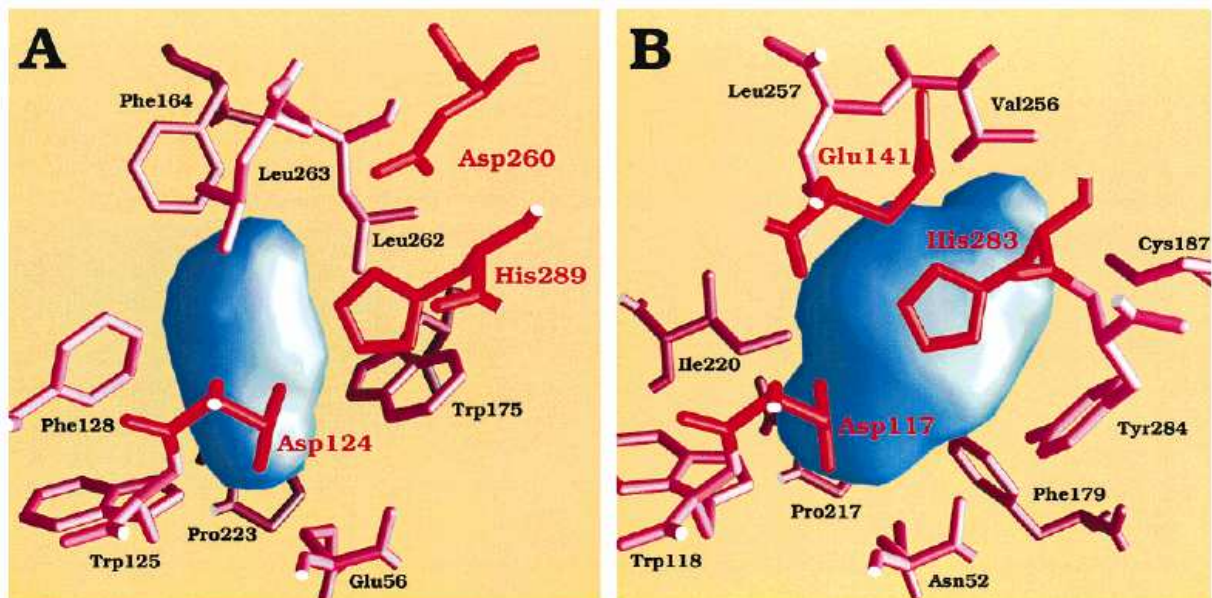


FIGURE 4: GRASP representation of the active site cavities of the (A) *Xanthobacter* and (B) *Rhodococcus* dehalogenases. The residues of the catalytic triads are colored red, and residues which contribute atoms to the cavity/protein interface are colored pink. The *Rhodococcus* cavity encloses 187 Å³, compared to the 96 Å³ in the *Xanthobacter* active site. The *Rhodococcus* cavity has a decided bulge; this may allow additional orientations of the substrate, enabling this enzyme to remove both primary and secondary halide ions. The calculations of cavity volume were performed in GRASP (51).

Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des aktiven Zentrums von Haloalkan-Dehalogenase DhaA (B) im Vergleich mit Haloalkan-Dehalogenase DhlA (A) aus *Xanthobacter autotrophicus* [NEWMAN, 1999].

Die Haloalkan-Dehalogenase DSD4 ist ebenfalls ein globuläres monomeres Enzym, das eine zu DhaA vergleichbare Grösse (32,9 kDa) aufweist. Die Aminosäurehomologie von DhaA und DSD4

beträgt 65 %. Die katalytische Triade von DSD4 wird aus den Aminosäuren Asp108, Glu132 und His272 gebildet. Aufgrund des identischen Aufbaus der katalytischen Triade verläuft der Dehalogenierungsmechanismus analog zu DhaA. Im Vergleich zu DhaA ist dieses Haloalkan-Dehalogenase-Enzym aus prozesstechnischer Sicht insbesondere aufgrund der wesentlich geringeren Produktinhibierung interessant. Der Enantiomerenüberschuss *ee* der von DSD4 katalysierten prochiralen Umsetzung von 1,2,3-Trichlorpropan zu 2,3-Dichlor-1-propanol beträgt 53% [FRITZ, 2007].

1.2.2 Enzymimmobilisierung

Unter dem Begriff der Enzymimmobilisierung versteht man allgemein die Einschränkung der Beweglichkeit von Enzymen, um deren kontinuierlichen oder mehrmaligen Prozesseinsatz zu ermöglichen [BAILEY, OLLIS, 1986]. Seit den späten sechziger Jahren konnten einige großtechnische Anwendungen immobilisierter Enzyme realisiert werden, deren Anzahl und Bedeutung zusehends wächst [TISCHER, WEDEKIND, 1999]. Die wichtigsten Industriezweige, die immobilisierte Biokatalysatoren einsetzen, sind die Nahrungsmittel- sowie die chemische und pharmazeutische Industrie. Bedeutende Beispiele für die kommerzielle Verwendung immobilisierter Enzyme sind die Produktion von L-Aminosäuren mit Hilfe immobilisierter Aminozyklase, die Glukoseisomerisierung zur Herstellung eines Glukosesirups mit einem hohen Fruktoseanteil sowie die Spaltung von Penizillin mittels Penizillinamidase zur Produktion von 6-Aminopenizillansäure.

Immobilisierte Enzyme besitzen gegenüber löslichen Biokatalysatoren entscheidende Vorteile: Sie zeichnen sich häufig durch eine erhöhte Stabilität gegenüber Denaturierungsfaktoren, wie z.B. extreme pH-Werte und Temperaturen, aus und ermöglichen eine leichtere Abtrennung vom Reaktionsgemisch. Der Einsatz unterschiedlichster Reaktortypen wird durch die Immobilisierung ermöglicht, so dass eine höhere Flexibilität bei der Prozessgestaltung erreicht wird. Die Enzymimmobilisierung birgt jedoch auch einige Nachteile: So ist mit einem Aktivitätsverlust der Enzyme zu rechnen und es entstehen Kosten für den zusätzlichen Immobilisationsschritt. Aufgrund der heterogenen Katalyse besteht die Möglichkeit einer Diffusionslimitierung der Reaktion, die zu einer nicht-effektiven Nutzung des Katalysators führen kann. Es muss daher im Einzelfall abgewägt werden, ob der Einsatz immobilisierter Enzyme ökonomisch von Vorteil ist [WISEMAN, 1995; BLANCH, CLARK, 1996; TISCHER, WEDEKIND, 1999].

Es gibt eine große Zahl unterschiedlicher Immobilisierungsmethoden für Enzyme. Die weitverbreiteste und am besten untersuchten Methode stellt die kovalente Bindung an ein Trägermaterial dar. Es gibt eine große Zahl möglicher Bindungsreaktionen und Träger, die diese Methode für viele Proteine einsetzbar machen. Aufgrund der starken Bindungsverhältnisse zeichnet sich das Immobilisat meist durch eine hohe Stabilität aus. Da die Eigenschaften des Trägermaterials die Charakteristiken des immobilisierten Enzyms sowie die Prozessgestaltung entscheidend beeinflussen, müssen diese bei der Wahl eines geeigneten Trägers berücksichtigt werden. Generell sollte der Träger unlöslich, mikrobiologisch und chemisch beständig sein sowie eine große Oberfläche aufweisen. Die

mechanischen Eigenschaften wie Druckfestigkeit, Kompressibilität und Elastizität grenzen mögliche Reaktorkonzepte ein. So ist für die Verwendung eines Festbettreaktors eine geringe Kompressibilität Grundvoraussetzung. Gleichzeitig sollte der Druckverlust möglichst niedrig sein, der von der Korngröße und -form entscheidend beeinflusst wird. Die Hydrophobie bzw. -philie der Matrix kann Auswirkungen auf die Affinität von Substrat und Produkt zum Immobilisat haben und somit die zu katalysierende Reaktion begünstigen oder hemmen. Die Zugänglichkeit des Enzyms an die Bindungsstellen während des Immobilisierungsvorgangs als auch die Zugänglichkeit des Substrates zum Enzym während des Katalyseeinsatzes muss gewährleistet sein. Die durchschnittliche Porengröße und die Porengrößenverteilung des Trägers sind hier von entscheidender Bedeutung. Die kovalente Bindung der Enzyme erfolgt über die funktionellen Gruppen des Trägers. Ihre Dichte und Verteilung und die Art der Bindungsreaktion bestimmen die Aktivität und Langzeitstabilität des erzeugten Biokatalysators [BUCHHOLZ, KASCHE, 1997; TISCHER, WEDEKIND, 1999].

Trotz der immensen Bedeutung der Enzymimmobilisierung für die Leistungsfähigkeit eines enzymkatalysierten Prozesses sind in der umfangreichen Literatur zur Enzymimmobilisierung nur wenige Aufsätze publiziert, die eine mathematische Modellierung des Immobilisierungsprozesses beinhalten [DO, BAILEY, 1981; HOSSAIN, DO, 1985; HOSSAIN ET AL., 1986]. Diese Modelle ermöglichen eine mechanistische Beschreibung der Vorgänge während der Immobilisierung, da sie u.a. zwei Kompartimente (Bulk- und Porenflüssigkeit) unterscheiden, die Abhängigkeit des diffusiven Stofftransports in den Partikelporen von der aktuell freien Porenquerschnittsfläche berücksichtigen sowie die Kopplungsreaktionsrate des Enzyms an den Träger abhängig von der aktuellen Beladung des Trägers beschreiben. Diese Detailvielfalt führt dazu, dass diese Modelle sehr schwierig zu parametrieren und numerisch sehr anspruchsvoll zu lösen sind [HEARN, ANSPACH, 2001]. Für eine rationelle Optimierung der Immobilisierung wäre es hilfreich, mit Modellen zu arbeiten, die einfacher zu handhaben sind.

1.2.3 Vollautomatisierte Versuchsanlagen für die Prozessentwicklung (Miniplants)

Der Begriff der Miniplant wird in vielen Forschungs- und Industriezweigen sehr unterschiedlich verstanden und gebraucht. Im Kontext der verfahrenstechnischen Entwicklung von industriellen Reaktionsprozessen geht die Definition des Miniplant-Begriffes auf ROBBINS, 1979 zurück. Unter Miniplant wird eine Versuchsanlage verstanden, die einen industriellen Prozess auf dem kleinstmöglichen Maßstab abbildet, der eine verlässliche Daten-Gewinnung für die Prozessentwicklung ermöglicht. Der in der Miniplant verwirklichte Prozess umfasst dabei sämtliche Verfahrensschritte (*unit operations*) einschließlich aller Rückführungen, Regelkonzepte und die Verwendung der Werkstoffe, die für die Industrieanlage vorgesehen sind. Das Ziel der größtmöglichen Maßstabsverkleinerung ist es, die Kosten für die Versuchsanlage und deren Betrieb zu minimieren.

Miniplants erfüllen eine Vielzahl von Aufgaben im Rahmen einer Verfahrensentwicklung. Als übergeordnete Hauptaufgabe ist die Validierung und gegebenenfalls Verbesserung des ausgearbeiteten Verfahrenskonzeptes zu sehen. Durch den Miniplant-Betrieb können die Interaktionen der im Labor oft nur einzeln betriebenen Verfahrensschritte experimentell beobachtet werden. Dazu gehört u.a. der Einfluss von sich akkumulierenden Nebenprodukten aufgrund von Rückführungen oder die Robustheit des Prozesses hinsichtlich dynamischer Anregungen durch Regeleingriffe. Im Miniplant-Maßstab sind Änderungen im Verfahren sowohl schnell als auch kostengünstig zu verwirklichen. Im Vergleich zur Miniplant steigen die Kosten für Verfahrensmodifikationen in einer Pilotanlage um einen Faktor 10 oder um einen Faktor 100 für eine Großanlage [VOGEL, 2002]. Die Langzeitstabilität von Katalysatoren ist eine weitere wichtige Beobachtungsgröße des Miniplantbetriebs, um die Wirtschaftlichkeit eines Prozesses abzuschätzen. Kann der Maßstabsübertrag aus einer Miniplant in die Großanlage realisiert werden, ist die Produktion von Mustermengen in der Miniplant für die betriebsinterne Verwendung (Forschung, Anwendungstechnik oder Marketing) oder für potentielle Kunden eine bedeutsame Zusatzaufgabe. Das Fachpersonal, das die spätere Industrieanlage betreuen und überwachen soll, kann unter Prozessbedingungen an einer Miniplant ausgebildet werden.

Um den gewünschten Verzicht von Pilotanlagen in der Prozessentwicklung realisieren zu können (Kap. 1.1), muss der Betrieb von Miniplants durch eine umfassende mechanistische Modellbildung des Prozesses ergänzt werden. Durch die in der Miniplant verifizierten Modelle kann der Maßstabsübertrag (*scale up*) in den Produktionsmaßstab sicher gestellt werden. Neben dem Ermöglichen großer Scale-up-Schritte dienen Modellbildung und Simulation in den häufig iterativ durchgeführten Verfahrensentwicklungen dazu, alternative Prozessführungen schnell und kostengünstig zu bewerten. Ist in Simulationsstudien ein verbessertes Verfahrenskonzept gefunden worden, kann es experimentell in der Miniplant überprüft werden. Die Kombination von experimenteller Datengewinnung in einer Miniplant und begleitender Modellierung und Simulation des Prozesses zur Optimierung und beschleunigten Übertragung des Verfahrens in den Produktionsmaßstab wird *integrierte Miniplant-Technologie* genannt [BUSCHULTE, HEIMANN, 1995; VOGEL, 2002]. Die in der Praxis maximal erzielbaren Scale-up-Faktoren sind für einige Verfahrensschritte in Tab. 1.1 dargestellt.

Durch die Vielzahl der zu bearbeitenden Aufgaben in Miniplant-Versuchsreihen ergeben sich hohe Anforderungen an die Miniplant. Aufgrund des auf den *hold-up* bezogenen kleineren Durchsatzes der *unit operations* gegenüber Großanlagen kann das Erreichen eines Fließgleichgewichtes in der Miniplant in der Größenordnung von Wochen bis Monaten liegen (VOGEL, 2002, Beispiel 4-3). Aus diesem Grund kommt der Automatisierung und Anlagenverfügbarkeit von Miniplants die gleiche Bedeutung wie bei Großanlagen zu. Trotz der erheblich geringeren Mengen und Durchsätze in einer Miniplant ist das Erstellen eines Sicherheitskonzeptes ratsam. Eine explosionsgeschützte Ausführung lässt sich allerdings häufig vermeiden. Für erforderliche Modifikationen des Prozesskonzeptes muss die Miniplant modular mit standardisierten Schnittstellen für Rohrverbindungen und Anbindungen ans Prozessleitsystem realisiert werden. Die Standardisierung und Modularisierung bietet die

Tabelle 1.1: Scale-up-Faktoren einiger Verfahrensschritte [VOGEL, 2002]

Reaktoren	Scale-up-Faktor
Rohrbündelreaktor	über 10000
homogenes Rohr	über 10000
homogenes Rührkessel	über 10000
Blasensäule	bis 1000
Wirbelschichtreaktor	50 bis 100
Trennoperationen	
Destillation und Rektifikation	1000 bis 50000
Adsorption	1000 bis 50000
Extraktion	500 bis 1000
Trocknung	20 bis 50
Kristallisation	20 bis 30

Möglichkeit, die verwendeten Komponenten der Miniplant in späteren Prozessentwicklungsvorhaben wieder einzusetzen und sowohl Beschaffungskosten als auch Lieferzeiten zu vermeiden.

Die Auslegung der Miniplant (Apparategröße und Durchsätze) richtet sich nach erzielbaren Scale-up-Faktoren der eingesetzten Verfahrensschritte (Tab. 1.1), den Überlegungen zum Erreichen eines Fließgleichgewichtes sowie der technischen Handhabbarkeit von kleinen Mengen und Strömen. MAIER, KAIBEL, 1990 listen bewährte Grenzen der Miniaturisierung von Bauteilen sowie die minimalen Messbereiche von Messgebern auf, die als die apparativen Grenzen der *integrierten Miniplant-Technologie* angesehen werden können (Tab. 1.2). In den letzten Jahren hat sich die Leistungsfähigkeit von verfahrenstechnischen Simulationstools aufgrund der raschen Entwicklung der Rechenleistung außerordentlich gesteigert, so dass auf der Modellierungsebene der Detaillierungsgrad der eingesetzten Modelle kein begrenzender Faktor darstellt. Vielmehr gilt es der Aussagekraft und Reproduzierbarkeit der gewonnenen Daten einen hohen Stellenwert beizumessen, um eine ausreichende Übertragungssicherheit in den größeren Maßstab zu gewährleisten.

Neben dem Einsatz als Forschungs- und Versuchsanlage ist für einzelne Anwendungen der Produktionsbetrieb von Miniplants denkbar. Miniplants als kontinuierliche Produktionsanlage für die pharmazeutische Industrie werden von BEHR ET AL., 2004 als eine Möglichkeit gesehen, mit deren Hilfe die wirtschaftlichen Herausforderungen dieser Branche angegangen werden können. Anstelle der bisher üblichen absatzweisen Produktion von Pharmazeutika könnten wesentlich kleinere, kontinuierlich betriebene Miniplants treten. In diesem Zusammenhang ist der von BEHR ET AL., 2000 beschriebene Sicherheitsaspekt von Miniplants beim Einsatz von Gefahrstoffen aufgrund des geringen *hold-ups* als weiterer Vorteil zu sehen.

Tabelle 1.2: Beispiele erprobter Grenzen der Miniaturisierung [MAIER, KAIBEL, 1990]

Apparat	Erprobte und getestete Grenzen	
Kolonnen	30 mm Durchmesser, gepackte Kolonnen	
Pumpen	1 ml / h Spritzenpumpen	
Bandfilter	50 mm Bandweite	
Zentrifugen	5 l / h Austrag	
Rohrleitungen	1,5 mm Außendurchmesser, Metall / PTFE	
Messgröße	Erprobter minimaler Messbereich	Messprinzip
Gasströme	0,02 - 0,6 l / h	thermisch
Flüssigströme	2 - 30 g / h	thermisch
Temperatur	-200 bis 600°C	Widerstandsänderung
Stand	50 mm	konduktiv, kapazitiv
Differenzdruck	ab 1,25 mbar	Dehnungsmessstreifen

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein kinetisches Modell der Enzymimmobilisierung entwickelt werden, das das dynamische Verhalten während des Immobilisierungsprozesses sowie das Resultat der Immobilisierung akkurat voraussagt. Durch diese Modellbildung und die Auswertung der dynamischen Daten sollte ein vertieftes Verständnis der Vorgänge bei der Enzymimmobilisierung gewonnen werden, um die Immobilisierung möglichst effizient betreiben zu können. Neben der gängigen Optimierung der Immobilisierung hinsichtlich Ausbeute an aktivem Enzym sind vor allem ökonomische Optimierungsanwendungen denkbar, die die Immobilisierung im Zusammenhang des Gesamtprozesses (Enzymherstellung, Immobilisierungs- und Syntheseprozess) betrachten. Als Beispiel dafür sei die Auswirkung der Enzymbeladung auf die benötigte Reaktorgröße und somit auf die Investitionskosten genannt. Als experimentelles Testsystem für die Modellierung wurde die Immobilisierung der Haloalkan-Dehalogenase DhaA aus *Rhodococcus rhodochrous* an Eupergit C herangezogen.

Neben der Immobilisierung mit Eupergit C wurde die von DRAVIS ET AL., 2001 beschriebene Immobilisierung von Haloalkan-Dehalogenasen an PEI-Alumina vergleichend in die Prozessentwicklungsarbeiten einbezogen. Diese verfahrenstechnische Prozessentwicklung der enzymkatalysierten Synthese von optisch aktivem 2,3-Dichlor-1-propanol ist der zweite Fokus dieser Arbeit. Bei der dazu eingesetzten Methode handelt es sich um die *integrierte Miniplant-Technologie*. Aufbauend auf der enzymkinetischen Charakterisierung der eingesetzten immobilisierten Haloalkan-Dehalogenasen sollte ein passendes Prozesskonzept erarbeitet und in einer Miniplant verwirklicht werden. Die im Kontext der *integrierten Miniplant-Technologie* essentielle mechanistische Modellierung der Reaktoren galt es zu entwickeln und durch dynamische Experimente in der Miniplant zu validieren. Mit Hilfe des validierten Reaktormodells sollte durch Langzeituntersuchungen die operative Stabilität der Enzyme unter Prozessbedingungen abgeschätzt werden.

Aufbauend auf den Ergebnissen der experimentellen Beobachtungen und den Erkenntnissen, die durch Modellbildung und Simulationen gewonnen wurden, sollte eine Bewertung der beiden eingesetzten Immobilisierungsträger erfolgen. Dieser Vergleich der Träger führt die Ergebnisse der beiden oben genannten Arbeitsgebiete zusammen und stellt eine übergeordnete Analyse der Immobilisierung aus der Sicht des Gesamtprozesses dar. Somit ergibt sich eine ganzheitliche Betrachtung der Immobilisierung, die den Immobilisierungsprozess in den Kontext der Gesamtprozessentwicklung einordnet und die Entscheidung für eine Immobilisierungsmethode nachhaltig unterstützt.

Kapitel 2

Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die in den weiteren Abschnitten angewandten Materialien und Methoden beschrieben.

2.1 Enzyme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die beiden Haloalkan-Dehalogenasen DhaA und DSD4 eingesetzt, die in Kap. 1.2.1 vorgestellt wurden. Die Enzyme wurden heterolog in *Escherichia coli* BW 3110 pJOE in Hochzell-dichtefermentationen expremiert und affinitätschromatographisch mit Hilfe eines His-Tags aufgereinigt. Die Enzyme befanden sich zur Immobilisierung in 20 mmol/l Kaliumphosphatpuffer (pH 7) mit einer NaCl-Konzentration von 0,2 mol/l. Der Anteil des Zielproteins am Proteingemisch wurde mittels SDS-PAGE-Gel-Elektrophorese bestimmt und betrug in der Regel ungefähr 90 %. Die Haloalkan-Dehalogenase DhaA wurde in einer mit dem fluoreszierenden Reporterprotein enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) fusionierten Variante eingesetzt.

2.2 Chemikalien

Die in dieser Arbeit betrachtete enzymatische Dehalogenierung setzt 1,2,3-Trichlorpropan (TCP) zu 2,3-Dichlor-1-propanol (DCH) um. Die wichtigsten Eigenschaften dieser beiden Stoffe sind in Tab. 2.1 aufgelistet. Abb. 2.1 zeigt die Struktur von Substrat und Produkt.



Abbildung 2.1: Struktur von TCP und DCH.

2.2.1 1,2,3-Trichlorpropan

1,2,3-Trichlorpropan (TCP) ist eine farblose, brennbare Flüssigkeit, die im Geruch Chloroform ähnelt. Es ist eine xenobiotische Substanz, d.h. es sind keine natürlichen Quellen für TCP bekannt, sondern es entsteht ausschließlich in industriellen Prozessen. Es ist giftig (Schweizer Giftklasse 3), biologisch nur schwer abbaubar und besitzt eine hohe Mobilität in Böden. Es ist als umweltgefährdende Substanz, die vor allem als Wasserschadstoff vorzufinden ist, eingestuft. TCP besitzt kein Chiralitätszentrum.

TCP kann durch Addition von Chlor an Allylchlorid oder durch Chlorierung von 1,2-Dichlorpropan hergestellt werden. Bei der industriellen Produktion von Epichlorhydrin fällt es als Nebenprodukt an, auch bei der Herstellung von Vinyl, 1,2-Dichlorethan, Propylenoxid und Glycerin kann TCP je nach Produktionsverfahren entstehen. 1990 fielen in der Bundesrepublik Deutschland 6240 t TCP als Abfallprodukt an. TCP kann als Lösungsmittel für Öle, Fette, Wachse und Harze und als Extraktionsmittel eingesetzt werden. Darüber hinaus findet es in der Polysulfidproduktion und als trifunktioneller Vernetzer, z.B. für Polysulfid-Elastomere, Anwendung. Der weitaus größte Teil (5740 t) wurde in Reststoffverwertungsanlagen verbrannt, 500 t wurden exportiert [BUA-STOFFBERICHT, 1995; BOSMA ET AL., 2002]. 1,2,3-Trichlorpropan (TCP) wurde freundlicherweise von DOW Deutschland, Stade, kostenlos zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2.1: Eigenschaften von TCP und DCH

Grösse	TCP	DCH	Einheit
Summenformel	$C_3H_5Cl_3$	$C_3H_6Cl_2O$	
Molare Masse	147,4	129,0	g/mol
CAS-Nummer	96-18-4	616-23-9	
Dichte bei 20°C	1,39	1,36	g/ml
Siedepunkt	156	182	°C
Schmelzpunkt	-14	-4	°C
Flammpunkt	82	93	°C
Löslichkeit in Wasser ^a	14	284	mmol/l
Toxikologische Einstufung	giftig, kanzerogen beim Tier	giftig, kanzerogen, mutagen	
Schweizer Giftklasse	3	1	–
Reinheit (GC)	≥ 99	≥ 98	%
Hersteller	DOW	Merck	

Herstellerangaben, ^aeigene Messungen

2.2.2 2,3-Dichlor-1-propanol

2,3-Dichlor-1-propanol (DCH) ist eine farblose bis gelbliche Flüssigkeit mit etherartigem Geruch, die in der industriellen Produktion von racemischem Epichlorhydrin in großen Mengen als Zwischenprodukt entsteht. DCH besitzt eine hohe Toxizität (Schweizer Giftklasse 1), ist kanzerogen, mutagen und biologisch schwer abbaubar.

Die Synthese von DCH erfolgt aus Propylen über Allylchlorid. DCH kann als Lösungsmittel eingesetzt werden und findet als Ausgangsmaterial für Harze, Polymere und Pharmazeutika Anwendung. 2,3-Dichlor-1-propanol besitzt ein chirales Zentrum (zweites Kohlenstoffatom) und kann daher in zwei zueinander spiegelbildlichen räumlichen Strukturen auftreten. Enantiomerenreines DCH ist für die Industrie als Reaktionspartner für organische Synthesen von großem Interesse [EFFENDI ET AL., 2000; KASAI ET AL., 1992; KASAI ET AL., 1998].

2.2.3 Weitere Chemikalien

Die zusätzlich verwendeten Chemikalien sind in Tab. 2.2 unter Angabe von Reinheit und Hersteller aufgelistet.

Tabelle 2.2: Weitere Chemikalien

Substanz	CAS-Nummer	Reinheit	Hersteller
Acetophenon	98-86-2	≥99%	Fluka
Glutardialdehyd	111-30-8	~25%, in Wasser	Fluka
2-Propanol	67-63-0	≥99,8%	Fluka
Tris-HCl	1185-53-1	≥99%	Roth
Albumin Fraktion V	-	≥98%	Roth

2.3 Trägermaterialien für die Immobilisierung

Im Rahmen des hier vorgestellten Projektes kamen zwei Enzymträger zum Einsatz. In den beiden folgenden Abschnitten werden diese Immobilisationsträger und ihre wichtigsten Eigenschaften kurz erläutert.

2.3.1 Eupergit

Bei Eupergit C handelt es sich um ein perlenförmiges, weißes Copolymer aus N,N-Methylen-bis-(Methacrylamid)-Glycidylmethacrylat, Allylglycidyl und Methacrylamid. Einen Ausschnitt aus der Struktur zeigt Abb. 2.2.

Das Material benötigt keine Aktivierung, es bindet Enzyme kovalent über die auf dem Träger vorhandene Oxirangruppen. Die Matrix ist chemisch und mikrobiologisch beständig und besitzt eine

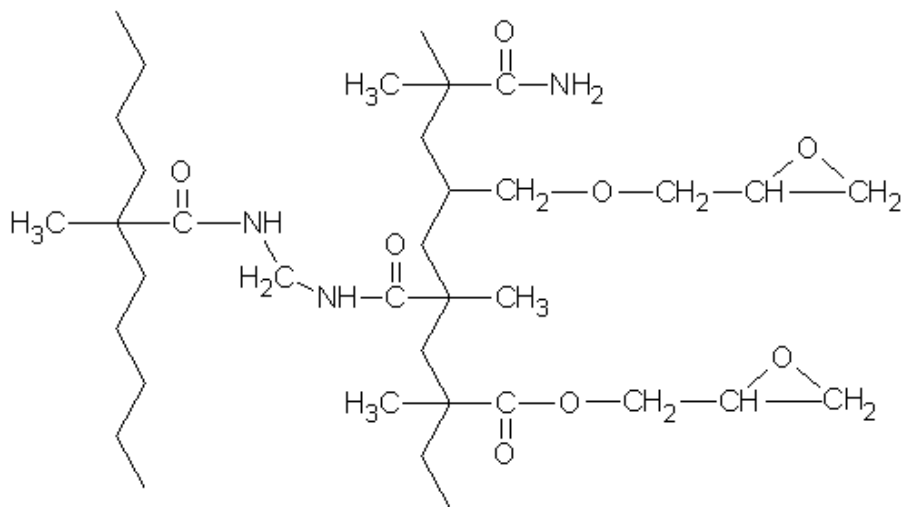


Abbildung 2.2: Ausschnitt aus der Struktur von Eupergit C (Bild: Röhm Deutschland, Darmstadt).

ausreichende mechanische Stabilität für den Einsatz in industriellen Rührkessel- und Festbettreaktoren [KATCHALSKI-KATZIR, KRAEMER, 2000]. Eine umfassende Übersicht über die Stoffeigenschaften des Materials gibt Tabelle 2.3. Eupergit C wurde freundlicherweise von Röhm Deutschland, Darmstadt, kostenlos zur Verfügung gestellt.

2.3.2 PEI-Alumina

PEI-Alumina ist ein Verbundträger aus anorganischem γ -Aluminiumoxid und organischem Polyethylenimin (PEI). Die Bindung des Polymers an Aluminiumoxid erfolgt sowohl physiko-chemisch durch Adsorption als auch durch Einschluss in den Poren [ROHRBACH, LESTER, 1981]. Der Enzymträger muss vor der Immobilisierungsreaktion entgast und mit Glutaraldehyd aktiviert werden. Die Enzyme werden durch Reaktion ihrer Aminogruppen mit den Aldehydgruppen des Aktivierungsreagens kovalent gebunden. Das weiße, körnige Material ist chemisch und mikrobiologisch beständig und besitzt aufgrund des anorganischen Anteils gute mechanische Eigenschaften. Die wichtigsten Eigenschaften des Trägers finden sich in Tabelle 2.3. PEI-Alumina wurde freundlicherweise von UOP Inc., Des Plaines, Illinois, USA, kostenlos zur Verfügung gestellt.

2.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur die Bestimmung von Proteinkonzentrationen kam ein photometrischer Assay zum Einsatz [BRADFORD, 1976]. Für diesen Test wurde das Farbstoffkonzentrat BIO-RAD PROTEIN ASSAY der Firma BIO-RAD Laboratories, München eingesetzt. Das Konzentrat wurde 1:5 mit nanofiltriertem entionisiertem Wasser verdünnt und jeweils 2,5 ml dieser Lösung zu 50 μ l Probe gegeben. Die Extinktionsmessung im Photometer (Pharmacia LKB Ultrospec III) erfolgte 10 Minuten nach Zuga-

Tabelle 2.3: Eigenschaften von Eupergit C und PEI-Alumina

Grösse	Eupergit C	PEI-Alumina	Einheit
Erscheinungsform	weißes Pulver	weißes, feinkörniges Granulat	
Zusammensetzung	Methacrylat-Kunststoff	Aluminiumoxid, Polyethylenimin	
Aktivierung nötig	nein	ja (Glutardialdehyd)	
Enzymbindung durch	Oxirangruppen	Glutardialdehyd	
Oxirangehalt	600	–	$\mu\text{mol/g}$
mittlere Partikelgrösse ^a	260	574	μm
mittlerer Porenradius	5	40	nm
mittleres Porenvolumen	0,6	1,2	ml/g
Partikelporosität	0,8	0,324 ^b	-
Schüttdichte	0,64	0,27	g/ml
Dichte des Materials	1,174 ^c	0,44	g/ml
Oberfläche	–	150	m^2/g
Lagerstabilität	6 Monate bei 8°C 8 Monate bei -15°C	–	
Hersteller	Röhm GmbH & Co. KG, Darmstadt	UOP Inc., Des Plaines, Illinois, USA	

Herstellerangaben, ^as. Kap. 5.2.1, ^b DRAVIS ET AL., 2001, ^cDichte des Kunststoffes ohne Poren

be bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595 \text{ nm}$. Für jede Messreihe wurde eine Kalibration durchgeführt. Dazu wurde Albumin Fraktion V als Proteinstandard in vier Konzentrationen zur Aufnahme der Kalibrationskurve (Polynom zweiter Ordnung) verwendet. Proben mussten gegebenenfalls verdünnt werden, um in das Konzentrationsintervall der Kalibration (0 – 0,4 g/l) zu fallen. Als Referenz für die Messungen diente nanofiltriertes VE-Wasser. Sämtliche Proben, einschließlich die der Kalibration, wurden einer Dreifachbestimmung unterzogen.

2.5 Enzymimmobilisierung

Das Vorgehen bei der Enzymimmobilisierung unterscheidet sich sehr stark in Abhängigkeit des verwendeten Enzymträgers. Für die beiden eingesetzten Immobilisationsträger wird das jeweils verwendete Protokoll in den folgenden Abschnitten vorgestellt.

2.5.1 Immobilisierung mit Eupergit C

Zur kovalenten Bindung der Dehalogenasen an Eupergit wurden Enzym und Träger in 20 ml Reagenzgläsern für 1 bis 7 Tage in Kontakt gebracht. Um Limitierungen durch den äußeren Stofftrans-

port zu verhindern, wurde ein Überkopfschüttler eingesetzt. Die Immobilisierungen wurden bei 7 und 22°C durchgeführt. Vor Beginn und nach Ende jeden Versuchs wurde die Proteinkonzentration der Enzymlösung mit der Methode nach Bradford (Kap. 2.4) ermittelt, um die Beladung des Trägers mit Protein zu bestimmen. Zur Aufnahme von Immobilisationskinetiken wurden zusätzlich in regelmäßigen Zeitabständen Proben genommen.

Um die Immobilisationsreaktion zu stoppen, wurde die Enzymlösung dekantiert und das beladene Eupergit mit Kaliumphosphatpuffer (10 mmol/l, pH 7) gewaschen und filtriert. Anschließend wurde das Immobilisat zwei Stunden lang unter ständigem Schütteln mit TRIS-HCl-Puffer (0,1 mol/l, pH 7,5) behandelt. Mit diesem Schritt werden die überschüssigen Oxirangruppen des Eupergit mit TRIS-Molekülen besetzt, da anderenfalls die Oxirangruppen beim Einsatz des immobilisierten Enzyms Nebenreaktionen der chlorierten Kohlenwasserstoffe verursachen können. Nach dieser Behandlung wurde mit Kaliumphosphatpuffer (10 mmol/l, pH 7) gewaschen, abfiltriert und das Immobilisat bei 7°C gelagert.

Neben den Versuchen im Reagenzglasmasstab wurde die Eupergit-Immobilisierung für die Miniplant durchgeführt. Die Vorgehensweise folgt dem obigen Protokoll, lediglich die verarbeiteten Mengen wurden angepasst. Insgesamt wurden 1 l Enzymlösung und 150 g trockenes Eupergit verteilt auf zwei Ansätze in 1-l-Schottflaschen für die Immobilisation eingesetzt. Die Reaktion fand bei einer Temperatur von 21°C statt, die Immobilisationsdauer betrug 2 Tage. Zur Abreaktion der Oxirangruppen wurden jeweils 500 ml 1 mol/l TRIS-HCl-Puffer zugegeben.

2.5.2 Immobilisierung mit PEI-Alumina

Das im Folgenden vorgestellte Immobilisierungsprotokoll wurde von DRAVIS ET AL., 2001 übernommen. Für die Immobilisierung mit PEI-Alumina muss der Träger mit nanofiltriertem destilliertem Wasser gewaschen und entgast werden. Der Entgasungsschritt wurde unter ständigem Schütteln in einer Saugflasche, an die ein Unterdruck angelegt wurde, durchgeführt. Der Träger wurde zwei Stunden unter Schütteln mit Glutardialdehyd (25%ig in Wasser) behandelt. Am Ende dieser Reaktion wurde das Glutardialdehyd dekantiert und das aktivierte PEI-Alumina mehrfach mit nanofiltriertem VE-Wasser gewaschen. Durch Zugabe der Enzymlösung wurde die Immobilisation gestartet. Die Reaktion fand bei Raumtemperatur (22°C) statt und dauerte 18 h. Am Ende der Immobilisation wurde die Enzymlösung dekantiert, das Immobilisat mit Kaliumphosphatpuffer (10 mmol/l, pH 7) gewaschen, filtriert und bei 7°C gelagert.

Um die Beladung des Trägers ermitteln zu können, wurden vor und nach der Immobilisationsreaktion Proben der Enzymlösung genommen und mit der Methode nach Bradford auf den Proteingehalt untersucht (Kap. 2.4). Immobilisierungsversuche mit PEI-Alumina im Kleinmaßstab fanden in 20-ml-Reagenzgläser statt, die durch Schütteln im Überkopfschüttler homogenisiert wurden. Miniplant-Immobilisierungen wurden in 1-l-, 2-l- oder 5-l-Schottflaschen auf einem Horizontalschüttler durchgeführt.

2.6 Gaschromatographische Konzentrationsbestimmung der chlorierten Kohlenwasserstoffe

Die Bestimmung der Konzentrationen von Substrat und Produkt der enzymkatalysierten Dehalogenierung erfolgte gaschromatographisch. Zur Analyse diente ein Gaschromatograph (GC) der Firma Hewlett Packard: HP 5860 mit Integrator 3396 Series II und Autosampler, der mit einem Flammenionisationsdetektor ausgestattet war. Als Trennsäule wurde PERMABOND CW20M, 1,0 μm , Länge 30 m, Durchmesser 0,53 mm von Macherey-Nagel, Düren, eingesetzt und mit Helium als Trägergas durchströmt. Acetophenon (1,6 mmol/l) in Isopropanol diente als interner Standard. 950 μl interne Standardlösung sowie 50 μl zu analysierende Probe wurden in einem GC-Vial vereint. 5 μl dieses Gemisches wurden vom GC injiziert. Das Splitverhältnis betrug 1:10. Das verwendete Temperaturprogramm hielt die Anfangstemperatur von 60°C für eine Minute, steigert die Temperatur danach um 20°C/min bis zur Endtemperatur von 220°C, die vier Minuten gehalten wurde. Das Verhältnis der Flächeneinheiten von Analyt zu Acetophenon wurde mittels einer Kalibrationsgeraden in die Analytkonzentration umgerechnet. Die Proben wurden jeweils dreifach bestimmt.

Zur Abschätzung der Messunsicherheit wurde eine Fehlerbetrachtung in Anlehnung an den Leitfaden der EURACHEM durchgeführt [EURACHEM, 2004]. Für TCP konnte ein relativer Messfehler von 2,6 % und für DCH von 3,9 % ermittelt werden.

2.7 Reaktionsexperimente der enzymatischen Dehalogenierung

Reaktionsexperimente mit immobilisiertem Enzym wurden in 20-ml-Reagenzgläsern bei einer Befüllung von 15 ml Substratpuffer (50 mmol/l TRIS-HCl-Puffer in vollentionisiertem Wasser, pH 9, 30°C) durchgeführt. Für eine ideale Durchmischung wurde durch die Verwendung eines Überkopfschüttlers gesorgt. Um den zeitlichen Verlauf der Reaktion bestimmen zu können, wurden Proben in regelmässigen Abständen entnommen. Die Proben wurden gaschromatographisch analysiert (Kap. 2.6). Die Bestimmung der Anfangsaktivitätsrate für die Modellvalidierung in Kap. 3 erfolgte bei einer Substratanfangskonzentration von 8 mmol/l TCP. Für die Quantifizierung der Anfangsaktivitätsrate wurde eine Ausgleichsgerade durch die ersten Produktkonzentrationsmesspunkte gelegt, deren Wert 1 mmol/l DCH nicht überschritt.

Zur Bestimmung der Enzyminaktivierung wurden Reaktionsexperimente mit löslichem Enzym durchgeführt. Dazu wurde 1 ml Enzymlösung zu 4 ml Substratpuffer (50 mmol/l TRIS-HCl-Puffer in vollentionisiertem Wasser, pH 9 bei 30°C, 10 mmol/l TCP) gegeben. Als Reaktionsgefäß wurden 10-ml-Rundkolben verwendet, die in einem Wasserbad auf 30°C temperiert wurden. Homogene Verhältnisse wurde durch einem Magnetrührer gewährleistet. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch die in Kap. 2.6 beschriebene Vorgehensweise. Die Anfangsaktivitätsrate wurde durch eine lineare Re-

gression der ersten Produktkonzentrationsmesspunkte bestimmt, deren Wert 1 mmol/l DCH nicht überschritt.

2.8 Parameterschätzung

Alle kinetischen Parameter der in den folgenden Kapiteln beschriebenen Modelle wurden mit Hilfe des integrierten Software-Pakets ACSL (Integration) und OptdesX (Optimierung) von Design Synthesis, Inc., Provo, UT, USA, geschätzt. Bis zu 15 Messdatensätze von Konzentrations-Zeit-Verläufen konnten simultan in eine Parameterschätzung einbezogen werden. Die Optimierung der Parameter wurde durch eine gradientenbasierte Methode vorgenommen (Generalized Reduced Gradients). Ziel der Parameterschätzung war es, die relative Fehlerquadratsumme zu minimieren.

2.9 Haloalkan-Dehalogenase-Miniplant

Bei der Planung und Auslegung der Haloalkan-Dehalogenase-Miniplant galt es die vielfältigen Anforderungen an eine Miniplant, die in Kap. 1.2.3 vorgestellt wurden, zu berücksichtigen und in eine technische Lösung zu überführen.

Ausgangspunkt für die Planung der Anlage war die Festlegung des Prozesskonzeptes (Kap. 4.4), auf dessen Basis ein detailliertes Fließschema (Abb. 2.3) erstellt wurde. Die Vorgaben des Fließschemas wurden unter Berücksichtigung des Modularkonzeptes in detaillierte Stücklisten übertragen. Die Umsetzung des modularen Konzeptes erfolgte durch den Einsatz von standardisierten Baugruppen und Schnittstellen. Der Aufbau der Miniplant fand am Institut für Bioverfahrenstechnik in Eigenleistung statt.

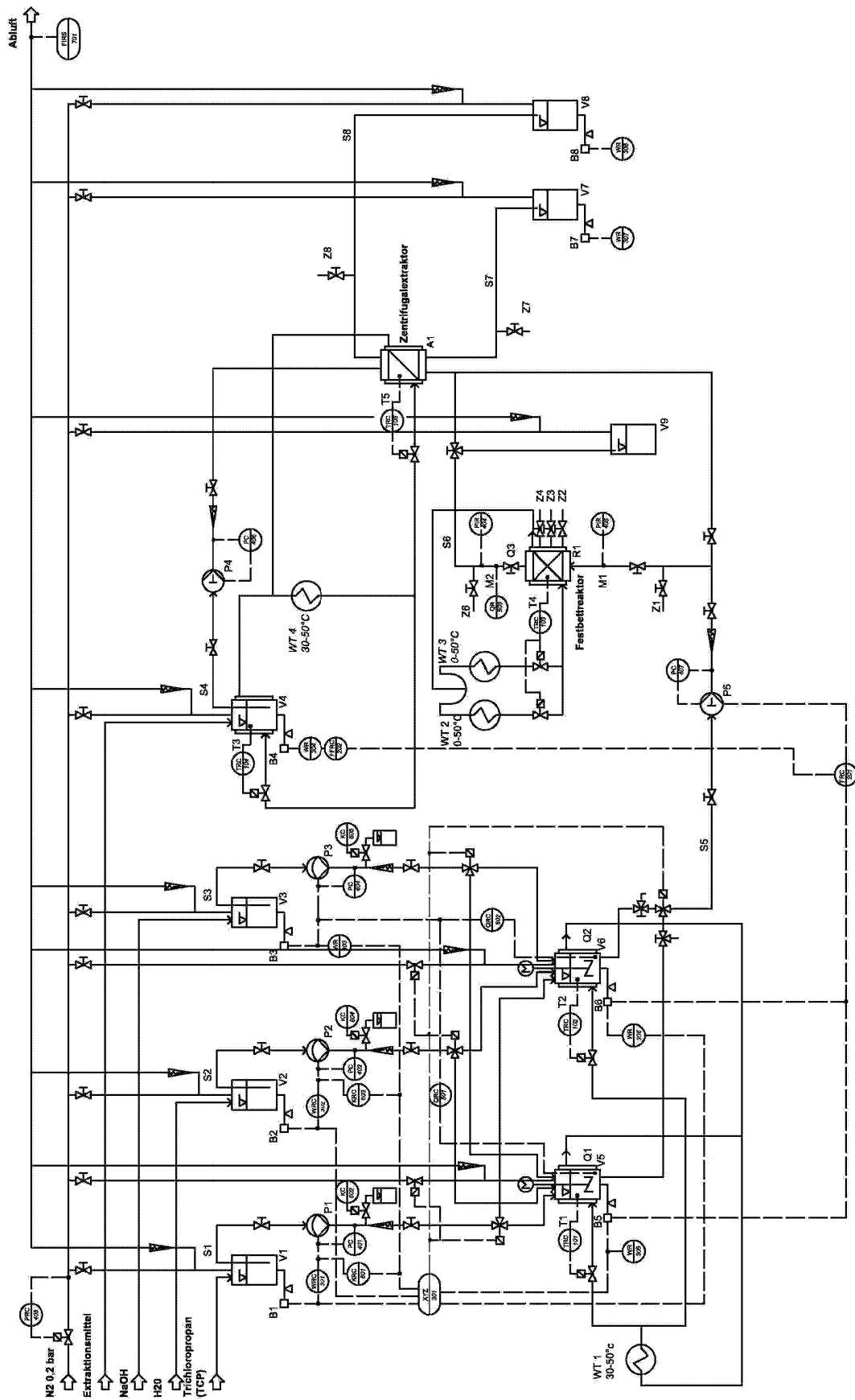


Abbildung 2.3: Fließschema der Haloalkan-Dehalogenase-Miniplant.

2.9.1 Aufbau der Haloalkan-Dehalogenase-Miniplant

Die Haloalkan-Dehalogenase-Miniplant ist in zwei Kompartimente unterteilt: einen gekapselten Reaktionsraum, in dem der untersuchte Prozess abläuft, und einen Versorgungs- und Steuerteil. In Abb. 2.4 ist der Versorgungs- und Steuerteil im Vordergrund zu erkennen, während sich der Reaktionsteil im Hintergrund befindet. Die Kapselung des Reaktionsraumes sollte in Verbindung mit einer Absaugung ein unkontrolliertes Austreten der chlorierten Kohlenwasserstoffe verhindern und eine größtmögliche Arbeitssicherheit gewährleisten.



Abbildung 2.4: Gesamtansicht der Haloalkan-Dehalogenase-Miniplant.

Der Reaktionsraum nahm folgende Komponenten auf: die Vorratsbehälter für Substrat, Lauge und Reaktionspuffer, das Auffanggefäß, die Waagen, Pumpen, Ventile, den Festbettreaktor und zwei Rührkessel zur Medienbereitung. Der Reaktionsraum der Haloalkan-Dehalogenase ist in Abb. 2.5 wiedergegeben. Im Versorgungsteil befinden sich die Prozessleittechnik, Gas- und Wärmeversorgung, sowie die Displays der Waagen.

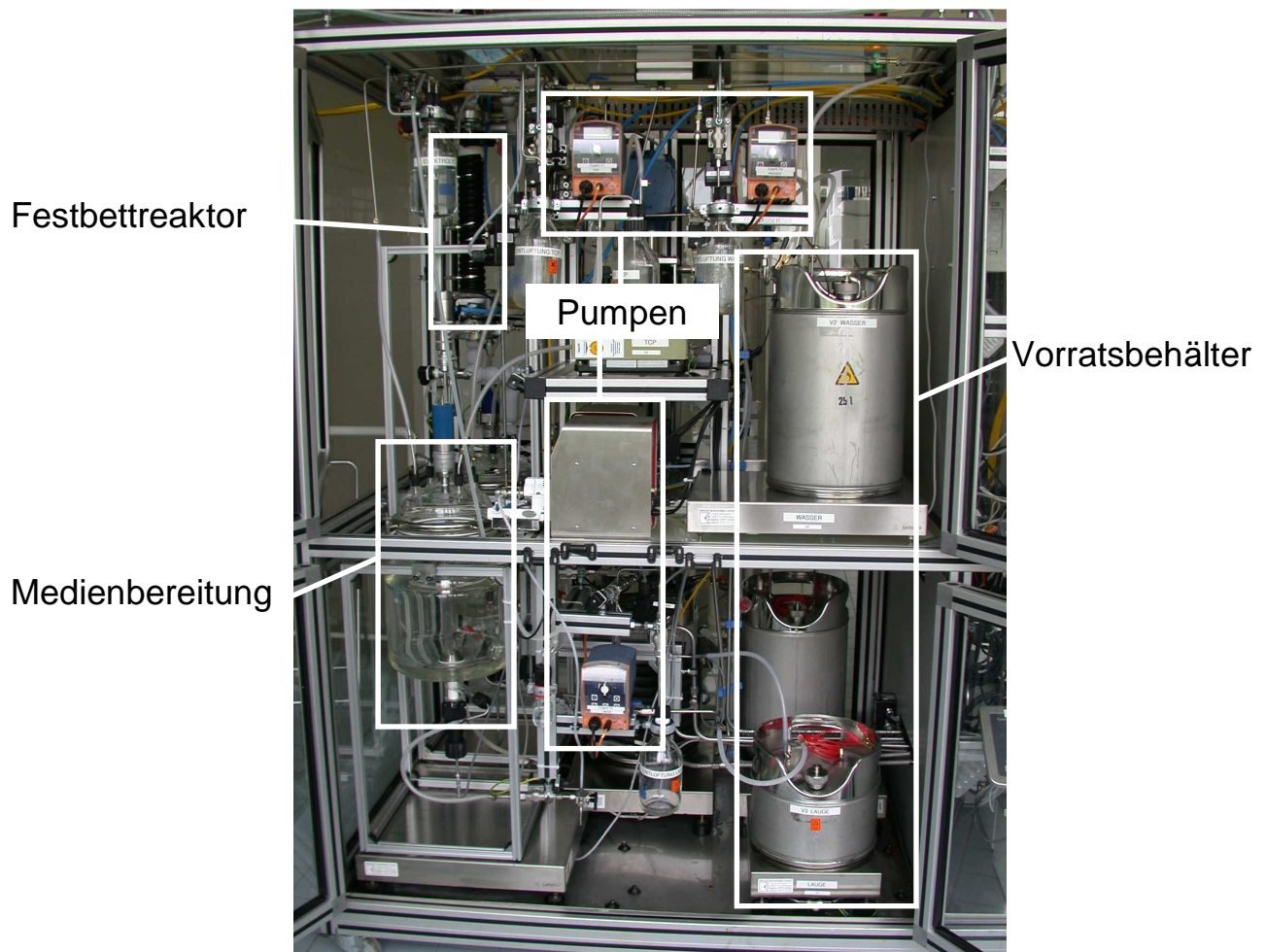


Abbildung 2.5: Reaktionsteil der Haloalkan-Dehalogenase-Miniplant.

Aufgrund der während der Reaktion gebildeten Salzsäure (Kap. 1.2.1) wurden sämtliche mit dem Medium benetzte Flächen in Edelstahl (1.4571) ausgeführt. Für alle flexible Verbindungen und Dichtungen wurde der Werkstoff PTFE aufgrund seiner Beständigkeit gegenüber den verwendeten chlorierten Kohlenwasserstoff eingesetzt.

2.9.2 Festbettreaktor

Der eingesetzte Festbettreaktor (Abb. 2.6) ist aus einem Edelstahlrohr mit 50 mm Innendurchmesser gefertigt und wurde von der Firma Linnemann, Tübingen bezogen. Die Länge des Rohres beträgt 525 mm. An beiden Enden dienen Gewinde zur Verschraubung der durch PTFE-Dichtungen abge-

dichteten Endkappen. Der Anschluss des Reaktors an die Versorgungsrohre erfolgte über Schraubensätze in den Endkappen. Es befinden sich symmetrisch über die Reaktorlänge verteilt drei Bohrungen (bei 137,5; 262,5 und 387,5 mm), die je ein Probennahmeventil aufgenommen haben. Ausgehend von den Ventilen wurden 1/8'-Edelstahlkapillare ins Innere der Schüttung geführt, um dort den Probenstrom auf zu nehmen.

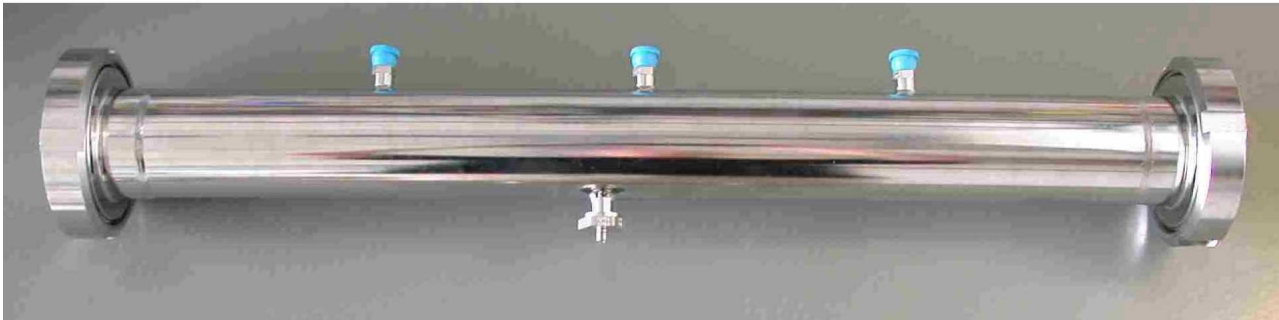


Abbildung 2.6: Festbettreaktor der Haloalkan-Dehalogenase-Miniplant. Oben sind die drei Bohrungen für die Probennahme und unten die Aufnahme des Temperaturfühlers zu erkennen.

Auf der entgegengesetzten Seite befindet sich ungefähr in der Reaktormitte eine Aufnahme für einen Temperaturfühler (Pt100, RS Components GmbH, Mörfelden-Walldorf). Die Spitze des Temperaturfühlers wurde in der Querschnittsmitte der Festbettschüttung positioniert. Der Temperaturfühler wurde an den Wärmetauscher zur Festbett-Temperierung angeschlossen. Der Wärmetauscher (F33, Julabo GmbH, Seelbach) besitzt eine PID-Regelung, die die Regelgröße Festbett-Temperatur auf den durch das Prozessleitsystem vorgegebenen Sollwert durch die Stellgröße Wasserbadtemperatur einregelt. Der Festbettreaktor war mit Temperierhalbschlauch umwickelt, der an den Wasserkreislauf des Wärmetauschers angeschlossen war.

Der innere Aufbau des Festbettreaktors ist schematisch in Abb. 2.7 dargestellt. Der Abschluss der Immobilisatschüttung wurde jeweils von 10 mm dicken Sintermetallscheiben mit einer maximalen Porengröße von 50 μm gebildet. Das Einstellen der tatsächlichen Schüttungslänge erfolgte durch den Einsatz von Edelstahlhülsen. Diese Spacer wiesen einen Durchmesser von 48 mm, eine zentrale Bohrung von 10 mm Durchmesser und Längen von 10, 20 und 30 mm auf. Zur Ausbildung einer möglichst kleinen Einlaufstrecke der Schüttungsströmung wurde der letzte Spacer vor der Sintermetallscheibe mit einer konischen Verbreiterung der zentralen Bohrungen auf 30 mm versehen. Die Länge der verwendeten Sintermetallscheiben und Edelstahlsparcer wurde von der Gesamtlänge des Rohres zur Bestimmung der Gesamtschüttungslänge und zur Positionsangabe der Probennahmestellen abgezogen.

Für die Auswertung der dynamischen Festbettexperimente wurden die zu berücksichtigenden Totvolumina vor und nach der Festbettschüttung ausgelitert. Vor der Festbettschüttung musste das Volumen der Rohrleitung vom Umschaltventil zwischen den beiden Medienbereitungskesseln bis zum Festbettreaktor sowie das freie Volumen im Einlauf des Reaktors, den Sintermetallscheiben und Spacern einbezogen werden. Das gemessene Volumen betrug 67 ml. Vom Schüttungsende bis zur

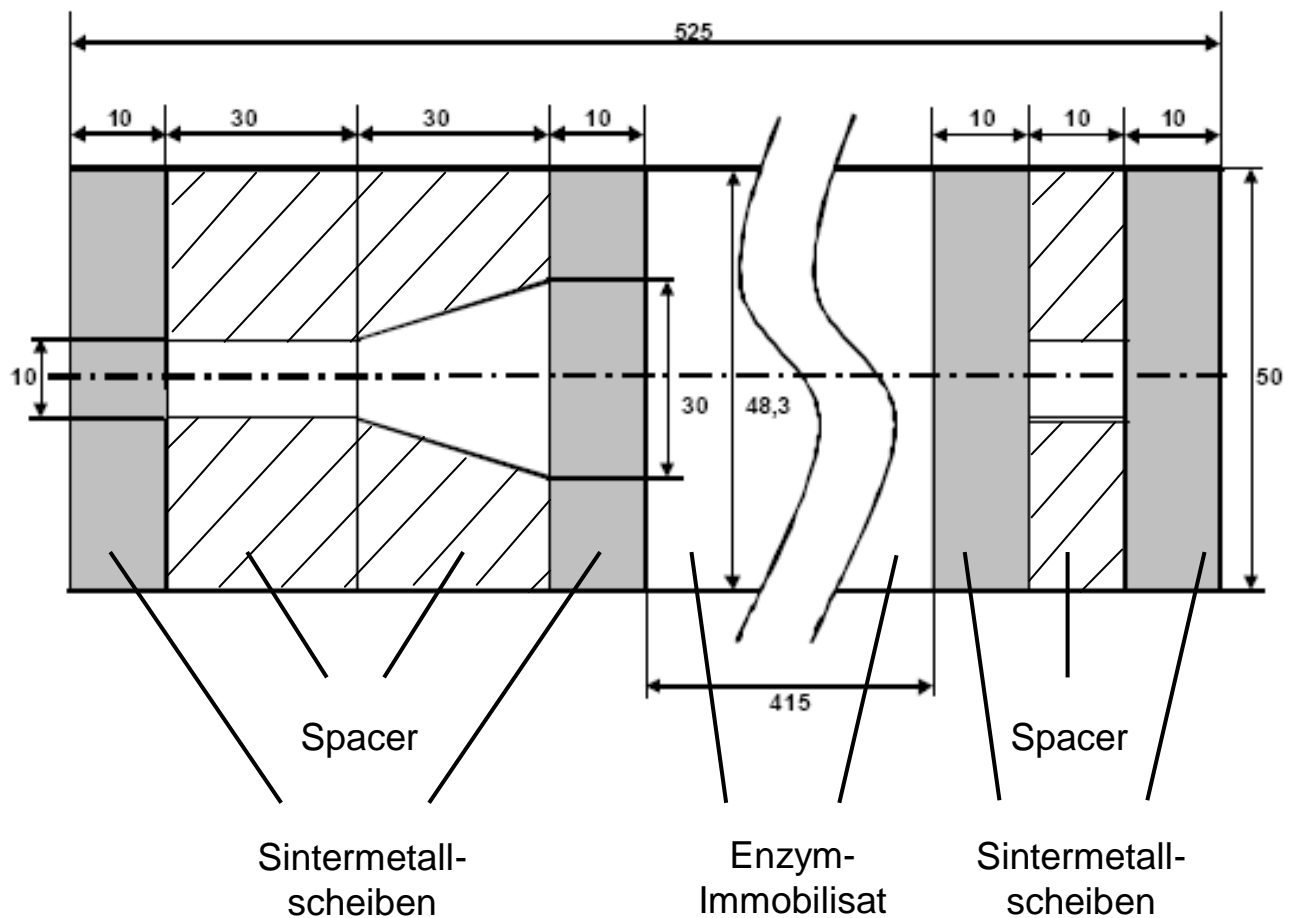


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung des Inneren des Festbettreaktors der Haloalkan-Dehalogenase-Miniplant.

Probennahmestelle setzt sich das vermessene Volumen aus den gleichen Einzelkomponenten und dem Einbau für eine pH-Elektrode zusammen, und beläuft sich auf 61 ml. Für Experimente mit sprunghafter Veränderung des Massenstroms musste nur das Totvolumen nach der Festbettschüttung zur Zeitkorrektur berücksichtigt werden. Die Totvolumen vor und nach der Festbettschüttung wurden bei sprunghaften Konzentrationsveränderungen zusammen berücksichtigt, da die Zulaufkonzentrationsveränderung durch einen Wechsel des Medienkessels realisiert wurde.

Die modellbasierte Beschreibung des Rückführungsprozesses erforderte zusätzlich die Bestimmung der Totvolumina vom Rührkesselansaugstutzen bis zum Schüttungsbeginn des Festbettreaktors sowie vom Festbettschüttungsende bis zum Rührkesselinlass. Das Volumen der Rohrleitungen vor der Festbettschüttung wurde zu 167 ml ausgelitert. Das korrespondierende Volumen nach der Festbettschüttung beläuft sich auf 81 ml.

Die Festbettpumpe (MCP-CPF Process, Ismatec, Wertheim-Mondfeld) wurde durch Vorgabe von zehn unterschiedlichen Drehzahlen zur MassenstromEinstellung kalibriert. Der gewünschte Massenstrom wurde durch die Kalibration in die benötigte Drehzahl umgerechnet. Der tatsächlich durchs

Festbett geflossene Massenstrom wurde durch den zeitlichen Verlauf des Auffangkesselwaagensignals bestimmt.

2.9.3 Prozessleittechnik

Die Modularisierung der Miniplant spiegelt sich auch im Aufbau der Prozessleittechnik wider. Die Miniplantsteuerung, -regelung und -datenerfassung setzt sich aus einem Prozessleitrechner, dem Controller einschließlich der Ein- und Ausgabemodule und der Prozessleitsoftware zusammen. Diese Komponenten sind mit Ausnahme des Rechners in einem Schaltschrank installiert worden.

Der Prozessleitrechner ist ein handelsüblicher PC, an den die Waagen über serielle Schnittstellen angeschlossen wurden. Die eingesetzte Hardware der Prozessleittechnik basiert auf Produkten der Field-Point-Serie der National Instruments GmbH, München. Sie umfasst einen Controller, zwei Analogeingangsmodule mit zusammen 16 Kanälen, einem Analogausgangsmodule mit 8 Kanälen, zwei Analogeingangsmodule mit zusammen 16 Kanälen, vier Digitalausgangsmodule mit zusammen 48 Kanälen, einem Digitaleingangsmodule mit 8 Kanälen und einem Eingangsmodule für die Temperaturmessfühler mit 8 Kanälen.

Die Prozessleitsoftware wurde in kleine Module untergliedert, die leicht modifiziert oder in einem neuen Kontext eingesetzt werden können. Der größere Teil der Prozessleitsoftware wurde auf dem Prozessleitrechner ausgeführt, wozu die Sollwertvorgaben für die Dosierungen, Temperaturregelungen und Massenströme sowie die Datenvisualisierung und -archivierung gehört. Dieser Teil der Software wurde in der Programmiersprache LabVIEW von National Instruments, München erstellt. Sicherheitsrelevante Teile der Prozessleitsoftware wurden auf den Prozessleitcontroller ausgelagert. Die Notabschaltung bei Überschreiten von Alarmgrenzen und die Temperaturregelung der Medienbereitungskessel gehören zu diesem Teil der Software. Für den Softwareteil auf dem Prozessleitcontroller wurde die LabVIEW-Erweiterung LabVIEW RealTime eingesetzt. Die Benutzeroberfläche der Prozessleitsoftware war in zwei Ebenen unterteilt, die in Abb. 2.8 dargestellt sind.

Die pH-Wert-Einstellung in den Medienbereitungskesseln wurde von zwei pH-Reglern des Typs M8832N der Firma Mostek, Liestal, Schweiz geregelt. Die Sollwertvorgabe geschah an den Reglern, die in den Schaltschrank eingebaut waren. Das Regelprinzip bestand aus einer An-Aus-Regelung der Laugenpumpe bis der Sollwert erreicht war.

2.9.4 Realisierung des Rückführungsprozesses

Aufgrund des modularen Aufbaus der Haloalkan-Dehalogenase-Miniplant mit standardisierten Verbindungen konnte der Rückführungsprozesses sehr einfach in kürzester Zeit realisiert werden. Das den Festbettreaktor verlassende Medium wurde nach Passieren der pH-Elektrode und Probenahmestelle in den Medienbereitungskessel zurückgeleitet. Dieser kontinuierlich betriebene Rührkessel ist ein 10l-Glasrührkessel der Firma HWS, Mainz, der durch einen Seitenstutzen die Aufnahme einer pH-Elektrode L9090 von Schott, Mainz ermöglicht hat. Durch weitere Stutzen im Glasdeckel wird

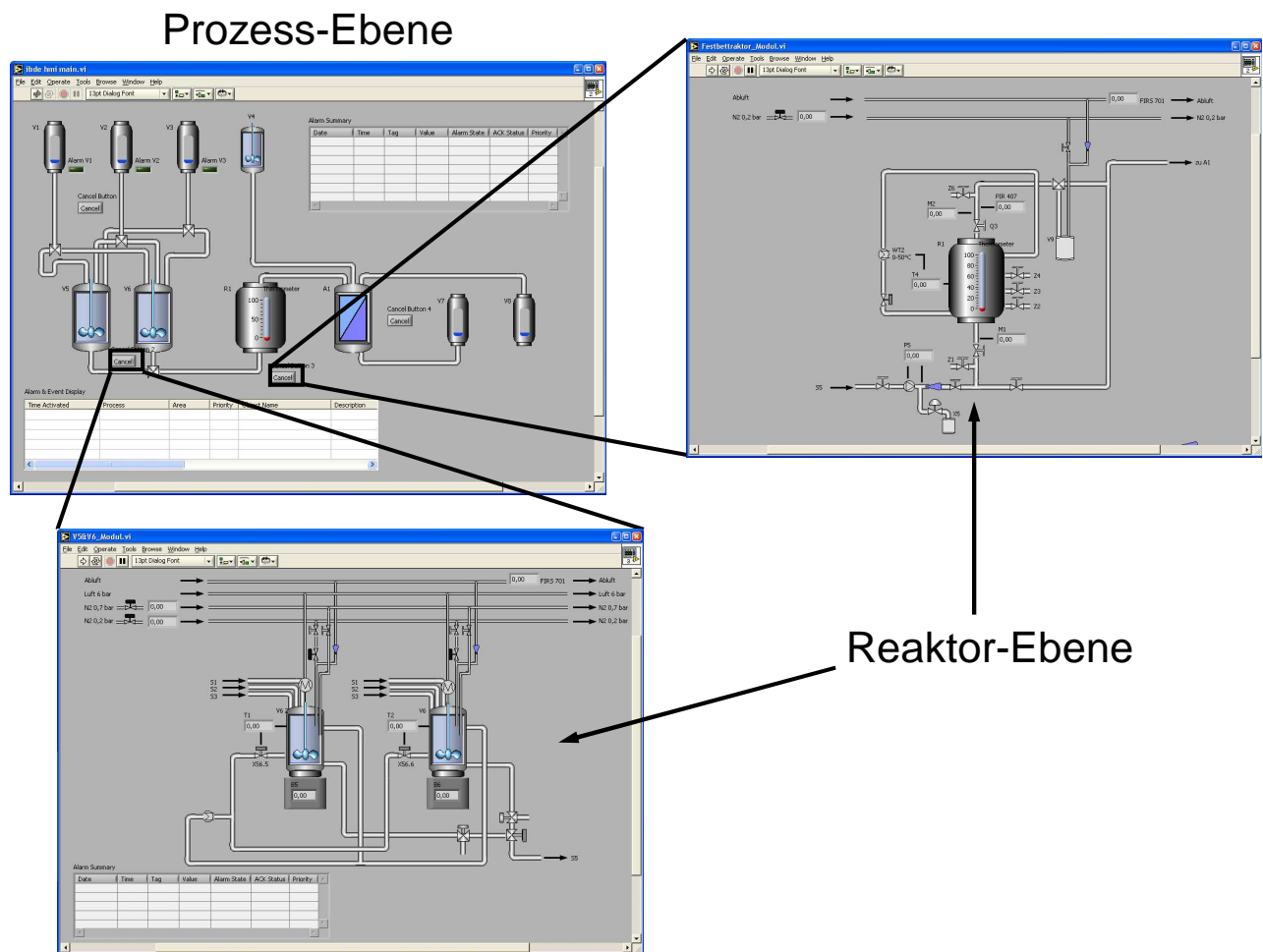


Abbildung 2.8: Prozessleitsoftware der Haloalkan-Dehalogenase-Miniplant.

der Kessel mit Reaktionspuffer, Substrat und Lauge befüllt. Die Homogenisierung des Mediums wird durch einen Druckluftmotor (LR3, Jurek, Niddatal) ermöglicht, der über eine Magnetkupplung einen PTFE-Glas-Rührer der Firma HWS, Mainz antreibt.

Durch das Gegentitrieren zum pH-Wert-Konstanthalten im Rührkessel stand neben der gaschromatographischen Konzentrationsbestimmung eine weitere Produktquantifizierung durch die Auswertung des Waagensignals des Laugenvorratskessels zur Verfügung.

2.10 Experimentelle Durchführung, Probennahme und -analyse von Miniplant-Versuchsreihen

Im Rahmen der Miniplant-Versuchsreihen wurde TRIS-HCl-Puffer in einer Konzentration von 25 und 50 mmol/l in vollentionisiertem Wasser eingesetzt, der durch Natronlauge (NaOH, 1 mmol/l) auf den gewünschten pH-Wert eingestellt wurde. Das Fördern von Reaktionspuffer, Lauge und Substrat in die Medienbereitungskessel (10l-Glaskessel mit Temperiermantel, HWS, Mainz) geschah durch

Membranpumpen der gamma/L-Serie der Firma Prominent, Heidelberg, die von der Prozessleitsoftware zur Dosierung gesteuert wurden.

Zur Analyse des enzymkatalysierten Reaktionsverlaufs wurden der Anlage Proben entnommen. Steady-state-Profile über die Festbettreaktorlänge wurden durch Proben vor und nach dem Reaktor sowie aus den drei Probennahmestellen des Festbettreaktors (Kap. 2.9.2) gebildet. Um eine gegenseitige Beeinflussung der Proben zu verhindern, erfolgte die Probennahme entgegen der Stömungsrichtung. Die erste Probe wurde nach dem Reaktor gezogen, zuletzt wurde vor dem Reaktor eine Probe genommen. Bei dynamischen Experimenten wurden Proben lediglich am Ausgang des Festbettreaktors aufgenommen, um die dynamischen Vorgänge im Festbettreaktor nicht durch Probennahmen aus dem Inneren des Reaktors zu beeinflussen.

Die Reaktionsproben wurden vor der Probenanalyse in einem Wasserbad auf Festbettreaktor-temperatur gebracht. Die Quantifizierung der Substrat- und Produktionskonzentrationen erfolgte durch die in Kap. 2.6 beschriebene gaschromatographische Konzentrationsbestimmung. Die pH-Wert-Bestimmung der temperierten Miniplant-Proben wurde mit Hilfe einer pH-Elektrode L9090 der Firma Schott, Mainz und eines Messverstärkers M8832N der Firma Mostek, Liestal, Schweiz durchgeführt.

Kapitel 3

Kinetische Modellierung der Eupergit-Immobilisierung von Haloalkan-Dehalogenase DhaA

In diesem Kapitel wird das kinetische Modell der Eupergit-Immobilisierung von Haloalkan-Dehalogenase DhaA hergeleitet sowie die experimentelle Validierung präsentiert.

3.1 Kinetisches Modell der Eupergit-Immobilisierung von Haloalkan-Dehalogenase DhaA

Im Rahmen dieser Arbeit sollte, wie bereits in Kap. 1.3 dargelegt, ein einfaches Modell der Eupergit-Immobilisierung von Haloalkan-Dehalogenase DhaA entwickelt werden. Um eine Unterteilung in die beiden Kompartimente Bulk- und Porenflüssigkeit zu vermeiden und eine pseudohomogene Modellierung zu ermöglichen, muss die Abwesenheit von diffusiven Limitierungen in den Partikelporen gewährleistet sein. Die dafür notwendigen Betrachtungen sowie die Präsentation der kinetischen Ansätze für die Enzym-Inaktivierung und -Immobilisierung wird in den folgenden Abschnitten dieses Kapitels erfolgen.

3.1.1 Potentielle Diffusionslimitierungen

Voraussetzung für das hier präsentierte pseudohomogene Modell der Eupergit-Immobilisierung von Haloalkan-Dehalogenase DhaA ist die Abwesenheit von Limitierungen des diffusiven Stofftransports in den Poren des Trägermaterials. Dies schliesst sowohl den diffusiven Transport des Enzyms während der Immobilisierung, als auch den diffusiven Stofftransport des Substrates während des Experiments zur Stoffumsetzung ein. Für die Beurteilung, ob eine Diffusionslimitierung ausgeschlossen werden kann, wird die dimensionslose Kennzahl des allgemeinen Thiele-Modulus (General Thiele Modulus)

Φ herangezogen, die die Reaktionsrate ins Verhältnis zur diffusiven Stofftransportrate setzt. Bei Werten des Thiele-Modulus Φ grösser 0,3 muss von einer Diffusionslimitierung ausgegangen werden [BAILEY, OLLIS, 1986].

Entsprechend der von BAILEY, OLLIS, 1986 vorgestellten Betrachtung lässt sich der Thiele-Modulus $\Phi_{Immobilisierung}$ für die Immobilisierungsreaktion herleiten:

$$\Phi_{Immobilisierung} = \frac{r_{Immobilisierung}}{D_{Enzym,eff} \cdot c_{Enzym}} \cdot \left(\frac{V_p}{A_p} \right)^2 \quad (3.1)$$

Um den effektiven Diffusionskoeffizienten $D_{Enzym,eff}$ des Enzyms in den Partikelporen abzuschätzen, wurde der Diffusionskoeffizient eines globularen Enzyms in wässriger stark verdünnter Lösung herangezogen, das eine zu DhaA ähnliche Größe aufweist ($1 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$, KROUGLOVA ET AL., 2004). Der Einfluss der behinderten Diffusion in den Poren wurde berücksichtigt, indem der effektive Diffusionskoeffizient zu 1% des Wertes des Diffusionskoeffizient in freier Lösung angenommen wurde (s. a. Kap. 5.2.5). Zusammen mit den messbaren Größen Enzymkonzentration c_{Enzym} und der Immobilisierungsrate $r_{Immobilisierung}$ sowie den Eupergit-Eigenschaften Volumen V_p und Oberfläche A_p konnte der Thiele-Modulus der Eupergit-Immobilisierung $\Phi_{Immobilisierung}$ berechnet werden. Die äußere Form von Eupergit-Partikeln wurde zur Berechnung von V_p und A_p als kugelförmig angenommen. Für sämtliche Immobilisierungsexperimente wurde für den Thiele-Modulus $\Phi_{Immobilisierung}$ kein höherer Wert als 0,025 bestimmt. Die Eupergit-Immobilisierung von Haloalkan-Dehalogenase DhaA kann daher als nicht diffusionslimitiert angesehen werden und die Modellierung der Immobilisierung mit einem homogenen Modell geschehen.

Analog zu der Betrachtung des Proteinstofftransports während des Immobilisierungsvorgangs erfolgt die Berechnung des allgemeinen Thiele-Modulus $\Phi_{Reaktion}$ für die Stoffumsetzung mit dem immobilisiertem Enzym:

$$\Phi_{Reaktion} = \frac{r_{Reaktion}}{D_{TCP,eff} \cdot c_{TCP}} \cdot \left(\frac{V_p}{A_p} \right)^2 \quad (3.2)$$

Die Berechnung des effektiven Diffusionskoeffizienten $D_{TCP,eff}$ ($1,52 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$) wurde von DRAVIS ET AL., 2001 übernommen. Die Reaktionsrate $r_{Reaktion}$ sowie die Substratkonzentration c_{TCP} wurden gemessen. Der Thiele-Modulus $\Phi_{Reaktion}$ in den Reaktionsexperimenten betrug maximal 0,002, was eine Diffusionslimitierung ausschließt. Aus diesem Grund kann anhand der Reaktionsexperimente durch die Aktivität des Trägers auf die Enzymbeladung geschlossen werden. Die gemessene Anfangsaktivität kann daher mit den modellbasierten Berechnungen der Trägerbeladung mit aktivem Enzym verglichen werden. Das Verhältnis der gemessenen absoluten Anfangsaktivitätsrate und der Trägerbeladung an Enzym kann herangezogen werden, um die spezifische Aktivität des immobilisierten Enzyms zu bestimmen.

3.1.2 Kinetik der Enzyminaktivierung

Immobilisierungen mit Eupergit C dauern verglichen mit anderen Immobilisierungsmethoden aufgrund der geringen Reaktivität der Oxirangruppen relativ lange (typischerweise 2 – 4 Tage). Während dieses Zeitraums ist das lösliche Enzym einer Inaktivierung unterworfen. Zur mathematischen Beschreibung der Enzyminaktivierung ist ausgehend von den unterschiedlichen Mechanismen der Inaktivierung eine große Anzahl von kinetischen Ansätzen vorgeschlagen worden [HENLEY, SADANA, 1986]. Dem simpelsten Kinetikansatz liegt die Annahme einer irreversiblen Reaktion erster Ordnung von einer aktiven zu einer inaktiven Form des Enzyms zugrunde.

$$\frac{dc_{Enzym}^{Akt}}{dt} = -k_1^{Inakt} \cdot c_{Enzym}^{Akt} \quad (3.3)$$

$$c_{Enzym}^{Akt}(t = 0) = c_{Enzym,0}^{Akt} \quad (3.4)$$

Aus der Kenntnis der Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung k_1^{Inakt} lässt sich die Halbwertszeit $t_{1/2}$ der Enzyminaktivierung bestimmen:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_1^{Inakt}} \quad (3.5)$$

Eine Inaktivierung des trägergebundenen aktiven Enzyms wurde nicht berücksichtigt, da die Halbwertszeit der Eupergit-immobilisierten Haloalkan-Dehalogenase DhaA (s. Kap. 7.2.1) um Größenordnungen größer als die des löslichen Enzyms ist.

3.1.3 Kinetik der Protein-Immobilisierung

Für eine Vorhersage des dynamischen Verhaltens der Immobilisierung ist die Kenntnis des zugrunde liegenden kinetischen Mechanismus der Immobilisierungsreaktion notwendig. Die Immobilisierungsreaktion kann als eine Reaktion erster Ordnung von einem löslichen zu einem an den Träger gebundenen Protein angesehen werden. Es wird hier weder zwischen aktivem und inaktivem Enzym, noch anderen verunreinigenden Proteinen unterschieden. Diese Annahme ist aufgrund der unspezifischen Bindungsart durch die Oxirangruppen von Eupergit realistisch. Da die Beladungskapazität q_{max} des Trägers nicht unbegrenzt ist, wird der Ansatz erster Ordnung um einen Term erweitert, der die Abnahme der Immobilisierungsrate aufgrund der zunehmenden Proteinbeladung des Trägers q berücksichtigt [DO, BAILEY, 1981; HOSSAIN, DO, 1985; HOSSAIN ET AL., 1986]:

$$\frac{dc_{Protein}}{dt} = -k_1^{Imm} \cdot c_{Protein} \cdot \left(1 - \frac{q}{q_{max}}\right) \quad (3.6)$$

$$c_{Enzym}(t = 0) = c_{Enzym,0} \quad (3.7)$$

In Fällen, in denen die Beladung q wesentlich kleiner als die Beladungskapazität q_{max} ist, kann die obige Gleichung zu einem Ansatz erster Ordnung vereinfacht werden:

$$\frac{dc_{Protein}}{dt} = -k_1^{Immоб} \cdot c_{Protein} \quad (3.8)$$

Aus der obigen Gleichung ist erkennbar, dass eine lineare Abhängigkeit der Immobilisierungsrate von der Proteinkonzentration $c_{Protein}$ vorliegt. Dies trifft ebenso auf die Eupergit-Konzentration zu, da die Geschwindigkeitskonstante der Immobilisierung $k_1^{Immоб}$ proportional einer auf die Eupergit-Konzentration bezogenen spezifischen Geschwindigkeitskonstanten $k_{1,spez}^{Immоб}$ und der Eupergit-Konzentration $c_{Eupergit}$ ist:

$$k_1^{Immоб} = k_{1,spez}^{Immоб} \cdot c_{Eupergit} \quad (3.9)$$

Der kinetische Ansatz zur Beschreibung der Protein-Immobilisierung geht damit in eine bimolekulare Reaktion über:

$$\frac{dc_{Protein}}{dt} = -k_{1,spez}^{Immоб} \cdot c_{Eupergit} \cdot c_{Protein} \quad (3.10)$$

3.1.4 Modellgleichungen

Für die Beschreibung der gleichzeitig auftretenden Phänomene Enzym-Inaktivierung und -Immobilisierung werden die oben vorgestellten kinetischen Ansätze kombiniert:

$$\frac{dc_{Enzym}^{Akt}}{dt} = -k_1^{Inakt} \cdot c_{Enzym}^{Akt} - k_{1,spez}^{Immоб} \cdot c_{Eupergit} \cdot c_{Enzym}^{Akt} \quad (3.11)$$

$$c_{Enzym}^{Akt}(t=0) = c_{Enzym,0}^{Akt} \quad (3.12)$$

Zur Bestimmung der Gesamtproteinbeladung $q_{Protein}$ des Trägers wird die Massenbilanz des Gesamtproteins herangezogen:

$$V_l \cdot \frac{dc_{Protein}}{dt} + m_{Eupergit} \cdot \frac{dq_{Protein}}{dt} = 0 \quad (3.13)$$

Aus dieser Beziehung ergibt sich mit Hilfe von Gl. 3.10 die Differentialgleichung für die Gesamtproteinbeladung $q_{Protein}$ des Trägers:

$$\frac{dq_{Protein}}{dt} = k_{1,spez}^{Immоб} \cdot c_{Protein} \quad (3.14)$$

$$q_{Enzym}(t=0) = q_{Enzym,0} = 0 \quad (3.15)$$

Die Trägerbelastung mit aktivem Enzym q_{Enzym}^{Akt} lässt sich mit folgender Differentialgleichung berechnen:

$$\frac{dq_{Enzym}^{Akt}}{dt} = k_{1,spez}^{Imm} \cdot c_{Enzym}^{Akt} \quad (3.16)$$

$$q_{Enzym}^{Akt}(t=0) = q_{Enzym,0}^{Akt} = 0 \quad (3.17)$$

Sämtliche vorgestellte Modellgleichungen sind gewöhnliche Differentialgleichungen erster Ordnung. Die analytischen Lösungen der Modellgleichungen sind leicht zugänglich und lauten:

$$c_{Protein}(t) = c_{Protein}(t=0) \cdot e^{-k_{1,spez}^{Imm} \cdot c_{Eupergit} \cdot t} \quad (3.18)$$

$$q_{Protein}(t) = \frac{c_{Protein}(t=0)}{c_{Eupergit}} \cdot \left(1 - e^{-k_{1,spez}^{Imm} \cdot c_{Eupergit} \cdot t}\right) \quad (3.19)$$

$$c_{Enzym}^{Akt}(t) = c_{Enzym}^{Akt}(t=0) \cdot e^{-(k_{1,spez}^{Imm} \cdot c_{Eupergit} + k_1^{Inakt}) \cdot t} \quad (3.20)$$

$$q_{Enzym}^{Akt}(t) = \frac{k_{1,spez}^{Imm} \cdot c_{Enzym}^{Akt}(t=0)}{k_{1,spez}^{Imm} \cdot c_{Eupergit} + k_1^{Inakt}} \cdot \left(1 - e^{-(k_{1,spez}^{Imm} \cdot c_{Eupergit} + k_1^{Inakt}) \cdot t}\right) \quad (3.21)$$

3.1.5 Ausbeutefunktion

Ziel der meisten Immobilisierungsstudien ist es, die Ausbeute an aktivem Enzym zu maximieren. Mathematisch lässt sich diese Zielfunktion in folgender Weise ausdrücken:

$$\max \left(\frac{m_{Eupergit} \cdot q_{Protein}^{Akt}}{V_l \cdot c_{Protein}^{Akt}(t=0)} \right) \quad (3.22)$$

Der Bruch in Gl. 3.22 beschreibt die Ausbeutefunktion Y_{Imm} der Immobilisierung, da die Gesamtmasse des immobilisierten aktiven Enzyms ins Verhältnis zum anfänglich vorliegenden aktiven Enzym gesetzt wird. Da die Modellgleichungen analytisch lösbar sind, lässt sich die Immobilisierungsausbeute Y_{Imm} umformen und durch die Kenntnis der Geschwindigkeitskonstanten $k_{1,spez}^{Imm}$ und k_1^{Inakt} und der Eupergit-Konzentration $c_{Eupergit}$ vorhersagen:

$$Y_{Imm} = \frac{m_{Eupergit} \cdot q_{Protein}^{Akt}}{V_l \cdot c_{Protein}^{Akt}(t=0)} = \frac{k_{1,spez}^{Imm} \cdot c_{Eupergit}}{k_{1,spez}^{Imm} \cdot c_{Eupergit} + k_1^{Inakt}} \cdot \left(1 - e^{-(k_{1,spez}^{Imm} \cdot c_{Eupergit} + k_1^{Inakt}) \cdot t}\right) \quad (3.23)$$

3.2 Vergleich experimenteller Ergebnisse mit Modellrechnungen

In dem folgenden Abschnitt werden die experimentell gewonnenen Daten mit den Modelllösungen verglichen, um das erarbeitete Modell hinsichtlich der Aussagekraft und Vorhersagegenauigkeit beurteilen zu können. Da Trägerbeladungen an aktivem Enzym nicht unmittelbar experimentell messbar sind, werden die berechneten Beladungen an aktivem Enzym den experimentellen Aktivitätsdaten qualitativ gegenübergestellt. Das Verhältnis von gemessener Aktivität zu berechneter Beladung aktiven Enzyms kann als die spezifische Aktivität des aktiven Enzyms nach der Immobilisierung angesehen werden.

3.2.1 Inaktivierung des löslichen Enzyms

Über einen Zeitraum von einer Woche wurde die Anfangsaktivität von löslicher Haloalkan-Dehalogenase DhaA bei 30°C, pH 9 und einer TCP-Anfangskonzentration von 8 mmol/l für zwei unterschiedliche Lagertemperaturen bestimmt (Kap. 2.7). In der logarithmischen Darstellung von Abb. 3.1 sind sowohl die Verläufe der gemessenen Anfangsaktivitätsraten, als auch die entsprechende Beschreibung der Verläufe mit kinetischen Ansätzen erster Ordnung dargestellt. Beim Vergleich der experimentellen Daten mit den Modellrechnungen lässt sich eine ausreichende Übereinstimmung erkennen. Die beobachtete Abnahme der Anfangsaktivitätsrate, die proportional der Abnahme an aktivem Enzym angenommen wurde, entspricht einer Halbwertszeit $t_{1/2}$ von 2,90 Tagen bei 7°C Lagertemperatur und von 0,54 Tagen bei 22°C Lagertemperatur.

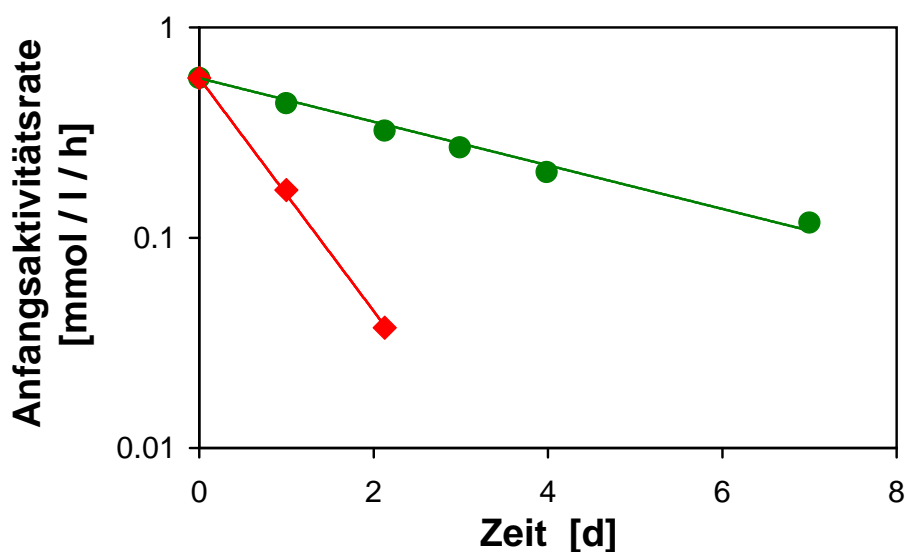


Abbildung 3.1: Inaktivierung der löslichen Haloalkan-Dehalogenase DhaA bei Lagertemperaturen von 7°C (Kreise) und 22°C (Rauten).

3.2.2 Immobilisierung des löslichen Proteins

Der kinetische Mechanismus der Proteinimmobilisierung wurde durch zeitliche Verläufe der Gesamtproteinkonzentration bestimmt. In Abb. 3.2 sind die logarithmischen Verläufe von Eupergit-Immobilisierungen bei 7°C und 22°C dargestellt.

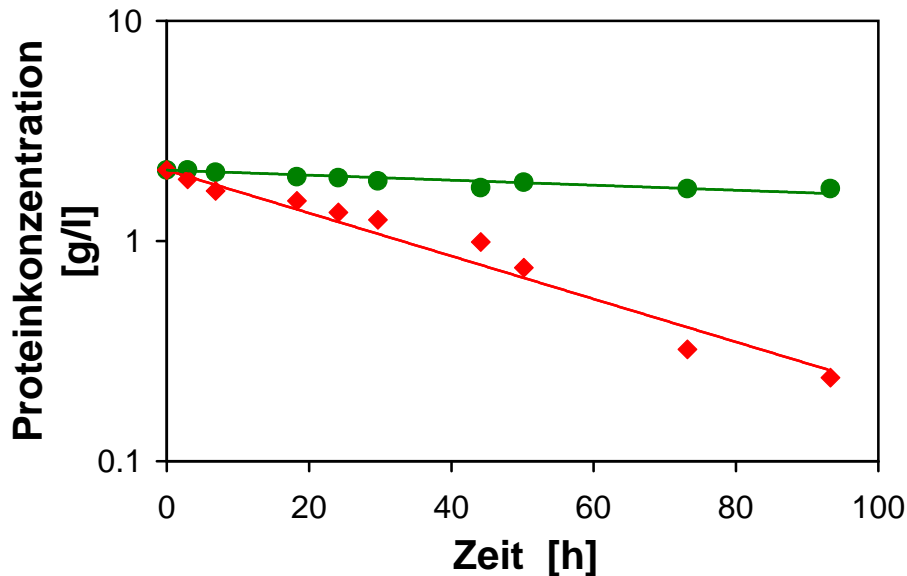


Abbildung 3.2: Kinetik der Immobilisierung bei Temperaturen von 7°C (Kreise) und 22°C (Rauten), Modelllösungen mit vereinfachter Immobilisierungskinetik erster Ordnung (Linien), Eupergit-Konzentration: 25 g/l.

Eine Abnahme der Immobilisierungsrate aufgrund einer Sättigung des Trägers an Protein konnte nicht beobachtet werden. Auf eine Beschreibung der Immobilisierung mit Hilfe einer Sättigungskinetik (Gl. 3.6) konnte demzufolge verzichtet werden und statt dessen wurde eine gewöhnliche Kinetik erster Ordnung herangezogen. Die Linien in Abb. 3.2 stellen somit Lösungen der Gln. 3.7 und 3.8 dar.

3.2.3 Einfluss der Proteinausgangskonzentration

In Immobilisierungsexperimenten, in denen die Protein-Ausgangskonzentration variiert wurde, konnte der Einfluss dieser Variablen auf das Immobilisierungsergebnis untersucht werden. In Abb. 3.3 A ist der Verlauf der Immobilisierungsexperimente und in Abb. 3.3 B die mit den immobilisierten Enzymen bestimmte Anfangsaktivität wiedergegeben.

Die logarithmische Darstellung von Abb. 3.3 A zeigt deutlich, dass unabhängig von der Proteinausgangskonzentration ein gleicher relativer Immobilisierungsfortschritt erzielt wird. In Abb. 3.3 B wird diese Beobachtung durch Aktivitätsdaten bestätigt, da eine lineare Korrelation zwischen gemessener Anfangsaktivitätsrate und Ausgangsproteinkonzentration vorliegt. Beide Ergebnisse stützen die Annahme, dass der kinetische Mechanismus der Immobilisierung mit einer Kinetik erster Ordnung beschrieben werden kann. Eine sterische Hinderung der Enzyme durch einen Beladungseffekt kann

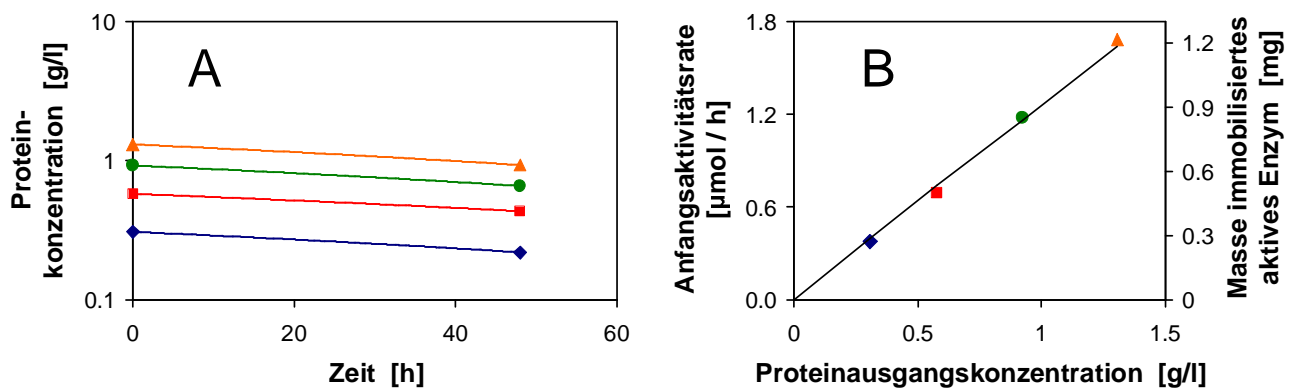


Abbildung 3.3: Einfluss der Proteinausgangskonzentration auf den Immobilisierungsfortschritt (A) und die gemessene Anfangsaktivitätsrate (B) bei der Eupergit-Immobilisierung von Haloalkan-Dehalogenase DhaA bei 22°C.

bis zur höchsten erreichten Beladung von 48,8 mg Enzym / g Eupergit (trocken) ausgeschlossen werden.

Die Lösungen der Modellgleichungen weisen eine gute Korrelation zu den gemessenen Aktivitätsdaten auf. Die Immobilisierungsausbeute sagt für alle Ansätze gleiche Werte voraus, was durch das konstante Verhältnis von gemessener Aktivität zu eingesetzter Proteinmenge bestätigt wird.

3.2.4 Einfluss der Eupergit-Konzentration

Die Ausbeute $Y_{Immobil}$ der Immobilisierung an aktiven Enzym kann vom Experimentator im Wesentlichen durch die beiden Variablen Zeit t und Eupergit-Konzentration $c_{Eupergit}$ beeinflusst werden (Gl. 3.23). Anhand der Variation der Eupergit-Konzentration soll der Einfluss dieser beiden Variablen in diesem Abschnitt behandelt werden.

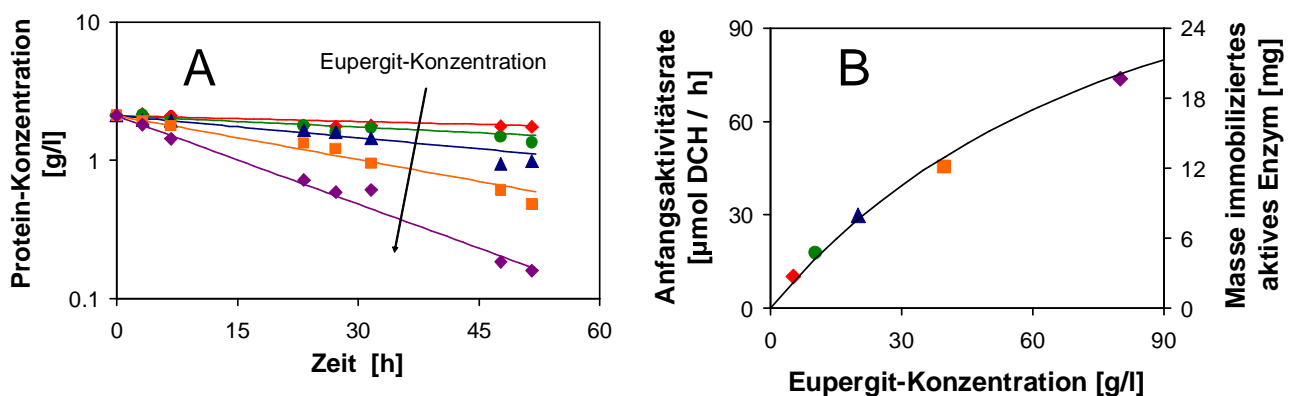


Abbildung 3.4: Einfluss der Eupergit-Konzentration auf den Immobilisierungsfortschritt (A) und die gemessene Anfangsaktivitätsrate (B) bei der Eupergit-Immobilisierung von Haloalkan-Dehalogenase DhaA bei 22°C.

Die Zeitverläufe der Proteinkonzentration zeigt Abb. 3.4 A. Die Abnahme der Proteinkonzentration und somit die Immobilisierungsrate korreliert eindeutig mit der Eupergit-Konzentration. Dieses

Verhalten wird durch das vorgestellte Modell gut vorhergesagt. Aufgrund der eindeutigen Verknüpfung von Eupergit-Konzentration und Immobilisierungsrate ist davon auszugehen, dass die Koppelungsreaktion des Proteins mit den Oxirangruppen des Trägers der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Immobilisierungsprozesses ist.

Die ermittelten Anfangsaktivitätsraten zeigen eine deutliche Zunahme mit ansteigender Eupergit-Konzentration und weisen eine sehr gute Übereinstimmung mit dem berechneten Verlauf für die Masse des immobilisierten aktiven Enzyms auf (Abb. 3.4 B). Die Zunahme der Masse immobilisierten aktiven Enzyms durch eine Steigerung der Eupergitkonzentration hat zur Konsequenz, dass die Ausbeute der Immobilisierung durch die Eupergit-Konzentration stark erhöht werden kann (Gl. 3.23). Der Verlauf der Ausbeutefunktion ist für das oben präsentierte Experiment in Abb. 3.5 dargestellt.

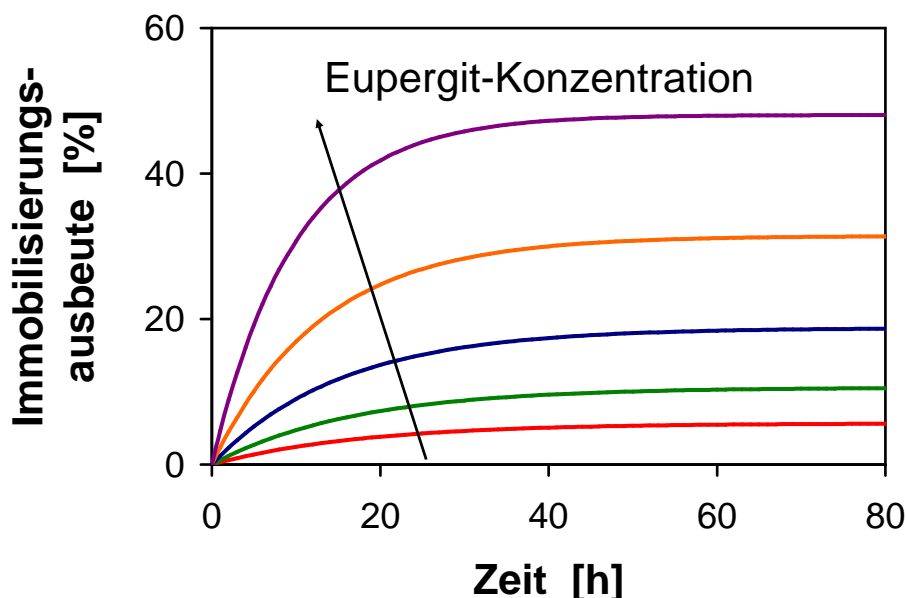


Abbildung 3.5: Einfluss der Eupergit-Konzentration auf die Ausbeute der Eupergit-Immobilisierung von Haloalkan-Dehalogenase DhaA bei 22°C.

Unter den gegebenen Bedingungen konnte eine maximale Ausbeute von 48 % für die höchste eingesetzte Eupergit-Konzentration von 80 g/l erreicht werden. Für niedrigere Eupergit-Konzentrationen verringerte sich die Ausbeute deutlich. Aus Abb. 3.5 wird zusätzlich der Einfluss der Immobilisationsdauer auf die Ausbeute $Y_{Immobil}$ ersichtlich. Nach ungefähr 60 h ist unabhängig von der verwendeten Eupergit-Konzentration der Endwert der Ausbeute erreicht, weil zu diesem Zeitpunkt aufgrund der Inaktivierung kein aktives lösliches Enzym mehr vorliegt (Abb. 3.6). Längere Immobilisationsdauern machen deshalb keinen Sinn.

Der Einfluss der Eupergit-Konzentrationen $c_{Eupergit}$ auf den Verlauf von Gesamtprotein und aktivem löslichen Enzym (Abb. 3.6) zeigt deutlich, dass die Steigerung der Immobilisierungsrate durch eine Erhöhung der Eupergit-Konzentration lediglich den Effekt der Inaktivierung des löslichen Enzyms mindert und nicht komplett verhindern kann. Aufgrund der Erhöhung der Geschwindigkeits-

3. Kinetische Modellierung der Eupergit-Immobilisierung von Haloalkan-Dehalogenase DhaA

konstanten der Proteinimmobilisierung $k_1^{Immobil}$ wird die Immobilisierung gegenüber der Inaktivierung begünstigt und führt zu einer höheren Ausbeute an immobilisierten aktivem Enzym.

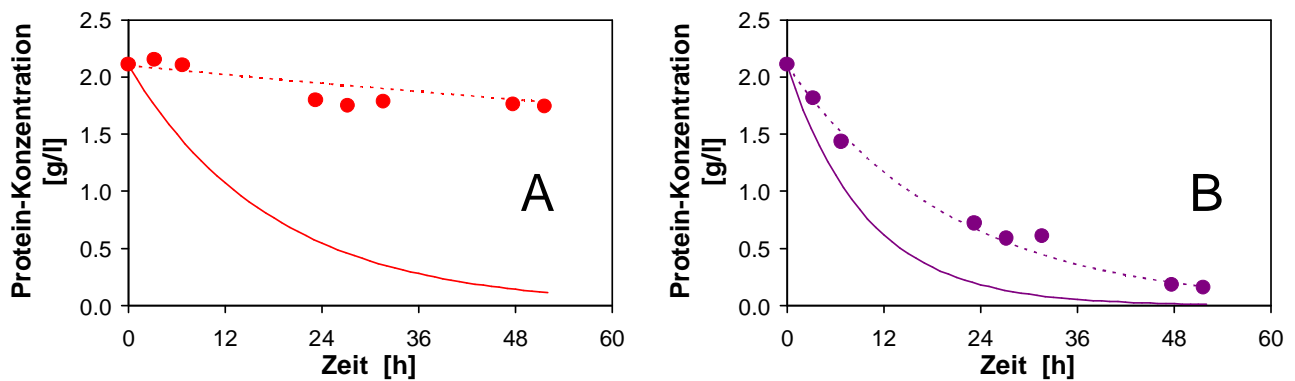


Abbildung 3.6: Konzentrationsverläufe des Gesamtproteins (Punkte, gestrichelte Linie) und des aktiven Enzyms (Linie) bei der Eupergit-Immobilisierung von Haloalkan-Dehalogenase DhaA bei 22°C und einer Eupergitkonzentration von 5 g/l (A) und 80 g/l (B).

Vergleicht man den Einfluss auf die Immobilisierungsausbeute, so stellt die Eupergit-Konzentration die wesentlich wirkungsvollere Designvariable im Vergleich zu der Immobilisationsdauer dar. Durch eine Erhöhung der Eupergit-Konzentration kann die Ausbeute drastisch gesteigert werden, während die Immobilisationsdauer nur zu Beginn der Immobilisierung die Ausbeute stark beeinflusst und ab ca. 40 h nur noch sehr geringe Änderungen der Ausbeute bewirkt (Abb. 3.5).

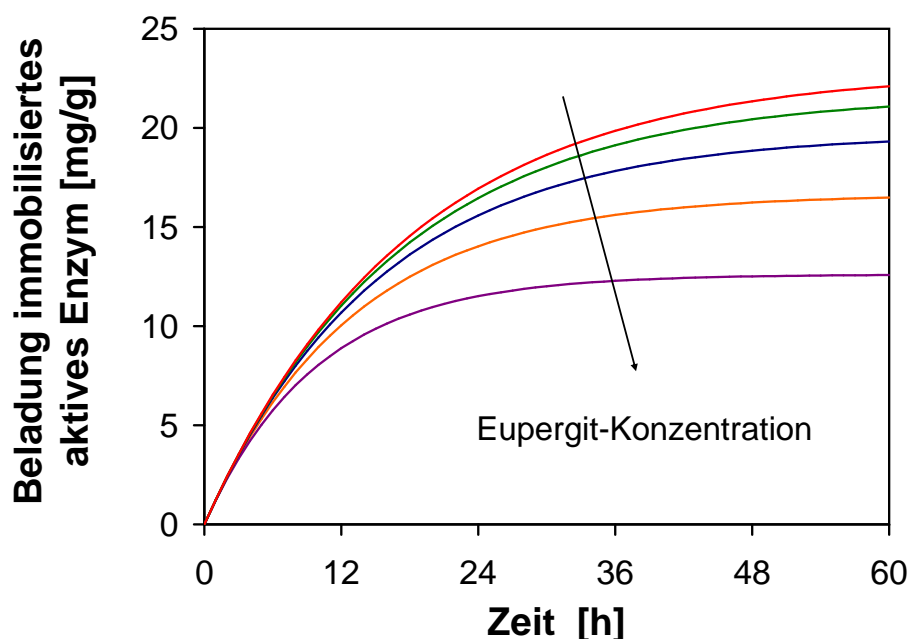


Abbildung 3.7: Einfluss der Eupergit-Konzentration auf die Trägerbeladung mit aktivem Enzym bei der Eupergit-Immobilisierung von Haloalkan-Dehalogenase DhaA bei 22°C.

Die Erhöhung der Eupergit-Konzentration führt zu einer gewünschten Zunahme der absoluten Masse an immobilisiertem aktivem Enzym. Als nachteilig kann aber die Abnahme der Beladung des

Trägers an aktivem Enzym angesehen werden (Abb. 3.7). Die Konsequenzen dieses Umstandes auf den Katalyseprozess des Enzyms werden ausführlich in Kap. 3.3 besprochen.

3.2.5 Einfluss der Temperatur bei der Immobilisierung

Die Immobilisierungsausbeute $Y_{Immobil}$ kann neben der Beeinflussung durch die Immobilisierungsdauer t und Eupergit-Konzentration $c_{Eupergit}$ zusätzlich durch die Immobilisierungstemperatur $T_{Immobil}$ beeinflusst werden, da die Geschwindigkeitskonstanten der Enzym-Inaktivierung k_1^{Inakt} und der Immobilisierung $k_{1,spez}^{Immobil}$ temperaturabhängig sind (Gl. 3.23).

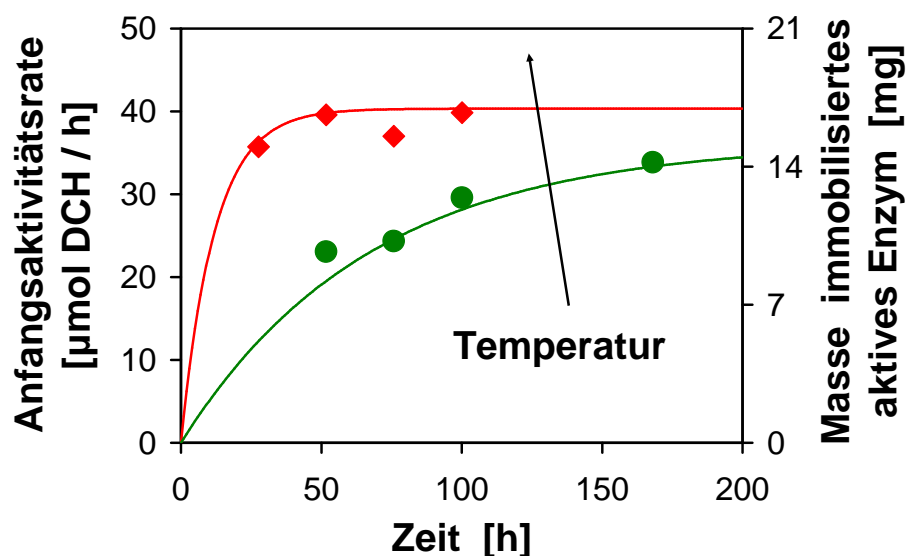


Abbildung 3.8: Einfluss der Immobilisierungstemperatur auf die gemessene Aktivität bei der Eupergit-Immobilisierung von Haloalkan-Dehalogenase DhaA bei 7°C (Kreise) und 22°C (Rauten), Eupergitkonzentration: 25 g/l.

Die Verläufe der gemessenen Anfangsaktivitätsrate von vergleichbaren Immobilisierungsproben sind für unterschiedliche Immobilisierungsdauern und -temperaturen in Abb. 3.8 dargestellt. Die Eupergit-Immobilisierung bei 22°C läuft vergleichsweise schnell ab und erreicht ihren Endzustand nach ca. 60 h. Bei einer Immobilisierungstemperatur von 7°C ist der Immobilisierungsfortschritt wesentlich langsamer, so dass auch nach 200 h noch eine Zunahme an immobilisiertem aktivem Enzym erkennbar ist. Unter ansonsten gleichen Bedingungen wird bei der höheren Immobilisierungstemperatur zu jeder Zeit eine größere Masse an immobilisiertem aktivem Enzym erzielt. Da die Immobilisierungsausbeute $Y_{Immobil}$ (Gl. 3.23) linear von dieser Masse abhängt, ist auch die Ausbeute für die Temperatur von 22°C zu jeder Zeit höher als für 7°C. Diese Tatsache ist in der größeren thermischen Aktivierung der Proteinimmobilisierungsreaktion gegenüber der Enzyminaktivierungsreaktion begründet. Beschreibt man die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten k_1^i durch den Arrheniusansatz,

$$k_1^i = A_i \cdot e^{-\frac{E_{A,i}}{R \cdot T}} \quad (3.24)$$

folgt aus obiger Schlussfolgerung, dass die Aktivierungsenergie $E_{A,Immobil}$ der Geschwindigkeitskonstante $k_1^{Immobil}$ der Immobilisierungsreaktion größer als die Aktivierungsenergie $E_{A,Inaktiv}$ der Geschwindigkeitskonstante $k_1^{Inaktiv}$ der Inaktivierungsreaktion ist.

$$E_{A,Immobil} > E_{A,Inaktiv} \quad (3.25)$$

Da die vorliegenden Untersuchungen lediglich bei zwei Temperaturen durchgeführt wurden, wurde auf eine Abschätzung der Aktivierungsenergien verzichtet. Aufgrund der größeren Enzym-Ausbeute als auch der immens größeren Raum-Zeit-Ausbeute ist eine Immobilisierung bei der höheren Temperatur vorzuziehen.

3.3 Auswirkungen der Immobilisierung auf die Reaktorgröße

Die Untersuchungen zur Eupergit-Immobilisierung der Haloalkan-Dehalogenase DhaA haben in den vorhergegangenen Abschnitten den großen Einfluss der verwendeten Eupergit-Konzentration $c_{Eupergit}$ offenbart. Insbesondere kann durch eine hohe Eupergit-Konzentration die Ausbeute $Y_{Immobil}$ an immobilisiertem aktiven Enzym verbessert werden. Gleichzeitig sinkt mit der Erhöhung der Eupergit-Konzentration die Beladung des Trägers mit aktivem Enzym q_{Enzym}^{Akt} (Kap. 3.2.4). Eine geringere Enzymbeladung bedeutet für die Auslegung des Synthesefestbettreaktors, in dem das immobilisierte Enzym zum Einsatz kommen soll, dass dieser Reaktor bei gleicher zu produzierender Menge Produkt entsprechend größer sein muss. Im Folgenden soll diese Auswirkung der Enzymbeladung auf die Reaktorgröße hergeleitet und quantifiziert werden. Die Betrachtung orientiert sich an der von MESSING, 1975 publizierten Herleitung.

Die Betrachtung soll für einen Festbettreaktor mit idealer Kolbenströmung ohne Unterscheidung in Bulk- und Porenphase in einer pseudohomogenen Betrachtung geschehen. Die Bilanzgleichung für den stationären Betrieb lautet:

$$u \cdot \frac{dc_S}{dx} - r_{Reaktion} = 0 \quad (3.26)$$

Die Leerrohrgeschwindigkeit u ergibt sich aus dem Verhältnis aus Volumenstrom \dot{V} zu Querschnittsfläche A_Q :

$$u = \frac{\dot{V}}{A_Q} \quad (3.27)$$

Als enzymkinetisches Modell soll das in Kap. 4.1 für die Haloalkan-Dehalogenase DhaA vorgestellte Michaelis-Menten-Modell mit kompetitiver Produktinhibierung herangezogen werden. Hieraus

folgt:

$$\dot{V} \frac{dc_S}{dx} = r_{Reaktion} = -A_Q \frac{\rho_{Eupergit} \cdot q_{Enzym}^{Akt} \cdot k_{cat} \cdot c_S}{K_M \cdot \left(1 + \frac{c_P}{K_I}\right) + c_S} \quad (3.28)$$

Neben den kinetischen Parameter k_{cat} , K_M und K_I gehen die Beladung des Trägers mit aktivem Enzym q_{Enzym}^{Akt} und die Schüttdichte von Eupergit $\rho_{Eupergit}$ in die Gleichung ein. Die Werte für die genannten Parameter seien konstant. Gleiches gilt für die geometrieabhängigen Größen Volumenstrom \dot{V} und Reaktorquerschnittsfläche A_Q .

Für die Integration der Differentialgleichung ist es erforderlich, die Produktkonzentration c_P durch die Massenbilanz

$$c_P = c_{S,0} - c_S \quad (3.29)$$

auszudrücken. Integriert man die Differentialgleichung durch Trennen der Variablen in den Grenzen $x = 0$ bis $x = L$ sowie $c_S = c_{S,0}$ bis $c_S = c_S$ und führt man den Umsatzgrad δ

$$\delta = \frac{c_{S,0} - c_S}{c_{S,0}} \quad (3.30)$$

ein, so ergibt sich folgender Zusammenhang:

$$\left(1 - \frac{K_M}{K_I}\right) \cdot c_{S,0} \cdot \delta - \left(1 + \frac{c_{S,0}}{K_I}\right) \cdot K_M \cdot \ln(1 - \delta) = \frac{A_Q}{\dot{V}} \cdot L \cdot \rho_{Eupergit} \cdot q_{Enzym}^{Akt} \cdot k_{cat} \quad (3.31)$$

Durch die Vorgabe eines gewünschten Umsatzgrades δ_{soll} kann die Reaktorgröße für den Syntheseprozess ausgelegt werden. Die linke Seite von Gl. 3.31 stellt somit einen konstanten Wert C dar. Mit

$$V_{Reaktor} = A_Q \cdot L \quad (3.32)$$

ergibt sich:

$$V_{Reaktor} = \frac{\dot{V} \cdot C}{\rho_{Eupergit} \cdot q_{Enzym}^{Akt} \cdot k_{cat}} \quad (3.33)$$

Um den Einfluss der Enzymbeladung auf die Reaktorgröße darzustellen, wird das Verhältnis zweier Reaktorgrößen gebildet, wodurch sich die als konstant angenommenen Größen heraus kürzen:

$$\frac{V_{Reaktor}}{V_{Reaktor,Referenz}} = \frac{q_{Enzym,Referenz}^{Akt}}{q_{Enzym}^{Akt}} \quad (3.34)$$

Mit Hilfe von Gl. 3.21 lässt sich somit ein Zusammenhang zwischen dem Verhältnis zweier Reaktorgrößen und der bei der Immobilisierung eingesetzten Eupergit-Konzentration herstellen:

$$\frac{V_{Reaktor}}{V_{Reaktor,Referenz}} = \frac{k_{1,spez}^{Imm} \cdot c_{Eupergit} + k_1^{Inakt}}{k_{1,spez}^{Imm} \cdot c_{Eupergit,Referenz} + k_1^{Inakt}} \cdot \frac{1 - e^{-(k_{1,spez}^{Imm} \cdot c_{Eupergit,Referenz} + k_1^{Inakt}) \cdot t}}{1 - e^{-(k_{1,spez}^{Imm} \cdot c_{Eupergit} + k_1^{Inakt}) \cdot t}} \quad (3.35)$$

Zur Veranschaulichung des gefundenen Zusammenhangs wird das Immobilisierungsexperiment aus Kap. 3.2.4, Abb. 3.4 wieder aufgegriffen. Für den Endzeitpunkt der Immobilisierung ($t = 51$ h) wird in Abb. 3.9 die relative Reaktorgröße mit der Referenz-Reaktorgröße für die höchste eingesetzte Eupergit-Konzentration ($c_{Eupergit} = 80$ g/l) dargestellt. Das Volumen $V_{Reaktor}$ des Festbettreaktors zur Stoffumsetzung kann erwartungsgemäß durch die Eupergit-Konzentration $c_{Eupergit}$ während des Immobilisierungsprozesses erheblich beeinflusst werden (Abb. 3.9).

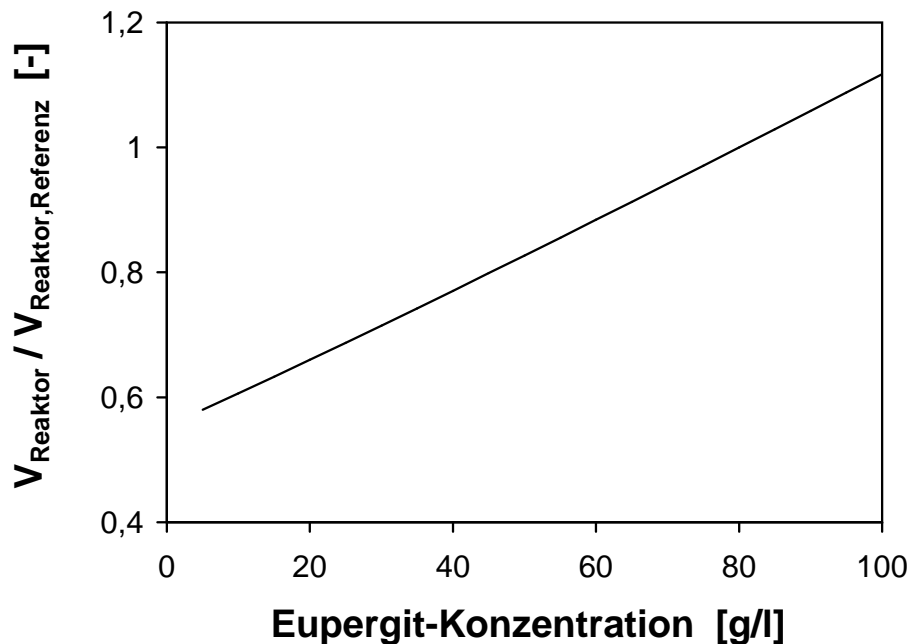


Abbildung 3.9: Einfluss der Eupergit-Konzentration auf die Reaktorgröße bei der Eupergit-Immobilisierung von Haloalkan-Dehalogenase DhaA bei 22°C (Linie: Beziehung nach Gl. 3.35, gewählter Referenzpunkt für $c_{Eupergit} = 80$ g/l).

In der vorgestellten Modellierung der Immobilisierung ist die ökonomische Bilanz nicht berücksichtigt worden. Durch deren Hinzunahme könnte das hier vorgestellte Modell erweitert werden, um die ökonomisch optimale Eupergit-Konzentration während der Immobilisierung zu finden. Neben der zusätzlichen Kosten-Bilanzierung müsste für diese wirtschaftliche Optimierung die Zielfunktion angepasst werden, um die Kosten für die Enzymherstellung, den Immobilisierungsträger, den Immobilisationsprozess sowie den Investitionskosten für den Synthese-Reaktor zu gewichten.

3.4 Zusammenfassung

In diesem Kapitel ist ein Modell der Eupergit-Immobilisierung der Haloalkan-Dehalogenase DhaA vorgestellt worden. Aufgrund der Abwesenheit von diffusiven Limitierungen beim Stofftransport in den Partikelporen sowohl beim Proteintransport während der Immobilisierung als auch beim Substrattransport während der Reaktionsexperimente kann auf eine Unterteilung in zwei Kompartimente (Bulk- und Porenphase) verzichtet und statt dessen auf eine pseudohomogene Betrachtung zurück-

gegriffen werden. Die während der Immobilisierung auftretende Inaktivierung des löslichen Enzyms kann durch eine Kinetik erster Ordnung modelliert werden. Die Dynamik der Immobilisierungsreaktion folgt einer bimolekularen Reaktion bezüglich Protein- und Eupergitkonzentration, wobei in den durchgeführten Experimenten keine Beeinträchtigung der Immobilisierungsrate durch eine Sättigung des Trägers aufgrund bereits immobilisierten Proteins beobachtet werden konnte.

Der Vergleich der Modelllösungen mit experimentellen Ergebnissen zeigt eine zufriedenstellende Übereinstimmung zwischen den berechneten Trägerbeladungen mit aktivem Enzym und den experimentell bestimmten Aktivitätsdaten. Die Variation der Proteinausgangskonzentration führte zu keiner Beeinflussung der Immobilisierungsausbeute an aktivem immobilisiertem Enzym. Ein großer Einfluss auf das Immobilisierungsergebnis konnte durch die Veränderung der Eupergit-Konzentration beobachtet werden. Eine Erhöhung der Eupergit-Konzentration führt zu einer gesteigerten Masse an aktivem immobilisiertem Enzym und dadurch zu einer erhöhten Immobilisierungsausbeute, gleichzeitig verringert sich die Beladung des Trägers an aktivem Enzym. Die Temperatur beeinflusst die Immobilisierung ebenfalls erheblich. Bei einer Temperatur von 7°C verlängert sich die benötigte Zeit für den Immobilisierungsprozess enorm und gleichzeitig wird aufgrund einer stärkeren thermischen Aktivierung der Immobilisierungsreaktion gegenüber der Enzym-Inaktivierung eine geringere Immobilisierungsausbeute erzielt. Immobilisierungen bei 22°C erzielen daher sowohl höhere Enzym-Ausbeuten als auch höhere Raum-Zeit-Ausbeuten gegenüber Immobilisierungen bei 7°C.

Die Auswirkungen der Eupergit-Konzentration bei der Immobilisierung auf die Reaktorgröße des vom immobilisierten Enzym katalysierten Reaktionsprozesses lassen sich durch die Bilanz für einen Festbettreaktor erfassen. Für die betrachtete Immobilisierung wurde eine starke Beeinflussung der Reaktorgröße ermittelt. Um die Bedeutung der Immobilisierung auf die Prozessentwicklung detailliert zu beschreiben und den Immobilisierungsprozess im Sinne des Gesamtprozesses weiter zu verbessern, müsste das hier vorgestellte Modell der Immobilisierung durch eine ökonomische Bilanz erweitert werden.

Kapitel 4

Kinetische Charakterisierung der Enzyme und Wahl der Prozessführung

In diesem Kapitel werden die eingesetzten Haloalkan-Dehalogenasen hinsichtlich ihrer kinetischen Eigenschaften charakterisiert, die Abhängigkeit der enzymkinetischen Parameter von Temperatur und pH-Wert beschrieben und darauf basierend eine geeignete Prozessführung für die enzymatische Haloalkan-Dehalogenierung von 1,2,3-Trichlorpropan zu 2,3-Dichlor-1-propanol ausgewählt.

4.1 Kinetische Beschreibung der enzymatischen Dehalogenierung von 1,2,3-Trichlorpropan

Für die gewünschte detaillierte Prozess-Modellierung der enzymatischen Dehalogenierung von 1,2,3-Trichlorpropan zu 2,3-Dichlor-1-propanol ist die Kenntnis des zugrunde liegenden Reaktionsmechanismus des Enzyms Voraussetzung. Auf der Grundlage dieses Mechanismus lässt sich die mathematische Beziehung zwischen der Reaktionsrate und den Einflussgrößen herleiten.

4.1.1 Identifikation der Kinetik der Haloalkan-Dehalogenasen DhaA und DSD4

Abb. 4.1 A zeigt die Abhängigkeit der spezifischen Anfangsaktivitätsrate von der Substrat-Konzentration für die an PEI-Alumina immobilisierte Haloalkan-Dehalogenase DhaA. Die Ergebnisse lassen sich durch eine Michaelis-Menten-Kinetik für eine irreversible Substrat-Produkt-Reaktion erfassen:

$$r = -\frac{dc_{TCP}}{dt} = \frac{k_{cat} \cdot c_{Enzym} \cdot c_{TCP}}{K_M + c_{TCP}} \quad (4.1)$$

Für PEI-Alumina-immobilisierte Haloalkan-Dehalogenase DSD4 ist in Abb. 4.1 B der analoge Vergleich zwischen spezifischer Anfangsreaktionsrate und Substrat-Konzentration aufgetragen. Auch

4. Kinetische Charakterisierung der Enzyme und Wahl der Prozessführung

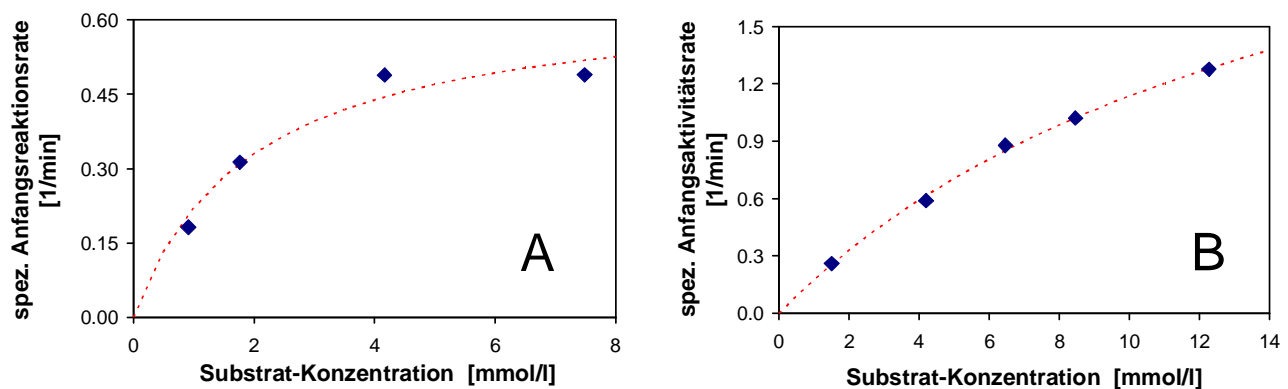


Abbildung 4.1: Abhängigkeit der spezifischen Anfangsreaktionsrate von der Substrat-Konzentration für Haloalkan-Dehalogenase DhaA (A) und DSD4 (B) bei 31°C und pH 9 (Punkte: Versuchsergebnisse, Linie: Michaelis-Menten-Modell).

für dieses Enzym ist eine Beschreibung der Messergebnisse durch die Michaelis-Menten-Kinetik möglich.

Zur vollständigen Beschreibung der katalytischen Fähigkeiten der beiden Haloalkan-Dehalogenasen DhaA und DSD4 muss zusätzlich der Einfluss des Reaktionsproduktes berücksichtigt werden. Die spezifische Anfangsreaktionsrate von Eupergit-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA in Abhängigkeit der Produkt-Konzentration ist in Abb. 4.2 A dargestellt.

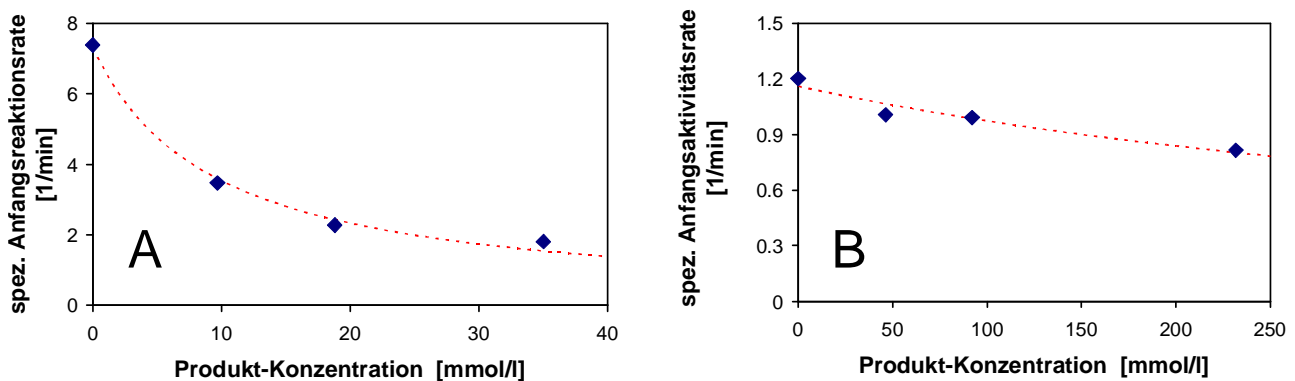


Abbildung 4.2: Abhängigkeit der spezifischen Anfangsreaktionsrate von der Produkt-Konzentration für Haloalkan-Dehalogenase DhaA (A) und DSD4 (B) bei 31°C und pH 9 (Punkte: Versuchsergebnisse, Linie: Michaelis-Menten-Modell mit kompetitiver Produkt-Inhibierung).

Die Anfangsreaktionsrate nimmt mit ansteigender Produkt-Konzentration erheblich ab. In den durchgeführten Experimenten konnte nicht eindeutig geklärt werden, welcher Inhibierungsmechanismus vorliegt (kompetitiv, nichtkompetitiv oder unkompetitiv). Aufgrund des geringen chemischen Unterschieds zwischen Substrat und Produkt wurde deshalb angenommen, dass eine kompetitive Produkt-Inhibierung vorliegt. Die kinetische Gleichung lautet:

$$r = -\frac{dc_{TCP}}{dt} = \frac{k_{cat} \cdot c_{Enzym} \cdot c_{TCP}}{K_M \cdot \left(1 + \frac{c_{DCH}}{K_I}\right) + c_{TCP}} \quad (4.2)$$

Die in der Abbildung dargestellte Modellkurve entspricht daher einer Michaelis-Menten-Kinetik mit kompetitiver Produktinhibierung. Die experimentellen Beobachtungen werden durch dieses Modell zufriedenstellend beschrieben. Für Haloalkan-Dehalogenase DSD4 lässt sich aufgrund ähnlicher Ergebnisse die gleiche Schlussfolgerung ziehen. In Abb. 4.2 B zeigt sich ebenfalls ein inhibierender Effekt des Produktes auf die Anfangsaktivität des Enzyms. Der experimentelle Verlauf kann wiederum durch einen um die kompetitive Produktinhibierung erweiterten Michaelis-Menten-Ansatz beschrieben werden.

4.1.2 Michaelis-Menten-Kinetik mit kompetitiver Produktinhibierung

Das Schema der Michaelis-Menten-Kinetik mit kompetitiver Produktinhibierung in Elementarreaktionen ist in Abb. 4.3 dargestellt. Enzym (E) und Substrat (S) bilden in einer reversiblen Reaktion den Enzym-Substrat-Komplex (ES), der irreversibel in Enzym und Produkt (P) zerfällt. Konkurrierend zu dieser Reaktionsfolge findet die reversible Bindung von Enzym und Inhibitor (I) zum Enzym-Inhibitor-Komplex (EI) statt. Jede dieser Elementarreaktionen ist durch eine Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung k_i charakterisiert. Für den hier betrachteten Fall der kompetitiven Produktinhibierung sind Produkt und Inhibitor ein und dieselbe Substanz.

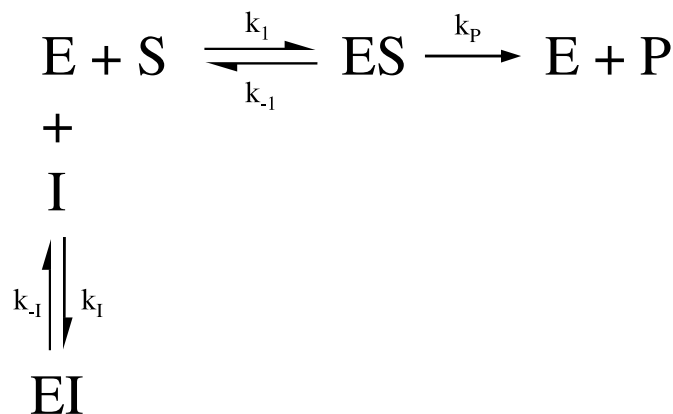


Abbildung 4.3: Schema der Michaelis-Menten-Kinetik in Elementarreaktionen.

Das System von 5 gekoppelten Differentialgleichungen, das diesen katalytischen Mechanismus beschreibt, lässt sich durch zwei Nebenbedingungen nach HALDANE, 1965 zur Michaelis-Menten-Gleichung vereinfachen. Die Massenbilanz des Enzyms und die Fließgleichgewichtsannahme für den Enzym-Substrat-Komplex ES führen für $S = \text{TCP}$ und $P = I = \text{DCH}$ zum Michaelis-Menten-Modell mit kompetitiver Produktinhibierung, das die Reaktionsrate r der enzymatischen Dehalogenierung beschreibt (Gl. 4.2).

Die Parameter der Michaelis-Menten-Kinetik k_{cat} , K_M und K_I lassen sich auf die Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung der Elementarreaktionen zurückführen:

$$k_{cat} = k_P \quad (4.3)$$

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_P}{k_{+1}} \quad (4.4)$$

$$K_I = \frac{k_{-I}}{k_{+I}} \quad (4.5)$$

4.2 Temperaturabhängigkeit der enzymkinetischen Parameter

Um das katalytische Verhalten der Haloalkan-Dehalogenasen bei unterschiedlichen Temperaturen beschreiben zu können, muss die Abhängigkeit der enzymkinetischen Parameter von der Temperatur adäquat berücksichtigt werden. Die dafür notwendigen theoretischen Überlegungen sowie die experimentellen Ergebnisse werden im Folgenden präsentiert.

4.2.1 Anwendung des Arrhenius-Ansatzes auf die kinetischen Parameter

Die temperaturabhängige Beschreibung der enzymkinetischen Parameter erfolgte über den Ansatz nach Arrhenius:

$$k_1 = A \cdot e^{-\frac{E_A}{R \cdot T}} \quad (4.6)$$

Der Arrhenius-Ansatz beschreibt die Temperaturabhängigkeit einer Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung k_1 mit Hilfe des Frequenzfaktors A , der Aktivierungsenergie E_A , der Gaskonstanten R sowie der absoluten Temperatur T . Wendet man diesen Ansatz auf die Definitionen der enzymkinetischen Parameter (Gln. 4.3 – 4.5) an, ergeben sich folgende Gleichungen:

$$k_{cat} = A_{cat} \cdot e^{-\frac{E_{A,cat}}{R \cdot T}} \quad (4.7)$$

$$K_M = \frac{A_{-1} \cdot e^{-\frac{E_{A,-1}}{R \cdot T}} + A_P \cdot e^{-\frac{E_{A,P}}{R \cdot T}}}{A_{+1} \cdot e^{-\frac{E_{A,+1}}{R \cdot T}}} \quad (4.8)$$

$$K_I = K_{I,\infty} \cdot e^{-\frac{E_{A,I}}{R \cdot T}} \quad (4.9)$$

Die katalytische Kapazität des Enzyms k_{cat} kann unmittelbar mit dem Ansatz von Arrhenius beschrieben werden. Die Produktinhibierungskonstante K_I kann als Gleichgewichtskonstante ebenso unmittelbar durch die Arrhenius-Gleichung formuliert werden.

Parameterschätzungen mit einem Modell der Michaelis-Menten-Kinetik in Elementarreaktionen zeigten, dass die Geschwindigkeitskonstante k_{-1} bei den Haloalkan-Dehalogenasen DhaA und DSD4 unter den betrachteten Reaktionsbedingungen um Größenordnungen kleiner als die Geschwindigkeitskonstante k_P ist. Aus diesem Grund kann sie in der Definition der Michaelis-Menten-Konstante K_M (Gl. 4.4) im Vergleich zu k_P vernachlässigt werden, so dass K_M ebenfalls den Charakter einer Gleichgewichtskonstanten annimmt. Die Temperaturabhängigkeit von K_M kann daher in Analogie zu der von K_I beschrieben werden:

$$K_M = K_{M,\infty} \cdot e^{-\frac{E_{A,M}}{R \cdot T}} \quad (4.10)$$

Das temperaturabhängig beschriebene Michaelis-Menten-Modell mit kompetitiver Produktinhibition, das für die kinetische Charakterisierung der Haloalkan-Dehalogenase DhaA eingesetzt wurde, beinhaltet sechs zu bestimmende Parameter und hat folgende Form:

$$r = -\frac{dc_{TCP}}{dt} = \frac{A_{cat} \cdot e^{-\frac{E_{A,cat}}{R \cdot T}} \cdot c_{Enzym} \cdot c_{TCP}}{K_{M,\infty} \cdot e^{-\frac{E_{A,M}}{R \cdot T}} \cdot \left(1 + \frac{c_{DCH}}{K_{I,\infty} \cdot e^{-\frac{E_{A,I}}{R \cdot T}}}\right) + c_{TCP}} \quad (4.11)$$

4.2.2 Ergebnisse

Mit den immobilisierten Haloalkan-Dehalogenasen DhaA und DSD4 wurden Reaktionsexperimente mit variiertem Substratanfangskonzentration bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt. Für DSD4 wurde zusätzlich die Produkthanfangskonzentration verändert, um den Produktinhibitionseinfluss bestimmen zu können. Die resultierenden Konzentrations-Zeit-Verläufe von Substrat und Produkt wurden zur Schätzung der kinetischen Parameter eingesetzt.

Der abgedeckte Temperaturbereich wurde durch Vorversuche mit löslichem Enzym bestimmt. Ab einer Temperatur von 45°C ist das kinetische Modell aufgrund der thermischen Inaktivierung nicht in der Lage, die Konzentrations-Zeit-Verläufe zu beschreiben.

Exemplarisch sind die Verläufe der enzymatischen Dehalogenierung von 1,2,3-Trichlorpropan mit Eupergit-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA bei vier unterschiedlichen Temperaturen in Abb. 4.2.2 dargestellt. In Tab. 4.1 sind die mit dem in Kap. 2.8 erläuterten Verfahren geschätzten enzymkinetischen Parameter sowie die Versuchsbedingungen wiedergegeben.

Erwartungsgemäß unterscheiden sich die geschätzten Parameterwerte für Eupergit- und PEI-Alumina-immobilisierte Haloalkan-Dehalogenase DhaA nur sehr geringfügig. Die Aktivierungsenergien $E_{A,cat}$ für DhaA als auch die für DSD4 weisen ebenfalls eine gute Übereinstimmung zueinander auf und liegen in einer ähnlichen Größenordnung, die SALLIS ET AL., 1990 für die Aktivierungsenergie einer Haloalkan-Dehalogenase aus *Rhodococcus erythropolis* Y2 ermittelt haben (43 kJ/mol). Anhand der Werte für $E_{A,M}$ und $E_{A,I}$ kann festgestellt werden, dass die kinetischen Parameter K_M und K_I einem nur sehr geringen thermischen Einfluss unterliegen. Der bemerkenswerteste Unterschied

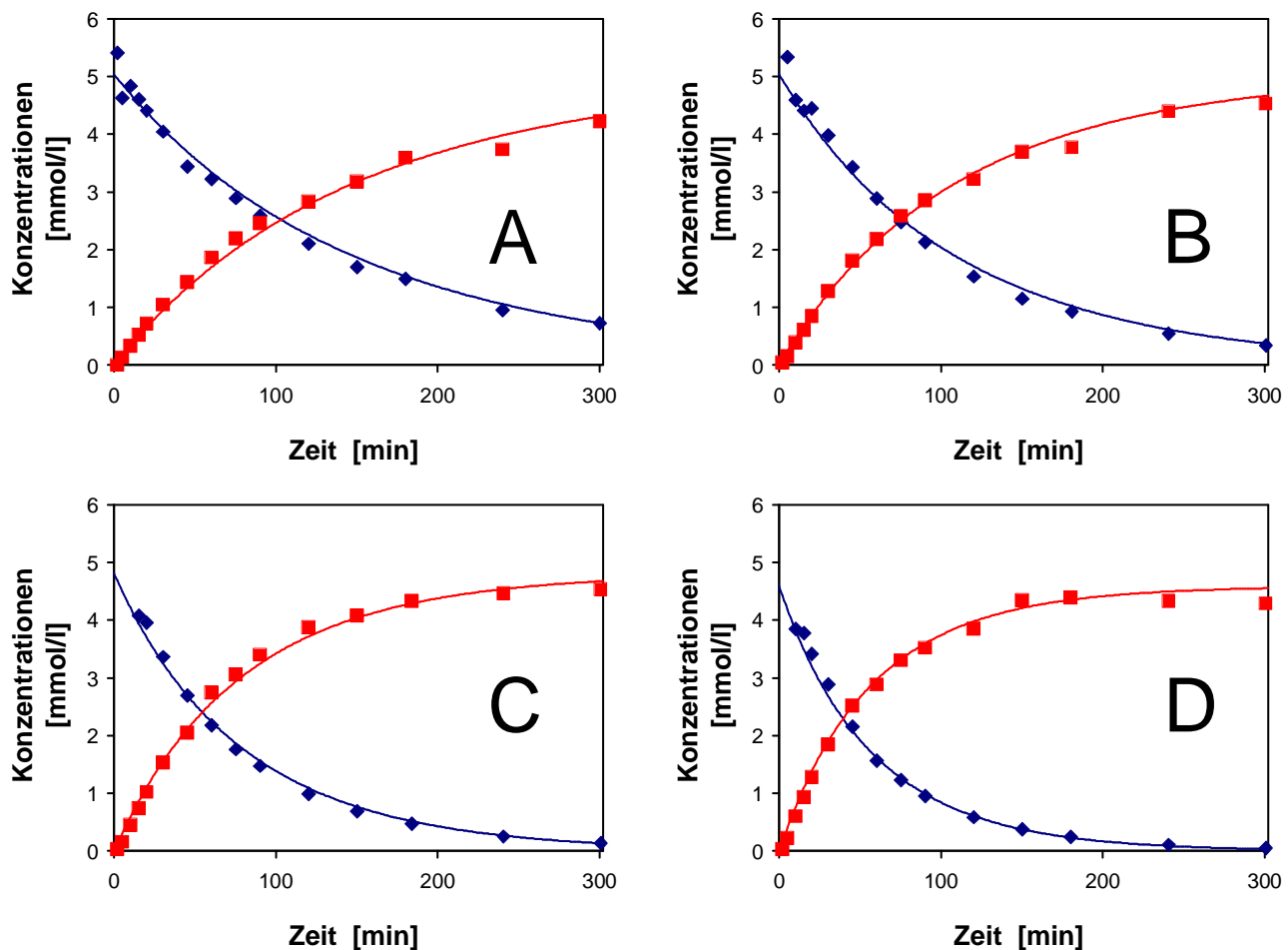


Abbildung 4.4: Temperatur-Einfluss auf die Aktivität von Haloalkan-Dehalogenasen DhaA immobilisiert an Eupergit (A: 25°C, B: 30°C, C: 35°C, D: 40°C).

zwischen den beiden eingesetzten Haloalkan-Dehalogenase-Enzymen ist der unterschiedlich stark ausgeprägte Produktinhibierungseinfluss. DSD4 weist eine um eine Größenordnung höhere Produktinhibierungskonstante $K_{I,\infty}$ auf, die allerdings mit einer höheren Michaelis-Menten-Konstante $K_{M,\infty}$ einhergeht. Aufgrund des praktisch zu vernachlässigenden thermischen Einflusses gilt dies auch für die Produktinhibierungskonstante K_I bei Reaktionstemperatur, so dass dieses Enzym erheblich weniger durch das Reaktionsprodukt inhibiert wird.

4.3 pH-Abhängigkeit der enzymkinetischen Parameter

Sämtliche Parameter einer Enzymkinetik können prinzipiell dem pH-Einfluss unterliegen. In der Literatur finden sich viele unterschiedliche Modellvorstellungen für diese Beeinflussung [SEGEL, 1993]. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Enzymen weisen eine nur schwach ausgeprägte pH-Abhängigkeit ihrer Aktivität auf. Diese Beobachtung deckt sich mit den von SALLIS ET AL., 1990 publizierten Ergebnisse für eine Haloalkan-Dehalogenase aus *Rhodococcus erythropolis* Y2, die das

Tabelle 4.1: Parameterwerte der temperaturabhängig beschriebenen Enzymkinetik

Enzym	DhaA	DhaA	DSD4	Einheit
Immobilisierung	Eupergit	PEI-Alumina	PEI-Alumina	
A_{cat}	3,71	6,79	1,47	$10^8/\text{min}$
$E_{A,cat}$	46,4	48,6	45,0	kJ/mol
$K_{M,\infty}$	2,17	1,79	9,96	mmol/l
$E_{A,M}$	0,08	-2,95	0,11	kJ/mol
$K_{I,\infty}$	1,77	1,56	25,6	mmol/l
$E_{A,I}$	-0,58	7,00	0,31	kJ/mol
Start-pH-Wert	9,0	9,0	9,0	-
Temperaturen	25, 30, 35, 40	25, 30, 35, 40	22, 31, 36	$^{\circ}\text{C}$
Substratkonzentrationen	2, 4, 6, 8, 10	2, 4, 6, 8, 10	1.5, 4, 6, 8, 12	mmol/l
Produktkonzentrationen ($c_{TCP,0} = 12 \text{ mmol/l}$)	-	-	0, 50, 100, 250	mmol/l

Aktivitätsoptimum bei pH 9,2 und im pH-Bereich 7,5 bis 11,0 mindestens 50 % der Maximalaktivität aufwies. Aufgrund des geringen Einflusses des pH-Wertes auf die kinetischen Eigenschaften der eingesetzten Enzyme wurde lediglich die Michaelis-Menten-Geschwindigkeitskonstante k_{cat} pH-abhängig beschrieben.

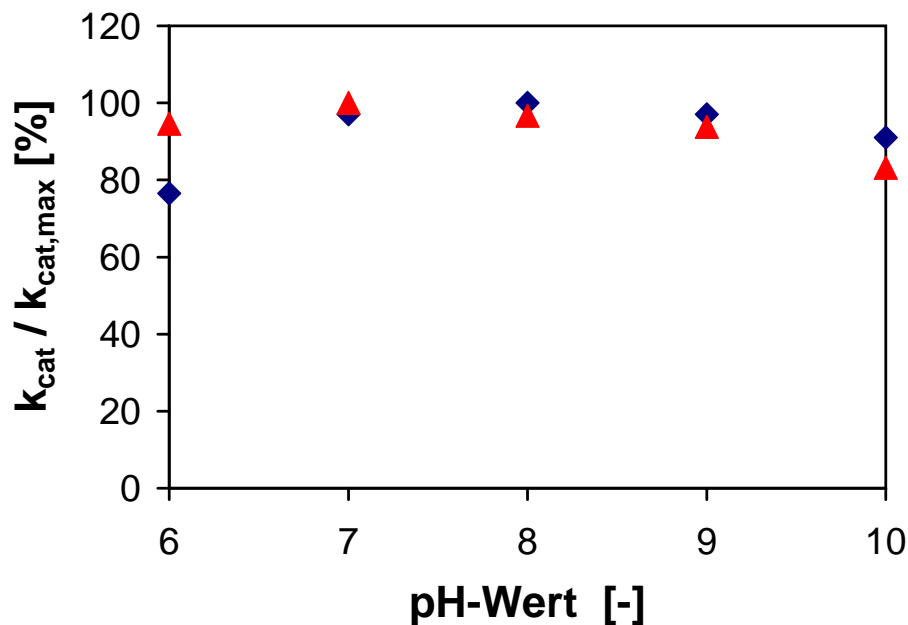


Abbildung 4.5: pH-Abhängigkeit der katalytischen Kapazität k_{cat} von Haloalkan-Dehalogenase DhaA bei einer Temperatur von 30°C (Dreieck: immobilisiert an Eupergit, Rauten: immobilisiert an PEI-Alumina).

Für Haloalkan-Dehalogenase DhaA ist die pH-Abhängigkeit von k_{cat} in Abb. 4.3 illustriert. Bezogen auf den maximal ermittelten Wert für die katalytische Kapazität des Enzyms $k_{cat,max}$ erreichen alle anderen Werte für k_{cat} mindestens 75%, wobei der überwiegende Teil der Ergebnisse

über 90% des Maximalwertes liegt. Der Einfluss des Immobilisierungsträger ist sehr gering, so dass sich die Ergebnisse für Eupergit- und PEI-Alumina-immobilisiertes DhaA sehr ähnlich sind. Zur mathematischen Beschreibung des pH-Einflusses auf k_{cat} wurden Polynome zweiter Ordnung gewählt.

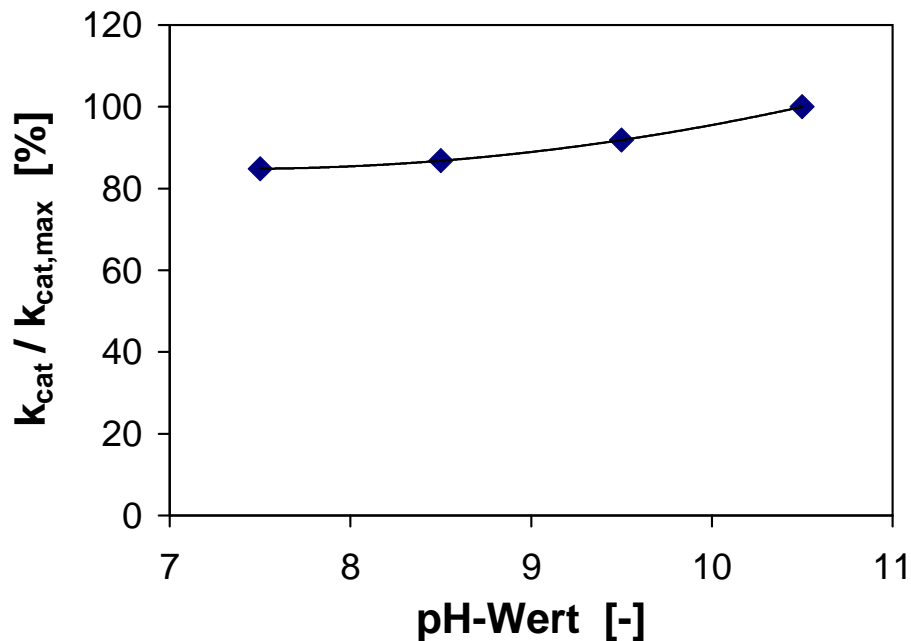


Abbildung 4.6: pH-Abhängigkeit der katalytischen Kapazität k_{cat} von Haloalkan-Dehalogenase DSD4 immobilisiert an PEI-Alumina bei einer Temperatur von 30°C (Rauten: experimentelle Ergebnisse, Linie: Polynom zweiter Ordnung).

Der pH-abhängige Verlauf der Michaelis-Menten-Geschwindigkeitskonstante k_{cat} für PEI-Alumina-immobilisierte Haloalkan-Dehalogenase DSD4 ist in Abb. 4.3 wiedergegeben. Der kleinste für die Geschwindigkeitskonstante k_{cat} gefundene Werte beträgt 85% des Maximalwertes, der sich für die höchste getestete pH-Stufe (pH = 10,5) ergab. Auf Messungen bei höheren pH-Werten wurde verzichtet, da ab einem pH-Wert = 11 mit der hydrolytischen Abspaltung eines weiteren Chloratoms von 2,3-Dichlor-1-propanol und dem Ringschluss zu Epichlorhydrin gerechnet werden muss.

Es wurde angenommen, dass sich die pH-Abhängigkeit der enzymkinetischen Parameter nicht mit der Temperatur verändert.

4.4 Reaktorauswahl für die enzymkatalysierte Dehalogenierung

Für den gewünschten kontinuierlichen Prozess der enzymatischen Dehalogenierung von 1,2,3-Trichlorpropan (TCP) stehen die beiden Standardreakortypen der Reaktionstechnik zur Wahl: kataly-

tischer Rohrreaktor und kontinuierlich betriebener Rührkessel (CSTR). Die Auswahl des Reaktortyps erfolgt durch eine Betrachtung der Verweilzeiten im Reaktor [LEVENSPIEL, 1999].

Mit Hilfe der Verweilzeit τ

$$\tau = \frac{V_{Reaktor}}{\dot{V}} \quad (4.12)$$

kann bei einem vorgegebenen Volumenstrom \dot{V} die Reaktorgröße $V_{Reaktor}$ ausgelegt oder bei vorgegebener Reaktorgröße entsprechend der einzustellende Volumenstrom ermittelt werden. Da bei einer gegebenen Reaktorgröße $V_{Reaktor}$ und zu produzierender Stoffmenge n die Raum-Zeit-Ausbeute RZA reziprok von der Verweilzeit τ abhängt,

$$RZA = \frac{n}{V_{Reaktor} \cdot \tau} \quad (4.13)$$

sollte im Sinne hoher Raum-Zeit-Ausbeuten die Verweilzeit im gewünschten Betriebspunkt möglichst klein sein.

Die Reaktionsrate r lautet für das Substrat TCP im idealen Rührkessel wie folgt:

$$\frac{dc_{TCP}}{dt} = -r \quad (4.14)$$

Mit der Stoffbilanz für den stationären Betriebspunkt des Rührkessels

$$c_{TCP,Inlet} - c_{TCP} = \frac{V_{Reaktor}}{\dot{V}} \cdot r \quad (4.15)$$

ergibt sich die Verweilzeit τ_{cstr} zu:

$$\tau_{cstr} = \frac{V_{Reaktor}}{\dot{V}} = \frac{c_{TCP,Inlet} - c_{TCP}}{r} \quad (4.16)$$

Die Verweilzeit τ_{cstr} im idealen Rührkessel stellt das Produkt aus umgesetztem Substrat und der inversen Reaktionsrate dar. In einem $1/r$ - c -Diagramm kann die Verweilzeit aus der rechteckigen Fläche zwischen der Substrateintrittskonzentration $c_{TCP,Inlet}$ und der gewünschten Austrittskonzentration c_{TCP} des Substrates sowie der Reaktionsrate $r(c_{TCP})$ bestimmt werden.

Für den idealen Rohrreaktor mit einer Querschnittsfläche A_Q kann die Verweilzeit τ_{Rohr} aus der Bilanz hergeleitet werden:

$$\frac{\dot{V}}{A_Q} \cdot \frac{dc_{TCP}}{dx} = -r \quad (4.17)$$

Durch die Trennung der Variablen kann die Differentialgleichung integriert werden,

$$\int_{c_{TCP,Inlet}}^{c_{TCP,Outlet}} \frac{dc_{TCP}}{r} = -\frac{A_Q}{\dot{V}} \int_0^L dx \quad (4.18)$$

so dass sich die Verweilzeit τ_{Rohr} ergibt:

$$\tau_{Rohr} = \frac{V_{Reaktor}}{\dot{V}} = \frac{A_Q \cdot L}{\dot{V}} = - \int_{c_{TCP,Inlet}}^{c_{TCP,Outlet}} \frac{dc_{TCP}}{r} \quad (4.19)$$

Für einen gewünschten Umsatz ergibt sich die Verweilzeit τ_{Rohr} als Integral der inversen Reaktionsrate in den Grenzen von Substrateintrits- und -austrittskonzentration. In Abbildung 4.4 sind für die beiden verwendeten Enzyme $1/r$ - c -Verläufe dargestellt, die mit Hilfe der im vorherigen Abschnitt für pH 9 und einer Temperatur von 30°C angegebenen Werte für die enzymkinetischen Parameter berechnet wurden. Die schraffierte Fläche stellt dabei die Verweilzeit τ_{Rohr} des Rohrreaktors und die Fläche des gestrichelten Rechtecks die Verweilzeit τ_{cstr} des idealen Rührkessels dar.

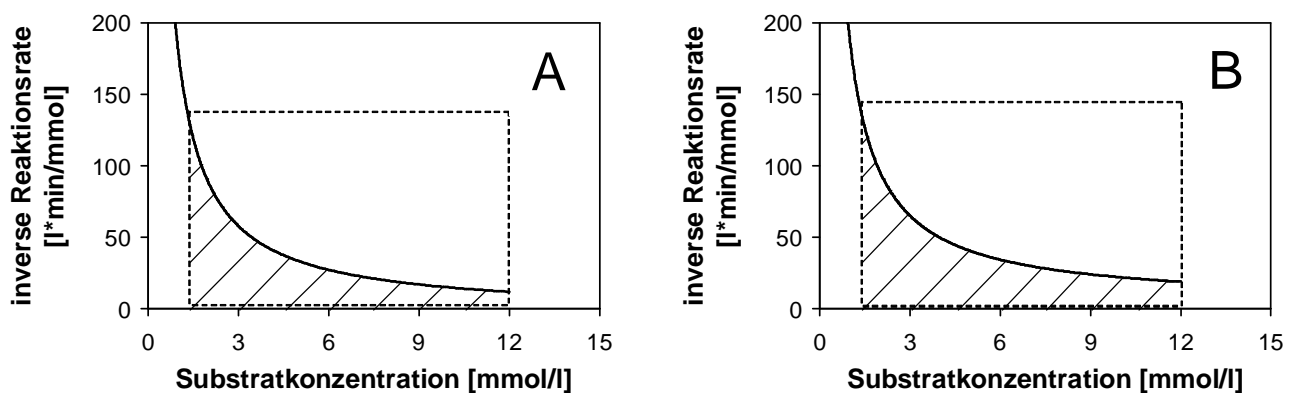


Abbildung 4.7: Prozessauslegung für Haloalkan-Dehalogenase DhaA (A) und DSD4 (B).

Aus den beiden Diagrammen ist klar ersichtlich, dass die Verweilzeit im Rohrreaktor wesentlich kleiner als im Rührkessel ist und somit höhere Raum-Zeit-Ausbeuten im Rohrreaktor zu erzielen sind. Aus diesem Grund stellt der Rohrreaktor die zu bevorzugende Reaktor-Wahl der enzymatischen Dehalogenierung von 1,2,3-Trichlorpropan dar. In der Haloalkan-Dehalogenase-Miniplant wurde der Rohrreaktor in Form eines Festbettes realisiert (Kap. 2.9.2).

Aufgrund der wesentlich höheren Löslichkeit von 2,3-Dichlor-1-propanol in Wasser als von 1,2,3-Trichlorpropan (Tab. 2.1) ist eine Prozessführung interessant, die ein Nachlösen von umgesetztem Substrat ermöglicht, um Produktkonzentrationen oberhalb der Substratlöslichkeit zu erzielen. Eine höhere Produktkonzentration könnte die der Synthese nachfolgenden Prozessschritte im industriellen Verbund (z.B. destillative Aufreinigung, Folgesyntheseschritt) hinsichtlich der Raum-Zeit-Ausbeute positiv beeinflussen. Sofern ein Bruttogewinn an Raum-Zeit-Ausbeute im Gesamtprozess zu erzielen wäre, könnten Einbußen in der Raum-Zeit-Ausbeute der enzymatischen Dehalogenierung aufgrund der Produktinhibierung in Kauf genommen werden. Auf Basis dieser Überlegungen wurde ein Prozesskonzept erarbeitet, das ein Nachlösen von 1,2,3-Trichlorpropan ermöglicht.

In Abb. 4.4 sind $1/r$ - c -Verläufe für variierte Produkthanfangskonzentrationen ($c_{DCH,0} = 0, 100, 200, 300 \text{ mmol/l}$) für die beiden eingesetzten Haloalkan-Dehalogenasen dargestellt. Aufgrund der wesentlich geringer ausgeprägten Produktinhibierung der Haloalkan-Dehalogenase DSD4 gegen-

über DhaA (Tab. 4.1) nimmt die Reaktionsrate für DSD4 wesentlich schwächer mit steigender Produktkonzentration als für DhaA ab. Aus diesem Grunde ist die Haloalkan-Dehalogenase DSD4 für diese Prozessführung auszuwählen. Die oben beschriebenen Überlegungen zur Reaktorauswahl treffen auch für diese Prozessführungsstrategie zu, so dass ein Rohrreaktor aufgrund der geringeren Verweilzeit einem Rührkesselreaktor vorzuziehen ist.

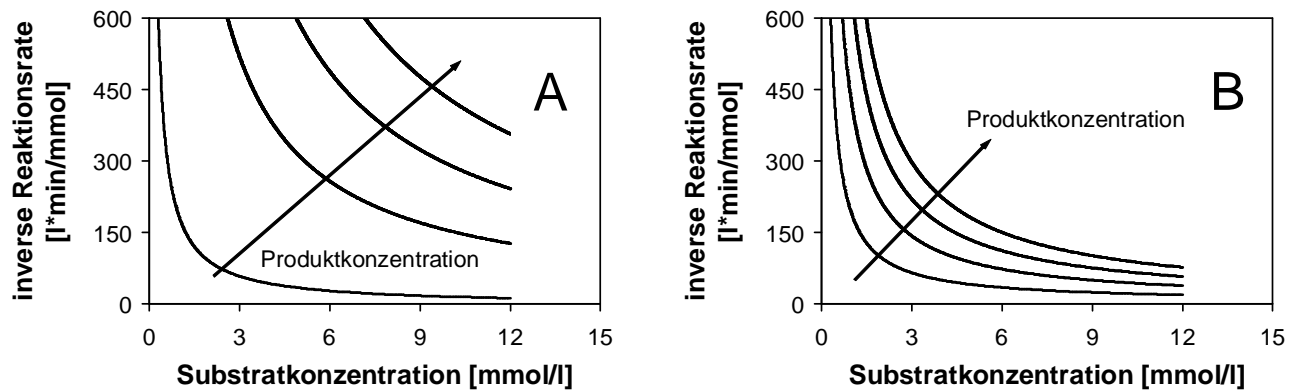


Abbildung 4.8: Prozessauslegung für Haloalkan-Dehalogenase DhaA (A) und DSD4 (B) bei hohen Produktkonzentrationen.

Bei dem Einsatz eines Rohrreaktors erfolgt das Nachlösen des Substrates in einem separaten Rührkessel, aus dem der Rohrreaktor versorgt und in den das aus dem Rohrreaktor austretende Medium wieder zurück geleitet wird. Abb. 5.6 zeigt das vereinfachte Fließschema dieses Rückführungsprozesses.

4.5 Zusammenfassung

Die enzymkinetischen Modelle zur Beschreibung des katalytischen Verhaltens der eingesetzten Haloalkan-Dehalogenasen sind in diesem Kapitel vorgestellt worden. Das kinetische Verhalten der Haloalkan-Dehalogenasen DhaA und DSD4 lässt sich mit einem Michaelis-Menten-Modell mit kompetitiver Produktinhibition beschreiben. Die verwendete Kinetik konnte durch Anwenden des Arrhenius-Ansatzes temperaturabhängig beschrieben werden. Die pH-Abhängigkeit der enzymkinetischen Parameter ist bei den hier betrachteten Haloalkan-Dehalogenasen nur schwach ausgeprägt.

Vergleicht man die katalytischen Eigenschaften der beiden verwendeten Haloalkan-Dehalogenasen, finden sich zwei wesentliche Unterschiede zwischen den Enzymen. Einerseits weist die Haloalkan-Dehalogenase DhaA eine wesentlich ausgeprägtere Affinität zum eingesetzten Substrat 1,2,3-Trichlorpropan auf als DSD4, die sich in einem geringeren Wert für die Michaelis-Menten-Konstante K_M erkennen lässt. Andererseits ist die Affinität zum Syntheseprodukt 2,3-Dichlor-1-propanol ebenfalls erheblich höher, so dass DhaA wesentlich stärker durch das Reaktionsprodukt inhibiert wird als DSD4. Der Temperatureinfluss auf die kinetischen Parameter ist bei den beiden Haloalkan-Dehalogenase vergleichbar. In erster Linie wird nur die katalytische Kapazität k_{cat} von der Tem-

peratur beeinflusst. Deren Aktivierungsenergien liegen im selben Größenordnungsbereich (45 - 49 kJ/mol). Die Beeinflussung der beiden anderen enzymkinetischen Konstanten K_M und K_I kann praktisch vernachlässigt werden, da die Werte für diese Aktivierungsenergien sehr gering sind. Die pH-Wert-Abhängigkeit ist bei beiden Enzymen relativ gering ausgeprägt, wobei DSD4 das katalytische Optimum bei einem höheren pH-Wert (pH 10.5) als DhaA (pH 7 - 8) erreicht.

Die Reaktorwahl für den kontinuierlichen Miniplant-Betrieb wurde basierend auf den kinetischen Daten getroffen. Aufgrund der höheren Raum-Zeit-Ausbeute wird ein Rohrreaktor gegenüber einem kontinuierlich betriebenen Rührkessel vorgezogen. Das gilt sowohl für das einmalige Durchströmen des Rohrreaktors mit dem Reaktionsmedium wie auch für das mehrmalige Durchströmen nach dem Nachlösen des verbrauchten Substrates zur Aufkonzentrierung des Produktes. Der Rohrreaktor wurde in der Miniplant in Form eines Festbettes realisiert.

Kapitel 5

Modellentwicklung des Haloalkan-Dehalogenase-Prozesses

Im vorhergehenden Kapitel wurde ein Festbettreaktor als vorteilhaft für die enzymatische Dehalogenierung von 1,2,3-Trichlorpropan zu 2,3-Dichlor-1-propanol identifiziert. In diesem Kapitel wird die im Konzept der *integrierten Miniplant-Technologie* wichtigen Modellierung für diesen Reaktortyp durchgeführt. Vorgestellt werden die Bilanzgleichungen zur Konzentrationbestimmung für Substrat und Produkt sowie das analytische Gleichungssystem zur Berechnung des pH-Wert-Profiles im katalytischen Festbettreaktors.

5.1 Herleitung der Bilanzgleichungen

Es wird ein (1+1)-dimensionales heterogenes Kontinuumsmodell für die Beschreibung des Festbettverhaltens eingesetzt. Die Struktur des Modells ist schematisch in Abb. 5.1 wieder gegeben. Die Bulkphase wird nur in Abhängigkeit der axialen Koordinate z beschrieben. Radiale Abhängigkeiten in der Bulkphase werden vernachlässigt. Dies ist zulässig, da erstens die als kugelförmig angenommenen Partikel mit einem Durchmesser D_P von 0,26 bzw. 0,574 mm klein gegenüber dem Reaktordurchmesser D_R von 50 mm sind. Ein Wandeffluss kann also vernachlässigt werden. Zweitens ist aufgrund der geringen Löslichkeit von 1,2,3-Trichlorpropan in Wasser ($c_{TCP,max} = 14$ mmol/l) und der geringen Reaktionsenthalpie der enzymatischen Dehalogenierung ($\Delta H_{Reaktion}^0 = -32,4$ kJ/mol) der durch die Reaktion freiwerdende Wärmestrom $\dot{Q}_{Reaktion}$ extrem gering. Wird bei einem Volumenstrom von $\dot{V} = 0,5$ l/h Vollumsatz erreicht, beläuft sich der freigesetzte Reaktionswärmestrom auf $\dot{Q}_{Reaktion} = -0,063$ W, der vernachlässigbar klein ist. Damit kann ein radialer als auch axialer Temperaturgradient vernachlässigt werden. Die Temperatur wurde im gesamten Reaktor als konstant angenommen, eine Energiebilanz muss damit nicht explizit berücksichtigt werden.

In den Reaktor mit dem Volumen V_R , der Länge L und der über die Länge konstanten Querschnittsfläche A_Q tritt der Volumenstrom \dot{V} mit den Konzentrationen $c_{TCP,0}$ und $c_{DCH,0}$ sowie

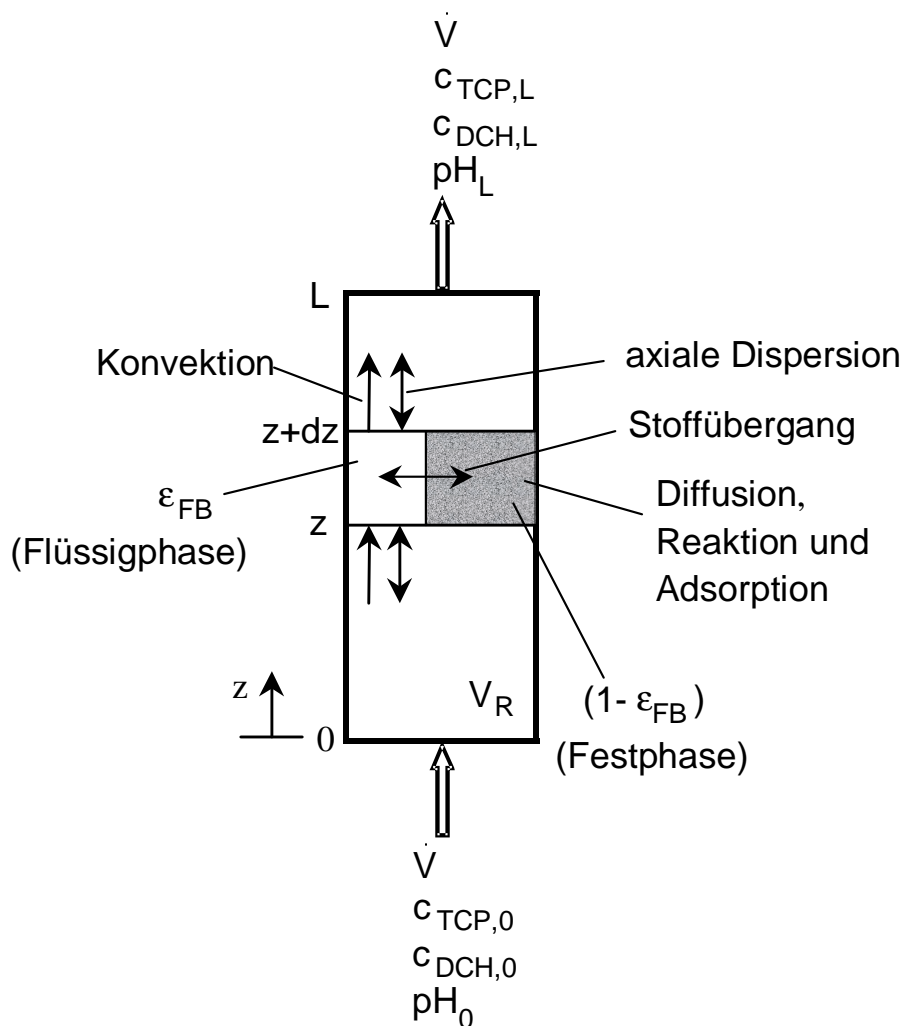


Abbildung 5.1: Struktur des eingesetzten (1+1)-dimensionalen heterogenen Kontinuumsmodell [INDLEKOFER, 1996].

dem pH-Wert pH_0 . Der Volumenstrom \dot{V} ist konstant, da eine Volumenänderung durch die Reaktion vernachlässigt werden kann. Den Reaktor verlässt ein ebenso großer Volumenstrom, die Austrittskonzentrationen sind $c_{TCP,L}$ und $c_{DCH,L}$, der pH-Wert am Austritt ist pH_L . Das Reaktorvolumen V_R teilt sich in das Flüssigvolumen der Bulkphase $\epsilon_{FB} \cdot V_R$ und das Volumen der Festphase $(1 - \epsilon_{FB}) \cdot V_R$. Der Leerraumanteil der Schüttung ϵ_{FB} stellt das Verhältnis von Zwischenkornvolumen zu Reaktorvolumen dar, das über die gesamte Schüttungslänge als konstant angesehen wird. Damit werden Druck- und Schwerkrafteinflüsse auf die Schüttung vernachlässigt. Nach Eintreten in den Reaktor werden die Gelöststoffe durch die aufgeprägte Strömung konvektiv in der Bulkphase durch den Reaktor transportiert. Gleichzeitig finden in der Bulkphase Ausgleichsvorgänge durch ungleichmäßige Strömungsverteilung, Wirbelbildung und Rückdiffusion statt, die durch einen Dispersionsansatz im Modell berücksichtigt und durch den Parameter des axialen Dispersionskoeffizienten D_{ax} beschrieben werden. Durch Konzentrationsgradienten zwischen der Flüssigphase und der Porenflüssigkeit im Korn kommt es zu einem Stoffaustausch zwischen Bulk und Partikelporen,

der durch einen Stoffaustauschkoeffizienten $k_{f,i}$ charakterisiert ist. Die Partikelporen weisen im Verhältnis zum Gesamtpartikelvolumen den Hohlraumanteil der Partikel ϵ_P auf. In den Poren verläuft der Stofftransport rein diffusiv, Konvektion in den Poren des Kornes wird ausgeschlossen. Die Beschreibung der behinderten Diffusion in den Poren geschieht durch die Verwendung eines effektiven Diffusionskoeffizienten $D_{i,eff}$. Die Reaktion wird durch das an der internen Oberfläche immobilisierte Enzym mit einer Reaktionsrate r_i katalysiert (Kap. 4). Die beschriebenen Vorgänge in den Partikelporen sind von einer reversiblen Adsorption von TCP und DCH an den Träger überlagert, die neben der Akkumulation der Komponenten in der Porenflüssigkeit eine zusätzliche Stoffspeicherung darstellen und das dynamische Verhalten des Reaktors stark beeinflusst. Die Modellvorstellung der in den Kornporen auftretenden physikalisch-chemischen Vorgänge ist in Abb. 5.2 dargestellt.

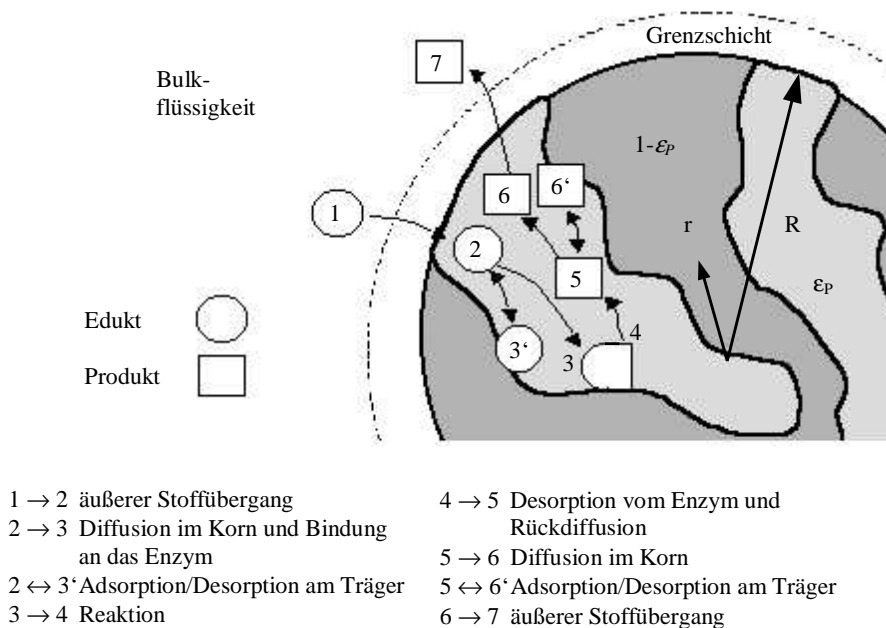


Abbildung 5.2: Im Modell berücksichtigte physikalisch-chemische Vorgänge in den Partikelporen der Enzymträger.

5.1.1 Bilanzierung der Bulk-Phase

Durch eine Bilanzierung am in Abb. 5.1 skizzierten Volumenelement dz lässt sich die Differentialgleichung zur Bestimmung der Bulkkonzentrationen $c_{b,i}$ von 1,2,3-Trichlorpropan (TCP) und 2,3-Dichlor-1-propanol (DCH) herleiten. Der Index b steht für Bulk und i im Folgenden sowohl für TCP als auch DCH.

$$\frac{\partial c_{b,i}}{\partial t} = -\frac{u_0}{\epsilon_{FB}} \frac{\partial c_{b,i}}{\partial z} + D_{ax} \frac{\partial^2 c_{b,i}}{\partial z^2} - \frac{1 - \epsilon_{FB}}{\epsilon_{FB}} \frac{3}{R} k_{f,i} (c_{b,i} - c_{p,i}^l(z, r = R)) \quad (5.1)$$

Die Bestimmung der Parameterwerte für den Hohlraumanteil der Festbettschüttung ϵ_{FB} , den axialen Dispersionskoeffizienten D_{ax} , den Stoffübergangskoeffizienten $k_{f,i}$ und den Partikeldurch-

messer R der Immobilisationsträger ist in Kap. 5.2 beschrieben. Die Leerrohrgeschwindigkeit u_0 ergibt sich aus dem Verhältnis des Volumenstroms \dot{V} und des Reaktorquerschnitts A_Q :

$$u_0 = \frac{\dot{V}}{A_Q} \quad (5.2)$$

Die Bulkbilanz stellt eine partielle Differentialgleichung zweiter Ordnung dar, zu deren Lösung zwei Randbedingungen und eine Anfangsbedingung für jede Komponenten i benötigt werden.

$$c_{b,i}(t, z = 0) = c_{b,i}^0 - \frac{D_{ax}}{u_0} \cdot \left. \frac{\partial c_{b,i}}{\partial z} \right|_{z=0} \quad (5.3)$$

$$\frac{\partial c_{b,i}(t, z = L)}{\partial z} = 0 \quad (5.4)$$

$$c_{b,i}(t = 0, z) = 0 \quad (5.5)$$

Zur Lösung zusätzlich erforderlich ist die Kenntnis der Konzentrationen $c_{p,i}^l(z, r = R)$ am Partikelrand. Diese Konzentrationen lassen sich durch das simultane Lösen der Bilanz für die Partikelporen bestimmen, die im nächsten Abschnitt beschrieben wird.

5.1.2 Bilanzierung der Partikelporen-Phase

Die Differentialgleichung zur Bestimmung der intrapartikulären Konzentrationsverläufe werden durch eine Bilanz an einer Kugelhülle des Partikel der Dicke dr gewonnen (Abb. 5.2). Durch die Adsorption von Substrat und Produkt an den Träger müssen sowohl die Flüssigkonzentrationen $c_{p,i}^l$ als auch die Feststoffkonzentrationen $c_{p,i}^f$ berücksichtigt werden.

$$\epsilon_p \frac{\partial c_{p,i}^l}{\partial t} + (1 - \epsilon_p) \frac{\partial c_{p,i}^f}{\partial t} = D_{i,eff} \left(\frac{\partial^2 c_{p,i}^l}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c_{p,i}^l}{\partial r} \right) + \rho_p \cdot RA \cdot X_{E,0} \cdot r_i \quad (5.6)$$

Die Feststoffkonzentrationen $c_{p,i}^f$ können durch eine Adsorptionsisotherme bestimmt werden. Diese Adsorptionsisotherme drückt das Gleichgewicht zwischen Feststoff- und Flüssigkonzentration in einer mathematischen Form aus:

$$c_{p,i}^f = f(c_{p,i}^l) \quad (5.7)$$

Unter der Annahme eines Gleichgewichts zwischen Flüssig- und Feststoffkonzentration kann die Feststoffkonzentration $c_{p,i}^f$ aus der Bilanz der Partikelporen (Gl. 5.6) durch

$$\frac{\partial c_{p,i}^f}{\partial t} = \frac{\partial c_{p,i}^f}{\partial c_{p,i}^l} \cdot \frac{\partial c_{p,i}^l}{\partial t} \quad (5.8)$$

eliminiert werden, so dass sich die Poren-Bilanz zu folgendem Ausdruck vereinfacht:

$$\left(\epsilon_p + (1 - \epsilon_p) \frac{\partial c_{p,i}^l}{\partial c_{p,i}^l} \right) \frac{\partial c_{p,i}^l}{\partial t} = D_{i,eff} \left(\frac{\partial^2 c_{p,i}^l}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c_{p,i}^l}{\partial r} \right) + \rho_p \cdot RA \cdot X_{E,0} \cdot r_i \quad (5.9)$$

Die Partikelbilanz stellt ebenfalls eine partielle Differentialgleichung zweiter Ordnung dar, für deren Lösung zwei Rand- und eine Anfangsbedingung erforderlich sind.

$$\frac{\partial c_{p,i}^l(t, r = R)}{\partial r} = \frac{k_{f,i}}{D_{i,eff}} (c_{b,i} - c_{p,i}^l(r = R)) \quad (5.10)$$

$$\frac{\partial c_{p,i}^l(t, r = 0)}{\partial r} = 0 \quad (5.11)$$

$$c_{p,i}^l(t = 0, r) = 0 \quad (5.12)$$

Die Beschreibung und Abschätzung der in die Partikelporen-Bilanz eingehenden Parameter Hohlraumanteil der Partikel ϵ_p , effektiver Diffusionskoeffizient $D_{i,eff}$, Schüttungsdichte der Partikel ρ_p , Enzymrestaktivität RA , Enzymbeladung des Trägers $X_{E,0}$ und die Beschreibung der Adsorption von Substrat und Produkt an den Träger erfolgt in Kap. 5.2. Die Reaktionsrate r_i und deren Parameter wurden ausführlich in Kap. 4 besprochen.

5.1.3 pH-Modellierung

Bei der enzymatischen Dehalogenierung von 1,2,3-Trichlorpropan (TCP) entsteht neben 2,3-Dichlor-1-propanol (DCH) äquimolar Salzsäure (HCl) (vgl. Reaktionsschema Abb. 1.1). Die freigesetzte Salzsäure bewirkt eine Veränderung des pH-Wertes des Reaktionsmediums. Die Reaktionsrate der enzymkatalysierten Dehalogenierung ist pH-Wert-abhängig (Kap. 4.3), so dass es zur einer Rückkopplung zwischen Reaktionsprodukt und Reaktionsrate kommt. Um diese Rückwirkung im Festbettmodell berücksichtigen zu können, ist eine Berechnung des pH-Wertes im Festbett erforderlich. Neben der Reaktion beeinflusst die Pufferung des Mediums den pH-Wert. Das analytische Gleichungssystem zur Berechnung des pH-Wertes, das simultan zum Differentialgleichungssystem gelöst werden muss und die beiden genannten Faktoren berücksichtigt, wird im folgenden vorgestellt.

Die Berechnung des pH-Wertes erfolgt mit Hilfe des negativen dekadischen Logarithmus der Protonenkonzentration im Medium c_{H^+} :

$$pH = -\log_{10}(c_{H^+}) \quad (5.13)$$

Die Protonenkonzentration stellt sich in Abhängigkeit der Dissoziation von Salzsäure, Wasser und des Puffers unter der Einhaltung der Elektroneutralität ein. Als weitere Bestimmungsgleichungen kommen Massenbilanzen zum Einsatz.

Die während der Reaktion entstehende Salzsäure liegt als starke Säure nahezu komplett dissoziiert vor. Das Dissoziationsgleichgewicht wird durch die Dissoziationskonstante von Salzsäure K_{HCl} charakterisiert, die HEINEMANN, 2003 entnommen wurde.

$$K_{HCl} = \frac{c_{H^+} \cdot c_{Cl^-}}{c_{HCl}} = 10^7 \text{ mol/l} \quad (5.14)$$

Ein analoger Ansatz beschreibt in Abhängigkeit der Temperatur T das Dissoziationsgleichgewicht des verwendeten TRIS-Puffers [DEUTSCHER, 1990],

$$K_{TRIS} = \frac{c_{H^+} \cdot c_{TRIS}}{c_{TRISH^+}} = 10^{-7.96+0.028 \cdot (T-30^\circ C)} \text{ mol/l} \quad (5.15)$$

für den die folgende Massenbilanz gilt:

$$c_{Puffer} = c_{TRIS} + c_{TRISH^+} \quad (5.16)$$

Als weitere Bedingungen müssen das Ionenprodukt des Wassers [HEINEMANN, 2003]

$$K_{H_2O} = c_{H^+} \cdot c_{OH^-} = 10^{-13.996} \text{ mol}^2 / \text{l}^2 \quad (5.17)$$

und die Elektroneutralität des Mediums berücksichtigt werden:

$$c_{H^+} + c_{TRISH^+} + c_{Na^+} = c_{OH^-} + c_{Cl^-} \quad (5.18)$$

Die in Gl. 5.18 angegebene Konzentration von Natriumionen muss in die Modellierung einbezogen werden, da die pH-Einstellung des Mediums mit Natronlauge (NaOH) erfolgt. Sie lässt sich unter der Annahme berechnen, dass der Puffer vor der pH-Wert-Einstellung vollständig als $TRISH^+$ vorlag. Diese Annahme ist gerechtfertigt, da der TRIS-Puffer in der Gebrauchsform TRIS-HCl eingesetzt wurde und durch die Dissoziation der Salzsäure ein pH-Wert weit unterhalb des pK-Wertes von TRIS vorlag. Die Natriumionenkonzentration, die sich im Reaktor nicht verändert, entspricht damit der TRIS-Konzentration am Reaktoreintritt.

$$c_{Na^+} = c_{TRIS}(z = 0) \quad (5.19)$$

Die Protonenkonzentration c_{H^+} an einer bestimmten Stelle im Reaktor ist festgelegt durch die am Reaktoreinlass $z = 0$ eingetretene Menge an Protonen und die durch die Reaktion entstandene Menge Protonen, wobei ein Teil davon durch den Puffer als $TRISH^+$ gebunden wird. Da im Festbettzulauf kein DCH vorliegt und in der Reaktion äquimolare Mengen an DCH und Salzsäure entstehen, kann über die DCH-Konzentration an einer bestimmten Stelle im Reaktor die gebildete Menge an Protonen berechnet werden. Durch diese Massenbilanz berechnet sich die Protonenkonzentration c_{H^+} an jeder Stelle im Reaktor aus der Summe der Protonen-Eintrittskonzentration

$c_{H^+,0}$ und der DCH-Konzentration c_{DCH} , vermindert um die Differenz der $TRISH^+$ -Konzentration c_{TRISH^+} an der entsprechenden Stelle und der $TRISH^+$ -Zulaufkonzentration $c_{TRISH^+,0}$.

$$c_{H^+} + c_{TRISH^+} = c_{DCH} + c_{TRISH^+,0} + c_{H^+,0} \quad (5.20)$$

Zur Bestimmung des pH-Wertes müssen sieben unbekannte Konzentrationen bestimmt werden. Zu deren Berechnung stehen sieben voneinander unabhängige Gleichungen (Gln. 5.14 – 5.20) zur Verfügung, so dass das analytische Gleichungssystem lösbar ist. Aufgrund der grossen Anzahl an Variablen wurde das erläuterte Gleichungssystem zur Berechnung des Medium-pH-Wertes nur in Abhängigkeit der Reaktorvariablen z angelegt. Der pH-Wert wurde in radialer Richtung als konstant angesehen mit dem Wert für die entsprechende Stelle z des Reaktors. Aufgrund der sehr geringen radialen Konzentrationsänderungen ist diese Vereinfachung akzeptabel.

Eine Änderung des pH-Wertes im Zulauf wirkt sich nach Gl. 5.20 ohne Verzögerung auf alle Stellen im Reaktor aus. Dieses Verhalten entspricht keinesfalls der Realität, sondern ist ein Nachteil dieser vereinfachten Modellierung des pH-Wertes über algebraische Beziehungen. Für die hier vorgestellten dynamischen Experimente zieht dies jedoch keine Einschränkungen nach sich. Bei Experimenten, in denen der Volumenstrom sprunghaft verändert wurde, wurde die Förderung aus ein und demselben Vorlagebehälter durchgeführt. Bei Experimenten, bei denen der Zulaufkessel für eine sprunghafte Konzentrationsveränderung gewechselt wurde, wurde sichergestellt, dass in beiden Behältern derselbe pH-Wert eingestellt war.

Das hier vorgestellte pH-Modell berücksichtigt nicht die puffernde Wirkung der Aminosäuren, aus denen die immobilisierten Enzyme aufgebaut sind. Auf die Beschreibung dieses Effektes wurde verzichtet, da die Dissoziationskonstanten der einzelnen Aminosäuren durch die intramolekularen Wechselwirkungen in den Enzymen stark von den Dissoziationskonstanten der Aminosäuren in freier Lösung abweichen ($pK_{eingebaut} = pK_{frei} \pm 1$). Bisher ist keine rationale Vorhersage dieser Eigenschaftsänderung bekannt. Eine rein empirische Anpassung an die experimentellen Daten wurde zu Gunsten einer vereinfachten pH-Modellierung verworfen. Aus diesem Grunde erfolgt die modellmässige Beschreibung der Dynamik der pH-Wert-Änderung wesentlich rascher als diese im Experiment beobachtet wird.

5.2 Abschätzung der Modellparameter

In diesem Abschnitt wird das entwickelte Festbettmodell durch die Bestimmung der Parameter komplettiert. Da der Reaktor bei verschiedenen Temperaturen betrieben wurde, wird auf die im Schrifttum bekannt gewordene Temperaturabhängigkeit der Parameter eingegangen. Die Parameterwerte basieren zum Teil auf Messungen, zum Teil werden sie über Korrelationen abgeschätzt.

5.2.1 Partikeldurchmesser

Im Modell werden die Enzymträgerpartikel als ideale Kugeln mit einheitlichem Radius R angenommen. Tatsächlich unterliegen die Partikel der Immobilisierungsträger einer Grössenverteilung und weichen von der angenommenen Kugelform ab. Die Korngrössenverteilung wurde am Institut für Mechanische Verfahrenstechnik (IMVT) der Universität Stuttgart mit einem Mastersizer 2000 mit Hydro 2000G Dispergiermodul (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK) ermittelt. In Abbn. 5.3 A und 5.3 B sind die gemessenen Korngrössenverteilungen für Eupergit und PEI-Alumina dargestellt.

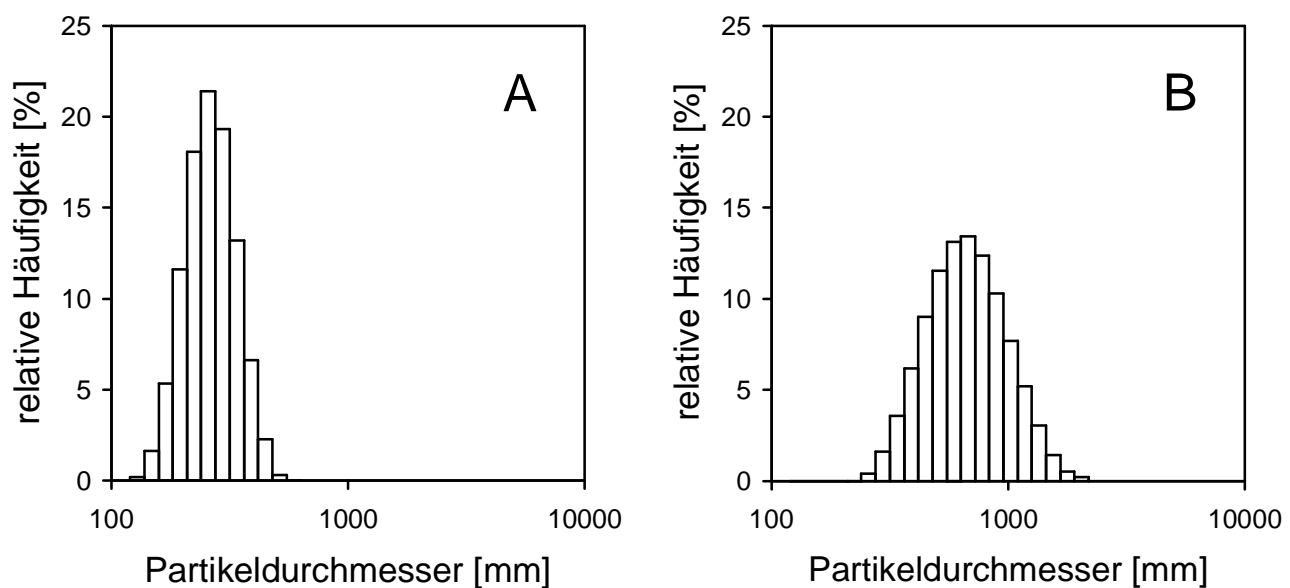


Abbildung 5.3: Korngrössenverteilung von Eupergit C (A) und PEI-Alumina (B).

Für Eupergit ist eine sehr schmale Korngrössenverteilung zu erkennen. Die Annahme eines einheitlichen Partikeldurchmesser ist deshalb sehr gut begründet. Der mittlere Partikeldurchmesser des im feuchten Zustand vermessenen Eupergits beträgt 260 μm . Die Verteilung der Korngrössen für PEI-Alumina ist breiter als für Eupergit. Allerdings kann auch in diesem Fall für die Modellierung von einem einheitlichen Partikeldurchmesser ausgegangen werden. Für PEI-Alumina beträgt der mittlere Partikeldurchmesser 574 μm .

5.2.2 Enzymbeladung der Träger

Die Beladung der Immobilisierungsträger mit Enzym $X_{E,0}$ wurde im Rahmen der Immobilisierungen bestimmt (Kap. 2.5). Waren mehrere Immobilisierungen zur Befüllung des Reaktors erforderlich, wurde die mittlere Beladung bestimmt. Die Enzymbeladungen beziehen sich auf trocken eingewogene Trägermassen.

5.2.3 Hohlraumanteile der Festbettschüttung und der Partikel

Der Leerraumanteil der Schüttung ϵ_{FB} ist definiert als das Verhältnis von Zwischenkornvolumen zu Reaktorvolumen. Bei der Reaktorbefüllung wurde darauf geachtet, eventuelle Lufteinschlüsse zu verhindern und die Schüttung durch Rütteln zu homogenisieren. Randeinflüsse werden wie in Kap. 5.1 beschrieben vernachlässigt. Druck- und Schwerkrafteinflüsse werden nicht berücksichtigt, da nur moderate Druckbelastungen auftreten und die Schüttungshöhe so gering ist, daß das Eigengewicht der Schüttung keinen Einfluss hat. Eine Volumenänderung der Partikel im Betrieb wurde ausgeschlossen. Damit kann von einem sowohl zeitlich wie auch örtlich konstanten Wert für den Leerraumanteil der Festbettschüttung ausgegangen werden.

Experimentelle Bestimmungen von Festbetthohlraumanteilen sind sehr fehlerbehaftet und deren Ergebnisse unterliegen einer breiten Streuung. Es wurde daher auf eine Messung von ϵ_{FB} verzichtet und statt dessen eine theoretische Abschätzung herangezogen.

Der Hohlraumanteil einer geordneten Packung monodisperser Kugeln liegt in einem Intervall zwischen $\epsilon_{FB} = 0,259$ für die kubisch-flächenzentrierte Packung und $\epsilon_{FB} = 0,476$ für die einfache kubische Packung. Für regellose monodisperse Schüttungen wird der Hohlraumanteil laut VDI, 1988 mit $\epsilon_{FB} = 0,36$ bis $0,42$ angegeben. Für polydisperse Schüttungen sei der Hohlraumanteil stets kleiner als für Schüttungen aus gleich großen Partikeln [VDI, 1988]. Für Eupergit wurde aufgrund der engeren Korngrößenverteilung (Kap. 5.2.1) ein Wert von $\epsilon_{FB} = 0,4$ und für Alumina $\epsilon_{FB} = 0,37$ angenommen.

Der Hohlraumanteil der Partikel ϵ_p , der den Anteil des Porenvolumens am Gesamtvolumen der Immobilisationspartikel angibt, wurde für Eupergit den Herstellerangaben (Tab. 2.3) sowie für Alumina DRAVIS ET AL., 2001 entnommen.

5.2.4 Schüttungsdichte der Immobilisierungsträger

Die Schüttungsdichte der Partikel ρ_p vernachlässigt die Porosität der Träger und geht davon aus, dass das gesamte Partikelvolumen zur Masse des Trägers beiträgt. Es lässt sich aus der trocken eingewogenen Masse an Immobilisierungsmatrix $m_{Träger}$, dem Schüttungshohlraumanteil ϵ_{FB} und dem Reaktorvolumen V_R berechnen:

$$\rho_p = \frac{m_{Träger}}{(1 - \epsilon_{FB}) \cdot V_R} \quad (5.21)$$

Für Eupergit ergab sich eine Schüttungsdichte ρ_p von 302 g/l und für Alumina von 516 g/l.

5.2.5 Effektive Diffusionskoeffizienten in den Partikelporen

Zur Bestimmung von effektiven Diffusionskoeffizienten $D_{i,eff}$ in porösen Trägermaterialien wurde von PPATHANASIOU ET AL., 1988 ein experimentelles Vorgehen vorgeschlagen. Für die hier

verwendeten Trägermaterialien und eingesetzten chlorierten Kohlenwasserstoffen konnte in einer Abschätzungsrechnung entsprechend des dort angegebenen Vorgehens gezeigt werden, dass mit diesem Stoffsystem keine verlässliche experimentelle Bestimmung der effektiven Diffusionskoeffizienten durchgeführt werden kann. Die für die manuelle Probennahme zur Verfügung stehende Zeitspanne würde maximal 20 Sekunden betragen, so dass keine ausreichende Datenbasis für eine Regression generiert werden kann.

Aus diesem Grunde muss der effektive Diffusionskoeffizient $D_{i,eff}$ über eine empirische Korrelation der Art

$$D_{i,eff} = f(D_{i,0}) \quad (5.22)$$

ermittelt werden.

Es existiert eine große Zahl empirischer Korrelationen zur Bestimmung des binären Diffusionskoeffizienten $D_{i,0}$ der Komponente i in verdünnter Lösung, die eine gute Übereinstimmung mit vermessenen Testsystemen zeigen. Die Methode nach *Wilke-Chang* [PERRY, 1997] erfüllt dieses Kriterium am besten und wurde zur Berechnung der Diffusionskoeffizienten von TCP und DCH in freier Lösung verwendet:

$$D_{i,0} = 7,4 \cdot 10^{-8} \cdot \sqrt{2,26 \cdot M_{H_2O}} \cdot \frac{T}{\eta_{H_2O} \cdot \nu_i^{0,6}} \quad (5.23)$$

Neben der Temperatur T und dem Molekulargewicht M_{H_2O} von Wasser geht das molare Volumen ν_i der Gelöststoffe bei Siedetemperatur und Normdruck in die Berechnung ein, das REID ET AL., 1977 entnommen wurde. Zur Berechnung der temperaturabhängigen Viskosität η_{H_2O} des Mediums wird eine empirische Gleichung eingesetzt [PERRY, 1997].

$$\eta_{H_2O} = \exp\left(A + \frac{B}{T} + C \cdot T + D \cdot T^2\right) \quad (5.24)$$

Die verwendeten Parameter wurden PERRY, 1997 entnommen (Tab. 5.1)

Tabelle 5.1: Parameter zur Viskositätsbestimmung

Parameter	Wert
A	$-2,471 \cdot 10^{-1}$
B	$4,209 \cdot 10^3$
C	$4,527 \cdot 10^{-2}$
D	$-3,376 \cdot 10^{-5}$

Die Diffusion in den Trägerporen unterscheidet sich erheblich von der Diffusion in freier Lösung. Die maximale Diffusionsstrecke wird durch den Partikelradius ausgedrückt. Die Poren bilden ein komplexes und verwinkeltes Netzwerk, sodass die tatsächliche maximale Diffusionsstrecke größer als der Partikelradius ist. In den Poren kommt es zudem zu Wechselwirkungen zwischen Träger und

Gelöststoff. Der effektive Diffusionskoeffizient im Korn bestimmt sich daher aus dem Diffusionskoeffizienten in freier Lösung, korrigiert um einen Faktor, der die geometrischen Eigenschaften des Trägers berücksichtigt.

BAILEY, OLLIS, 1986 geben eine Beziehung an, die die genannten Phänomene explizit berücksichtigt:

$$D_{eff,i} = D_{0,i} \cdot \frac{\epsilon_p}{\tau} \cdot \left(1 - \frac{R_i}{R_{Pore}}\right)^4 \quad (5.25)$$

Der Klammerterm kann für die hier betrachteten chlorierten Kohlenwasserstoffe praktisch vernachlässigt werden, da das Verhältnis des Molekülradiuses $R_{TCP} = 0.081$ nm zum mittleren Porenradius $R_{Pore} = 5$ bzw. 40 nm sehr klein ist. Neben dem Hohlraumanteil der Partikel ϵ_p geht der Tortuositätsfaktor τ in die Gleichung zur Abschätzung des effektiven Diffusionskoeffizienten ein. Die Werte für τ liegen laut PERRY, 1997 typischerweise zwischen 2 und 6. DRAVIS ET AL., 2001 haben daher für ihre Abschätzung des effektiven Diffusionskoeffizienten in PEI-Alumina-Poren einen Wert von $\tau_{PEI-Alumina} = 4$ angenommen. Dieses Vorgehen wurde in dieser Arbeit übernommen, so dass der effektive Diffusionskoeffizient in PEI-Alumina-Poren 8,1% des Diffusionskoeffizienten in freier Lösung beträgt. Für Eupergit ist kein Wert des Tortuositätsfaktors τ bekannt. SPIESS ET AL., 1999 waren in der Lage den effektiven Diffusionskoeffizienten von PenicillinG in Eupergit-Poren zu messen, dessen Wert sie mit 30% des Diffusionskoeffizienten in freier Lösung angeben. Mit Hilfe des Molekülradiuses von PenicillinG ($R_{PenG} \approx 0.2$ nm) konnte der Tortuositätsfaktor für Eupergit zu $\tau_{Eupergit} = 2,27$ abgeschätzt werden. Für Substrat und Produkt der betrachteten enzymatischen Dehalogenierung ergibt sich damit ein Verhältnis des effektiven Diffusionskoeffizienten in den Eupergit-Poren zum Diffusionskoeffizient in freier Lösung von 33%.

5.2.6 Axialer Dispersionskoeffizient

Der axiale Dispersionskoeffizient D_{ax} beschreibt die Abweichung der realen Strömung im Rohrreaktor von einer idealen Kolbenströmung. Die komplexen hydrodynamischen Effekte, wie Strömungsungleichverteilung, Rückvermischung durch Turbulenz und molekulare Diffusion, werden gemeinsam durch diesen Parameter berücksichtigt.

CHUNG, WEN, 1968 haben die Ergebnisse von Dispersionskoeffizientenbestimmungen in Festbettschüttungen mehrerer Autoren zusammen getragen. Für die Pecletzahl Pe_{ax} , eine dimensionslose Kennzahl, die den dispersiven ins Verhältnis zum konvektiven Stoffstrom stellt, geben sie folgende empirische Korrelation an:

$$\epsilon_{FB} \cdot Pe_{ax} = \epsilon_{FB} \cdot \frac{d_p \cdot u_0}{D_{ax}} = 0,2 + 0,0011 \cdot Re^{0,48} \quad (5.26)$$

Mit Hilfe dieser Gleichung wurde der axiale Dispersionskoeffizient D_{ax} im verwendeten Modell unter Kenntnis der Leerrohrgeschwindigkeit u_0 , des Hohlraumanteils der Schüttung ϵ_{FB} , des Parti-

keldurchmessers d_p , der kinematischen Viskosität des Mediums ν und der Reynoldszahl Re

$$Re = \frac{d_p u_0}{\nu} \quad (5.27)$$

berechnet. Der Temperatureinfluss ist implizit durch die vorgestellte Gleichung zur Bestimmung der Viskosität (Gl. 5.24) berücksichtigt.

5.2.7 Stoffübergangskoeffizient

Zur Abschätzung des Stoffübergangskoeffizienten sind zahlreiche empirische Korrelationen veröffentlicht worden, die in der Regel vom Typ

$$Sh = f(Re, Sc) \quad (5.28)$$

sind. Die Sherwoodzahl Sh wird dabei in Abhängigkeit der Reynoldszahl Re und der Schmidtzahl Sc beschrieben, deren Definitionen wie folgt lauten:

$$Sh = \frac{k_{f,i} \cdot d_p}{D_{i,0}} \quad (5.29)$$

$$Re = \frac{d_p \cdot u_0}{\nu} \quad (5.30)$$

$$Sc = \frac{\nu}{D_{i,0}} \quad (5.31)$$

Die Gleichung von Wilson und Geankoplis [PERRY, 1997]

$$Sh = \frac{1,09}{\epsilon_{FB}} \cdot Re^{1/3} \cdot Sc^{1/3} \quad (5.32)$$

deckt auch den Bereich sehr kleiner Reynoldszahlen ab. Sie ist gültig in folgenden Grenzen:

$$0,016 < Re < 55 \quad (5.33)$$

$$165 < Sc < 70600 \quad (5.34)$$

$$0,35 < \epsilon_{FB} < 0,75 \quad (5.35)$$

Der Gültigkeitsbereich der Reynoldszahl wurde üblicherweise in den Festbettreaktorexperimenten eingehalten, lediglich einmal wurde er minimal unterschritten ($Re = 0,015$). Die Schmidtzahl nimmt einen Wert von 1100 an und liegt damit im Gültigkeitsbereich der Korrelation. Die Temperaturabhängigkeit ist implizit über den Diffusionskoeffizienten und die Viskosität gegeben.

5.2.8 Adsorptionsisotherme

Batchexperimente zur Bestimmung des Adsorptionsverhaltens von 1,2,3-Trichlorpropan und 2,3-Dichlor-1-propanol an die eingesetzten Immobilisationsträger legten die Vermutung eines reversiblen linearen Zusammenhangs zwischen den im Gleichgewicht stehenden Feststoff- und Flüssigkonzentrationen nahe.

$$c_{p,i}^f = m_i \cdot c_{p,i}^l \quad (5.36)$$

Für das in der Porenbilanz (Gl. 5.9) benötigte partielle Differential ergibt sich somit:

$$\frac{\partial c_{p,i}^f}{\partial c_{p,i}^l} = m_i \quad (5.37)$$

Eine verlässliche Quantifizierung der Adsorptionsgleichgewichtskonstanten m_i war in den Laborexperimenten aufgrund der immensen Streuung der Ergebnisse nicht möglich. Die Streuung ergab sich aus der begrenzten Trägerkonzentration in Batchexperimenten und des Messfehlers der Konzentrationsbestimmung. Aufgrund der geringen Konzentrationsänderung in den Adsorptionsversuchen kommt der in Kap. 2.6 angegebenen Messungenauigkeit für TCP und DCH von 2,6 bzw. 3,9 % einer signifikante Bedeutung zu. Aus diesen Ergebnissen konnte daher keine quantitative Beschreibung des Adsorptionsverhalten von Substrat und Produkt erzielt werden.

Stattdessen wurden die Werte der Adsorptionsparameter mit Hilfe der in Kap. 6 vorgestellten zeitlichen Konzentrationsverläufe dynamischer Festbettexperimenten unter Annahme eines linearen Adsorptionsverhaltens geschätzt. Dieses Vorgehen hat den Vorteil, dass im Festbett die maximal erzielbare Trägerkonzentration vorliegt und durch das Sprungexperimente grosse Konzentrationsänderungen erzielt werden können, so dass der Einfluss des Messfehlers erheblich verringert wird.

Die Adsorptionsparameter wurden mit dem in Kap. 5.4 beschriebenen Simulationsprogramm aus der Minimierung der relativen Fehlerquadratsumme geschätzt. In die Parameteranpassung wurden die Ergebnisse mehrerer dynamischer Experimente einbezogen. In Tab. 5.2 sind die geschätzten Werte der Adsorptionsgleichgewichtskonstanten m_i für die beiden Immobilisationsträger, die Anzahl der zur Parameterschätzung hinzugezogenen dynamischen Experimente sowie deren in Kap. 6 verwendete Bezeichnung in Klammern angegeben.

Tabelle 5.2: Zusammenstellung der Adsorptionsgleichgewichtskonstanten von Substrat und Produkt

Träger	TCP	DCH	Einheit	Dynamische Experimente	Temperatur
Alumina	1,51 (± 4,1 %)	0,80 (± 5,3 %)	-	5 (E - I)	30°C
Eupergit	8,13 (± 1,1 %)	3,03 (± 3,7 %)	-	4 (A - D)	35°C

Aus den Werten für die Gleichgewichtskonstanten der Adsorptionsisothermen m_i geht hervor, dass die Adsorption an den Immobilisationsträger Eupergit wesentlich stärker ist als für PEI-Alumina. Neben den geschätzten Werte sind die prozentualen Standardfehler SF der Gleichgewichtskonstanten in Klammern angegeben. Sie sind ein Mass für die Bestimmungsgüte des Parameters. Mit Hilfe des Standardfehlers kann der Vertrauensbereich eines geschätzten Parameters berechnet werden, der sich für ein 95-prozentiges Konfidenzniveau nach folgender Beziehung bestimmen lässt:

$$(1 - 2 \cdot SF) \cdot m_{i,geschätzt} < m_{i,tat} < (1 + 2 \cdot SF) \cdot m_{i,geschätzt} \quad (5.38)$$

Das durch diese Beziehung aufgespannte Intervall beläuft sich für die Adsorptionsgleichgewichtskonstanten m_i zwischen 2,2 % und 10,6 %, so dass die Parameter als ausreichend gut bestimmt angesehen werden können.

5.2.9 Enzymrestaktivität

Enzyme unterliegen einer thermischen Inaktivierung, so dass im Verlauf des Miniplant-Betriebs der Anteil des aktiven Enzyms zum ursprünglich aktiven Enzym abnimmt. Der in die Partikelporenbilanz eingehende Parameter Enzymrestaktivität RA ist entsprechend auf Basis der Enzymbeladung des Trägers definiert:

$$RA = \frac{X_E^{akt}}{X_{E,0}^{akt}} \quad (5.39)$$

Die Enzymrestaktivität RA wird für jedes Experiment durch Minimierung der relativen Fehlerquadratsumme geschätzt. Bei Fließgleichgewichtsexperimenten wurden dazu die gemessenen Konzentrationen von Substrat und Produkt entlang des Reaktors verwendet. Für die Auswertung dynamischer Experimente wurde die Restaktivität an die Reaktorauslasskonzentrationen vor und nach den dynamischen Veränderungen angepasst.

5.2.10 Startwerte zur Lösung des Festbettmodells

Bei den Miniplant-Versuchen wurden kleine Schwankungen in der Substrateintrittskonzentration $c_{TCP,0}$ in den Festbettreaktor beobachtet (Abb. 5.1). Diese Variationen haben ihre Ursache in dem Adsorptions- / Desorptionsverhalten von 1,2,3-Trichlorpropan an die medienbenetzten Oberflächen der Anlage, einem sehr geringen Zerfall des Substrates in den Medienkesseln, dem sehr langsamen Lösen des Substrates im Medium sowie der Ungenauigkeit der gaschromatografischen Konzentrationsbestimmung. Um die Schwankungen auszugleichen, wurde bei stationären Versuchen eine Mittelung der Summe aus Substrat- und Produktkonzentrationen an den fünf Probennahmestellen des Festbettreaktors vorgenommen und dieser arithmetische Mittelwert $\bar{c}_{TCP,0}$ als Startwert $c_{TCP,0}$ für die Substrateintrittskonzentration zur Lösung des Festbettmodells verwendet:

$$\bar{c}_{TCP,0} = \frac{\sum_{i=1}^5 (c_{TCP,i} + c_{DCH,i})}{5} \quad (5.40)$$

Diese Mittelwertbildung wird in Abb. 5.4 veranschaulicht.

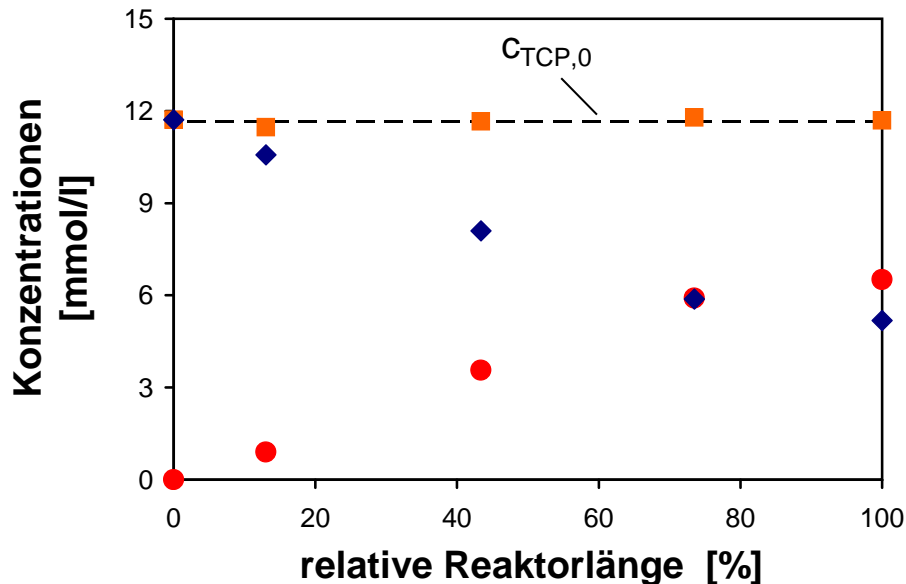


Abbildung 5.4: Ermittlung des Startwerts $c_{TCP,0}$ für die Lösung des Festbettmodells bei stationären Experimenten (Rauten: TCP, Kreise: DCH, Quadrate: TCP + DCH, gestrichelte Linie: Mittelwert von TCP + DCH der fünf Probennahmestellen und Startwert $\bar{c}_{TCP,0}$ zum Lösen des Festbettmodells).

Bei dynamischen Experimenten wurde ein analoges Vorgehen gewählt, indem während der beiden stationären Zustände die Summe von Substrat- und Produktkonzentration am Reaktorlauss gemittelt wurde und als Startwert der Substrateintrittskonzentration $c_{TCP,0}$ für die Lösung des Festbettmodells verwendet wurde (Abb. 5.5).

Systematische Abweichungen konnten bei diesem Vorgehen nicht beobachtet werden, so dass durch das Modell nicht berücksichtigte Effekte im Festbettreaktor ausgeschlossen werden können.

5.3 Modellierung des Rückführungsprozesses

Die erzielbaren Produktkonzentrationen sind aufgrund der geringen Substratlöslichkeit sehr niedrig. Eine Steigerung der Produktkonzentration ist durch eine Rückführung des Produktstroms und ein Nachlösen von umgesetztem Substrat möglich. Aus dem Fließschema eines solchen Rückführungsprozesses (Abb. 5.6) wird ersichtlich, dass für diese Verfahrensvariante neben der Festbettmodellierung zusätzlich der Rührkessel modelliert und mit dem Festbettmodell verknüpft werden muss, um eine Vorhersage des Gesamtprozessverhaltens zu ermöglichen.

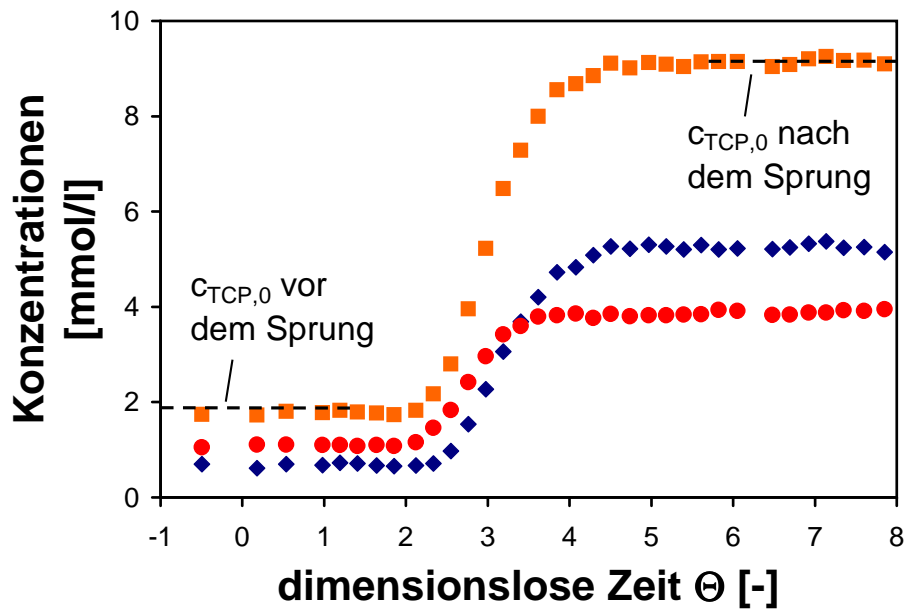


Abbildung 5.5: Ermittlung des Startwerts $c_{TCP,0}$ für die Lösung des Festbettmodells bei dynamischen Experimenten (Rauten: TCP, Kreise: DCH, Quadrate: TCP + DCH, gestrichelte Linie: Mittelwert von TCP + DCH der fünf Probennahmestellen und Startwert $\bar{c}_{TCP,0}$ zum Lösen des Festbettmodells).

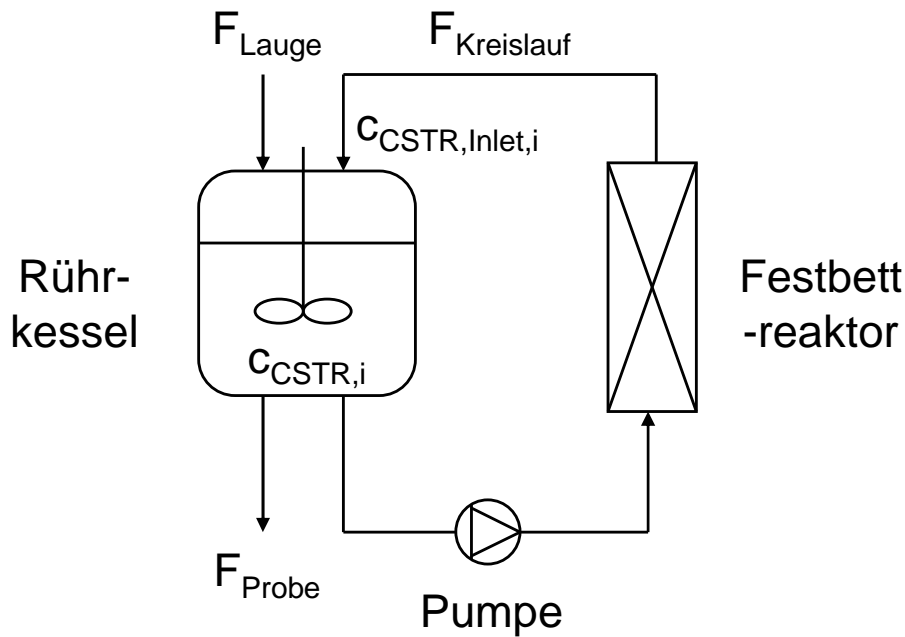


Abbildung 5.6: Fließschema des Rückführungsprozesses der Haloalkan-Dehalogenase-Miniplant.

Die Verknüpfung der beiden Verfahrenseinheiten Festbett und Rührkessel erfolgt durch die Verwendung eines Rohrmodells, das den Verzögerungseffekt der Rohrleitungen in der Miniplant beschreibt. In den folgenden Abschnitten werden die Modellgleichungen für die zusätzlich benötigten Modelle vorgestellt sowie die Ermittlung der Volumenströme und der Enzymrestaktivität erläutert.

5.3.1 Modellierung des kontinuierlich betriebenen Rührkessels

Bei der Bilanzierung des kontinuierlich betriebenen Rührkessels (CSTR) muss die Volumenänderung aufgrund der Titration zur Regelung des pH-Wertes und des Verluststromes durch die Probenahmen berücksichtigt werden. Die Volumenänderung durch Nachfördern des Substrates wurde in dem hier vorgestellten Modell vernachlässigt, da sowohl das Nachlösen des Substrates als auch nicht gelöstes Substrat keinen Einfluss auf das Medienvolumen hat.

$$\frac{dV_{cstr}}{dt} = \dot{V}_{Lauge} - \dot{V}_{Probe} + \dot{V}_{Kreislau} - \dot{V}_{Kreislau} = \dot{V}_{Lauge} - \dot{V}_{Probe} \quad (5.41)$$

Der Laugenvolumenstrom \dot{V}_{Lauge} wurde im Rührkessel-Modell berechnet, um eine präzise Vorhersage des Rückführungsprozesses für einen Produktionseinsatz zu ermöglichen. Unter Berücksichtigung des Probenvolumenstroms \dot{V}_{Probe} ist eine exakte Vorhersage des Rührkesselvolumens und daher des Gesamtprozessverhaltens durch das Modell möglich. Aufgrund der nahezu vollständigen Dissoziation des Reaktionsprodukts Salzsäure wurde angenommen, dass zum Konstanthalten des Kessel-pH-Wertes der Lauge-Massenstrom dem Massenstrom des verbrauchten Substrats entspricht:

$$\dot{V}_{Lauge} \cdot c_{Lauge} = \dot{V}_{Kreislau} \cdot (c_{cstr,TCP} - c_{cstr,TCP,Inlet}) \quad (5.42)$$

Durch Umstellen dieser Gleichung kann der Laugenstrom berechnet werden:

$$\dot{V}_{Lauge} = \frac{\dot{V}_{Kreislau} \cdot (c_{cstr,TCP} - c_{cstr,TCP,Inlet})}{c_{Lauge}} \quad (5.43)$$

Die Anfangsbedingung lautet:

$$V_{cstr}(t = 0) = V_{cstr,0} \quad (5.44)$$

Bei der Massenbilanzierung des Rührkessels wird von einem ideal durchmischten, isothermen Rührkessel ausgegangen.

$$\frac{d(V_{cstr} \cdot c_{cstr,i})}{dt} = \dot{V}_{Kreislau} \cdot (c_{cstr,i,Inlet} - c_{cstr,i}) - \dot{V}_{Probe} \cdot c_i \quad (5.45)$$

Die für die Lösung der Differentialgleichungen erforderlichen Anfangsbedingungen sind folgende:

$$c_{cstr,TCP}(t = 0) = c_{TCP,0} \quad (5.46)$$

$$c_{cstr,DCH}(t = 0) = 0 \quad (5.47)$$

Das zeitliche Profil der Substratkonzentration $c_{cstr,TCP}(t)$ wurde dem verwendeten Simulationstool (Kap. 5.4) aus den experimentellen Beobachtungen vorgegeben. Der Rührkessel-pH-Wert wurde aufgrund der pH-Regelung als konstant angenommen und der Wert für die Simulation aus einer Mittelwertbildung der extern gemessenen pH-Werte gewonnen (Kap. 2.10).

5.3.2 Modellierung der Rohrleitungen

Zur Berücksichtigung der Totvolumina zwischen Rührkessel und Festbettreaktor wurde für beide Verbindungen ein Rohrmodell zur Verknüpfung der beiden Reaktoren benutzt. Die Rohrverbindungen stellen Verzögerungsglieder dar, ohne deren Berücksichtigung die Modellvorhersage eine erhebliche Überschätzung der Produktion von 2,3-Dichlor-1-propanol liefern würde. Für das Rohrmodell gilt:

$$\frac{dc_{Rohr,i}}{dt} = u_0 \cdot \frac{dc_{Rohr,i}}{dx} \quad (5.48)$$

Die Leerrohrgeschwindigkeit u_0 ergibt sich aus dem Kreislaufvolumenstrom $\dot{V}_{Kreislauf}$ und der Rohrquerschnittsfläche A_Q zu:

$$u_0 = \frac{\dot{V}_{Kreislauf}}{A_Q} \quad (5.49)$$

Die Verknüpfung der Modelle des kontinuierlich betriebenen Rührkessels, des Festbetts und der Rohre erfolgt über die Übergabe der Austrittskonzentration als Eingangswert für das nachgeschaltete Modell. In den Rohren sowie im Festbett befinden sich zum Startzeitpunkt weder Substrat noch Produkt:

$$c_{Rohr,i}(t = 0) = 0 \quad (5.50)$$

$$c_{Festbett}(z, r, t = 0) = 0 \quad (5.51)$$

5.3.3 Bestimmung der Volumenströme und Enzymrestaktivität

Für die Simulationen des Rückführungsprozesses sind die beiden Volumenströme $\dot{V}_{Kreislauf}$ und \dot{V}_{Probe} zu quantifizieren.

Der Kreislaufstrom $\dot{V}_{Kreislauf}$ wurde in Experimenten ermittelt, die direkt vor und nach den Rückführungsversuchen bei gleichen Pumpeneinstellungen durchgeführt wurden. Zu diesem Zweck wurde der zeitliche Verlauf des Waagensignals mittels einer linearen Regression in den Massen-

strom umgerechnet. Die beiden bestimmten Werte wurden in einen Volumenstrom umgerechnet und gemittelt.

In den Rückführungsexperimenten wurde ein im Verhältnis zum Rührkesselvolumen V_{cstr} nicht zu vernachlässigendes Gesamtvolumen $V_{Proben,gesamt}$ an Proben dem System entnommen. Da die Probennahmen gleichmässig über die Gesamtdauer der Experimente t_{gesamt} verteilt waren, wurde der Probenvolumenstrom \dot{V}_{Probe} als über die Versuchsdauer konstant angesehen und durch das Verhältnis des Probengesamtvolumens zu Gesamtexperimentdauer bestimmt:

$$\dot{V}_{Probe} = \frac{V_{Proben,gesamt}}{t_{gesamt}} \quad (5.52)$$

Das dem Rührkessel entnommene Gesamtprobenvolumen $V_{Proben,gesamt}$ wurde durch Auswertung des Rührkesselwaagensignals bestimmt.

Die durchgeführten Rückführungsexperimente hatten je eine Dauer von ungefähr einer Woche. In diesem Beobachtungszeitraum kann die thermische Enzyminaktivierung nicht vernachlässigt werden, so dass nicht von einer über der Versuchsdauer konstanten Enzymrestaktivität RA ausgegangen werden kann. Für den zeitlichen Verlauf der Enzymrestaktivität RA wurde eine Kinetik erster Ordnung angenommen (ausführliche Erläuterung der Enzyminaktivierung in Kap. 7):

$$RA(t) = RA_0 \cdot e^{-k_1^{Inakt} \cdot t} \quad (5.53)$$

Die beiden Parameter RA_0 und k_1^{Inakt} wurden durch Anpassung an die gemessenen Konzentrationszeitverläufe am Festbettein- und -austritt gewonnen.

5.4 Simulationstool Aspen Custom Modeler

Zur Lösung des Systems partieller Differentialgleichungen und gekoppeltem analytischen Gleichungssystem kam das kommerzielle Modellierungstool *AspenCustomModeler*TM der Firma AspenTech Inc., Cambridge, MA, USA in der Version 11.1.1 zum Einsatz. Dieses Software-Paket ermöglicht das Implementieren von selbst generierten Modellen sowie das Verknüpfen mehrerer Modelle. Bei der numerischen Lösung der Differentialgleichungen bietet *AspenCustomModeler*TM dem Anwender eine weitreichende Automatisierung und Einfachheit. Dieser Komfort muss allerdings mit einem Verlust an detaillierter Kontrolle der numerischen Einstellungen durch den Nutzer bezahlt werden. Daher fand bei der Implementierung des vorgestellten Festbettmodells eine umfassende Bewertung der numerischen Stabilität der von *AspenCustomModeler*TM berechneten Lösungen statt. Bei diesen Voruntersuchungen mussten einige Diskretisierungsverfahren wegen Neigung zum Überschwingen verworfen werden. Für die Bestimmung der axialen Konzentrationen (Gl. 5.1) kam schliesslich das UBF4-Verfahren (Upwind Biased Finite Difference, 4. Ordnung) zum Einsatz. Das CFD4-Verfahren (Central Finite Difference, 4. Ordnung) wurde für die Lösung der Kornbilanz (Gl. 5.6) herangezogen.

gen. Zusätzlich wurde die Anzahl der Stützstellen in den Bilanzierungsrichtungen variiert, um einen Kompromiss zwischen Genauigkeit und Rechendauer zu erzielen. In axialer Richtung wurde die Anzahl der Stützstellen in Abhängigkeit der Festbettlänge so gewählt, dass der Abstand zwischen den Stützstellen 1 mm realer Festbettlänge entsprach. In radialer Richtung wurden unabhängig vom verwendeten Immobilisationsträger acht Stützstellen benutzt.

Kapitel 6

Miniplant-Experimente der enzymatischen Dehalogenierung und Modellvalidierung

In diesem Kapitel wird das im vorhergehenden Kapitel entwickelte Festbettmodell mit den in der Haloalkan-Dehalogenase-Miniplant gewonnenen experimentellen Daten verglichen. Für die Modellüberprüfung werden die im Festbettreaktor der Haloalkan-Dehalogenase-Miniplant gewonnenen experimentellen Daten mit den Lösungen der Modellgleichungen für die Bulkphase verglichen. Bei Fließgleichgewichtsexperimenten werden die gemessenen Konzentrationen von Substrat und Produkt sowie der pH-Wert an den fünf Probennahmestellen des Miniplant-Festbettreaktors (Kap. 2.9.2) den berechneten Werten der Bulkkonzentrationen $c_{b,i}(z)$ und des pH-Wertes $pH(z)$ (Kap. 5.1) gegenüber gestellt. Für dynamische Experimente erfolgt der Vergleich der gemessenen Reaktoraustrittskonzentrationen mit den Bulkkonzentrationen $c_{b,i}(L)$ am Schüttungsende.

Die Profile im stationären Zustand werden jeweils als Funktion der dimensionslosen Reaktorlänge dargestellt, um die in den folgenden Abschnitten angegebenen unterschiedlichen Schüttungshöhen zu vereinheitlichen. Bei den dynamischen Experimenten sind die Ergebnisse auf die dimensionslose Zeit Θ bezogen, die sich aus der Zeit t nach dem Sprungereignis und der hydraulischen Verweilzeit τ im Festbettreaktor ergibt:

$$\Theta = \frac{t}{\tau} = \frac{t \cdot \dot{V}}{\epsilon_{FB} \cdot V_{Reaktor}} \quad (6.1)$$

Es wurden sowohl Konzentrations- als auch Volumenstromsprünge durchgeführt, bei denen der Sprung jeweils zum Zeitpunkt $\Theta = 0$ vorgenommen wurde. Die vorgestellten Diagramme zeigen die Antwort des Festbettreaktors auf die sprunghafte Änderung in Form von Konzentrationszeitverläufe am Reaktorauslass (Abb. 6.1).

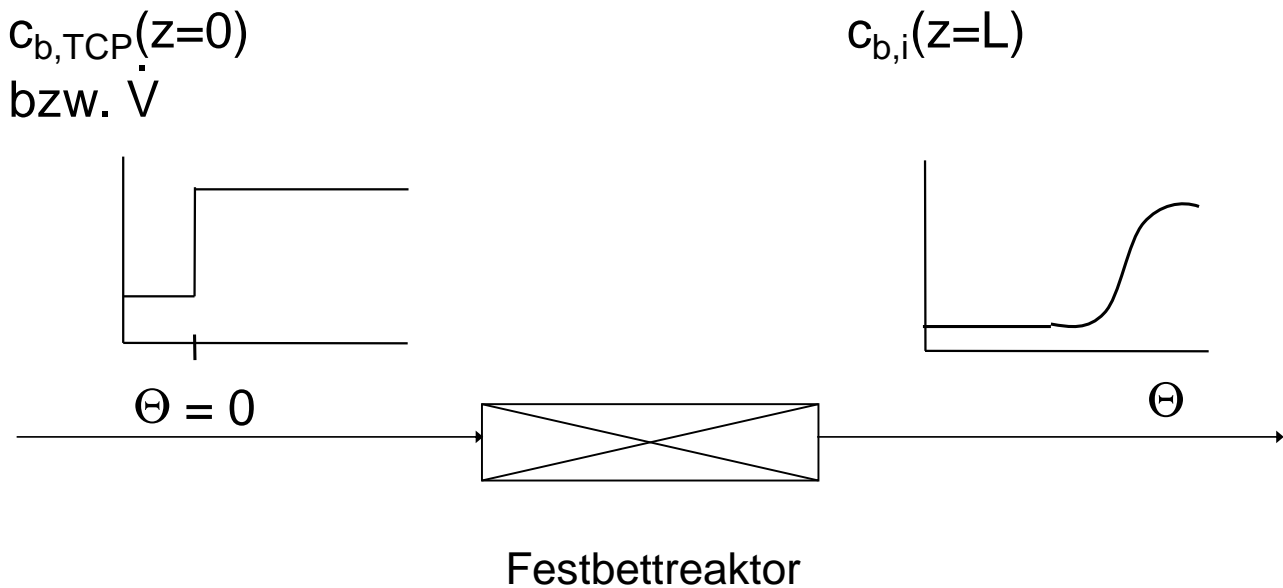


Abbildung 6.1: Schematische Darstellung der dynamischen Sprungexperimente in der Haloalkan-Dehalogenase-Miniplant zur Validierung des entwickelten Festbettreaktormodells.

6.1 Experimente mit Eupergit-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA

Das Haloalkan-Dehalogenase-Enzym DhaA wurde in Eupergit-immobilisierter Form zur Modellvalidierung des in Kap. 5 erarbeiteten Festbettreaktormodells herangezogen. Zu diesem Zwecke wurden sowohl Fließgleichgewichts- als auch dynamische Experimente in der Haloalkan-Dehalogenase-Miniplant durchgeführt. Der dabei abgedeckte Bereich der Versuchsbedingungen ist in Tab. 6.1 angegeben.

Tabelle 6.1: Versuchsbedingungen der Miniplantversuche mit Eupergit-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA

Festbetteigenschaft		Wert	Einheit
Masse Enzym DhaA		2,84	g
Masse Träger		145	g
Trägerbeladung		19,6	mg/g
Schüttungshöhe		405	mm
Prozessgröße	von	bis	Einheit
Festbett-Temperatur	25	35	°C
TCP-Eintrittskonzentration $c_{TCP,0}$	0,3	12,0	mmol/l
Eintritts-pH-Wert pH_0	7,74	9,65	-
Volumenstrom	38,8	606	ml/h

6.1.1 Untersuchungen des stationären Betriebs mit Eupergit-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA

Ein typischer Verlauf der Bulk-Konzentrationen und des pH-Wertes für Eupergit-immobilisierte Haloalkan-Dehalogenase DhaA ist in Abb. 6.2 wiedergegeben. Das dargestellte Experiment wurde mit einer TCP-Eintrittskonzentration von $c_{TCP,0} = 4,37 \text{ mmol/l}$, einem Eintritts-pH-Wert von $pH_0 = 8,54$, einer Pufferkonzentration von $c_{Puffer} = 53 \text{ mmol/l}$ und einem Volumenstrom von $\dot{V} = 155,5 \text{ ml/h}$ bei einer Temperatur von $T = 30^\circ\text{C}$ durchgeführt. Die dargestellten Simulationsergebnisse wurden mit einer Enzymrestaktivität RA von 97 % erzielt.

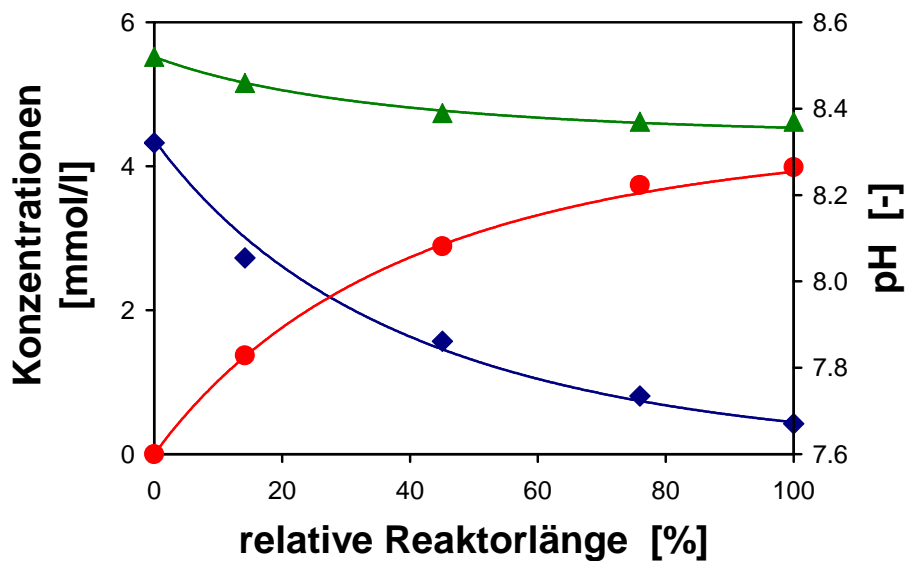


Abbildung 6.2: Fließgleichgewichts-Experimente mit Eupergit-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA bei einer Temperatur von 30°C (Rauten: TCP, Kreise: DCH, Dreiecke: pH-Wert) und Simulationsergebnisse (Linien).

Das Festbettreaktorprofil der Konzentrationen von Substrat und Produkt in Abb. 6.2 zeigt sehr deutlich den Einfluss der stark ausgeprägten Produktinhibition des eingesetzten Haloalkan-Dehalogenase-Enzyms DhaA. Die Reaktionsrate nimmt mit ansteigender Produktkonzentration ab. Hieraus folgt, dass ein erheblicher Anteil des Reaktors aufgrund niedriger Reaktionsraten nur begrenzt zur Gesamtleistung des Festbettreaktors beiträgt. Für eine Verbesserung des Prozesses wäre demzufolge ein Enzym mit wesentlich geringerer Produktinhibition wünschenswert.

Der pH-Wert erfährt eine nur sehr geringe Veränderung entlang des Festbettreaktors bei der hier eingesetzten Pufferkonzentration von $c_{Puffer} = 53 \text{ mmol/l}$ (Abb. 6.2). Aufgrund der nur schwach ausgeprägten pH-Wert-Abhängigkeit der katalytischen Eigenschaften der Haloalkan-Dehalogenase DhaA (Kap. 4.3), könnte die Pufferkonzentration stark herabgesetzt werden, ohne die Raum-Zeit-Ausbeute wesentlich zu beeinflussen. Durch diese Reduktion an organischen Puffer können die Betriebskosten für die enzymatische Produktion von optisch aktivem 2,3-Dichlor-1-propanol gesenkt werden. Die weiterführenden Versuchsreihen in der Haloalkan-Dehalogenase-Miniplant sind aus die-

sem Grund mit einer halbierten Pufferkonzentration von ungefähr $c_{Puffer} = 25 \text{ mmol/l}$ durchgeführt worden.

Der Vergleich der experimentellen Daten und den Simulationsergebnissen (Abb. 6.2) zeigt eine gute Übereinstimmung von Experiment und Modell. Es kann daher angenommen werden, dass alle zur Beschreibung von Experimenten im stationären Zustand notwendigen Einflussfaktoren durch das in Kap. 5 entwickelte Festbettreaktormodell berücksichtigt worden sind.

6.1.2 Dynamische Experimente mit Eupergit-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA

Das Eupergit-immobilisierte Haloalkan-Dehalogenase-Enzym DhaA wurde in insgesamt vier dynamischen Versuchen in der Miniplant zur Überprüfung des entwickelten Festbettmodells herangezogen. Die Ergebnisse der zwei Volumenstrom- (A + B) und zwei Konzentrationssprungexperimente (C + D) sind in Abb. 6.3 dargestellt. Die für die Simulationen eingesetzten Werte der Prozessgrößen sind in Tab. 6.2 angegeben.

Tabelle 6.2: Für die Simulation verwendete Prozessgrößen der dynamischen Experimente mit Eupergit-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA

Dynamik-Versuch	A	B	C	D	Einheit
Temperatur	35	35	35	35	°C
TCP-Eintrittskonzentration					
vor dem Sprung	13,02	9,48	6,67	0,35	mmol/l
nach dem Sprung	13,02	9,48	2,08	8,15	mmol/l
Volumenstrom					
vor dem Sprung	45,0	38,8	285	134	ml/h
nach dem Sprung	586	593	285	134	ml/h
Eintritts-pH-Wert pH_0	8,11	8,78	9,06	8,01	-
Pufferkonzentration	29,0	30,0	27,8	19,0	mmol/l
Restaktivität RA	101,6	99,0	77,0	62,8	%
zur Schätzung der Adsorptionsparameter eingesetzt	ja	ja	ja	ja	

In den dargestellten Verläufen ist der Einfluss der unterschiedlich stark ausgeprägten Adsorption von Substrat und Produkt deutlich zu erkennen. Die dynamische Übergangsphase bis zur Einstellung des neuen Fließgleichgewichts dauert für das Substrat der enzymatischen Dehalogenierung (1,2,3-Trichlorpropan, TCP) erheblich länger als für das Produkt (2,3-Dichlor-1-propanol, DCH). Diese Verzögerung liegt in der größeren Stoffspeicherung von TCP gegenüber DCH durch reversible Adsorption an den Enzymträger begründet, die sich in den unterschiedlichen Adsorptionsgleichgewichtskonstanten m_i (Kap. 5.2.8) widerspiegelt. In den Volumenstromsprungexperimenten (A + B) wird die unterschiedliche Adsorptionsneigung der beiden halogenierten Kohlenwasserstoffe zusätzlich

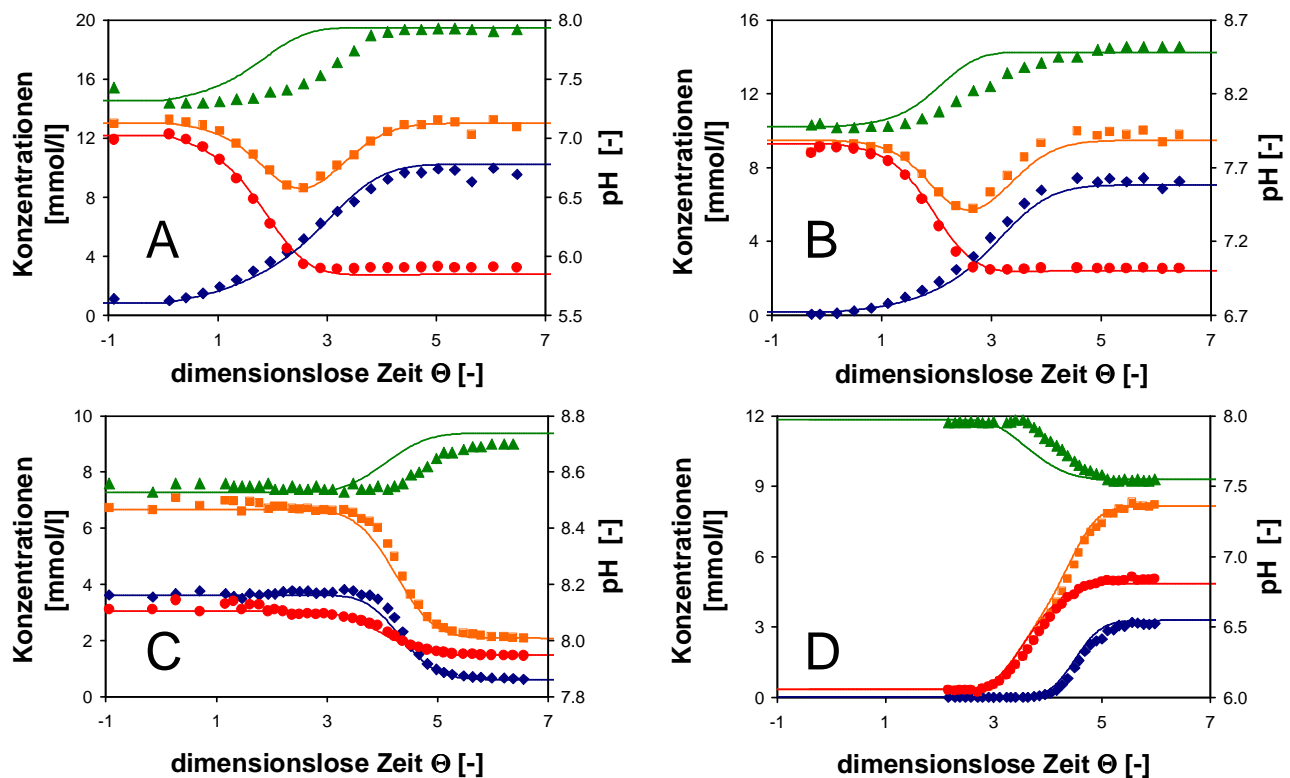


Abbildung 6.3: Dynamische Festbettreaktor-Experimente mit Eupergit-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA bei einer Temperatur von 35°C (Rauten: TCP, Kreise: DCH, Quadrate: TCP + DCH, Dreiecke: pH-Wert, A + B: Volumenstromsprung, C + D: Konzentrations- und pH-Sprung) und Simulationsergebnisse (Linien).

durch eine ausgeprägte Verringerung der Summe der beiden Konzentrationen verdeutlicht. Bei der jeweils durchgeführten Erhöhung des Volumenstroms kommt es aufgrund der geringeren Verweilzeit im Reaktor zu einem Umsatzrückgang, der mit höheren Substrat- und niedrigeren Produktkonzentrationen einhergeht. Aufgrund der Adsorption werden die dynamischen Änderungen durch die Speicherspeicherung am Träger verzögert. Da die TCP-Adsorption stärker ist, fällt für TCP die zeitliche Verzögerung größer aus, so dass es zu den charakteristischen Einbrüchen in der Summe von Substrat- und Produktkonzentration kommt.

Zur Verdeutlichung der immensen Beeinflussung des dynamischen Übergangs zwischen zwei stationären Zuständen durch die reversible Adsorption von Substrat und Produkt bei der enzymkatalysierten Dehalogenierung von 1,2,3-Trichlorpropan an den Enzymträger ist in Abb. 6.4 exemplarisch das Dynamikexperiment A erneut dargestellt. Die in dieser Abbildung gezeigten Simulationsergebnisse stellen die Lösung des Festbettreaktormodells dar, die für Adsorptionsgleichgewichtskonstanten $m_i = 0$ berechnet wurde. Der Vergleich der experimentellen adsorptionsbehafteten Daten mit den hypothetischen, unter Vernachlässigung der Adsorption berechneten Ergebnissen dokumentiert die Bedeutung der Adsorption am instationären Übergang des Festbettreaktors zwischen zwei stationären Betriebspunkten.

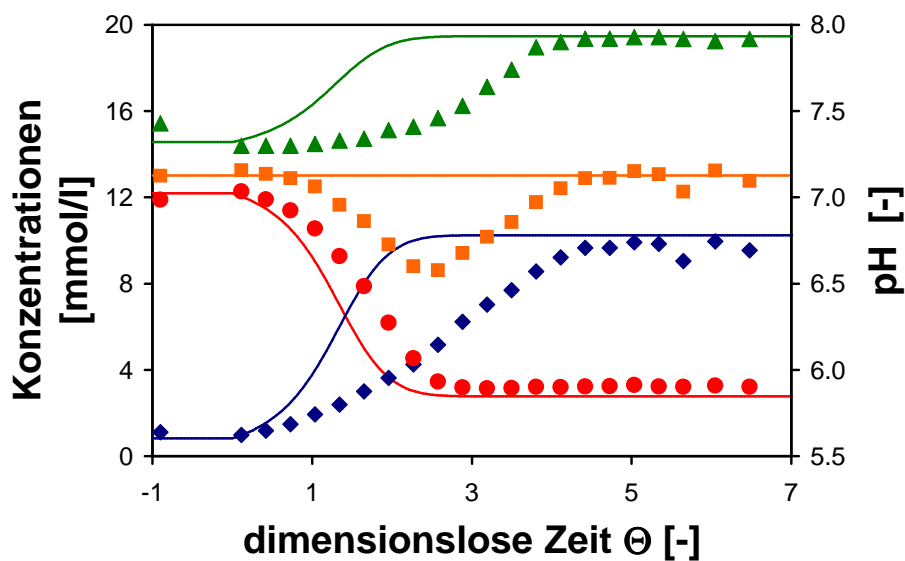


Abbildung 6.4: Einfluss der reversiblen Adsorption von TCP und DCH auf das dynamische Festbettreaktorverhalten mit Eupergit-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA bei einer Temperatur von 35°C (Rauten: TCP, Kreise: DCH, Quadrate: TCP + DCH, Dreiecke: pH-Wert, Linien: Simulationsergebnisse unter Vernachlässigung der Adsorption).

Die Verläufe der dynamischen Experimente können benutzt werden, um die Zeitdauer zum Erreichen eines neuen stationären Zustands abzuschätzen. Dieser Zeitraum hat für den alltäglichen Betrieb einer Anlage zur enzymatischen Produktion von optisch aktivem 2,3-Dichlor-1-propanol eine große praktische Bedeutung. Wird der Enzymfestbettreaktor im Prozessverbund betrieben, kann nach einer Änderung der Betriebsbedingungen erst nach dieser Zeitdauer von konstanten Austrittszuständen des katalytischen Festbetts ausgegangen werden. In der Miniplant musste diese Zeitspanne bei der Aufnahme von Fließgleichgewicht-Festbettprofilen mindestens seit einer Änderung der Prozessgrößen vergangen sein, um auswertbare Daten gewinnen zu können. Die Dauer des dynamischen Übergangs beträgt ungefähr fünf Verweilzeiten, wobei zwischen der Art der Experimente unterschieden werden muss. Bei den durchgeführten sprunghaften Volumenstromänderungen vollzogen sich die Ausgleichsvorgänge ein wenig schneller (ungefähr 4,5 Verweilzeiten), während die Konzentrationssprungexperimente zu Übergangsdauern von ungefähr 5,5 Verweilzeiten führten.

Der Vergleich der experimentell ermittelten Konzentrationen mit den entsprechenden Simulationsergebnissen zeigt eine gute Übereinstimmung. Sowohl die Fließgleichgewichte, als auch die Phasen des dynamischen Übergangs werden gut beschrieben. Die pH-Verläufe der dynamischen Experimente mit Eupergit-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA können erwartungsgemäß durch das entwickelte Festbettmodell nicht präzise vorhergesagt werden (Kap. 5.1.3). Die Pufferwirkung der immobilisierten Enzyme ist im verwendeten pH-Modell nicht berücksichtigt. Durch die Vernachlässigung dieses puffernden Effekts kommt es zu einem schnelleren pH-Wert-Ausgleich in den Simulationsergebnissen als in den Experimenten. Aufgrund der geringen pH-Wertabhängigkeit der Enzymaktivität der Haloalkan-Dehalogenase DhaA sind allerdings keine signifikanten Abweichungen zwischen den experimentellen Konzentrationsdaten für Substrat und Produkt und den kor-

respondierenden Simulationsergebnissen zu beobachten. Aus diesem Grunde sind die beobachteten Abweichungen in der Vorhersage des dynamischen pH-Wert-Übergangs tolerierbar.

6.2 Experimente mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA

Das in Kap. 5 erarbeitete Festbettreaktormodell wurde für PEI-Alumina-immobilisierte Haloalkan-Dehalogenase DhaA in gleicher Weise einer experimentelle Überprüfung in der Miniplant unterzogen wie die Eupergit-immobilisierte Variante des gleichen Enzyms. Die in Fließgleichgewichts- und dynamischen Experimenten untersuchten Versuchsbedingungen sind in Tab. 6.3 angegeben.

Tabelle 6.3: Versuchsbedingungen der Miniplantversuche mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA

Festbetteigenschaft		Wert	Einheit
Masse Enzym DhaA		7,54	g
Masse Träger		65	g
Trägerbeladung		28,5	mg/g
Schüttungshöhe		415	mm
Prozessgrösse	von	bis	Einheit
Festbett-Temperatur	25	40	°C
TCP-Eintrittskonzentration	1,1	14,8	mmol/l
Eintritts-pH-Wert pH_0	7,66	10,08	-
Volumenstrom	143	2448	ml/h

6.2.1 Untersuchungen des stationären Betriebs mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA

Das in Abb. 6.5 beispielhaft dargestellte Experiment der PEI-Alumina-immobilisierten Haloalkan-Dehalogenase DhaA wurde mit einer TCP-Eintrittskonzentration von $c_{TCP,0} = 10,26$ mmol/l, einem Eintritts-pH-Wert von $pH_0 = 8,90$, einer Pufferkonzentration von $c_{Puffer} = 28$ mmol/l und einem Volumenstrom von $\dot{V} = 191,1$ ml/h bei einer Temperatur von $T = 35^\circ\text{C}$ durchgeführt. Die gezeigten Simulationsergebnisse wurden mit einer Enzymrestaktivität RA von 41,5 % berechnet.

In diesem Experiment ist eine im Unterschied zum für Eupergit-immobilisierte Haloalkan-Dehalogenase DhaA wiedergegebenen Versuch (Abb. 6.2) reduzierte Pufferkonzentration eingesetzt worden. Aus diesem Grunde beträgt die pH-Wert-Veränderung über den Reaktor durch die Reaktion ungefähr eine ganze pH-Stufe. Das vorgeschlagene pH-Modell beschreibt diese Veränderung ebenfalls sehr genau.

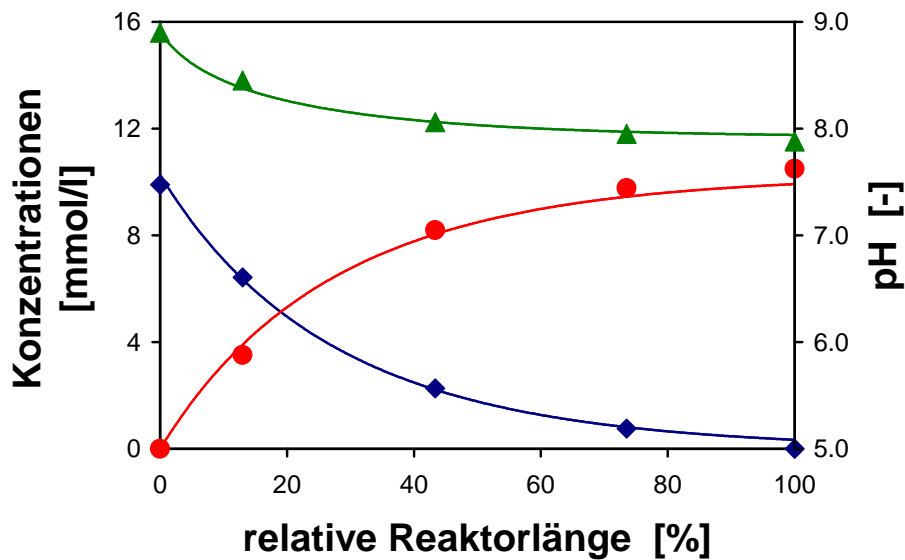


Abbildung 6.5: Fließgleichgewichts-Experiment mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA bei einer Temperatur von 35°C (Rauten: TCP, Kreise: DCH, Dreiecke: pH-Wert) und Simulationsergebnisse (Linien).

Die präsentierten Verläufe ähneln den für Eupergit-immobilisierte Haloalkan-Dehalogenase DhaA vorgestellten Profilen (Abb. 6.2). Aufgrund des Einsatzes des gleichen Enzyms und der nur geringfügig unterschiedlichen enzymkinetischen Parameter für beiden Immobilisierungsmethoden ist diese Beobachtung zu erwarten gewesen. Durch die in diesem Versuch höhere Substratkonzentration und den höheren Umsatz, ist der Einfluss der Produktinhibierung auf den Konzentrationsverlauf entlang des Reaktors noch deutlicher zu erkennen. Ein Haloalkan-Dehalogenase-Enzym mit deutlich geringerer Produktinhibierung würde zu erhöhten Raum-Zeit-Ausbeuten des Prozesses führen.

In einer Simulationsstudie wurde der Einfluss der Produktinhibierungskonstanten K_I auf den Verlauf der Konzentrationen im Festbettreaktor untersucht. In Abb. 6.6 ist ein Festbettreaktorprofil eines Miniplant-Versuchs mit den korrespondierenden Modelllösungen (dicke Linien, TCP-Eintrittskonzentration $c_{TCP,0} = 10,41$ mmol/l, Eintritts-pH-Wert $pH_0 = 9,18$, Volumenstrom $\dot{V} = 499,9$ ml/h, Festbett-Temperatur $T = 30^\circ\text{C}$, Enzymrestaktivität $RA = 71$ %) dargestellt. Der Umsatz bei ansonsten gleichen Prozessbedingungen wäre von 83% für das real eingesetzte Enzym (DhaA, $K_I = 1,45$ mM) auf 100% für ein quasi nicht-produktinhibiertes Enzym ($K_I = 100$ mM) gestiegen. Auch geringere Erhöhungen der Produktinhibierungskonstanten K_I würden die Leistungsfähigkeit des Festbettreaktors positiv beeinflussen (Abb. 6.6). Entsprechend der Umsatzerhöhung würde sich die Raum-Zeit-Ausbeute des Festbettprozesses steigern lassen.

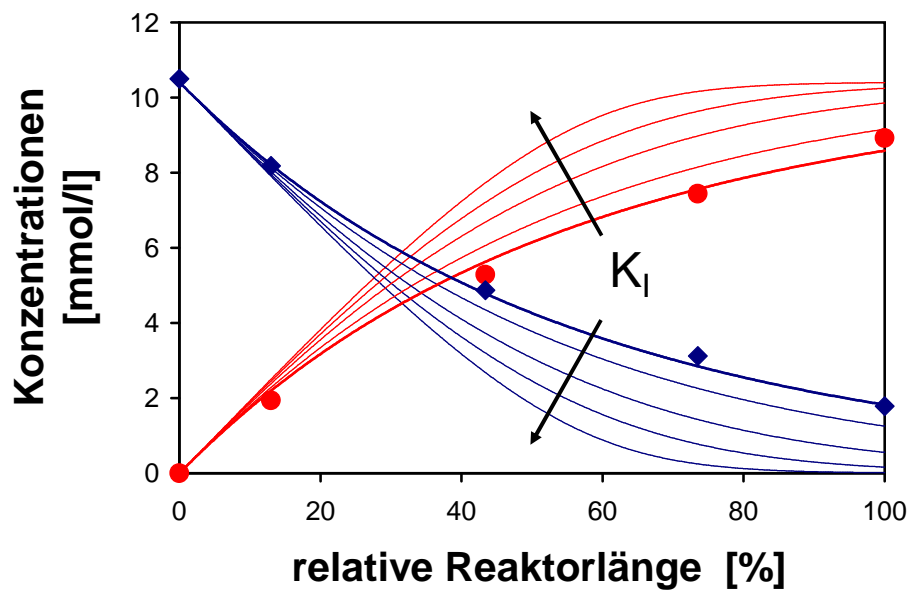


Abbildung 6.6: Einfluss der Produktinhibierungskonstante K_I auf den Verlauf der Konzentrationen im Festbettreaktor (Messwerte: reales Experiment, Rauten: TCP, Kreise: DCH; dicke Linien: Simulationsergebnisse für reales Experiment mit $K_I = 1,45$ mmol/l; dünne Linien: theoretischer Verlauf bei höheren Produktinhibierungskonstanten $K_I = 2,2; 4,5; 10; 100$ mmol/l).

6.2.2 Dynamische Experimente mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA

Zur Modellüberprüfung wurde die Haloalkan-Dehalogenase DhaA auch mit dem Enzymträger PEI-Alumina in dynamischen Experimenten eingesetzt. Die insgesamt sechs Versuche sind in Abb. 6.7 dargestellt. Es wurden je drei Volumenstrom- (E, H, J) und drei Konzentrations sprünge (F, G, I) durchgeführt. Die für die Modellvorhersagen eingesetzten Werte der Prozessgrößen sind in Tab. 6.4 aufgelistet.

Ähnlich wie bei den mit Eupergit-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA durchgeführten dynamischen Experimenten ist der dynamische Verlauf zwischen den beiden stationären Zuständen erheblich von der reversible Adsorption von Substrat und Produkt an den Enzymträger beeinflusst. Aufgrund der geringeren Adsorptionsgleichgewichtskonstanten m_i fällt die Verringerung der Summe der Austrittskonzentrationen von TCP und DCH bei den Volumenstromsprüngen (E, H, J) jedoch geringer als bei Eupergit aus. Die zeitliche Verzögerung des dynamischen Übergangs durch die Adsorption an PEI-Alumina ist aus dem selben Grund nicht ganz so gross wie bei der Adsorption an Eupergit. Die Zeitspannen, die für das Einstellen des neuen Konzentrationsfließgleichgewichts erforderlich sind, sind daher und aufgrund der geringeren Partikelporosität für die PEI-Alumina-Immobilisierung kürzer. Die dynamischen Übergänge der Substrat- und Produktkonzentrationen sind nach ungefähr vier bis fünf Verweilzeiten beendet.

Zur Schätzung der Gleichgewichtskonstanten der reversiblen Adsorption von Substrat und Produkt an den Enzymträger PEI-Alumina wurden die Dynamikexperimente E bis I eingesetzt. Das

Tabelle 6.4: Für die Simulation verwendete Prozessgrößen der dynamischen Experimente mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA

Dynamik-Versuch	E	F	G	H	I	J
Temperatur [°C]	30	30	30	30	30	30
TCP-Eintrittskonzentration [mmol/l]						
vor dem Sprung	10,49	1,04	0,38	9,98	9,78	5,17
nach dem Sprung	10,49	10,78	9,28	9,98	0,58	5,17
Volumenstrom [ml/h]						
vor dem Sprung	244,3	500	605	218	397	243
nach dem Sprung	1252	500	605	807	397	650
Eintritts-pH-Wert pH_0 [-]	9,15	9,15	9,31	9,25	8,46	8,27
Pufferkonzentration [mmol/l]	30,0	25,0	25,0	28,0	26,5	24,5
Restaktivität RA [%]	90,0	75,0	75,0	79,0	62,5	65,0
zur Schätzung der Adsorptionsparameter eingesetzt	ja	ja	ja	ja	ja	nein

Experiment J wurde in der Parameterschätzung nicht berücksichtigt und dient daher zur Überprüfung der Vorhersagegüte des Modells, da außer der Enzymrestaktivität RA kein weiterer Parameter zur Beschreibung des Verlaufs angepasst wurde. Die Übereinstimmung von Experiment und Modell kann für diesen Versuch als zufriedenstellend bezeichnet werden, da die Abweichungen sehr gering sind. Das entwickelte und parametrisierte Modell ist also zu präzisen Vorhersagen des Festbettreaktorverhaltens der enzymatischen Produktion von optisch aktivem 2,3-Dichlor-1-propanol fähig.

Die instationären Übergänge des pH-Wertes dauern wesentlich länger als die Konzentrationsübergänge. Nach ungefähr zehn Verweilzeiten stellt sich der neuen pH-Wert ein. Dieser erhebliche Zeitanstieg gegenüber den dynamischen Übergängen mit Eupergit-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA beruht auf zwei Effekten. Einerseits ist die Enzymbeladung bei den mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA höher (Tabn. 6.1 und 6.3), so dass es zu einer verstärkten Pufferung durch die Aminosäuren des immobilisierten Enzyms kommt. Andererseits puffern die Imin-Gruppen des Polyethylenimin (PEI) ebenfalls die pH-Wert-Änderung. Aufgrund dieser beiden Phänomene weichen für den pH-Wert die Modelllösungen von den experimentellen Ergebnissen erheblich voneinander ab. Die geringe pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität von Haloalkan-Dehalogenase DhaA bewirkt, dass es trotz des erheblich verzögerten Einstellens des pH-Fließgleichgewichts zu keinen signifikanten Abweichungen zwischen den gemessenen und berechneten Konzentrationen von Substrat und Produkt der enzymatischen Dehalogenierung von 1,2,3-Trichlorpropan kommt.

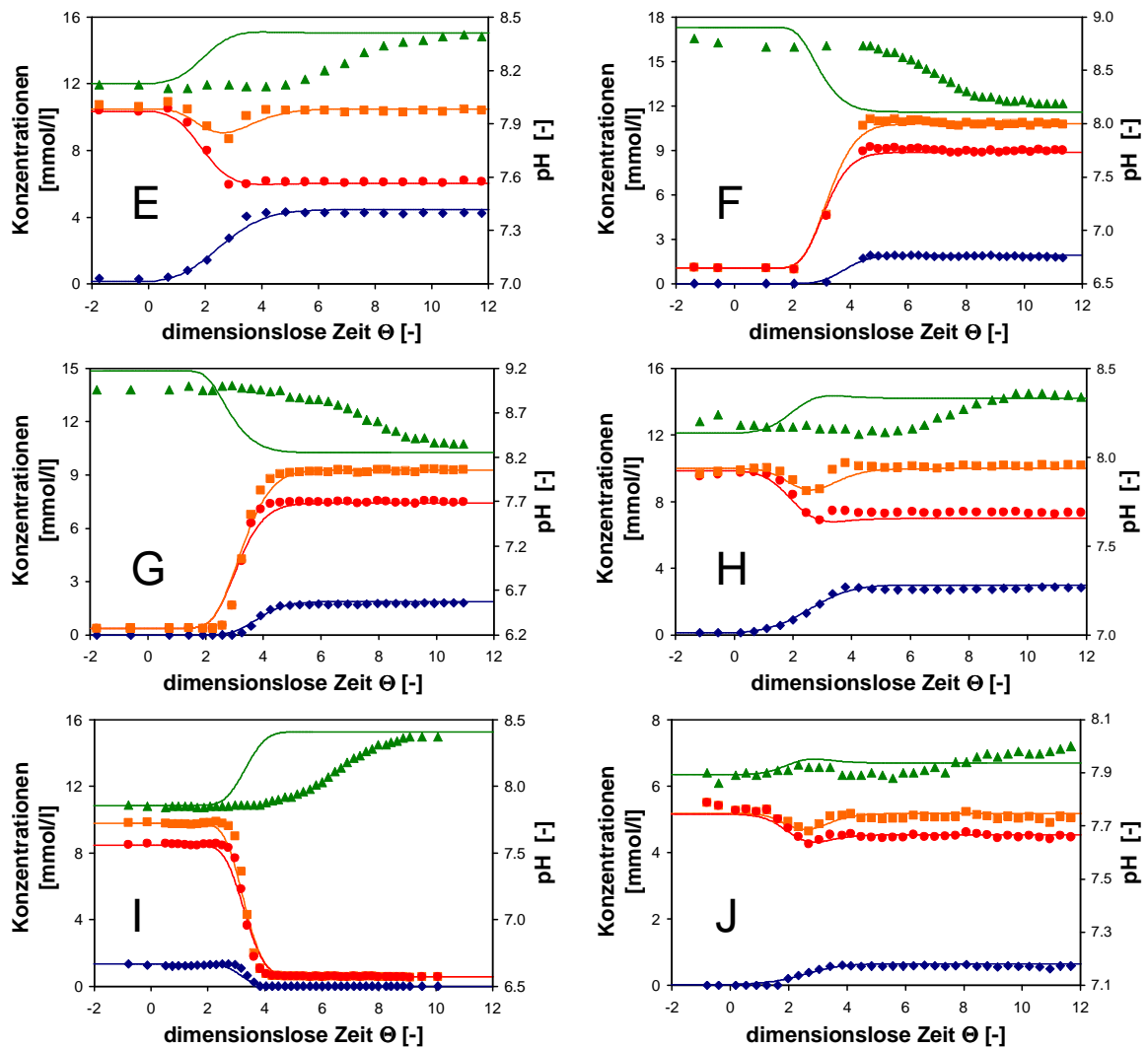


Abbildung 6.7: Dynamische Festbettreaktor-Experimente mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA bei einer Temperatur von 30°C (Rauten: TCP, Kreise: DCH, Quadrate: TCP + DCH, Dreiecke: pH-Wert, E, H + J: Volumenstrumsprung, F, G + I: Konzentrationsprung) und Simulationsergebnisse (Linien).

6.3 Experimente mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DSD4

Ziel der im Folgenden vorgestellten stationären und dynamischen Experimente mit der PEI-Alumina-immobilisierten Haloalkan-Dehalogenase DSD4 war es, dass für das mit demselben Träger immobilisierte Enzym DhaA entwickelte und validierte Festbettreaktormodell auf DSD4 zu übertragen und die Vorhersagegüte des Modells unter veränderten Bedingungen zu überprüfen. Außer der Anpassung der enzymrelevanten Modellparametern (Beladung $X_{E,0}$, Kinetikkonstanten k_{cat} , K_M und K_I , Restaktivität RA) wurden keine weiteren Modifikationen am Modell vorgenommen. Die dabei in den Miniplant-Experimenten abgedeckten Versuchsbedingungen sind in Tab. 6.5 aufgelistet.

Tabelle 6.5: Versuchsbedingungen der Miniplantversuche mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DSD4

Festbetteigenschaft		Wert	Einheit
Masse Enzym DSD4		6,51	g
Masse Träger		268	g
Trägerbeladung		24,3	mg/g
Schüttungshöhe		415	mm
Prozessgröße	von	bis	Einheit
Festbett-Temperatur	25	35	°C
TCP-Eintrittskonzentration	1,8	13,9	mmol/l
Eintritts-pH-Wert pH_0	8,59	9,60	-
Volumenstrom	322	1205	g/h

Das in Kap. 5.3 entwickelte Modell für einen Rückführungsprozess wurde zusätzlich mit der Haloalkan-Dehalogenase DSD4 einer experimentellen Überprüfung unterzogen.

6.3.1 Untersuchungen des stationären Betriebs mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DSD4

Für diese Träger-Enzym-Paarung wird ebenfalls nur ein stationärer Zustand beispielhaft präsentiert. Das in Abb. 6.8 dargestellte Festbettreaktorprofil wurde mit einer TCP-Eintrittskonzentration von $c_{TCP,0} = 13,89$ mmol/l, einem Eintritts-pH-Wert von $pH_0 = 9,03$, einer Pufferkonzentration von $c_{Puffer} = 24$ mmol/l und einem Volumenstrom von $\dot{V} = 407$ ml/h bei einer Temperatur von $T = 30^\circ\text{C}$ ermittelt. Die dargestellten Simulationsergebnisse wurden mit einer Enzymrestaktivität RA von 65,7 % berechnet.

Die Verläufe der Konzentrationen und des pH-Wertes entlang des Reaktors werden auch für die PEI-Alumina-immobilisierte Haloalkan-Dehalogenase DSD4 durch das entwickelte Festbettmodell beschrieben. Das für dieses Enzym gegenüber DhaA nur durch Modifikationen der enzymbezogenen Größen angepasste Modell zeigt damit seine Übertragbarkeit auf weitere Enzyme.

Der Vergleich der Festbettreaktorverläufe der PEI-immobilisierten Haloalkan-Dehalogenasen DhaA und DSD4 (Abb. 6.5 und Abb. 6.8) offenbart trotz erheblich unterschiedlicher enzymkinetischer Parameter für die beiden Enzyme (Tab. 4.1) keinen signifikant unterschiedlichen Charakter der Konzentrationsverläufe im Festbett. Um diese Einschätzung deutlicher zu untersuchen, wurde eine Simulationsstudie durchgeführt.

Für diese Simulationsstudie wurde ein Referenzzustand gewählt, der die abweichenden spezifischen Enzymaktivitäten vereinheitlicht und den Einfluss der unterschiedlich stark ausgeprägten Affinitäten bezüglich Substrat und Produkt (Kap. 4) herausarbeitet. Zu diesem Zweck wurden die Volumenströme für die Simulationen so eingestellt, dass für einen vorgegebenen Betriebspunkt (Sub-

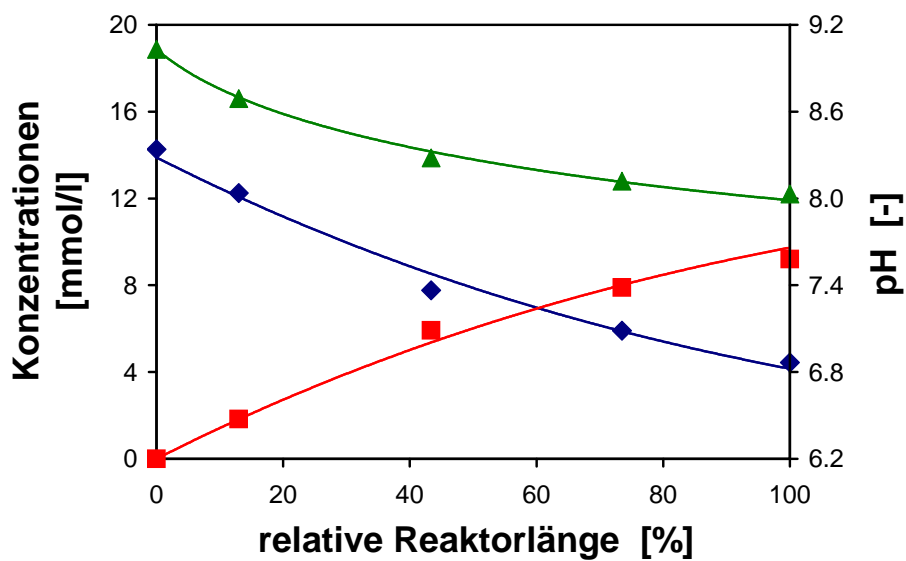


Abbildung 6.8: Fließgleichgewichts-Experimente mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DSD4 bei einer Temperatur von 30°C (Rauten: TCP, Kreise: DCH, Dreiecke: pH-Wert) und Simulationsergebnisse (Linien).

strateintrittskonzentration $c_{TCP,0} = 12 \text{ mmol/l}$, Eintritts-pH-Wert $pH = 9$, Temperatur $T = 30^\circ\text{C}$) ein Umsatz von 95 % erzielt wurde.

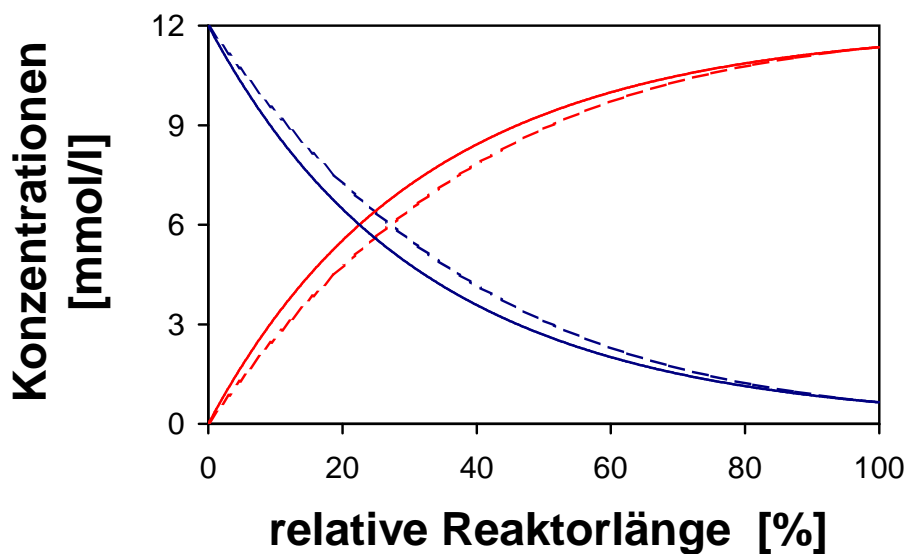


Abbildung 6.9: Vergleich der Konzentrationsverläufe bei einem Einsatz von Haloalkan-Dehalogenase DhaA (durchgezogene Linien) und DSD4 (gestrichelte Linien) und einem identischen Endumsatz von 95 %.

Das Ergebnis dieses rechnerischen Vergleichs (Abb. 6.9) zeigt, dass sich die Konzentrationsverläufe lediglich geringfügig voneinander unterscheiden. Die maximale Differenz zwischen den Verläufen von DhaA und DSD4 beträgt $\Delta c_i = 0,79 \text{ mmol/l}$. Bezogen auf die an dieser Stelle (relative Reaktorlänge = 21,4 %) durch DSD4 katalysierte Produktkonzentration $c_{DCH} = 5,00 \text{ mmol/l}$ macht diese Konzentrationsdifferenz Δc_i einen Unterschied von 15,8 % aus. Trotz des Vorsprungs

im vorderen Teil des Reaktors von DhaA gegenüber DSD4 erreichen beide Prozesse den vorgegebenen Endumsatz von 95 %. Anhand dieses Vergleichs wird somit die schon in Kap. 6.1 geäußerte Einschätzung untermauert, dass beim Einsatz des Haloalkan-Dehalogenase-Enzyms DhaA ein erheblicher Anteil des Festbettreaktors aufgrund der starken Produktinhibierung nur mit geringen Reaktionsraten zur Gesamtleistung des Reaktors beiträgt. Beim Einsatz der Haloalkan-Dehalogenase DSD4 verteilt sich der Reaktionsfortschritt gleichmäßiger über die Reaktorlänge. Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, dass für die Haloalkan-Dehalogenase DhaA der Einfluss der höheren Produktinhibierung nicht durch die höhere Substrataffinität kompensiert werden kann, um sie gegenüber dem Haloalkan-Dehalogenase-Enzym DSD4 als vorteilhaft zur Erzielung hoher Produktkonzentrationen einzustufen.

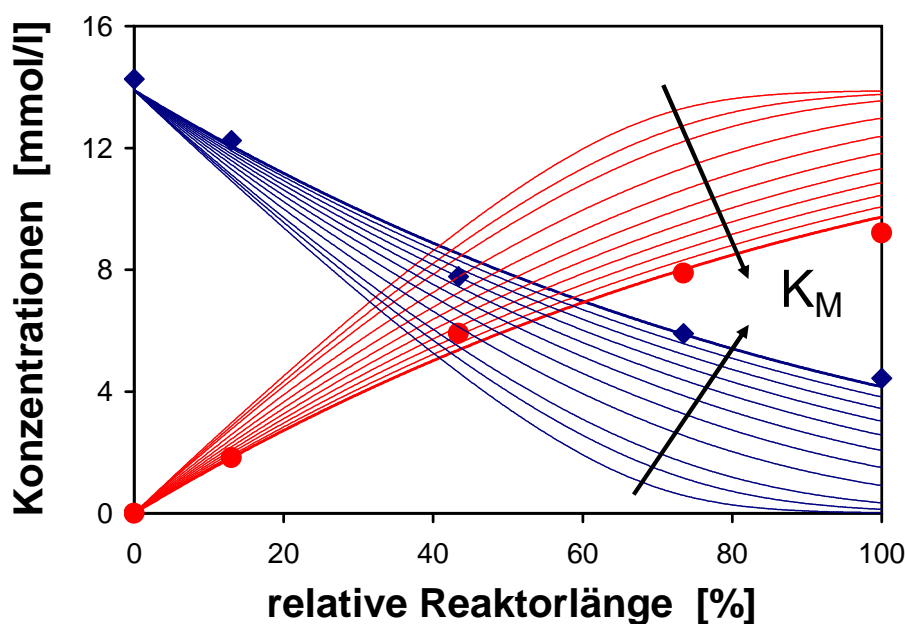


Abbildung 6.10: Einfluss der Michaelis-Menten-Konstante K_M auf den Verlauf der Konzentrationen im Festbettreaktor (Messwerte: reales Experiment, Rauten: TCP, Kreise: DCH; dicke Linien: Simulationsergebnisse für reales Experiment mit $K_M = 9,96$ mmol/l; dünne Linien: theoretischer Verlauf bei geringeren Michaelis-Menten-Konstanten $K_M = 1; 2; 4; 6; 8$ mmol/l).

Bezogen auf Haloalkan-Dehalogenase DSD4 zeigt diese Simulationsstudie, dass der wünschenswerte geringere Produktinhibierungseinfluss den ungewollten Einfluss der geringeren Substrataffinität (jeweils im Vergleich zu DhaA, Tab. 4.1) überwiegt. In einer weiteren Parameterstudie wurde der Einfluss der Substrataffinität auf das in Abb. 6.8 gezeigte Miniplant-Fließgleichgewichtsexperiment mit Haloalkan-Dehalogenase-Enzym DSD4 herausgearbeitet, in dem die Michaelis-Menten-Konstante K_M variiert wurde. Die dünnen Linien stellen die Simulationsergebnisse für ein hinsichtlich K_M modifiziertes Enzym dar, dessen weitere Eigenschaften gegenüber DSD4 unverändert sind. Würde in Enzymoptimierungsverfahren ein solches Enzym gefunden, könnte der Umsatz der Reaktion erheblich gesteigert (Abb. 6.10) und entsprechend die Raum-Zeit-Ausbeute des Festbettreaktors verbessert werden.

6.3.2 Dynamische Experimente mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DSD4

In den dynamischen Experimenten mit Haloalkan-Dehalogenase DSD4 immobilisiert an PEI-Alumina wurde das entwickelte und mit dem Enzym DhaA validierte Festbettreaktormodell auf seine Vorhersagegüte unter veränderten Bedingungen getestet. Außer den enzymbezogenen Größen (enzymkinetische Parameter, Enzymbeladung) wurden keine Änderungen am Modell vorgenommen. Da mit Hilfe der dynamischen Experimenten mit Haloalkan-Dehalogenase DhaA die Adsorptionsgleichgewichtskonstanten m_i der reversiblen Adsorption von Substrat und Produkt der enzymatischen Dehalogenierung geschätzt wurden, stellen die beiden im Folgenden präsentierten Sprungversuche insbesondere eine Überprüfung dieser Adsorptionsparameter dar. Der enorme Einfluss der Adsorption auf das dynamische Reaktorverhalten wurde ausführlich anhand von Abb. 6.4 in Kap. 6.1.2 erläutert. Die Versuchsbedingungen der in Abb. 6.11 gezeigten Experimente sind in Tab. 6.6 aufgelistet.

Tabelle 6.6: Für die Simulation verwendete Prozessgrößen der dynamischen Experimente mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DSD4

Dynamik-Versuch	K	L	Einheit
Temperatur	30	30	°C
TCP-Eintrittskonzentration			
vor dem Sprung	12,45	1,78	mmol/l
nach dem Sprung	12,45	9,16	mmol/l
Volumenstrom			
vor dem Sprung	329,0	322,0	ml/h
nach dem Sprung	944,	322,0	ml/h
Eintritts-pH-Wert pH_0	9,21	8,98	-
Pufferkonzentration	23,3	23,0	mmol/l
Restaktivität RA	22,5	14,7	%
zur Schätzung der Adsorptionsparameter eingesetzt	nein	nein	

Es wurde sowohl ein Volumenstromsprung (Versuch K), als auch eine sprunghafte Konzentrationsänderung (Versuch L) durchgeführt. Der prinzipielle Verlauf der beiden Experimente ähnelt den in den vorherigen Abschnitten diskutierten Ergebnissen für das Enzym DhaA. Entsprechend den Versuchen für PEI-Alumina-immobilisierte Haloalkan-Dehalogenase DhaA dauert das dynamische Einstellen eines neuen Fließgleichgewichtes der Konzentrationen ungefähr vier bis fünf Verweilzeiten. Aufgrund der geringeren eingesetzten Enzymmasse gegenüber den Versuchen mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA (Tabn. 6.4 und 6.6) und der damit verbundenen geringeren Pufferung durch die Proteinamino-säuren nimmt das Einstellen des pH-Wert-Fließgleichgewichtes nur ungefähr acht bis neun Verweilzeiten in Anspruch.

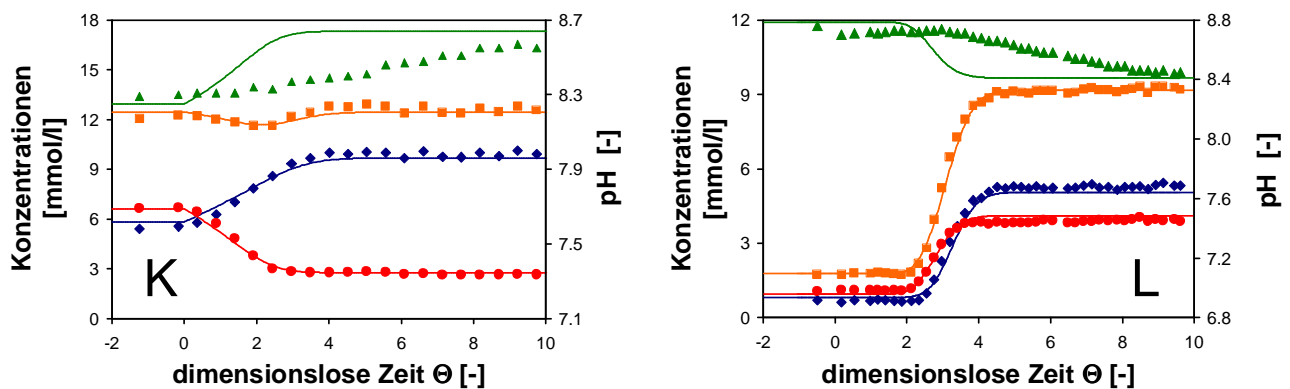


Abbildung 6.11: Dynamische Festbettreaktor-Experimente mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DSD4 bei einer Temperatur von 30°C (Rauten: TCP, Kreise: DCH, Quadrate: TCP + DCH, Dreiecke: pH-Wert, K: Volumenstrumsprung, L: Konzentrationsprung) und Simulationsergebnisse (Linien).

Für beide Versuche kann eine zufriedenstellende Beschreibung der instationären Übergänge zwischen den beiden Fließgleichgewichten durch das Festbettreaktormodell konstatiert werden.

6.3.3 Rückführungsexperimente mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DSD4

Zur Überprüfung des in Kap. 5.3 entwickelten Modells des Rückführungsprozesses zur Erzielung von Produktkonzentrationen oberhalb der geringen Substratlöslichkeit wurde PEI-Alumina-immobilisierte Haloalkan-Dehalogenase DSD4 aufgrund der gegenüber DhaA günstigeren Enzymeigenschaften eingesetzt (Kap. 4.4). Die Versuchsbedingungen und die für die Simulationen eingesetzten Parameterwerte der Rückführungsversuche finden sich in Tab. 6.7.

Die Verläufe der Substrat- (TCP) und Produktkonzentration (DCH) sowie des pH-Wertes im Rührkessel und am Festbettauslass der beiden Rückführungsversuche sind in Abb. 6.12 dargestellt. In beiden Rückführungsexperimenten wurde sowohl eine dauerhaft hohe Substratkonzentration $c_{cstr,TCP}$ im Rührkessel durch Vorlegen des flüssigen Substrates im Überschuss als auch ein geringer Umsatz im Festbettreaktor durch einen hohen Kreislaufvolumenstrom $\dot{V}_{Kreislauf}$ realisiert. Dieser geringe Umsatz korrespondiert mit im gesamten Festbettreaktor hohen Substratkonzentrationen, die bei dem hier vorliegenden Enzymreaktionsmechanismus der kompetitiven Produktinhibierung den negativen Einfluss hoher Produktkonzentrationen auf die Reaktionsrate mildern (Gl. 4.2). Durch dieses Vorgehen wird die Konkurrenz zwischen Substrat und Produkt um das aktive Zentrum des Enzyms weitest möglich zu Gunsten des Substrates und damit zur gewünschten Reaktion verschoben.

In den dargestellten Experimenten ließen sich Produktkonzentrationen weit oberhalb der maximalen Löslichkeit von 1,2,3-Trichlorpropan ($c_{TCP,max} = 14 \text{ mmol/l}$) erzielen. In Versuch M wurde eine maximale Produktkonzentration $c_{DCH} = 44,3 \text{ mmol/l}$ erzielt und in Versuch N betrug die

Tabelle 6.7: Für die Simulation verwendete Prozessgrößen der Rückführungsexperimente mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DSD4

Versuch	M	N	Einheit
Temperatur	30	35	°C
Versuchsdauer	166	193	h
pH-Wert im Rührkessel pH_{cstr}	9,05	9,53	-
Pufferkonzentration	19,0	21,0	mmol/l
Anfangsvolumen des Rührkessels $V_{cstr,0}$	3732	3161	ml
Kreislauf-Volumenstrom $\dot{V}_{Kreislauf}$	523,5	524,0	ml/h
Proben-Volumenstrom \dot{V}_{Probe}	3,05	3,71	ml/h
Laugenkonzentration c_{Lauge}	917	917	mmol/l
Restaktivität RA_0	21,2	11,9	%
prozentualer Standardfehler von RA_0	1,2	3,1	%
Inaktivierungsgeschwindigkeitskonstante k_1^{inakt}	0,035	0,230	1/d
Standardfehler von k_1^{inakt}	9,0	3,1	%

Produkt-Endkonzentration $c_{DCH} = 32,6$ mmol/l. Das grundlegende Ziel dieser Versuche konnte damit erreicht werden. Wie aus den Diagrammen in Abb. 6.12 sowie einem exemplarisch gezeigten Festbettprofil aus Versuch M (Abb. 6.13) hervorgeht, konnte eine gute Beschreibung der Konzentrationszeitverläufe durch das entwickelte und ausführlich in Kap. 5.3.1 beschriebene Modell des Rückführungsprozesses ebenfalls erzielt werden.

Beim Vergleich der beiden experimentellen Datensätze mit den Simulationslösungen fällt die bessere Beschreibung des Versuchs M gegenüber Versuch N auf, die vor allem für die Verläufe der Substratkonzentration und des pH-Wertes am Festbettaustritt erhalten wurde. Als Ursache für die unterschiedliche Vorhersagegüte konnte eine Nebenproduktbildung identifiziert werden, die in den beiden Versuchen unterschiedlich stark ausgeprägt war. In den Chromatogrammen der gaschromatographischen Konzentrationsbestimmung der chlorierten Kohlenwasserstoffe wurde mit fortschreitender Versuchsdauer ein weiterer Analyt beobachtet. Diese Substanz weist eine um 0,1 min höhere Retentionszeit als 1,2,3-Trichlorpropan auf und ist vermutlich 3-Chlor-1,2-propandiol, das ein entsprechendes Retentionsverhalten zeigt. 3-Chlor-1,2-propandiol (3CPD) kann als Abbauprodukt sowohl aus 1,2,3-Trichlorpropan über 1,3-Dichlor-2-propanol als auch aus 2,3-Dichlor-1-propanol gebildet werden. In den relativ kurzen Reaktionsexperimenten zur Schätzung der enzymkinetischen Parameter (maximal 6 h) wurde im Gegensatz zu den Rückführungsversuchen (bis zu 193 h) keine 3CPD-Bildung beobachtet. In Laborstabilitätsuntersuchungen von 1,2,3-Trichlorpropan und 2,3-Dichlor-1-propanol über einen Zeitraum von 430 Stunden konnte ebenfalls keine Bildung von 3-Chlor-1,2-propandiol gemessen werden. Die Produktion von 3-Chlor-1,2-propandiol in den Rückführungsexperimenten könnte daher auf eine schwache Katalyse durch das Enzym oder den Träger zurückzuführen sein.

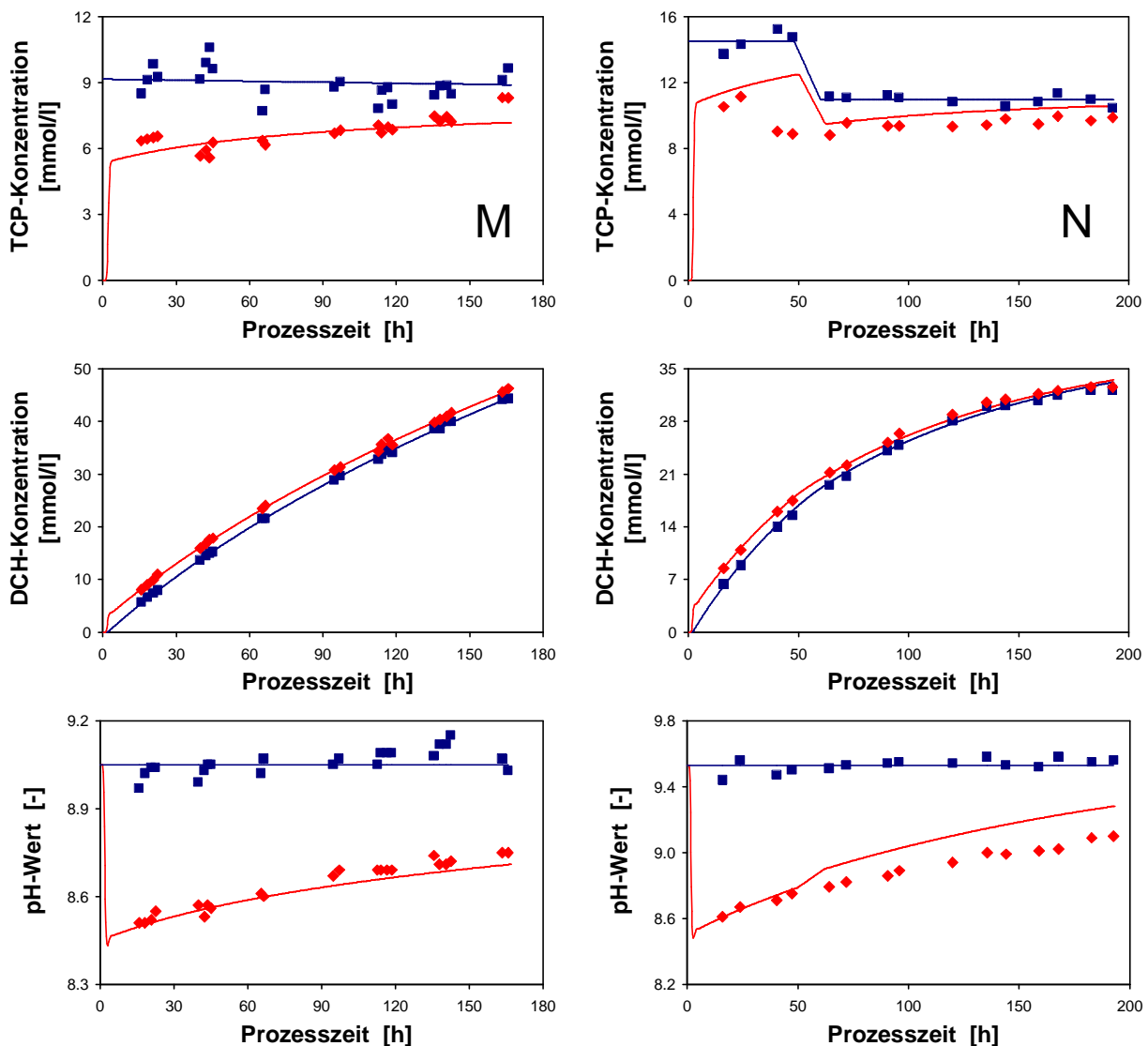


Abbildung 6.12: Experimente des Rückführungsprozesses mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DSD4 (Quadrate: Werte im Rührkessel, Rauten: Werte am Festbettaustritt) und Simulationsergebnisse (Linien).

Zur Bildung von 3-Chlor-1,2-propandiol aus entweder 1,2,3-Trichlorpropan oder 2,3-Dichlor-1-propanol ist mindestens ein Dehalogenierungsschritt erforderlich, der durch die äquimolaren Freisetzung von Salzsäure zu einer Absenkung des pH-Wertes führt. Eine pH-Absenkung, die über das durch das Modell vorhergesagte Masse aufgrund der Reaktion von 1,2,3-Trichlorpropan zu 2,3-Dichlor-1-propanol hinausging, konnte insbesondere für Versuch N beobachtet werden (Abb. 6.12). Eine Abweichung zwischen den Verläufen des zum pH-Konstanthalten zum Rührkessel hinzutitrierten Laugenvolumens und der entsprechenden Modelllösung wurde für beide Versuche festgestellt (Abb. 6.14). Der experimentelle Verlauf des zutitrierten Laugenvolumens wurde durch eine Vorratswaage ermittelt, während der dargestellte Modellverlauf durch das zeitliche Integral des berechneten Laugenstroms \dot{V}_{Lauge} (Gl. 5.43) bestimmt wurde. Für Versuch M ist eine signifikante Abweichung

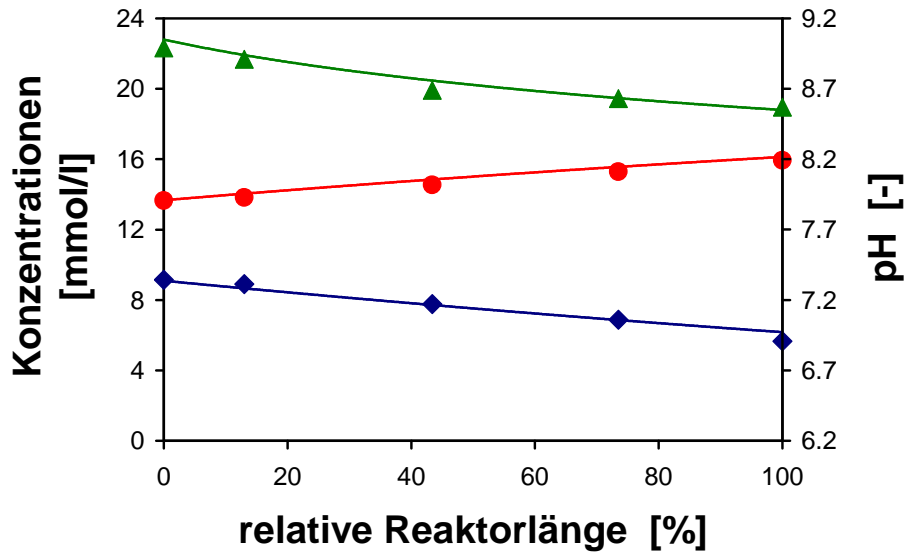


Abbildung 6.13: Festbettreaktorprofil während des Rückführungsprozesses mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DSD4 (Rauten: TCP, Kreise: DCH, Dreiecke: pH-Wert) und Simulationsergebnisse (Linien).

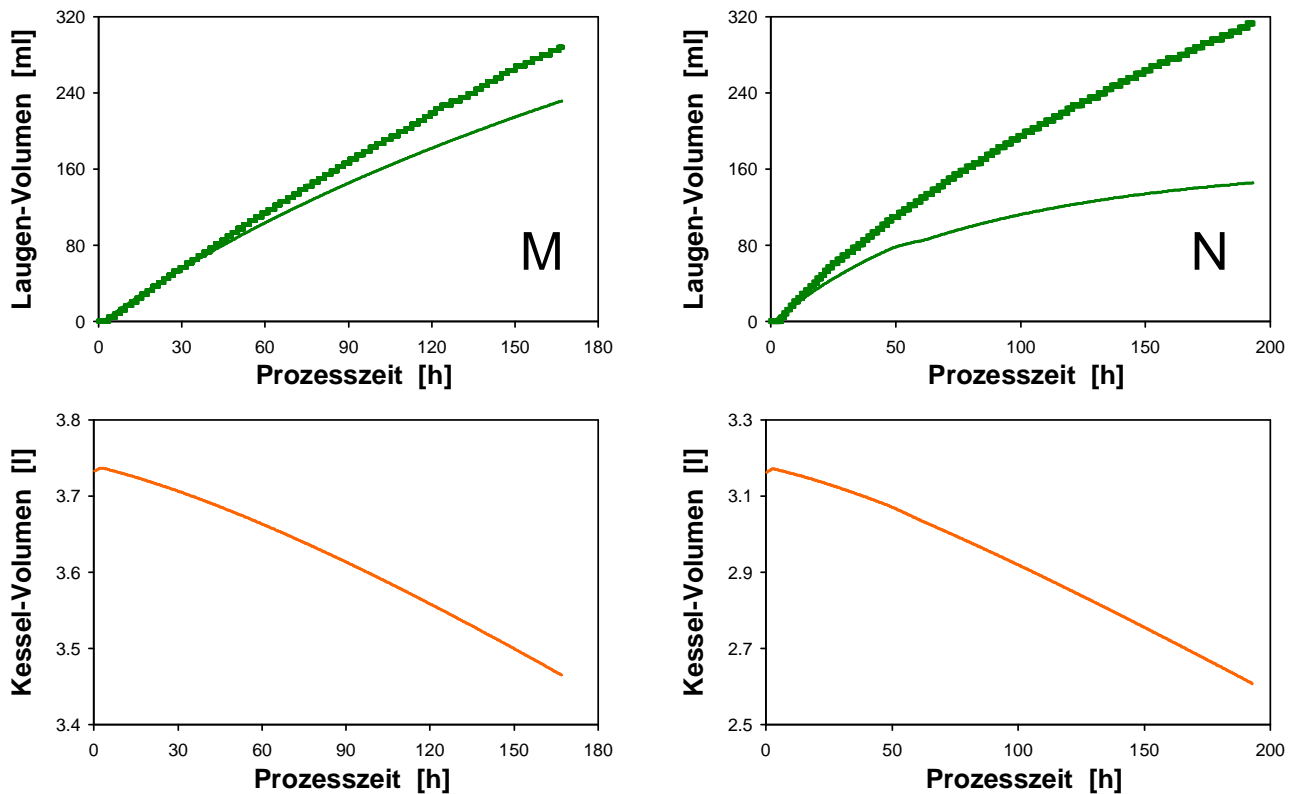


Abbildung 6.14: Verläufe des zum pH-Titrieren zugefütterten Laugen-Volumens und des Rührkesselvolumens des Rückführungsprozesses mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DSD4 (Quadrate: gemessener Verlauf) und Simulationsergebnisse (Linien).

zwischen den Verläufen ab ungefähr der Hälfte der Versuchsgesamtdauer zu erkennen, während beide Verläufe in Versuch N erheblich früher und gravierender auseinander laufen. Die darunter gezeigten Verläufe des Rührkesselvolumens entsprechen daher nicht den realen Verläufen, wobei für Versuch M die Abweichung ($< 1,5\%$) zu vernachlässigen ist und für Versuch N der Unterschied aufgrund des geringeren Startvolumens und der größeren Abweichung ungefähr 7% aufweist und damit nicht tolerabel ist.

Trotz der im Modell nicht berücksichtigten Nebenproduktbildung kann eine insgesamt zufriedenstellende Beschreibung des Rückführungsprozesses durch das erarbeitete Modell festgehalten werden.

6.3.4 Vergleich von Festbett- und Rückführungsprozess mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DSD4

In den vorhergehenden Abschnitten konnte gezeigt werden, dass das entwickelte Festbettmodell gut geeignet ist, die experimentellen Ergebnisse der Haloalkan-Dehalogenase-Miniplant für einen kontinuierlich betriebenen Festbettreaktor zu beschreiben. In diesem Abschnitt wird daher ein Vergleich der beiden Prozessführungsstrategien auf Basis von Simulationsergebnissen des entwickelten und in der Miniplant überprüften Modells für einen kontinuierlich betriebenen Festbettreaktor mit den experimentellen Ergebnissen des Rückführungsprozesses durchgeführt, um die Leistungsfähigkeit der beiden Prozesskonzepte vergleichend beurteilen zu können.

Als Kriterium für die Bewertung der Prozesskonzepte wird die Raum-Zeit-Ausbeute RZA herangezogen, die sich aus der insgesamt produzierten Stoffmenge an Produkt n_{DCH} , dem Reaktorvolumen $V_{Reaktor}$ und der Prozessdauer $t_{Prozess}$ ergibt:

$$RZA = \frac{n_{DCH}}{V_{Reaktor} \cdot t_{Prozess}} \quad (6.2)$$

Für den kontinuierlich betriebenen Festbett-Prozess ermittelt sich die hergestellte Stoffmenge an Produkt n_{DCH} aus dem zeitlichen Integral der Festbettaustrittskonzentration des Produktes, während diese Stoffmenge für den Rückführungsprozess aus der im Rührkessel und in den Rohren zum Endzeitpunkt des Prozesses vorhandenen Produktmenge bestimmt wurde. Die Raum-Zeit-Ausbeute RZA hängt erheblich vom Reaktionsumsatz δ ab, so dass die beiden Prozesse nur bei gleichem Umsatz δ verglichen werden können. Der Reaktionsumsatz δ wurde bei diesem Simulationsvergleich, der eine Nebenproduktbildung nicht berücksichtigt, gleich der Reaktionsausbeute angenommen, d.h. als Verhältnis der gebildeten Produktstoffmenge n_{DCH} zur eingesetzten Substratstoffmenge $n_{TCP,0}$.

$$\delta = \frac{n_{DCH}}{n_{TCP,0}} \quad (6.3)$$

Aufgrund der Nebenproduktbildung weisen die realen Rückführungsversuche M und N geringere Reaktionsausbeuten auf, die für die Wirtschaftlichkeit der betrachteten enzymatischen Produktion von optisch aktivem 2,3-Dichlor-1-propanol unerheblich sind, da das verwendete Substrat ein nicht anderweitig zu verwertendes und daher billiges Abfallprodukt darstellt.

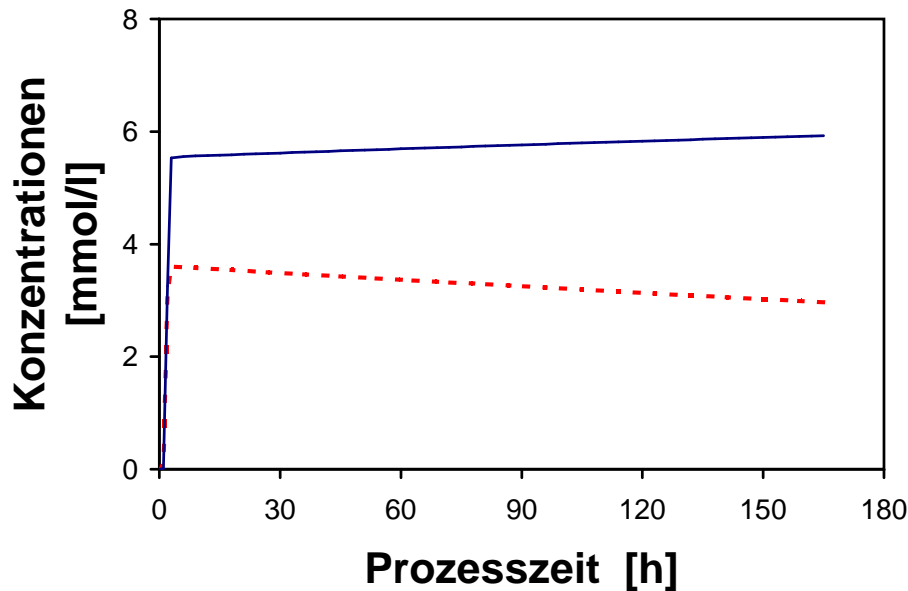


Abbildung 6.15: Zeitlicher Verlauf der Austrittskonzentrationen von Substrat (TCP, durchgezogene Linie) und Produkt (DCH, gestrichelte Linie) des kontinuierlich betriebenen Festbettreaktors für die in Tab. 6.7 genannten Parameterwerte.

Aufgrund der in den Rückführungsexperimenten beobachteten Problematik der Nebenproduktbildung stützt sich der rechnerische Vergleich der Prozessführungsstrategien auf die Bedingungen des Versuchs M, da dieser wesentlich weniger von der Bildung des unerwünschten Nebenproduktes betroffen war. Aus diesem Grunde werden hier die in Tab. 6.7 für Versuch M genannten Werte der Prozessgrößen und das in Abb. 6.12 gezeigte TCP-Festbetteintrittsprofil für den Vergleich von kontinuierlich betriebenen Festbettreaktor und diskontinuierlich betriebenen Rückführungsprozess als Musterprozessgrößen und somit als Vergleichsgrundlage gewählt.

Für den Raum-Zeit-Ausbeute-Vergleich (Abb. 6.16) wurde für den kontinuierlichen Festbettprozess der Volumenstrom $\dot{V}_{Festbett}$ variiert, um den Zusammenhang zwischen Raum-Zeit-Ausbeute und Umsatz herauszuarbeiten. Für die in Tab. 6.7 genannten Bedingungen ist der zeitliche Verlauf der Festbettaustrittskonzentrationen von Substrat und Produkt beispielhaft in Abb. 6.15 dargestellt. Der Einfluss der Enzyminaktivierung ist deutlich durch die Abnahme der Produktkonzentration über den Betrachtungszeitraum erkennbar. Für den Rückführungsprozess wurde für den Raum-Zeit-Ausbeute-Vergleich auf die Simulationsergebnisse, die in Abb. 6.12 präsentiert wurden, zurückgegriffen.

Die grafische Darstellung des Raum-Zeit-Ausbeute-Vergleichs der beiden Prozessführungsstrategien zeigt, dass die Raum-Zeit-Ausbeute des Rückführungsversuchs M nur unwesentlich niedriger als die des kontinuierlich betriebenen Festbettreaktors bei gleichem Umsatz ist. Für den Fall, dass der Probennahmestrom \dot{V}_{Probe} zu null angenommen wird, liegt die Raum-Zeit-Ausbeute des Rück-

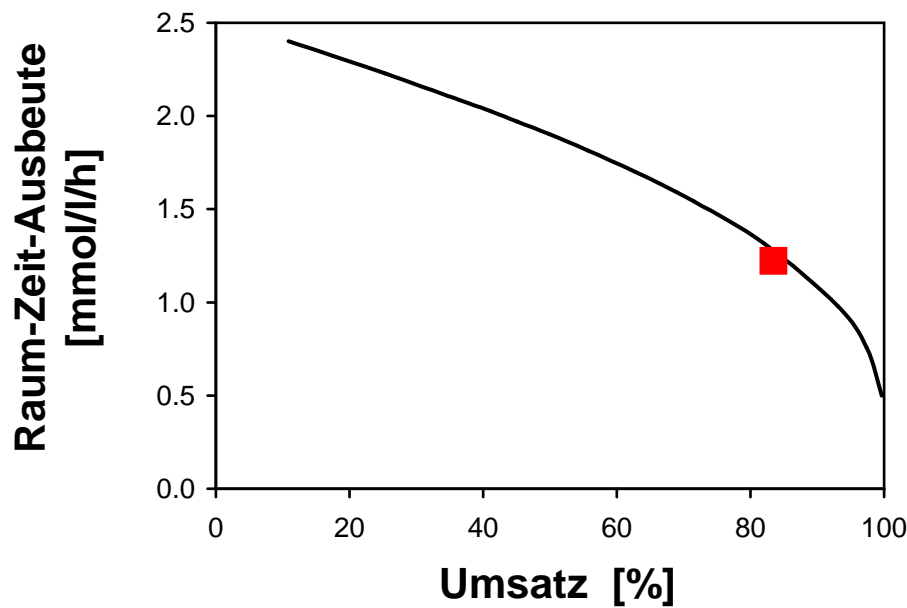


Abbildung 6.16: Vergleich der Raum-Zeit-Ausbeute des kontinuierlich betriebenen Festbettreaktorprozesses (Linie) und des Rückführungsprozesses (Quadrat).

führungsexperiment sogar oberhalb der dargestellten Linie des kontinuierlichen Festbettprozesses. Diese mit dem Festbettprozess vergleichbare Leistungsfähigkeit des Rückführungskonzeptes liegt in dem oben erklärten kinetischen Effekt der hohen Substratsättigung des Mediums, die den Wettbewerb zwischen Substrat und Produkt um das aktive Zentrum des Enzyms weitest möglich zugunsten des Substrates und damit zur gewünschten Reaktion beeinflusst.

Der Rückführungsprozess stellt aufgrund einer nahezu gleichen Raum-Zeit-Ausbeute bei gleichzeitig erheblich höheren Produktkonzentrationen eine interessante Prozessalternative zum kontinuierlich betriebenen Festbettreaktor dar. Das Potential dieses Prozesskonzeptes sollte daher in weiterführenden Experimenten detailliert erforscht werden.

6.4 Zusammenfassung

Die in Kap. 5 vorgestellten Modelle des Festbettreaktors und des Rückführungsprozesses wurden in diesem Kapitel den experimentellen Ergebnissen der Haloalkan-Dehalogenase-Miniplant gegenübergestellt und auf ihre Vorhersagegüte der Experimente untersucht.

Das Haloalkan-Dehalogenase-Enzym DhaA wurde sowohl in Eupergit- als auch PEI-Alumina-immobilisierter Form in stationären und dynamischen Miniplantexperimenten zur Validierung des Festbettreaktormodells eingesetzt. Die stationären Festbettkonzentrationsprofile von Substrat und Produkt sind geprägt von der enormen Produktinhibierung des Enzyms. Soll im Reaktor Vollumsatz erzielt werden, trägt vor allem der vordere Teil des Reaktors durch hohe Reaktionsraten dazu bei. Die dynamischen Übergänge zwischen zwei stationären Zuständen werden insbesondere von der reversiblen Adsorption / Desorption von 1,2,3-Trichlorpropan und 2,3-Dichlor-1-propanol be-

stimmt. Das Einstellen stationärer Konzentrationszustände erfordert ungefähr fünf Verweilzeiten. Aufgrund der Pufferung durch die Proteinamino­säuren und bei PEI-Alumina zusätzlich durch den Träger nimmt das Einstellen eines pH-Fließgleichgewichts bis zu zehn Verweilzeiten in Anspruch. Die Beschreibung der stationären und dynamischen Experimente mit Haloalkan-Dehalogenase DhaA durch das entwickelte Festbettreaktormodell ist zufriedenstellend, obwohl die zusätzliche Pufferung durch die Proteine und ggf. den Träger nicht berücksichtigt wird. Aufgrund der schwachen pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität von DhaA kommt es daher zu keinen messbaren Unterschieden zwischen experimentellen und Simulationsergebnissen.

Miniplant-Experimente mit Haloalkan-Dehalogenase DSD4 wurden ausschließlich in PEI-Alumina-immobilisierter Form durchgeführt. Fließgleichgewichtsprofile zeigen aufgrund der geringeren Produktinhibierung einen im Vergleich zu DhaA gleichmäßigeren Beitrag sämtlicher Reaktorbereiche zur Gesamtreaktorleistung. Das nur für die enzymbezogenen Größen modifizierte Modell beschreibt sämtliche Fließgleichgewichts- und dynamischen Versuche mit Haloalkan-Dehalogenase DSD4 zufriedenstellend, mit der Ausnahme der verfrühten Vorhersage des pH-Wert-Einstellens nach einem Sprungexperiment. Das Rückführungskonzept zur Erzielung von Produktkonzentrationen oberhalb der Löslichkeit des Substrates und das entwickelte Modell des Rückführungsprozesses wurden mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DSD4 in Miniplant-Versuchen ebenfalls einer experimentellen Untersuchung unterzogen. Es konnte eine maximale Produktkonzentration von 44,3 mmol/l erzielt werden, die mehr als dem Dreifachen der Substratlöslichkeit entspricht. In den Rückführungen konnte eine geringe Bildung eines Nebenprodukts beobachtet werden, bei dem es sich vermutlich um 3-Chlor-1,2-propandiol handelt. Durch die zusätzliche hydrolytische Dehalogenierung zu 3-Chlor-1,2-propandiol kommt es zu einem höheren Laugenverbrauch, der im Modell nicht berücksichtigt werden kann. Bei einer geringen Nebenproduktbildung (Versuch M) kommt es zu einer tolerierbaren Fehlvorhersage des Laugenverbrauchs durch das Prozessmodell und dadurch zu einer insgesamt zufriedenstellenden Beschreibung des zeitlichen Verhaltens dieses Prozesskonzeptes. In Versuch N kam es durch eine erhebliche Nebenproduktbildung zu einem sehr hohen zusätzlichen Laugenverbrauch der zu einer Fehlschätzung des Rührkesselvolumens führte, so dass die entsprechenden Modelllösungen trotz teils guter Übereinstimmung von experimentellen und Simulationsergebnissen nicht brauchbar sind.

Ein Vergleich der Raum-Zeit-Ausbeuten von Rückführungs- und kontinuierlichem Festbettprozess zeigte, dass für die Bedingungen von Versuch M die Raum-Zeit-Ausbeuten beider Prozessführungen bei gleichem Umsatz nahezu gleich ausfallen. Da der Rückführungsprozess dabei erheblich höhere Produktkonzentrationen erzielt, erscheint dieses Verfahrenskonzept sehr viel versprechend und sollte in weitergehenden Untersuchungen systematisch weiterentwickelt werden.

Kapitel 7

Langzeitstabilität von immobilisierten Haloalkan-Dehalogenasen im kontinuierlichen Miniplant-Betrieb

Langzeitstabilitätsuntersuchungen der eingesetzten Katalysatoren unter Prozessbedingungen ist eine der wichtigsten Aufgaben einer voll automatisierten Miniplant-Versuchsanlage (Kap. 1.2.3). Die modellbasierte Beschreibung und Quantifizierung der Enzymstabilität unter realen Prozessbedingungen in einer Miniplant dient in Rahmen von Prozessentwicklungen enzymkatalysierter Reaktionen dazu, den Maßstabsübertrag und die Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen des beobachteten Verfahrens durch experimentell abgesicherte Daten hinsichtlich der maximalen Standzeiten der enzymatischen Katalysatoren zu verfeinern. Der hier verfolgte Ansatz, die Enzymstabilität unter gleichen Prozessbedingungen wie in einer industriellen Großanlage zu bestimmen, vertieft die Prozesskenntnis, erhöht die Übertragungssicherheit und ist in der Enzymtechnologie kaum verbreitet. ILLANES, WILSON, 2003 weisen daraufhin, dass der überwiegende Teil der veröffentlichten Enzymstabilitätsuntersuchungen sogar in Abwesenheit von Substrat und Produkt durchgeführt wurden. Der Einfluss dieser für die Enzyme und ihre Eigenschaften wichtige Modulatoren kann dadurch nicht berücksichtigt werden. Abschätzungen der Standzeiten im industriellen Einsatz basierend auf solchen Untersuchungen können zu gravierenden Fehleinschätzungen führen.

Bei dem hier betrachteten Stoffsystem eines in Wasser schwer löslichen flüssigen Haloalkans war eine dauerhaft reproduzierbare Einstellung der Substratkonzentration nicht möglich. Die Langzeitstabilität der verwendeten Enzyme ist daher nicht unmittelbar über die Rohdaten abschätzbar. Das vorgestellte und validierte Festbettmodell bietet durch die Auswertung des Parameters Enzymrestaktivität RA (Gl. 5.39) die Möglichkeit das Inaktivierungsverhalten der immobilisierten Enzyme zu beobachten und zu bewerten. Zu diesem Zwecke wird der zeitliche Verlauf der Enzymrestaktivität RA betrachtet.

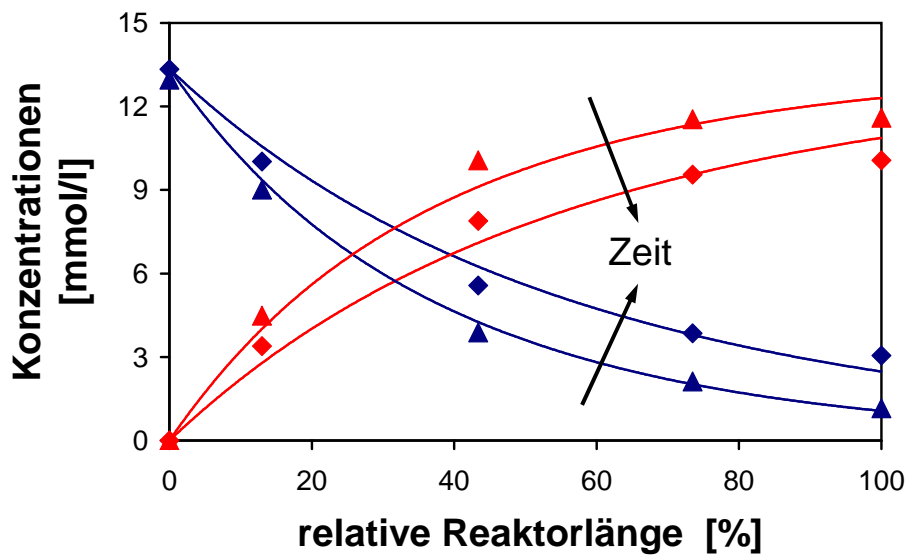


Abbildung 7.1: Einfluss der Enzyminaktivierung auf die Konzentrationsprofile entlang des Festbettreaktors der Haloalkan-Dehalogenase-Miniplant (Rauten: TCP, Dreiecke: DCH).

Beispielhaft für den erheblichen Einfluss der Enzyminaktivierung auf die Leistungsfähigkeit des Reaktors und damit auf die Raum-Zeit-Ausbeute des Prozesses zeigt Abb. 7.1 einen Vergleich zweier Festbettprofile. Diese Konzentrationsverläufe von Substrat und Produkt der enzymatischen Dehalogenierung sind unter gleichen Bedingungen ermittelt worden (PEI-Alumina-immobilisierte Haloalkan-Dehalogenase DhaA, Temperatur $T = 40^{\circ}\text{C}$, Volumenstrom $\dot{V} = 300 \text{ ml/h}$, TCP-Ausgangskonzentration $c_{TCP,0} = 13,3 \text{ mmol/l}$, Start-pH $pH_0 = 8,9$). Zwischen den beiden Experimenten lag ein Zeitraum von 13,8 Tagen kontinuierlicher Miniplant-Betrieb. In diesem Zeitraum sank der gemessene Umsatz am Reaktorauslass von 90,9% auf 75,1% und die abgeleitete Enzymrestaktivität RA von 44,25% auf 28,5%.

7.1 Modellbasierte Beschreibung des Inaktivierungsverlaufs

Für die mathematische Beschreibung des zeitlichen Enzyminaktivierungsverlaufs ist eine Modellvorstellung des Inaktivierungsmechanismus erforderlich. Das Reaktionsmodell beinhaltet dabei die angenommenen Enzymformen, die unterschiedliche spezifische Enzymaktivitäten aufweisen können, und die Elementarreaktionen, die die Enzymvarianten ineinander übergehen lassen und die mit Hilfe von Geschwindigkeitskonstanten beschrieben werden (Abb. 7.2).

Die einfachste Modellvorstellung der Enzyminaktivierung stellt die schon in Kap. 3.1.2 vorgestellte Inaktivierungskinetik erster Ordnung dar. Ihr liegt die Vorstellung zugrunde, dass das Enzym in zwei unterschiedlichen Formen vorliegen kann: einer aktiven sowie einer inaktiven Variante, wobei die inaktive Form durch eine irreversible Reaktion erster Ordnung aus der aktiven Form entsteht (Abb. 7.2, Nr. 1).

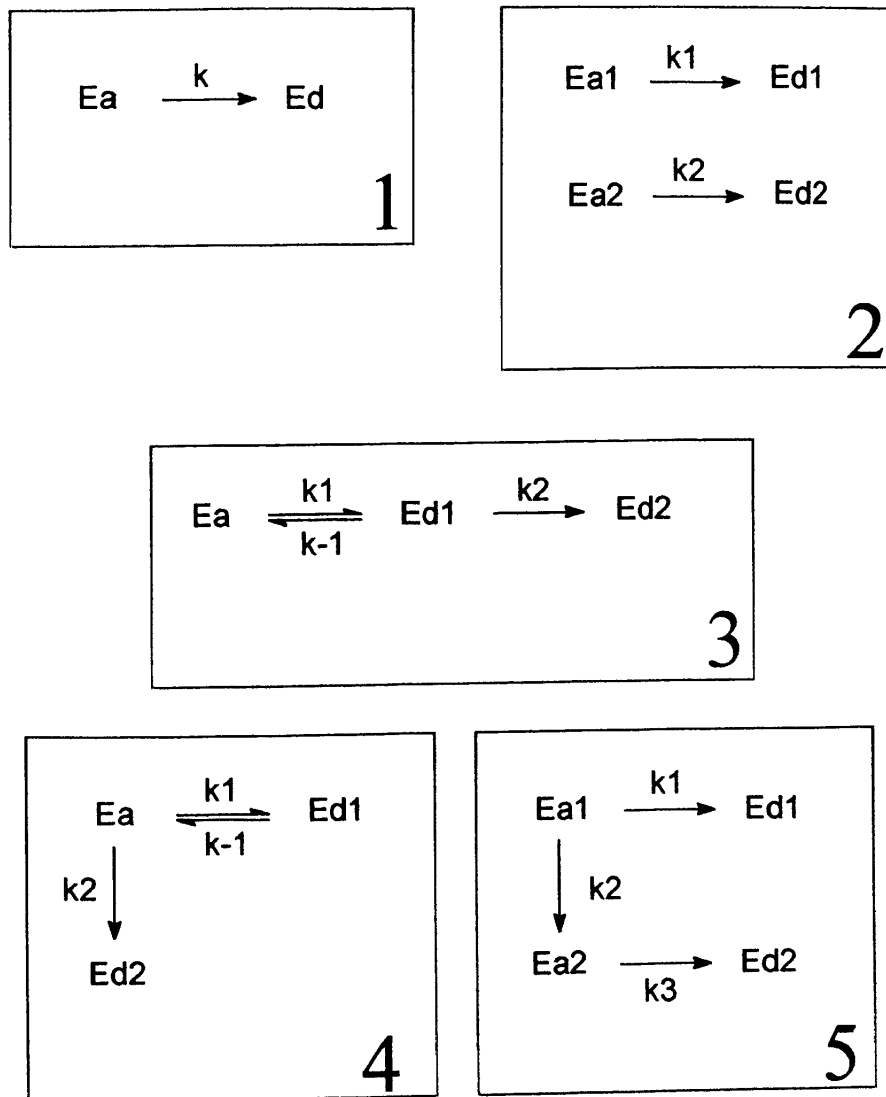


Abbildung 7.2: Ausgewählte Mechanismen der thermischen Inaktivierung von Enzymen nach AYMARD, BELARBI, 2000 (Inaktivierung erster Ordnung (1), parallele (2), serielle (3), kompetitive (4) und kompetitiv-serielle Inaktivierung (5); Indices: a = aktiv, d = desaktiviert).

Mathematisch wird der zeitliche Verlauf der Enzymrestaktivität RA bei einer Inaktivierung erster Ordnung durch folgende Differentialgleichung beschrieben:

$$\frac{dRA}{dt} = -k_1^{inakt} \cdot RA \quad (7.1)$$

$$RA(t = 0) = RA_0 \quad (7.2)$$

Einige der in den folgenden Abschnitten präsentierten zeitlichen Verläufe der Enzymrestaktivität RA wurden benutzt, um in Parameteranpassungen jeweils die Anfangsrestaktivität RA_0 und die Inaktivierungsgeschwindigkeitskonstanten erster Ordnung k_1^{inakt} zu schätzen. Die daraus abgeleiteten Halbwertszeiten $t_{1/2}$ der Enzyminaktivierung sind mit Hilfe von Gl. 3.5 ermittelt worden.

Die Abhängigkeit der Inaktivierungsgeschwindigkeitskonstanten erster Ordnung k_1^{inakt} von der Temperatur ist durch den Arrhenius-Ansatz gegeben:

$$k_1^{inakt} = A_{inakt} \cdot e^{-\frac{E_A^{inakt}}{R \cdot T}} \quad (7.3)$$

Die Parameter des Arrheniusansatzes (Frequenzfaktor A_{inakt} , Aktivierungsenergie E_A^{inakt}) werden im Folgenden nicht bestimmt, sondern Gl. 7.3 dient zur Diskussion der ermittelten Ergebnisse bei unterschiedlichen Temperaturen. Durch eine Temperatursteigerung steigt die Inaktivierungsgeschwindigkeitskonstante k_1^{inakt} an, da die Aktivierungsenergie E_A^{inakt} nur positive Werte annimmt.

Für die komplexeren Kinetikansätze der Enzyminaktivierung (Abb. 7.2, Nr. 2 - 5) ist das Vorgehen zur mathematischen Beschreibung des Inaktivierungsverlaufs analog. Aus den Bilanzen wird ein Differentialgleichungssystem abgeleitet, das durch Verwenden des Arrhenius-Ansatzes temperaturabhängig beschrieben werden kann. Für den Spezialfall des isothermen Betriebs können die analytischen Lösungen des Restaktivitätsverlaufs für die in Abb. 7.2, Nr. 2 – 5 dargestellten Inaktivierungsmechanismen nach AYMARD, BELARBI, 2000 zu einer biexponentiellen Funktion der Form

$$RA(t) = a \cdot e^{-\alpha \cdot t} + (1 - a) \cdot e^{-\beta \cdot t} \quad (7.4)$$

vereinfacht werden.

Zur Bewertung der Bestimmungsgüte der geschätzten Parameterwerte wird in den folgenden Abschnitten der Vertrauensbereich der Parameter angegeben. Zur Berechnung des Vertrauensbereichs ist der prozentuale Standardfehler SF des geschätzten Parameters erforderlich, der als statistisches Ergebnis vom eingesetzten Regressionstool ausgegeben wurde. Für das hier gewählte Konfidenzniveau von 95 % ergibt sich der Vertrauensbereich eines zu schätzenden Parameters P aus:

$$(1 - 2 \cdot SF) \cdot P_{geschätzt} < P_{tat} < (1 + 2 \cdot SF) \cdot P_{geschätzt} \quad (7.5)$$

Für eine verlässliche Vorhersage des Enzyminaktivierungsverhaltens sind möglichst kleine Vertrauensbereiche der Parameter erstrebenswert.

7.2 Langzeitstabilität der Haloalkan-Dehalogenase DhaA

Die Stabilität der Haloalkan-Dehalogenase DhaA konnte ausführlich in mehreren Versuchsreihen in der Miniplant untersucht werden. Es wurden dabei sowohl die Eupergit- als auch die PEI-Alumina-Immobilisierung betrachtet.

7.2.1 Experimente mit Eupergit-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA

Die Haloalkan-Dehalogenase DhaA wurde in Eupergit-immobilisierter Form auf ihre Langzeitstabilität unter Prozessbedingungen in einer Miniplant-Versuchsreihe untersucht. Die abgedeckten Prozessgrößen und die Eigenschaften des Festbetts entsprechen den in Tabelle 6.1 angegebenen Werten. Es wurde ausschließlich eine Festbetttemperatur von 30°C betrachtet.

Der durch Anpassen des Parameters Enzymrestaktivität RA an experimentell bestimmte Festbettreaktorprofile der Konzentrationen von Substrat und Produkt gewonnene zeitliche Verlauf der Enzyminaktivierung ist in Abb. 7.3 wiedergegeben. Die durchgezogene Linie stellt die Kinetik erster Ordnung nach Gl. 7.2 und die beiden gestrichelten Linien jeweils plus bzw. minus 10% dieser Kurve dar. Die Ergebnisse sind tabellarisch in Tab. 7.1 zusammengefasst.

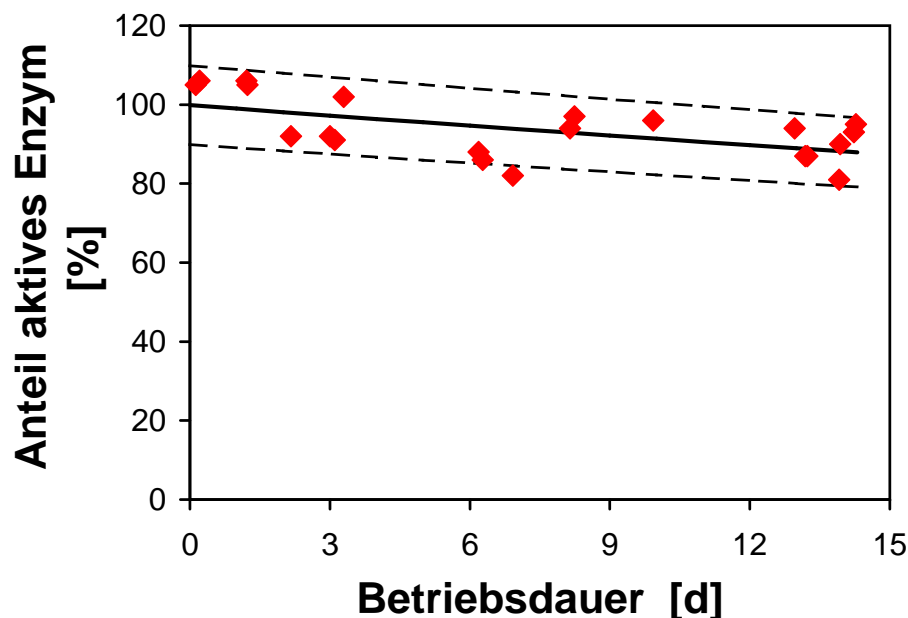


Abbildung 7.3: Zeitlicher Verlauf der Enzymrestaktivität von Eupergit-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA bei kontinuierlichem Miniplant-Betrieb und einer Temperatur von 30°C (Punkte: Messergebnis, Linie: Kinetik erster Ordnung).

Der Verlauf der Restaktivität RA von Eupergit-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA bei einer Temperatur von 30°C zeigt eine geringe Abnahme der Enzymaktivität (ca. 12 %) über den Beobachtungszeitraum von 14,3 Tagen. Im Verhältnis zur Aktivitätsabnahme weisen die Werte der Enzymrestaktivität eine relativ starke Streuung auf, die in der fehlerbehafteten Konzentrationsbestimmung und einem geringen Zerfall des Substrats, der in dieser Versuchsreihe beobachtet wurde, begründet liegt. Bis auf einen Wert fallen sämtliche 24 ermittelten Restaktivitätswerte in einen $\pm 10\%$ -Schwankungsbereich um die angepasste Kinetik erster Ordnung. Aufgrund des breiten Bereichs der Reaktionsbedingungen, der im Rahmen dieser Versuchsreihe abgedeckt wurde (Tab. 6.1), kann dieses Ergebnis als zufriedenstellend bezeichnet werden.

Tabelle 7.1: Ergebnisse des Langzeitversuchs mit Eupergit-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA

Grösse	Wert	Einheit
Festbett-Temperatur	30	°C
Dauer	14,27	d
Anzahl der Einzelversuche	24	-
Anfangsrestaktivität RA_0	100,4	%
prozentualer Standardfehler von RA_0	2,5	%
Inaktivierungsgeschwindigkeitskonstante k_1^{inakt}	0,0093	1/d
Standardfehler von k_1^{inakt}	30,1	%
Halbwertszeit $t_{1/2}$	74,5	d

Aufgrund der starken Streuung der Restaktivitätswerte und der über den Beobachtungszeitraum relativ geringen Aktivitätsabnahme ist die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der Enzyminaktivierung k_1^{inakt} statistisch nicht sehr aussagefähig. Der Wert der Geschwindigkeitskonstanten beträgt $k_1^{inakt} = 0,0093$ 1/d, der einer Halbwertszeit $t_{1/2}$ von 74,5 Tagen entspricht. Der relative Standardfehler SF der angepassten Geschwindigkeitskonstante beträgt 30,1% und bestätigt die geringe Aussagekraft der bestimmten Geschwindigkeitskonstante. Bei einem 95-prozentigen Konfidenzniveau fällt der tatsächliche Wert der Geschwindigkeitskonstante k_1^{inakt} in den von Gl. 7.5 aufgespannten Bereich, so dass sich die tatsächliche Halbwertszeit im Bereich von 46 bis 187 Tagen bewegt.

Aufgrund des kleinen abgedeckten Bereichs der Inaktivierung kann die hier vorgestellte Studie und ihr Ergebnis nur als erster Hinweis zum Inaktivierungsverhaltens der Eupergit-immobilisierten Haloalkan-Dehalogenase DhaA gesehen werden. Umfangreichere Langzeituntersuchungen wären für eine verlässliche Quantifizierung der Enzymstabilität durchzuführen.

7.2.2 Experimente mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA

Die Langzeitstabilität der Haloalkan-Dehalogenase DhaA immobilisiert an PEI-Alumina wurde in insgesamt fünf Versuchsreihen unter kontinuierlichen Betriebsbedingungen in der Miniplant untersucht. Die Festbetteigenschaften und der abgedeckte Größenbereich der Startbedingungen sind in Tab. 6.3 gezeigt.

In der folgenden Darstellung Abb. 7.4 der fünf Versuchsreihen sind die Werte der Enzymrestaktivität RA sämtlicher Einzelversuche zusammengetragen worden. In den Betriebspausen wurde der mit dem immobilisierten Enzym beladenen Festbettreaktor auf eine Temperatur von 5°C gekühlt. Die in diesen Kühlphasen aufgetretene Enzyminaktivierung kann aufgrund der sehr niedrigen Kühltemperatur gegenüber der Inaktivierung während des Betriebs vernachlässigt werden. Die durchgezogenen

Linien stellen eine für die jeweilige Versuchsreihe angepasste Kinetik erster Ordnung nach Gl. 7.2 dar.

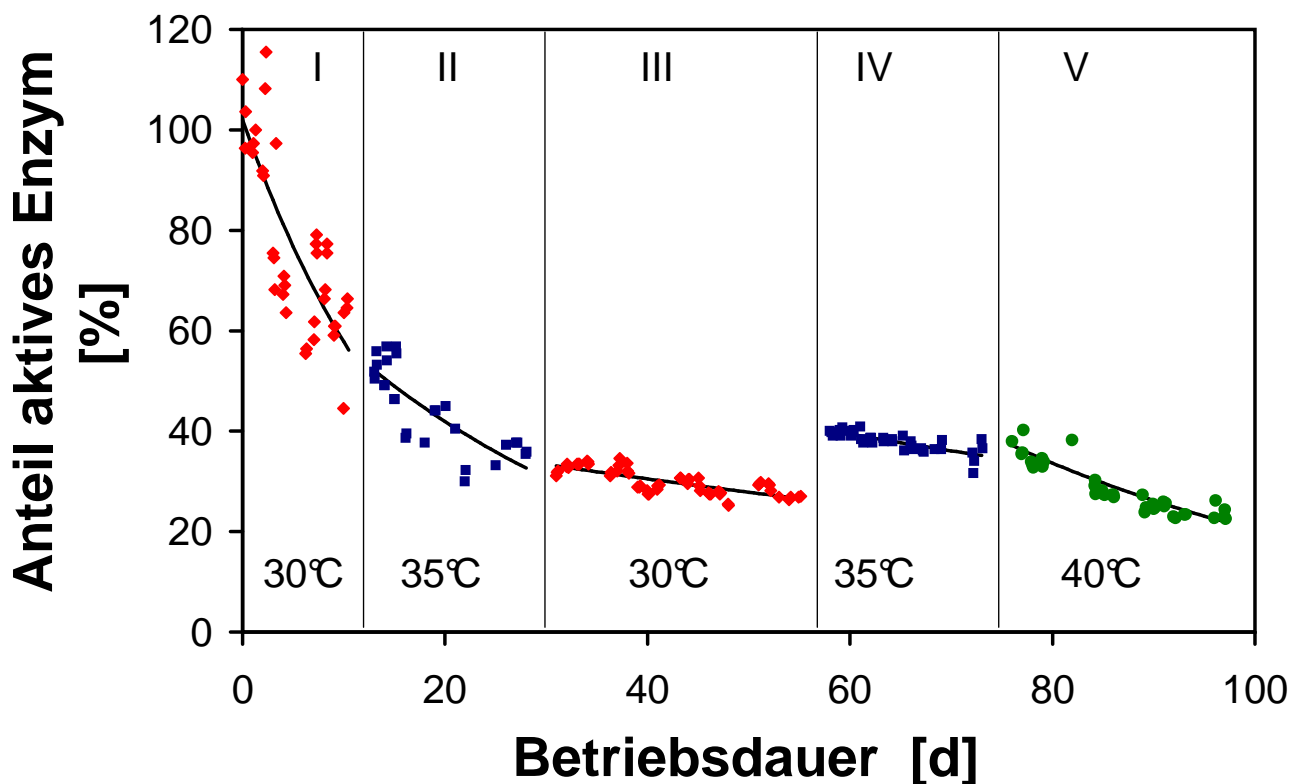


Abbildung 7.4: Verlauf der Enzymrestaktivität von PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA bei kontinuierlichem Miniplant-Betrieb (Punkte: Messergebnis, Linie: Kinetik erster Ordnung).

Die grafische Zusammenfassung sämtlicher Enzymrestaktivitätswerte (Abb. 7.4) zeigt gute Übergänge zwischen den einzelnen Versuchsreihen. Der Anstieg in der ermittelten Restaktivität RA zwischen Versuchsreihe III und IV ist in einer vorgenommenen Homogenisierung der Festbetschüttung begründet. Diese Neudurchmischung des Festbetts wurde durchgeführt, da in den Versuchsreihen II und III eine schleichende Inaktivierung des Reaktoreinlassbereichs durch ungelöstes Substrat auftrat. Überschüssiges Substrat 1,2,3-Trichlorpropan inaktiviert als zweite, organische Phase das Enzym. Erkennbar wurde dieses Phänomen durch den Vergleich der experimentell bestimmten Fließgleichgewichts-Festbettreaktorprofile mit den korrespondierenden Simulationsergebnissen, die nicht mehr zur Deckung zu bringen waren. Die relativen Fehlerquadratsummen der angepassten Profile stiegen durch den inaktivierten Frontbereich um bis zu eine Größenordnung gegenüber üblicherweise erzielten Werten an. Bei der Interpretation der Langzeitstabilitätsuntersuchungen muss diese zusätzliche Inaktivierung des Frontbereichs, die der thermischen Inaktivierung des Enzyms überlagert ist, für die Versuchsreihen II und III berücksichtigt werden.

Aus dem zeitlichen Inaktivierungsverlauf (Abb. 7.4) ist die relativ starke Streuung der Einzelwerte der Enzymrestaktivität RA um die angepassten Kinetiken erster Ordnung erkennbar. Diese Streuung ergibt sich aufgrund von Messfehlern und einer schleichenden Zersetzung des Substrates, die wäh-

rend des Miniplant-Betriebs beobachtet werden konnte. Ähnlich wie für die Eupergit-immobilisierte Haloalkan-Dehalogenase DhaA befand sich der weitaus überwiegende Teil der Restaktivitätswerte in einem 10%-Schwankungsbereich um die angepassten Kinetiken erster Ordnung. Im Vergleich zur Eupergit-Stabilitätsuntersuchung konnte für PEI-Alumina ein wesentlich größerer Zeitraum betrachtet werden, in dem die Enzymrestaktivität insgesamt um ungefähr 80% abnahm. Das Verhältnis der Streuung der Einzelwerte zum Aktivitätsverlust ist daher für die hier vorgestellte Untersuchung günstiger. Die Versuchsbedingungen und die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen von PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA sind in Tab. 7.2 zusammen getragen.

Tabelle 7.2: Ergebnisse der Langzeitversuche mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA

Versuchsreihe	I	II	III	IV	V	Einheit
Festbett-Temperatur	30	35	30	35	40	°C
Dauer	10,36	15,06	24,14	15,10	21,14	d
Anzahl der Einzelversuche	36	25	57	35	38	-
Inaktivierung des Reaktoreinlasses	nein	ja	ja	nein	nein	
Anfangsrestaktivität RA_0	102,0	52,1	33,1	40,1	37,2	%
prozentualer Standardfehler von RA_0	3,9	2,9	1,2	0,9	2,0	%
Inaktivierungsgeschwindigkeitskonstante k_1^{inakt}	0,0568	0,0311	0,0091	0,0088	0,0251	1/d
Standardfehler von k_1^{inakt}	13,2	15,1	11,0	13,6	7,2	%
Halbwertszeit $t_{1/2}$	12,2	22,3	76,2	78,8	27,6	d

Die Ergebnisse aller fünf Inaktivierungsstudien zeigen, dass sich der Inaktivierungsmechanismus der PEI-Alumina-immobilisierten Haloalkan-Dehalogenase DhaA offenbar nicht durch einen Kinetikansatz erster Ordnung beschreiben lässt. Diese Schlussfolgerung kann durch den Vergleich der in Tab. 7.2 aufgelisteten Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung der Enzyminaktivierung k_1^{inakt} gezogen werden. Die starke Aktivitätsabnahme zu Beginn des Langzeitexperiments bei 30°C (Versuchsreihe I) konnte in der zweiten Versuchsreihe bei 30°C (Versuchsreihe III) nicht beobachtet werden. In den Versuchsreihen bei höheren Temperaturen als 30°C (Versuchsreihen II, IV und V) wurden ebenfalls geringere Inaktivierungsgeschwindigkeitskonstanten erster Ordnung k_1^{inakt} beobachtet als in Versuchsreihe I. Theoretisch erwartet man mit einem Anstieg der Temperatur eine Zunahme der Inaktivierungsgeschwindigkeitskonstanten erster Ordnung k_1^{inakt} (Gl. 7.2). Es ist daher anzunehmen, dass ein komplexerer Inaktivierungsmechanismus für PEI-Alumina-immobilisierte Haloalkan-Dehalogenase DhaA als eine Inaktivierungsreaktion erster Ordnung vorliegt. Die angepassten Kinetiken erster Ordnung dienen daher vor allem zur Veranschaulichung dieses Umstandes sowie als Argumentationsgrundlage und sollten nicht als zutreffender Mechanismus angesehen werden. Der Verlauf der Restaktivität (Abb. 7.4) könnte zum Beispiel durch einen mehrstufigen Inaktivierungsprozess, eine kompetitive oder parallele Deaktivierung erklärt werden (s. Abb. 7.2). Aufgrund der

überlagerten Inaktivierung des Enzyms durch überschüssiges Substrat wurde auf eine detailliertere Analyse des Inaktivierungsmechanismus verzichtet. Eine Anpassung an eine biexponentielle Funktion nach Gleichung 7.4 wurde aus der gleichen Überlegung verworfen. Ein solcher parametrisierter phänomenologischer Kinetikansatz wäre für den Maßstabsübertrag und die Wirtschaftlichkeitsüberprüfung des Haloalkan-Dehalogenase-Prozesses sehr wünschenswert, da dann das Ziel der modellbasierten Beschreibung und Quantifizierung der Enzymstabilität unter realen Prozessbedingungen in einer Miniplant erfüllt wäre.

Der Rohdatenverlauf der zeitlichen Enzyminaktivierung (Abb. 7.4) lässt sich auch ohne Aufklärung des Inaktivierungsmechanismus und Parametrierung eines kinetischen Ansatzes als erster Hinweis auf die Standzeit des Enzym unter realen Prozessbedingungen ansehen, so dass Abschätzungen der maximalen Betriebsdauer einer Immobilisatcharge in einer industriellen Produktionsanlage durch die in der Miniplant erhobenen Daten gestützt sind. Es gilt dabei insbesondere zu klären, ob die Stabilität den ökonomischen Anforderungen eines industriellen Prozesses genüge trägt.

7.3 Langzeitstabilität der Haloalkan-Dehalogenase DSD4

Die Stabilität der Haloalkan-Dehalogenase DSD4 wurde unter kontinuierlichen Prozessbedingungen ausschließlich mit dem Träger PEI-Alumina untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe werden im folgenden Abschnitt vorgestellt.

7.3.1 Experimente mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DSD4

Die Stabilität des Haloalkan-Dehalogenase-Enzyms DSD4 konnte in einer Versuchsreihe von 18,8 Tagen Dauer untersucht werden, in denen das in Tab. 6.5 dargelegte Feld der Betriebsgrößen abgedeckt wurde. Abweichend von den Langzeituntersuchungen mit Haloalkan-Dehalogenase DhaA wurden in dieser einzelnen Versuchsreihe mehrere Festbetttemperaturen eingestellt (Tab. 7.3). Im zeitlichen Verlauf der Enzymrestaktivität (Abb. 7.5) sind die Temperaturen durch unterschiedliche Symbole gekennzeichnet.

Tabelle 7.3: Ergebnisse des Langzeitversuchs mit PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DSD4

Grösse	Wert	Einheit
Festbett-Temperatur	25, 30, 35	°C
Dauer	18,8	d
Anzahl der Einzelversuche	14	-

Der Verlauf der Enzymrestaktivität RA für Haloalkan-Dehalogenase DSD4 im Miniplant-Betrieb zeigt eine drastische Aktivitätsabnahme von ungefähr 75 bis 80 % innerhalb der ersten Betriebswo-

che. Danach reduziert sich der Aktivitätsverlust, so dass am Ende der Versuchsreihe (18,8 Tage) ungefähr 15 % des ursprünglich aktiven Enzyms weiterhin aktiv sind. Dieser zeitliche Verlauf ähnelt dem von Haloalkan-Dehalogenase DhaA in PEI-Alumina-immobilisierter Form in der Hinsicht, dass auch bei dieser Träger-Enzym-Paarung eine starke anfängliche Abnahme der Enzymaktivität zu beobachten war (Abb. 7.4). Es stellt sich daher die Frage, ob dieser relativ starke Verlust an Enzymaktivität in der ersten Betriebsphase seine Ursache in der Immobilisierungsmethode hat oder typisch für die hier eingesetzten Haloalkan-Dehalogenasen sind. Eine gesicherte Antwort auf diese Frage konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gefunden werden und müsste durch weitergehenden Untersuchungen erarbeitet werden.

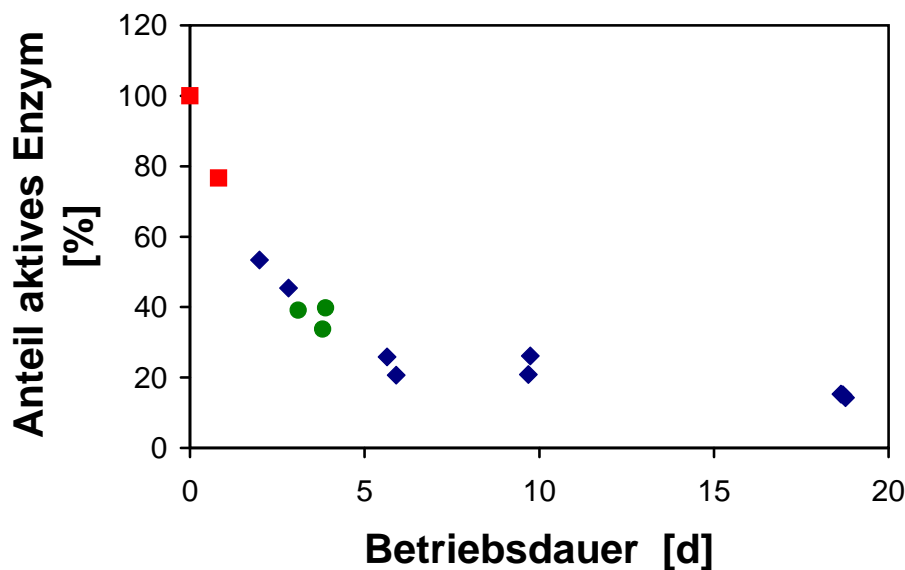


Abbildung 7.5: Verlauf der Enzymrestaktivität von PEI-Alumina-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DSD4 bei kontinuierlichem Miniplant-Betrieb (Quadrate: Festbett-Temperatur 25°C, Rauten: Festbett-Temperatur 30°C, Kreise: Festbett-Temperatur 35°C).

Für einen industriellen Einsatz erscheint der beobachtete Aktivitätsverlauf der PEI-Alumina-immobilisierten Haloalkan-Dehalogenase DSD4 eine nicht ausreichende Enzymstabilität darzustellen. Im Vergleich mit dem ebenfalls auf seine Langzeitstabilität getesteten Enzym DhaA fällt die Stabilität erheblich schlechter aus.

Zur Identifikation des Inaktivierungsmechanismus der PEI-Alumina-immobilisierten Haloalkan-Dehalogenase DSD4 wurde ein temperaturabhängig beschriebenes Kinetikmodell erster Ordnung eingesetzt (Kap. 7.1), das mit Hilfe der in Abb. 7.5 gezeigten Ergebnisse parametrisiert wurde. Dieses Modell war weder in der Lage den zeitlichen Verlauf der Enzymrestaktivität RA zu beschreiben, noch wiesen die Parameter physikalisch sinnvolle Werte auf. Die Aktivierungsenergie E_A der Inaktivierungsgeschwindigkeitskonstanten erster Ordnung k_1^{inakt} nahm negative Werte an, die thermodynamisch unmöglich sind. Aus diesem Grunde muss dieses Modell verworfen werden.

Aufgrund der geringen Anzahl an Messwerten wurde keine weitergehende Entschlüsselung des zugrunde liegenden Inaktivierungsmechanismus für PEI-Alumina-immobilisierte Haloalkan-

Dehalogenase DSD4 unternommen. Für den hier willkürlich als Beispiel herangezogenen Fall des in Abb. 7.2, Nr. 3 dargestellten seriellen Inaktivierungsmechanismus sind bei der Anpassung an die vierzehn für unterschiedliche Temperaturen bestimmten Einzelwerte der Enzymrestaktivität RA mindestens acht Parameter zu schätzen (vier Parameter der temperaturabhängigen Geschwindigkeitskonstanten, zwei unbekannte Startmengen der Enzymformen, zwei spezifische Aktivitäten der Enzymvarianten unter der Annahme, dass E_{d2} nicht aktiv ist, ansonsten drei spezifische Aktivitäten der Enzymvarianten). Für andere Kinetikansätze der Enzyminaktivierung, die komplexer als ein Ansatz erster Ordnung sind, ist die zu bestimmende Parameteranzahl mindestens genauso groß. Aufgrund der aus dem vorhergehenden Abschnitt für das Enzym DhaA bekannten relativ großen Schwankung der Einzelwerte können bei einer so geringen Anzahl an Messwerten keine statistisch verlässlich bestimmten Parameterwerte erwartet werden bzw. kann keine fundierte Modelldiskriminierung zur Identifikation des Enzyminaktivierungsmechanismus erfolgen. Da die Stabilität dieses Enzyms ohnehin industriellen Anforderungen nicht genügt, kann dieses Ergebnis der Stabilitätsuntersuchungen akzeptiert werden.

7.4 Zusammenfassung

Durch Langzeituntersuchungen mit immobilisierten Haloalkan-Dehalogenasen unter realen Prozessbedingungen in einer Miniplant konnten Abschätzungen der Enzymstabilität gewonnen werden. Die Haloalkan-Dehalogenase DhaA wurde sowohl mit Eupergit C als auch mit PEI-Alumina als Immobilisierungsträger hinsichtlich der Prozessstabilität betrachtet. Das Haloalkan-Dehalogenase-Enzym DSD4 wurde ausschließlich in der PEI-Alumina-immobilisierten Form auf die Prozessstabilität untersucht.

Für Eupergit-immobilisierte Haloalkan-Dehalogenase DhaA wurde über einen Zeitraum von 14,3 Tagen ein Verlust an aktivem Enzym von ungefähr 12% bestimmt. Im Verhältnis zu dieser Abnahme weisen die ermittelten Einzelwerte der Restaktivität eine relativ starke Streuung auf, die sich aufgrund von Messfehlern und einer Zersetzung des Substrates ergibt. Die aus den Ergebnissen abgeleitete Halbwertszeit von 74,5 Tagen ist daher statistisch nicht verlässlich. Im Sinne einer genaueren Vorhersagesicherheit der Enzymstabilität besteht für diese Enzym-Träger-Paarung ein Bedarf an weiteren Versuchen zur detaillierten Aufklärung und Beschreibung des Inaktivierungsverhaltens.

Haloalkan-Dehalogenase DhaA immobilisiert an PEI-Alumina wurde insgesamt fünf Langzeit-Miniplant-Versuchsreihen bei drei unterschiedlichen Temperaturen (30°C, 35°C, 40°C) unterzogen. Bei der zweiten und dritten Versuchsreihe trat eine zusätzliche, der thermischen Inaktivierung überlagerten Inaktivierung des Festbettreaktoreinlassbereiches aufgrund ungelösten Substrats als zweite, organische Phase auf. Im Verlauf des ungefähr vier Monate umfassenden Zeitraums kontinuierlichen Miniplant-Betriebs wurde ein Aktivitätsverlust von ungefähr 80% beobachtet. Der zeitliche Verlauf legt die Vermutung nahe, dass der Mechanismus der Enzyminaktivierung nicht mit einer Reaktion erster Ordnung beschrieben werden kann, sondern mit weiteren Zwischenschritten verlaufen

dürfte. Auf eine mathematische Beschreibung des Gesamtverlaufs der fünf Versuchsreihen wurde aufgrund der überlagerten Enzyminaktivierung durch ungelöstes organisches Substrat in zwei der fünf Versuchsreihen verzichtet. Für diese Enzym-Träger-Kombination ist eine Wiederholung des Langzeitexperiments zur Parametrierung eines kinetischen Ansatzes der Enzyminaktivierung wünschenswert. Eine Abschätzung des Verhaltens in einer industriellen Großanlage ist auf Basis der in der Miniplant gewonnenen Ergebnisse trotzdem qualitativ machbar.

Das Haloalkan-Dehalogenase-Enzym DSD4 wurde in PEI-Alumina-immobilisierter Form in einer 18,8 Tage dauernden Versuchsreihe auf die Prozessstabilität untersucht. Innerhalb der ersten Betriebswoche kam es dabei zu einer Aktivitätsabnahme um mind. 75 %. Der Aktivitätsverlust verringerte sich danach erheblich, so dass am Ende der Versuchsreihe eine Restaktivität von 15 % bestimmt werden konnte. Dieser dramatische Verfall der Enzymaktivität bei der Inbetriebnahme des Immobilisats ist für eine industrielle Anwendung nicht akzeptabel. Der Mechanismus der Inaktivierung von DSD4 konnte aufgrund der geringen Anzahl der Messpunkte nicht aufgeklärt werden.

Der Vergleich der beiden mit PEI-Alumina-immobilisierten Haloalkan-Dehalogenasen DhaA und DSD4 weist ein ähnliches Inaktivierungsmuster auf. Einer anfänglich starken Aktivitätsabnahme folgt eine Stabilisierung der Restaktivität mit nur noch geringer Inaktivierung. In weitergehenden Versuchen sollte die hier nicht zu beantwortende Frage geklärt werden, ob diese Muster spezifisch für den verwendeten Träger oder die beiden Enzyme ist.

Kapitel 8

Vergleich der verwendeten Immobilisierungsträger

In diesem Kapitel werden die im Rahmen dieser Arbeit über die verwendeten Immobilisierungsträger gesammelten Informationen zusammengestellt. Für eine rationale Auswahl des geeigneteren Trägers für die industrielle Verwirklichung der enzymatischen Dehalogenierung von 1,2,3-Trichlorpropan zu 2,3-Dichlor-1-propanol werden die Daten vergleichend präsentiert und mit Blick auf den Gesamtprozess beurteilt. Mit Gesamtprozess ist die Kombination von Immobilisierungsvorgang und katalytischem Einsatz des immobilisierten Enzyms gemeint. Da die rekombinante Expression der eingesetzten Haloalkan-Dehalogenasen sehr ineffektiv ist [FRITZ, 2007], kommt der Bewahrung von Enzymaktivität sowohl im Immobilisierungsprozess als auch im Syntheseinsatz des immobilisierten Enzyms eine große Bedeutung zu. Ein industrieller, großtechnischer Einsatz von immobilisierten Enzymen stellt neben den ökonomischen Erwartungen ebenso Anforderungen praktischer oder sicherheitstechnischer Natur, denen im Forschungsbetrieb oftmals nachrangige Aufmerksamkeit zuteil wird. Diese Aspekte sollen in den folgenden Trägervergleich mit einfließen.

Die in den folgenden Abschnitten präsentierten Ergebnisse beziehen sich auf Experimente mit Haloalkan-Dehalogenase DhaA. Aufgrund der unspezifischen Bindungsreaktionen sind diese Ergebnisse unmittelbar auf die Haloalkan-Dehalogenase DSD4 übertragbar.

8.1 Vergleich des Immobilisierungsvorgangs

Die Bewertung der Enzymträger im Hinblick auf den Immobilisierungsprozess wird in zwei Kriterien unterteilt: die Immobilisierungsdurchführung und Immobilisierungseffizienz.

8.1.1 Durchführung der Immobilisierung

Das Vorgehen bei den beiden Immobilisierungsmethoden ist ausführlich in Kap. 2.5 beschrieben worden. Für eine großtechnische Anwendung ist eine Enzymimmobilisierung mit Eupergit C erheblich

einfacher durchzuführen, weil für diese Methode das Entgasen des Trägers sowie der Aktivierungsschritt mit dem Kopplungsreagenz und den zusätzlichen Waschschrritten entfällt. Die Aktivierungsreaktion von PEI-Alumina mit Glutardialdehyd erfordert aufgrund der Toxizität von Glutardialdehyd Sicherheitsvorkehrungen, die bei Verwendung von Eupergit C nicht notwendig sind. Das bei Eupergit notwendige Abreagieren der überschüssigen Oxirangruppen und die lange Immobilisierungsdauer mindern allerdings die Vorteile gegenüber PEI-Alumina.

Bei Immobilisierungen mit PEI-Alumina wurde nach Beenden des Immobilisierungsvorgangs pulverförmiger Abrieb festgestellt. Der Anteil des Abriebs war stets sehr gering. Diese Beobachtung liegt in einer geringeren mechanischen Beständigkeit des anorganischen Alumina-Trägers gegenüber dem polymerbasierten Eupergit C begründet, dessen mechanische Formbeständigkeit über 650 Reaktionszyklen im Rührkesselseinsatz von KATCHALSKI-KATZIR, KRAEMER, 2000 gezeigt wurde. Wenn ein Einsatz im Rührbetrieb oder mehrmaliges Benutzen einer Immobilisiatcharge in unterschiedlichen Reaktor vorgesehen sein sollte, ist Eupergit C aufgrund der höheren mechanischen Stabilität PEI-Alumina vorzuziehen.

In Summe ergibt sich bei der vergleichenden Beurteilung der großtechnischen Immobilisierungsdurchführung ein klarer Vorteil für den Immobilisierungsträger Eupergit C gegenüber PEI-Alumina.

8.1.2 Effizienz der Immobilisierung

Unter Effizienz der Haloalkan-Dehalogenase-Immobilisierung ist hier die Aktivitätsausbeute Y_{Akt} des Immobilisierungsprozesses gemeint.

$$Y_{Akt} = \frac{A_{Immob}}{A_0} = \frac{m_{E,Immob}}{m_{E,0}} \cdot \frac{a_{Immob}}{a_0} = Y_{Masse} \cdot Y_{Akt,spez} \quad (8.1)$$

Die Aktivitätsausbeute Y_{Akt} stellt das Verhältnis der nach der Immobilisierung wiedergefundenen absoluten Enzymaktivität A_{Immob} zu der zur Immobilisierung eingesetzten absoluten Enzymaktivität A_0 dar. Die absoluten Aktivitäten A_i können durch die Enzymmasse $m_{E,i}$ und die spezifische Enzymaktivitäten a_i ausgedrückt werden. Die Immobilisierungsausbeute Y_{Akt} kann durch diese Umformulierung als das Produkt der Massenausbeute der Immobilisierung Y_{Masse} und der Ausbeute der spezifischen Aktivität $Y_{Akt,spez}$ verstanden werden. Die spezifischen Enzymaktivitäten a_i können durch Bestimmung der spezifischen Anfangsaktivitätsraten und die Enzymmassen $m_{E,i}$ durch die Proteingehaltmessung ermittelt werden, so dass die Aktivitätsausbeute Y_{Akt} mit Hilfe von Gl. 8.1 berechnet werden kann.

Der Vergleich zweier für die verwendeten Immobilisierungsmethoden typischer Verläufe des zeitlichen Immobilisierungsverhaltens (Abb. 8.1) zeigt sehr deutlich die stark unterschiedlichen Immobilisierungsraten. Der PEI-Alumina-Ansatz hat zum Probenzeitpunkt $t = 3,5$ h den Endzustand bereits erreicht. Die Immobilisierung mit Eupergit C verläuft erheblich langsamer. Die durchgezogene Linie

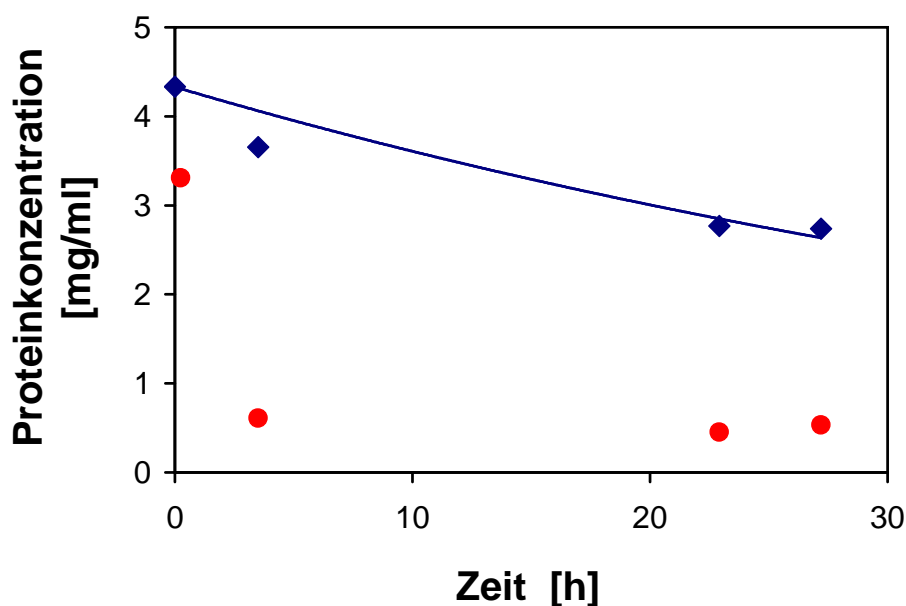


Abbildung 8.1: Vergleich des Immobilisierungsverlaufs von Haloalkan-Dehalogenase DhaA bei Immobilisierungen mit Eupergit C (Rauten, Linie: Modelllösung entsprechend Kap. 3) und PEI-Alumina (Kreise).

stellt eine Modelllösung der Proteinkonzentration entsprechend Kap. 3 dar. Die aus diesem Versuch abgeleiteten Ausbeuten der beiden Immobilisierungen sind in Tab. 8.1 dargestellt.

Tabelle 8.1: Vergleich der Aktivitätsausbeute von Immobilisierungen mit Eupergit C und PEI-Alumina

Grösse	Eupergit C	PEI-Alumina	Einheit
Massenausbeute Y_{Masse}	36,8	83,9	%
Ausbeute der spezifischen Aktivität $Y_{Akt, spez}$	22,0	35,1	%
Aktivitätsausbeute Y_{Akt}	8,1	29,4	%
Immobilisierungsausbeute $Y_{Immobil}$	21,8	–	%
Ausbeute der spezifischen Aktivität $Y_{Akt, spez}$	37,1	–	%
Aktivitätsausbeute Y_{Akt}	8,1	–	%
<i>bezogen auf die Masse immobilisierten aktiven Enzyms (s. Kap. 3, nur Eupergit)</i>			

Sowohl die Enzymmassenausbeute Y_{Masse} als auch die Ausbeute der spezifischen Aktivität $Y_{Akt, spez}$ ist für die Immobilisierung mit PEI-Alumina wesentlich höher als für Eupergit C. Da die beiden Einzelfaktoren der Gesamtaktivitätsausbeute Y_{Akt} jeweils höher für PEI-Alumina sind, ist auch die Gesamtaktivitätsausbeute Y_{Akt} erheblich größer. Gegenüber Eupergit C nimmt sie einen ungefähr 3,6-fachen Wert an, so dass eine immens höhere Aktivität nach der Immobilisierung durch den Gebrauch des Enzymträgers PEI-Alumina erzielt werden kann.

Bezieht man die Massenausbeute der Eupergit-Immobilisierung auf die Masse des immobilisierten aktiven Enzym, die sich durch das in Kap. 3 vorgestellte Modell der Eupergit-Immobilisierung bestimmen lässt, ergibt sich für die beiden verglichenen kovalenten Immobilisierungstechniken eine ungefähr übereinstimmende spezifische Aktivität des immobilisierten Enzyms. Würde man eine in Kap. 3 skizzierte Optimierung der Eupergit-Immobilisierung durch eine Erhöhung der Eupergit-Konzentration (von 25 g/l auf 80 g/l) durchführen, könnte die Immobilisierungsausbeute Y_{Imm} an immobilisierten aktivem Enzym auf 50% erhöht werden. Durch diese Maßnahme könnte die Gesamtaktivitätsausbeute Y_{Akt} der Eupergitimobilisierung auf 18,5% gesteigert werden. Verglichen mit diesem optimierten Eupergit-Ansatz wäre die PEI-Alumina-Immobilisierung trotzdem wesentlich effizienter, da die Gesamtaktivitätsausbeute um einen Faktor 1,6 höher ausfiele.

Das vorgestellte Ergebnis zeigt eindeutig, dass die PEI-Alumina-Immobilisierung einen erheblich größeren Anteil der Aktivität der Haloalkan-Dehalogenase-Enzyme im Vergleich zur Eupergit-Immobilisierung bewahrt. Aus diesem Grund ist diese Immobilisierungsmethode als wesentlich effizienter anzusehen.

8.2 Vergleich der reaktionstechnischen Eigenschaften der Enzymträger

Die Beurteilung der beiden Immobilisierungsträger im katalytischen Einsatz der Haloalkan-Dehalogenasen wird in drei Kategorien vorgenommen: Stofftransporteigenschaften, dynamisches Reaktorverhalten und Stabilisierung der Enzyme.

8.2.1 Stofftransporteigenschaften der Enzymträger

Bei den Überlegungen zum Stofftransport von in porösen Trägern immobilisierten Enzymen spielt vor allem der interne Stofftransport eine entscheidende Rolle. Zur Bewertung des Einflusses des als rein diffusiv angenommenen Stofftransports in der Porenphase des Trägers dient die dimensionslose Kennzahl des allgemeinen Thiele-Modulus (*general modulus*) Φ

$$\Phi = \frac{r}{D_{TCP,eff} \cdot c_{TCP}} \cdot \left(\frac{V_p}{A_p} \right)^2 = \frac{r \cdot R_p^2}{9 \cdot D_{TCP,eff} \cdot c_{TCP}} \quad (8.2)$$

die die Reaktionsrate r ins Verhältnis zur diffusiven Stofftransportrate eines als kugelförmig angenommenen Partikel setzt [BAILEY, OLLIS, 1986]. Werte größer 0,3 bedeuten, dass von einer Diffusionslimitierung der enzymkatalysierten Reaktion ausgegangen werden muss. Ziel der Auswahl eines Immobilisierungsträger ist es, neben weiteren Aspekten, eine solche Diffusionslimitierung zu vermeiden.

Die maximale Diffusionsstrecke innerhalb der Träger ist durch den Radius R_p der Trägerpartikel festgelegt. Für Eupergit-C-Perlen beträgt diese Strecke nur ca. 45% derjenigen bei PEI-Alumina, da der mittlere Korndurchmesser entsprechend kleiner ist (Tab. 2.3). Die Diffusionsrate in den Poren wird neben dem Konzentrationsgradienten durch den effektiven Diffusionskoeffizienten $D_{i,eff}$ bestimmt. In Kap. 5.2.5 wurden die unterschiedlichen Werte der effektiven Diffusionskoeffizienten in den Poren von Eupergit C und PEI-Alumina bestimmt. Für PEI-Alumina beträgt der effektive Diffusionskoeffizient nur ca. 8% des Wertes in freier Lösung. Die Reduktion des Diffusionskoeffizienten in Eupergit-Poren ist wesentlich geringer, der effektive Diffusionskoeffizient beträgt hier ca. 33%.

Die beiden erläuterten Umstände bewirken, dass unter vergleichbaren Bedingungen der Thiele-Modulus für Eupergit-immobilisierte Enzyme stets niedrigere Werte annimmt als für PEI-Alumina-immobilisierte Enzyme. Bei gleicher Reaktionsrate r und Substratkonzentration c_{TCP} ist der Thiele-Modulus Φ für PEI-Alumina zwanzigfach größer als für Eupergit C. Dieser Unterschied bewirkt, dass Eupergit mit aktiveren Enzymen oder höheren Enzymbeladungen eingesetzt werden könnte. Prozesstechnisch kann so die Raum-Zeit-Ausbeute vergrößert oder der Reaktor verkleinert werden. Vor diesem Hintergrund stellt Eupergit bei Stofftransportüberlegungen die geeignetere Wahl als PEI-Alumina dar.

Es muss jedoch erwähnt werden, dass bei den im Rahmen dieser Arbeit erzielten Enzymbeladungen und spezifischen Aktivitäten der zur Verfügung stehenden Haloalkan-Dehalogenase-Enzyme für beide Trägermaterialien eine Diffusionslimitierung auf jeden Fall ausgeschlossen werden konnte und daher beträchtliche Reserven bestehen, die durch eine Verbesserung der Enzymaktivitäten via *protein engineering* genutzt werden könnten.

8.2.2 Einfluss der Enzymträger auf das dynamische Reaktorverhalten

Der Vergleich des dynamischen Verhaltens des Dehalogenierungsprozesses ist aus Betreibersicht interessant, da es für den industriellen Einsatz von Bedeutung ist. An- und Abfahrverhalten des Festbettreaktors sowie der dynamische Übergang zwischen zwei Betriebspunkten haben insbesondere im Prozessverbund Einfluss auf die Leistungsfähigkeit des Gesamtprozesses. Aus Anwendersicht sind daher möglichst schnelle Übergänge wünschenswert.

Der transiente Übergang zwischen zwei Betriebspunkten wurde in einer Simulationsstudie untersucht, in der die beiden verwendeten Träger bei gleichem Referenz-Betrieb (TCP-Eintrittskonzentration $c_{TCP,0} = 12$ mmol/l, Eintritts-pH-Wert $pH = 9$, Temperatur $T = 30^\circ\text{C}$, Volumenstrom $400 = \text{ml/h}$, identische Enzymmasse im Reaktor, Enzymrestaktivität $RA = 1$) verglichen wurden. Die unterschiedlichen Zeitverläufe für das gewählte Beispiel des Reaktorabfahrens sind in Abb. 8.2 dargestellt.

Der Unterschied im dynamischen Verhalten der beiden Träger ist erheblich. Der Zeitraum zum Erreichen des neuen Fließgleichgewichtes dauert in diesem Beispiel für Eupergit ungefähr 42 %

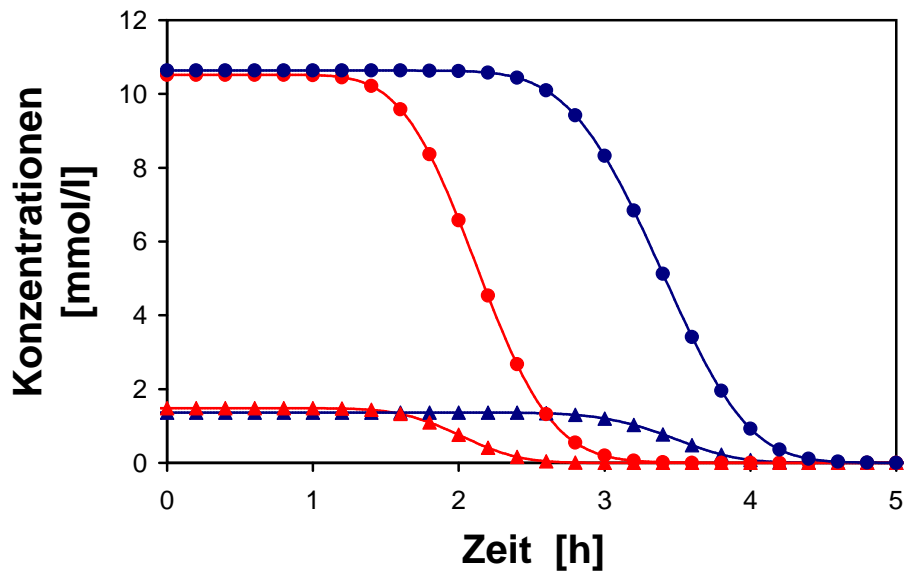


Abbildung 8.2: Vergleich des Enzymträgereinflusses auf das dynamische Festbettreaktorverhalten (Änderung der Zulaufkonzentration bei $t = 0$, Eupergit: blau, PEI-Alumina: rot, TCP: Dreiecke, DCH: Kreise).

länger als für PEI-Alumina. Dieser Unterschied kann durch die jeweils größere Stoffspeicherung in der Partikelflüssigphase und durch Adsorption am Trägermaterial erklärt werden.

Stoffspeicherung von Substrat und Produkt wird in dem hier verwendeten Modell durch drei Phänomene berücksichtigt: Stoffspeicherung in der Bulkflüssigphase, Stoffspeicherung in der Porenflüssigphase der Partikel und Stoffspeicherung in der Festphase der Partikel (Adsorption). Der Anteil des Gesamtvolumen der Bulkflüssigkeit V_{Bulk} am Reaktorgesamtvolumen $V_{Reaktor}$ beträgt

$$\frac{V_{Bulk}}{V_{Reaktor}} = \epsilon_{FB} \quad (8.3)$$

Der Hohlraumanteil der Festbettschüttung ϵ_{FB} bewegt sich für beide Träger in einer vergleichbaren Größenordnung (Kap. 5.2.3), weshalb diese Stoffspeicherung nicht für den gravierenden Unterschied im dynamischen Unterschied verantwortlich ist. Das Gesamtflüssigkeitsvolumen in den Partikelporen V_{Poren} , das bei einer Variation der Betriebsbedingungen als Trägheitsglied fungiert, variiert für beide Enzymträger deutlich (Tab. 2.3). Der Anteil der Porenflüssigkeit am Gesamtreaktorvolumen lässt sich mittels folgender Gleichung bestimmen:

$$\frac{V_{Poren}}{V_{Reaktor}} = (1 - \epsilon_{FB}) \cdot \epsilon_P \quad (8.4)$$

Für Eupergit C beträgt der Anteil des Gesamtporenvolumens am Reaktorvolumen ungefähr 48%, bei PEI-Alumina beträgt dieser Wert lediglich 20,4%. Aus diesem Grund wird der dynamische Übergang für Eupergit C gegenüber PEI-Alumina verzögert.

Die Gleichgewichtskonstanten m_i der Adsorption von Substrat und Produkt sind in Tab. 5.2 angegeben. Aus dieser Auflistung wird deutlich, dass für Eupergit C die Adsorption an den Träger der beiden Analyten wesentlich stärker ausgeprägt ist als für PEI-Alumina. Daher ist eine Verlängerung des dynamischen Übergangs des mit immobilisierten Enzym beladenen Festbettreaktors beim Einsatz von Eupergit C zu erwarten, da die Stoffspeicherung durch Adsorption für diesen Träger erheblich größer ausfällt.

Aufgrund der größeren Porosität und der stärkeren Adsorption von Substrat und Produkt bei der Verwendung von Eupergit C als Enzymträger wird das dynamische Verhalten des enzymbeladenen Festbettreaktors wesentlich verzögert, so dass PEI-Alumina für einen industriellen Einsatz vorzuziehen ist.

8.2.3 Stabilisierende Wirkung der Enzymträger

Neben der Erhaltung der Enzymaktivität während des Immobilisierungsvorgangs spielt die Bewahrung der Enzymaktivität im Prozesseinsatz eine entscheidende Rolle, um einen ökonomisch erfolgreichen großtechnischen Einsatz der enzymatischen Produktion von optisch aktivem 2,3-Dichlor-1-propanol zu erzielen.

Stellt man die in Kap. 7.2 vorgestellten Inaktivierungsverläufe für die Haloalkan-Dehalogenase DhaA bei Eupergit- und PEI-Alumina-Immobilisierung und einer Temperatur von 30°C einander gegenüber, ist eine deutlich stärkere anfängliche Abnahme der Enzymaktivität für die PEI-Alumina-Immobilisierung zu erkennen. Für die Halbwertszeit $t_{1/2}$ von Eupergit-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA wurde unter diesen Bedingungen ein Wert von 74,5 Tagen ermittelt, während dieser Wert für die PEI-Alumina-Immobilisierung lediglich 12,2 Tage betrug. Für PEI-Alumina konnte ein wesentlich längerer Zeitraum des kontinuierlichen Miniplant-Betriebs für die Bestimmung der Enzymstabilität ausgewertet werden als für Eupergit C. Im Verlauf dieses längeren Betriebszeitraums nahm die Enzyminaktivierungsrate erheblich ab, so dass für eine zweite Versuchsreihe bei 30°C eine Halbwertszeit von 76,2 Tagen trotz überlagerter Inaktivierung des Reaktoreinlassbereichs durch nicht-gelöstes Substrat beobachtet wurde. Es ist daher davon auszugehen, dass der Inaktivierungsverlauf der PEI-Alumina-immobilisierten Haloalkan-Dehalogenase DhaA nicht mit einem Ansatz erster Ordnung zu beschreiben ist und stattdessen der Rohdatenverlauf nach Abb. 7.4 zur Beurteilung der Enzymstabilität herangezogen werden muss. Dieser Verlauf zeigt eindeutig, dass nach einer anfänglich stärkeren Inaktivierung des Enzyms der Verlust an Aktivität abnimmt. Die Abnahme der Enzymaktivität bewegt sich dabei auf einem ähnlichem Niveau wie es für Eupergit-immobilisierte Haloalkan-Dehalogenase DhaA bestimmt wurde.

Für die Eupergit-immobilisierte Variante konnten keine weiteren Daten ermittelt werden. Auf Basis der gewonnenen Daten scheint diese Immobilisierungsmethode das Enzym deutlicher gegen Inaktivierung zu schützen als PEI-Alumina. Zur Bestätigung dieser Vermutung sollte ein entspre-

chender Langzeitversuch mit Eupergit-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase DhaA durchgeführt werden.

Eine abschließende Beurteilung der Wirkung der beiden eingesetzten Träger auf die Enzymzeitstabilität lässt sich erst nach einer umfassenden Versuchsreihe mit Eupergit C durchführen. Mit der hier präsentierten Datenbasis erscheint die Vermutung begründet, dass Eupergit C als Enzymträger PEI-Alumina vorzuziehen ist.

8.3 Zusammenfassung

Die beiden eingesetzten Enzymträger Eupergit C und PEI-Alumina wurden in den vorhergehenden Abschnitten unter verschiedenen Aspekten vergleichend beurteilt, um die Auswahl des geeigneteren Immobilisierungsträgers für die enzymatische Herstellung von optisch aktivem 2,3-Dichlor-1-propanol zu ermöglichen. Da die Herstellung der rekombinanten Haloalkan-Dehalogenase-Enzyme sehr aufwendig ist [FRITZ, 2007], liegt ein besonderes Augenmerk auf der Erhaltung der Enzymaktivität im Rahmen dieses Trägervergleichs.

Die Durchführung der Enzymimmobilisierung ist wesentlich einfacher mit Eupergit C durchzuführen, da der Träger voraktiviert ist. PEI-Alumina muss vor der Immobilisierung entgast werden und wird mit Glutardialdehyd aktiviert. Glutardialdehyd erfordert Sicherheitsvorkehrungen aufgrund der Toxizität und zusätzliche Waschschrte zur Entfernung sämtlicher Rückstände. Eupergit erfordert hingegen das Abreagieren der nichtbesetzten Kopplungsstellen, so dass auch für diesen Träger weitere Prozessschritte und Abfälle anfallen. Im Rahmen der durchgeführten Immobilisierungen konnte beobachtet werden, dass PEI-Alumina einen geringen Abrieb bildet. Die mechanische Formbeständigkeit von Eupergit C wurde von KATCHALSKI-KATZIR, KRAEMER, 2000 gezeigt. Aufgrund der einfacheren Handhabung, geringeren Gefährdung und höheren mechanischen Stabilität ist die Durchführung einer Immobilisierung mit Eupergit C gegenüber der mit PEI-Alumina vorzuziehen.

Die Ausbeute der Enzymaktivität im Immobilisierungsprozess wurde als Bewertungsmaßstab der Immobilisierungseffizienz gewählt. Aufgrund der sowohl höheren Ausbeute an immobilisierter Enzymmasse, als auch höheren spezifischen Aktivität des immobilisierten Enzyms ist die Immobilisierungseffizienz bei PEI-Alumina-Immobilisierungen erheblich höher als bei Immobilisierungen mit Eupergit C.

Der Vergleich der internen Stofftransporteigenschaften der beiden Träger offenbarte, dass Eupergit C aufgrund des geringeren Partikeldurchmessers und des höheren effektiven Diffusionskoeffizienten in den Partikelporen die günstigeren Diffusionseigenschaften aufweist. Ausschlaggebend für die Auswahl des Trägers sind die Stofftransporteigenschaften allerdings nur, wenn Haloalkan-Dehalogenase-Enzyme mit beträchtlich gesteigerter spezifischer Aktivität eingesetzt werden sollten.

Aufgrund unterschiedlicher Partikelporosität und Adsorptionsverhalten beeinflussen die Enzymträger erheblich das dynamische Festbettreaktorverhalten beim Übergang zwischen zwei Fließgleichgewichten. Eupergit C weist den größeren Partikelhohlraumanteil und die größeren Adsorpti-

onsgleichgewichtskonstanten von Substrat und Produkt auf. Das dynamische Übergangsverhalten verlängert sich dadurch gegenüber PEI-Alumina, das daher für einen industriellen Einsatz interessanter erscheint.

Auf Basis der ermittelten Stabilitätsverläufe der Haloalkan-Dehalogenase DhaA in sowohl Eupergit- als auch PEI-Alumina-immobilisierter Form in Rahmen von Miniplant-Versuchsreihen scheint Eupergit eine größere enzymaktivitätserhaltende Wirkung aufzuweisen. Diese Vermutung sollte durch einen umfangreichen Langzeitversuch abgesichert werden, bevor eine abschließende Bewertung der stabilisierende Wirkung der Träger erfolgt.

Die abschließende Entscheidung über den Enzymträger für die enzymatische Dehalogenierung von 1,2,3-Trichlorpropan zu optisch aktivem 2,3-Dichlor-1-propanol sollte erst nach der Bewertung des Langzeitverhaltens von Eupergit-immobilisierter Haloalkan-Dehalogenase getroffen werden, da der Bewahrung von Enzymaktivität eine entscheidende Rolle im Gesamtverfahren aus Immobilisierung und Reaktionsprozess zu kommt.

Kapitel 9

Ausblick

Aus den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Prozessentwicklung der enzymatischen Produktion von optisch aktivem 2,3-Dichlor-1-propanol ergeben sich diverse Ansatzpunkte für die weitere Optimierung des Prozesses, die im Folgenden zusammengestellt werden.

Die kinetische Modellierung der Immobilisierung von Haloalkan-Dehalogenase DhaA an Eupergit C konnte durch ein einfaches Modell erreicht werden, das mit zufriedenstellender Güte das Immobilisierungsergebnis vorhersagt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte der Einfluss von zahlreichen Parametern wie z.B. pH-Wert, Puffer, Ionenstärke auf die Geschwindigkeitskonstanten der Immobilisierungsreaktion sowie der Enzymaktivierung nicht bestimmt werden. Als weiterer Einflussfaktor auf die Immobilisierungsrate kommt das Alter der verwendeten Eupergit-Charge in Betracht. Durch die Analyse des Einflusses dieser Parameter könnte die Immobilisierung weiter verbessert werden. Es stellt sich zudem die Frage, in wie weit und unter welchen Bedingungen das erarbeitete Modell auf andere Enzyme und Träger übertragbar ist.

Die im Kontext der *integrierten Miniplant-Technologie* essentielle Modellbildung der Verfahrenseinheiten konnte für den eingesetzten Festbettreaktor als kontinuierlich betriebenen Reaktor sowie die Verschaltung des Festbettreaktors mit einem kontinuierlich betriebenen Rührkessels für einen diskontinuierlich zu betreibenden Kreisprozess realisiert und in der Miniplant überprüft werden. Für die Übertragung in einen industriell relevanten Maßstab steht somit ein validiertes Modell zur Verfügung.

Die durchgeführten Langzeituntersuchungen zur Quantifizierung der Stabilität der verwendeten enzymatischen Katalysatoren erwiesen sich wegen der Abtrennung der überschüssigen organischen Phase und der Schwankung der experimentellen Daten als schwierig. Für eine rationale Auswahl des das Enzym stabilisierenden Trägers bedarf es daher weiterer umfangreicher Langzeitversuche, um das Stabilitätsverhalten durch Parametrierung eines passenden kinetischen Ansatzes zuverlässig vorhersagen zu können. Hierzu muss jedoch zuerst eine zuverlässige Abscheidung von eventuell nicht gelöstem organischen Substrat realisiert werden.

Für eine industrielle Verwirklichung der hier bearbeiteten enzymatischen Dehalogenierung ist neben der bedeutsamen Optimierung der Reaktionsstufe das Ausarbeiten eines Gesamtverfahrens-

konzeptes erforderlich. Dieses Gesamtverfahren muss den kompletten Bereich vom angelieferten Rohstoff bis zum formulierten Produkt mit sämtlichen dafür erforderlichen Verfahrensschritten abdecken. Ein solches Konzept gilt es für die hier vorgestellte enzymatische Produktion von optisch aktivem 2,3-Dichlor-1-propanol zu entwickeln und in die vorhandene Miniplant zu integrieren, um den Gesamtprozess mit allen Verfahrensschritten zur industriellen Reife zu bringen. Die voraussichtlich zur Produktaufreinigung notwendigen Extraktions- und/oder Destillationsschritte stellen aufgrund der erforderlichen Rückführungen im Kontext des Gesamtprozesses kritische Verfahreseinheiten dar, deren verlässlicher Betrieb durch Langzeit-Versuchsreihen in einer integrierten Miniplant getestet werden könnte.

Das Konzept, die Methoden des *simultaneous engineering* und der *integrierten Miniplant-Technologie* in der Bioprozesstechnik zusammenzuführen, hat sich in der praktischen Entwicklungsarbeit bewährt. Eine Übertragung dieses Konzeptes auf weitere Entwicklungsvorhaben im Bereich der Bioprozesstechnik erscheint daher erstrebenswert und kann als Mittel zur intensiveren Vernetzung der beteiligten Forschungsdisziplinen sowie zur Beschleunigung der Gesamtentwicklung eingesetzt werden.

Literaturverzeichnis

- [AYMARD, BELARBI, 2000] Aymard, C.; Belarbi, A.: Kinetics of thermal deactivation of enzymes: a simple three parameters phenomenological model can describe the decay of enzyme activity irrespectively of the mechanism, *Enzyme & Microbial Technology*, 27, 612 - 618, (2000).
- [BAILEY, OLLIS, 1986] Bailey, J. E.; Ollis, D. F.: *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill, (1986).
- [BEHR ET AL., 2000] Behr, A.; Ebbers, W.; Wiese, N.: Miniplants - Ein Beitrag zur inhärenten Sicherheit?, *Chemie - Ingenieur - Technik*, 72(10), 1157 - 1166, (2000).
- [BEHR ET AL., 2004] Behr, A.; Brehme, V. A.; Ewers, C. L. J.; Grön, H.; Kimmel, T.; Küppers, S.; Symietz, I.: New developments in chemical engineering for the production of drug substances, *Engineering in Life Science*, 4(1), 15 - 24, (2004).
- [BLANCH, CLARK, 1996] Blanch, H. W.; Clark, D. S.: *Biochemical Engineering*, Dekker, New York, (1996).
- [BOSMA ET AL., 2002] Bosma, T.; Damborsky, J.; Stucki, G.; Janssen, D. B.: Biodegradation of 1,2,3-trichloropropane through directed evolution and heterologous expression of a haloalkane dehalogenase, *Applied & Environmental Microbiology*, 68(7), 3582 - 3587, (2002).
- [BRADFORD, 1976] Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248 - 254, (1976)
- [BUA-STOFFBERICHT, 1995] Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe (BUA) der Gesellschaft Deutscher Chemiker: *BUA-Stoffbericht 154: 1,2,3-Trichlorpropan*, S. Hirzel Verlag, (1995).
- [BUCHHOLZ, KASCHE, 1997] Buchholz, K.; Kaschke, V.: *Biokatalysatoren und Enzymtechnologie*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, (1997).
- [BULLINGER, WARSCHAT, 1996] Bullinger, H.-J.; Warschat, J.: *Concurrent simultaneous engineering systems - The way to successful product development*, Springer, 1. Auflage, (1996).

- [BUSCHULTE, HEIMANN, 1995] Buschulte, T. K.; Heimann, F.: Verfahrensentwicklung durch Kombination von Prozeßsimulation und Miniplant-Technik, *Chemie - Ingenieur - Technik*, 67(6), 718 - 724, (1995)
- [CHUNG, WEN, 1968] Chung, S. F.; Wen, C.-Y.: Longitudinal dispersion of liquid flowing through fixed and fluidized beds, *AIChE Journal*, 14, 857-66, (1968).
- [DAMBORSKY, 1999] Damborsky, J.; Koča, J.: Analysis of the reaction mechanism and substrate specificity of haloalkane dehalogenases by sequential and structural comparisons, *Protein Engineering*, 12, 989 - 998, (1999).
- [DEUTSCHER, 1990] Deutscher, M. P.: *Guide to Protein Purification - Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, (1990).
- [DO, BAILEY, 1981] Do, D.D.; Bailey, J.E.: Analysis of the initial stages of enzyme immobilization in porous solids, *Chemical Engineering Communications*, 12, 221 - 240, (1981).
- [DRAVIS ET AL., 2001] Dravis, B.C.; Swanson, P.E.; Russell, A. J.: Haloalkane hydrolysis with an immobilized haloalkane dehalogenase, *Biotechnology & Bioengineering*, 75(4), 416 - 423, (2001)
- [EFFENDI ET AL., 2000] Effendi, A. J.; Greenaway, S. D.; Dancer, B. N.: Isolation and Characterization of 2,3-Dichloro-1-Propanol-Degrading Rhizobia, *Applied & Environmental Microbiology*, 66, 2882 - 2887, (2000).
- [EURACHEM, 2004] EURACHEM / CITAC Leitfaden: Ermittlung der Messungenaugigkeit bei analytischen Messungen, <http://www.eurachem.ul.pt>, (2004).
- [FRITZ, 2007] Fritz, C.: *Hydrogel-eingehüllte Enzyme und deren Einsatz in organischen Lösungsmitteln*, Dissertation, Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart, (2006).
- [HALDANE, 1965] Haldane, J. B. S.: *Enzymes*, M.I.T. Press, (Reprint eines ursprünglich von Longmans, Green and Company 1930 veröffentlichten Buchs), (1965).
- [HEARN, ANSPACH, 2001] Hearn, M. T. W.; Anspach, B.: Chemical, physical, and biochemical concepts in isolation and purification in proteins, *Separation and Purification Methods*, 30 (2), 221 - 263, (2001).
- [HEINEMANN, 2003] Heinemann, M.: *Experimental analysis, modeling and dynamic simulation of thermodynamic and kinetic phenomena in gel-stabilized enzyme carriers*, VDI Verlag, Düsseldorf, (2003).
- [HENLEY, SADANA, 1986] Henley, J.P.; Sadana, A.: Deactivation theory, *Biotechnology & Bioengineering*, 28, 1277 - 1285, (1986).

- [HOSSAIN, DO, 1985] Hossain, M.M.; Do, D. D.: Modeling of enzyme immobilization in porous membranes, *Biotechnology & Bioengineering*, 27, 1126 - 1135, (1985).
- [HOSSAIN ET AL., 1986] Hossain, M.M.; Do, D.D., Bailey, J.E.: Immobilization of enzymes in porous solids under restricted diffusion conditions, *AIChE Journal*, 32(7), 1088 - 1098, (1986).
- [ILLANES, WILSON, 2003] Illanes, A.M.; Wilson, L.: Enzym reactor design under thermal inactivation, *Critical Reviews in Biotechnology*, 23(1), 61 - 93, (2003).
- [INDLEKOFER, 1996] Indlekofer, M.; Brotz, F.; Bauer, A.; Reuss, M.: Stereoselective bioconversion in continuously operated fixed bed reactors: modeling and process optimization, *Biotechnology & Bioengineering*, 52, 459 - 471, (1996).
- [JANSSEN, 2004] Janssen, D. B.: Evolving haloalkane dehalogenases, *Current Opinion in Chemical Biology*, 8, 150 - 159, (2004).
- [JUNG, 1991] Jung, H.-J.: *Theoretische Ableitung eines Reaktormodells für heterogen-katalytische Enzymreaktionen und experimentelle Überprüfung am Beispiel der Lipidumesterung*, VDI Verlag, Düsseldorf, (1991).
- [KASAI ET AL., 1992] Kasai, N., Tsujimura, K.; Unoura, K.; Suzuki, T.: Preparation of (S)-2,3-dichloro-1-propanol by *Pseudomonas* sp. and its use in the synthesis of (R)-epichlorohydrin, *Journal of Industrial Microbiology*, 9, 97 - 101, (1992).
- [KASAI ET AL., 1998] Kasai, N.; Suzuki, T.; Furukawa, Y.: Chiral C3 epoxides and halohydrins: Their preparation and synthetic application, *Journal of Molecular Catalysis B*, 4(5), 237 - 252, (1998).
- [KATCHALSKI-KATZIR, KRAEMER, 2000] Katchalski-Katzir, E.; Kraemer, D. M.: Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10(1-3), 157 - 176, (2000).
- [KROUGLOVA ET AL., 2004] Krouglova, T.; Vercammen, J.; Engelborghs, Y.: Correct diffusion coefficients of proteins in fluorescence correlation spectroscopy. Application to tubulin oligomers induced by Mg^{2+} and Paclitaxel, *Biophysical Journal*, 87, 2635 - 2646, (2004).
- [LEVENSPIEL, 1999] Levenspiel, O.: *Chemical Reaction Engineering*, John Wiley & Sons, New York, (1999).
- [MAIER, KAIBEL, 1990] Maier, S.; Kaibel, C. F.: Verkleinerung verfahrenstechnischer Versuchsanlagen - was ist erreichbar?, *Chemie - Ingenieur - Technik*, 62(3), 169 - 174, (1990).
- [MESSING, 1975] Messing, R. A.: *Immobilized enzymes for industrial reactors*, Academic Press, New York, (1975).

- [NEWMAN, 1999] Newman, J.; Peat, T. S.; Richard, R.; Kan, L.; Swanson, P. E.; Affholter, J. A.; Holmes, I.H.; Schindler, J. F.; Unkefer, C. F.; Terwiliger, T. C.: Haloalkane dehalogenases: Structure of a *Rhodococcus* enzyme, *Biochemistry*, 38, 16105 - 16114, (1999).
- [PAPATHANASIOU ET AL., 1988] Papathanasiou, T. D.; Kalogerakis, N.; Behie, L. A.: Dynamic modeling of mass transfer phenomena with chemical reaction in immobilized-enzyme bioreactors, *Chemical Engineering Science*, 43, 1489 - 98, (1988).
- [PERRY, 1997] Perry, R. H.; Green, D. W.: *Perry's Chemical Engineer's Handbook*, McGraw-Hill, 7. Auflage, (1997).
- [REID ET AL., 1977] Reid, R. C.; Prausnitz, J. M.; Sherwood, T. K.: *The Properties of Gases and Liquids*, McGraw-Hill, 3. Auflage, New York, (1977).
- [REUSS, 2005] Reuss, M.: *Bioreaktionstechnik*, Vorlesungsskript, Universität Stuttgart, (2005).
- [ROBBINS, 1979] Robbins, L. A.: The miniplant concept, *Chemical Engineering Progress*, 9, 45 - 48, (1979).
- [ROHRBACH, LESTER, 1981] Rohrbach, R. P.; Lester, G. W.: Preparation of support matrices for immobilized enzymes, United States Patent 4,250,080, Assignee: UOP Incorporation, (1981).
- [ROY ET AL., 1999] Roy, U.; Usher, J. M.; Parsaei, H. R.: *Simultaneous Engineering - Methodologies and Applications*, Gordon and Breach Science Publishers, 1. Auflage, (1999).
- [SALLIS ET AL., 1990] Sallis, P. J.; Armfield, S. J.; Bull, A. T.; Hardman, D. J.: Isolation and characterization of a haloalkane halidohydrolase from *Rhodococcus erythropolis* Y2, *Journal of General Microbiology*, 136, 115 - 120, (1990).
- [SEGEL, 1993] Segel, I. H.: *Enzyme kinetics*, John Wiley & Sons, New York, (1993).
- [SPIESS ET AL., 1999] Spieß, A.; Schlothauer, R. C.; Hirichs, J.; Scheidat, B.; Kasche, V.: pH Gradients in immobilized amidases and their influence on rates and yields of β -lactam hydrolysis, *Biotechnology and Bioengineering* 62, 267-277, (1999).
- [SWANSON, 1999] Swanson, P.E.: Dehalogenases applied to industrial-scale biocatalysis, *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 365 - 369, (1999).
- [SWISS-PROT] Swiss-Prot-Datenbank: <http://www.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?Q53042>;
Swiss-Prot-Datenbank-Eintragsnummer: Q53042.
- [TISCHER, WEDEKIND, 1999] Tischer, W.; Wedekind, F.: Immobilized Enzymes: Methods and Applications, *Topics in Current Chemistry*, 200, 95 - 126, (1999).

- [TSOTSAS, 1990] Tsotsas, E.: *Über die Wärme- und Stoffübertragung in durchströmten Festbetten*, VDI Verlag, Düsseldorf, (1990).
- [VDI, 1988] Verein Deutscher Ingenieure: *VDI-Wärmeatlas - Berechnungsblätter für den Wärmeübergang*, VDI Verlag, Düsseldorf, 5. Auflage, (1988).
- [VOGEL, 2002] Vogel, G. H.: *Verfahrensentwicklung*, Wiley-VCH, Weinheim, (2002).
- [WISEMAN, 1995] Wiseman, A.: *Handbook of Enzyme Biotechnology*, Ellis Horwood, 3. Auflage, (1995).