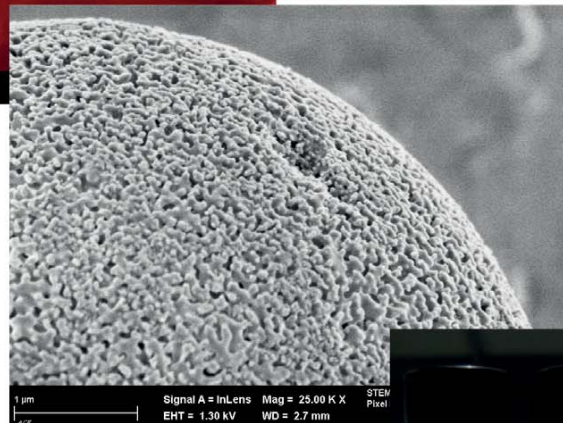
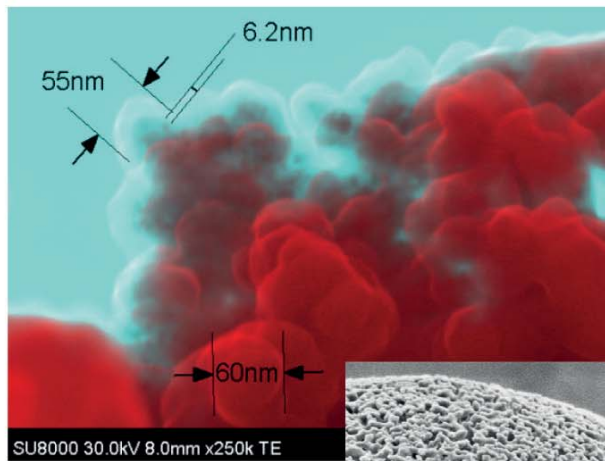


Aline Pasteur

Einsatz magnetisierbarer Partikelsysteme in der Bioverfahrenstechnik



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag



Einsatz magnetisierbarer Partikelsysteme in der Bioverfahrenstechnik





Einsatz magnetisierbarer Partikelsysteme in der Bioverfahrenstechnik

Vom Fachbereich Maschinenbau und Verfahrenstechnik
der Technischen Universität Kaiserslautern
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)

genehmigte

Dissertation

Von

Frau

Dipl.-Biophys. Aline Melanie Pasteur

aus Paris

Datum der mündlichen Prüfung:	12.09.2014
Dekan:	Prof. Dr.-Ing. Christian Schindler
Prüfungsvorsitzender:	Prof. Dr. techn. Hans-Jörg Bart
Begutachter:	Prof. Dr. Roland Ulber Prof. Dr. Rolf Diller

Kaiserslautern, 2014

D 386



Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2014

Zugl.: (TU) Kaiserslautern, Univ., Diss., 2014

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2014

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2014

Gedruckt auf umweltfreundlichem, säurefreiem Papier aus nachhaltiger Forstwirtschaft.

ISBN 978-3-95404-900-4

eISBN 978-3-7369-4900-3



Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei vielen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit sehr unterstützt haben.

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Roland Ulber für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas danken und für die eingeräumten Freiheiten meine Forschung in den verschiedensten Anwendungsgebieten der Bioverfahrenstechnik durchführen zu können. Während der Zeit an seinem Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik habe ich sehr viel gelernt.

Herrn Prof. Rolf Diller danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und auch für die angenehme Zusammenarbeit im Rahmen der Antibiotika-Aufarbeitung. Er hat mich bereits während meinem Biophysik-Studium unterstützt und ich bin sehr froh, dass dies mit der Promotion fortgeführt werden konnte.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Hans-Jörg Bart, dass er sich bereiterklärt hat den Prüfungsvorsitz zu übernehmen, sowie Herrn Prof. Siegfried Ripperger, dass er mir gestattet hat an seinen Geräten das PCD-Potential, die Partikelgrößenverteilung und die Oberfläche meiner Partikelsysteme zu messen. Vielen Dank auch an seine Mitarbeiter Alexandra Vetter, Denis Goldnik und Thomas Grein für die Einführung in die Gerätebedienung. Herrn Prof. Schünemann und Herrn Heming Huang danke ich für die Bereitstellung der Mößbauerspektren und Herrn Prof. Kampeis für die Erstellung der Hysteresekurven zur Charakterisierung der magnetischen Komponente meiner Partikelsysteme. Ich bin sehr froh, dass auch die arbeitsgruppenübergreifende Arbeit immer sehr viel Spaß gemacht hat und quasi selbstverständlich war.

Für die Finanzierung der Arbeiten im Rahmen der Forschungsschwerpunkte NanoKat, AME sowie durch den DBU und auch für die Unterstützung bei den REM-Aufnahmen durch das NanoBioCentrum (jetzt: NanoStructuringCenter) und Frau Sandra Wolff bin ich sehr dankbar.

Ganz besonders möchte ich natürlich auch allen meinen Studenten danken die einen sehr großen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben. Gaoping Wang, Slobodanka Maurer, Erik Enderle, Benjamin Barth, Jens Trampert, Ming Zhang, Hui Fan, Eva Hackemann, Markus Kolano und Alejandro López Soriano haben alle sehr viel Zeit und Engagement in die Ausarbeitung der Ergebnisse gesteckt.

Bei einer solchen Arbeit ist es besonders wichtig, dass das Arbeitsklima zwischen den Kollegen stimmt, denn nur so kommt es auch zu einem regen Ideenaustausch und auch zur



notwendigen Entschleunigung, die für den richtigen Ausgleich im Arbeitsalltag sorgt. Aus diesem Grund möchte ich mich ganz herzlich bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhl BioVT bedanken, die mich während meiner Zeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin begleitet haben; Stefanie Köhler, Nils Tippkötter, Kai Muffler, Doris Geib, Gesine Wunsch, Sebastian Poth, Tim Sieker, Benjamin Ludwig, Christian Staub, Magaly Monzon, Marie Scheller, Alexander Thiel, Steffen Wollny, Sebastian Wiesen, Ralf Stadtmüller, Stephan Kuhne, Anna Duwe und Christin Schlägel. Es war nicht nur ein professionelles Umfeld mit vielen wissenschaftlichen Diskussionen, sondern auch eine sehr freundschaftliche Atmosphäre zwischen den Kollegen; wir hatten immer etwas zu lachen, und auch in Zukunft bleiben diese Freundschaften, hoffe ich, erhalten. Leider hatte ich nicht mehr die Chance alle aktuellen Mitarbeiter näher kennenzulernen, möchte mich aber auch bei ihnen herzlich für den tollen Doktorhut bedanken, der einen Ehrenplatz bekommt.

Neben den Kollegen ist natürlich auch der Rückhalt durch die Familie wichtig. Da möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern Gabriele und Hans-Otto Nenninger sowie meiner Großmutter Helene Schäfer, die das Ergebnis nun leider nicht mehr erlebt hat, bedanken. Sie haben mich immer bei allen meinen Entscheidungen sehr unterstützt. Vielen Dank auch an Joachim Thiel für das Korrekturlesen der Arbeit, was mit Sicherheit eine wirkliche Fleißarbeit war. Auch hier musste man echtes Durchhaltevermögen zeigen.

Alex, dir danke ich nicht nur für deine redaktionelle Unterstützung, dein Beitrag zu dieser Arbeit ist deutlich größer. Dadurch, dass du mir in der schweren Zeit der vielen Veränderungen und Entbehrungen den Rücken freigehalten hast und immer das nötige Verständnis für die Situation aufbringen konntest, war es überhaupt möglich, diese Arbeit neben meinem Beruf an den Wochenenden und im Urlaub zu schreiben. Ohne deine liebevolle Unterstützung hätte ich nicht die Kraft hierzu aufbringen können, vielen Dank dafür!



Kurzzusammenfassung

Nanopartikel sind in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus der Forschungen gerückt. Die außergewöhnlichen physikochemischen Eigenschaften dieser Partikel eröffnen ein breites Feld von Anwendungsmöglichkeiten in verschiedenen wissenschaftlichen Bereichen. Die vorgestellte Arbeit befasst sich mit der Anwendung von magnetischen Nanoartikeln in der Bioverfahrenstechnik. Bisher sind magnetische Partikel kaum in großtechnischen Prozessen eingesetzt. Anhand von drei Beispielen aus den Bereichen Hydrolyse, Katalyse und dem Downstream-Prozess werden mögliche Einsatzgebiete vorgestellt und das Potential für den Einsatz in einem bioverfahrenstechnischen Prozess diskutiert.

Das erste Beispiel für eine Anwendung sind magnetische Nanopartikel mit einer Goldschale, die als Träger für einen Biokatalysator dienen. Aufgrund der geringen Partikeldurchmesser bleibt trotz der Immobilisierung der Enzyme die Beweglichkeit der Katalysatoren erhalten. Vergleichende Studien mit einem magnetischen Partikel im μm -Maßstab am Beispiel der Hydrolyse von Cellulose durch das Enzym Cellulase zeigen, dass bei schwer zugänglichen Substraten tatsächlich eine Aktivitätssteigerung beobachtet werden kann. Die magnetische Charakteristik ermöglicht die einfache Rückgewinnung der Partikel trotz der kleinen Durchmesser und somit einen wiederholten Einsatz im Prozess.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die trägerkatalysierte Umsetzung von Glucose zu Gluconsäure mittels Goldnanopartikeln auf einen magnetischen Träger übertragen. Der katalytische Umsatz der Partikel ist vergleichbar mit der Fermentation, die zur großtechnischen Produktion eingesetzt wird. Die Katalysatoren sind mehrfach ohne Aktivitätsverlust sowie mit annähernd 100 % Selektivität einsetzbar und bilden so eine für die Fermentation konkurrenzfähige Alternative. Neben der magnetischen Abtrennbarkeit aus dem Batch-Prozess können diese magnetischen Partikel außerdem in einem semi-kontinuierlichen Prozess mit integrierter Aufarbeitung eingesetzt werden. Hierzu wurde ein Prototyp eines magnetischen Wirbelschichtreaktors entwickelt und charakterisiert.

Als letztes Beispiel wurden magnetische Partikel als Adsorber in der Aufarbeitung von Lactam-Antibiotika eingesetzt. Die durch multivalente Wechselwirkung hochselektiven Adsorber zeigen Beladungen, die mit keinem kommerziellen System erreichbar sind. Durch den Einsatz eines auf Bioprozesse optimierten Hochgradienten Magnetseparators wird ein halbkontinuierlicher Aufarbeitungsprozess diskutiert, der in die Fermentation integriert wird. Die abschließende Diskussion fasst alle wichtigen Ergebnisse erneut zusammen und beschreibt die Erfolge, aber auch die Probleme sowie die noch ausstehenden zukünftigen Untersuchungen, um das Potential dieser Technologie voll ausschöpfen zu können.



Abstract

In recent years nanoparticles have attracted more and more attention to modern research. The unusual physicochemical properties of these particles open up a wide range of applications in various scientific fields. The presented work discusses the application of magnetic particles in bioprocess engineering. So far, magnetic particles are hardly used in industrial processes. Three examples concerning the fields of hydrolysis, catalysis, and downstream processing are presented and discussed as possible applications with a high potential for use in bioprocess engineering.

The first example for an application is a magnetic nanoparticle covered with a gold shell which serves as a carrier for biocatalysts. The immobilization of these enzymes on macroscopic carriers leads to a huge decrease in catalytic activity. By using nanoparticles as carrier the mobility of the catalysts is retained so that the decrease in enzyme activity can be minimized. Comparative studies with magnetic particles in the micron and nanometer scale show, that for the hydrolysis of hard accessible cellulose by the immobilized enzyme cellulase the decrease in enzyme activity can be reduced by using the synthesized magnetic nanoparticles. The magnetic characteristic of these particles allow an easy recovery, despite the small diameter and also a repeated use in the hydrolysis of the substrate.

In the second part, the conversion of glucose to gluconic acid by means of gold nanoparticles is transferred to a magnetic carrier. The catalytic conversion by particles is comparable to the fermentation which is used for large-scale production. The catalysts can be used several times without loss of activity with almost 100 % selectivity and hence form a competitive alternative for the fermentation process. In addition to the magnetic separability in batch processes, these magnetic particles can also be used in a semi-continuous process with integrated purification. As a final step, a prototype of a magnetic fluidized bed reactor was developed and characterized.

As last example, magnetic particles are used as adsorbent in the downstream processing of lactam antibiotics. A shell of highly selective adsorber polymer with multivalent interaction between molecule and adsorber, show particle loadings that are significant higher than for commercial systems. By using a high gradient magnetic separator which is optimized for bioprocesses the magnetic particles can be integrated into the fermentation to form a semi-continuous process. The concluding discussion summarizes all the important results, describes the possible successes but also the still existing problems and outstanding future studies in order to fully exploit the potential of this technology.



Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AGM	Alternating-Gradient-Magnetometer
Ax	Axial
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
CIP	Clean in Place
CPC	Cephalosporin C
DBU	Deutscher Bund Umwelt
DFT	Dichtefunktionaltheorie
DP	Deposition Precipitation
EDC	1-Ethyl-3-(3dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
EM-Feld	elektromagnetisches Feld
FEM	Finite Elemente Methode
FTIR-ATR	Fouriertransformierte Infrarot-Attenuated total reflectance Spektroskopie
GOD	Glucoseoxidase
GS	Gluconsäure
HGMS	Hochgradientenmagnetseparator
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IEP	Isoelektrischer Punkt
IR	Infraroter Spektralbereich
Kap.	Kapitel
KPP	Kaliumphosphat
m/z	Masseladungsverhältnis
MES	2-(N-Morpholino)etansulfonsäure
M-PVA	magnetisierbare Polyvinylalkoholpartikel
MS	Massenspektroskopie
n	Brechungsindex
n	Heterogenitätsfaktor Isothermen
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NP	Nebenprodukt
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCD	Particle Charge Detector
PEG	Polyethylenglycol
PMO	periodisch mesoporöse Organosilikate
POD	Peroxidase
PVA	Polyvinylalkohol
REM	Rasterelektronenmikroskopie
SAM	self assembled monolayer
SERS	surface enhanced raman spectroscopy
SSF	Simultane Sacchrifizierung und Fermentation
Tab.	Tabelle



TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEOS	Tetraethylorthosilikat
Trans	Transversal
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	Toluolsulfonsäure
UV/VIS	Ultraviolett/visible (sichtbarer) Spektralbereich
VWZ	Verweilzeit
z.B.	zum Beispiel



Formelzeichen

n	Brechungsindex [-]
δ	Isomerieverschiebung [mm/s]
B_{HF}	Hyperfeinfeldaufspaltung [T]
c_G	Konzentration Glucose [g/L]
c_{GS}	Konzentration Gluconsäure [g/L]
K_G	Adsorptionskonstante Glucose [L/g]
K_{GS}	Adsorptionskonstante Gluconsäure [L/g]
c_{Au}	Katalysatorkonzentration [g/L]
k_1	Geschwindigkeitskonstante der Oberflächenreaktion [L/(g·s)]
k_P	Geschwindigkeitskonstante für den Verbrauch von Glucose in Nebenreaktionen [L/(g·s)]
$c_{O_2}^*$	Sauerstoffsättigung der Lösung [mmol/L]
c_{O_2}	Sauerstoffkonzentration in Lösung [mmol/L]
$c_{G;t=0}$	Konzentration Glucose zu Beginn der Reaktion [g/L]
k	Geschwindigkeitskonstante [mmol/(L·h)]
k_{La}	Sauerstoffübergangskoeffizient [1/h]
q	Adsorberbeladung [mg/g]
q_{max}	Maximale Adsorberbeladung [mg/g]
N	Heterogenitätsfaktor Isothermen [-]
Q_{max}	Maximale Adsorberbeladung pro Fläche [mg/m ²]
c_0	Partikelkonzentration am Kammereingang [g/L]
C	Partikelkonzentration am Ausgang [g/L]
σ_S	Sättigungskapazität der Filtermatrix [g/m ²]
v_0	Fluidgeschwindigkeit am Einlass [m/s]
λ_0	initialer Filterkoeffizient [1/m]
τ	Verweilzeit in der Kammer [s]
L_F	Filterlänge [m]
v_F	Fluidgeschwindigkeit innerhalb des Filters [m/s]
ε	Filterporosität [-]
\vec{F}_M	Magnetkraft [N]
\vec{H}	magnetische Feldstärke [A/m]
μ_0	Permeabilitätskonstante im Vakuum [V·s/A·m]
r_P	Partikelradius magn. Komponente [m]
χ	Suszeptibilität [-]
\vec{F}_D	Reibungskraft auf Partikel im Flüssigkeitsstrom [N]
η	Dynamische Viskosität [Pa·s]
r_{Pges}	Gesamtpartikelradius [m]
\vec{u}	Fluidgeschwindigkeit [m/s]
R_c	Einfangradius Gitterstab [m]
$v_{0,s}$	maximale Fluidgeschwindigkeit zwischen 2 Gitterstäben [m/s]
v_m	Partikelschwindigkeit durch magnetischen Gradienten [m/s]
$\Delta\kappa$	Differenz der Volumensuszeptibilität [-]
M_s	Sättigungsmagnetisierung der Gitterstäbe [A·m ² /kg]
A	Radius Gitterstäbe [m]



v	Reaktionsgeschwindigkeit [mmol/(L·s)]
c_A	Substratanfangskonzentration [g/L]
μ_t	mittlere Verweilzeit [s]
σ	Varianz [-]
B_0	Bodensteinzahl [-]
u	Leerrohrgeschwindigkeit [m/s]
L	Länge Reaktionsvolumen [m]
D_{ax}	axiale Rückvermischung [m ² /s]
V_R	Reaktorvolumen [m ³]
μ_r	materialabhängige Permeabilitätszahl [-]
\vec{B}_r	Remanenzmagnetisierung [T]
\vec{A}	Vektorpotential [V·s/m]
∇	Nabla-Operator [-]
\vec{M}	Magnetisierung [A/m]
ρ	Fluiddichte [kg/m ³]
\vec{r}	Ortsvektor [m]



Inhaltsverzeichnis

Danksagung	III
Kurzzusammenfassung	V
Abstract	VI
Abkürzungen	VII
Formelzeichen	IX
Inhaltsverzeichnis	XI
1 Einleitung und Stand der Technik	1
2 Enzymatische Hydrolyse von Cellulose	5
2.1 Einleitung und Zielsetzung	5
2.2 Theoretische Grundlagen.....	7
2.2.1 Hydrolyse von Cellulose.....	7
2.2.2 Immobilisierte Biokatalysatoren.....	11
2.2.3 Einsatz immobilisierter Cellulasen.....	14
2.2.4 Magnetische Eigenschaften von Eisenoxid-Nanopartikeln	19
2.2.5 Optische Eigenschaften der Partikel	22
2.3 Synthese und Charakterisierung der Fe ₃ O ₄ /Au-Trägerpartikel	27
2.3.1 Stand der Technik.....	27
2.3.2 Weiterführende Charakterisierung der Eisenoxid-Kerne.....	32
2.4 Immobilisierung von Cellulase auf Eisenoxid/Gold-Trägerpartikeln	37
2.4.1 Stand der Technik - Immobilisierung durch Selbstorganisation	37
2.4.2 Selbstorganisierte Bindung von Enzymen.....	41
2.4.3 Quantifizierung der Immobilisierten Cellulase	43
2.5 Modellsystem der enzymatischen Hydrolyse von Cellulose	49
2.5.1 Hydrolyse von Carboxymethylcellulose und fibröser Cellulose.....	49
2.5.2 Hydrolyse in mehreren Zyklen.....	53
2.6 Zusammenfassung	55
3 Katalytische Oxidation von Glucose zu Gluconsäure	59
3.1 Einleitung und Zielsetzung	59
3.2 Theoretische Grundlagen.....	61
3.2.1 Industrielle Gewinnung von Gluconsäure.....	61
3.2.2 Katalytische Oxidation an Edelmetallkatalysatoren	65
3.2.3 Katalytischer Mechanismus der Glucoseoxidation	69
3.2.4 PCD (Particle-Charge-Detector).....	73
3.3 Synthese und Charakterisierung geträgerter Goldkatalysatoren	77



3.3.1	Silanisierte Trägerpartikel	77
3.3.2	Träger auf Aluminiumoxidbasis	81
3.4	Katalytische Aktivität	89
3.4.1	Vergleich der magnetischen Katalysatoren	89
3.4.2	Syntheseoptimierung auf Al ₂ O ₃ -Trägermaterial	94
3.4.3	Reaktionsverlauf im 500 ml Maßstab	98
3.4.4	Upscaling in einen 1 L Bioreaktor	101
3.4.5	Langzeitstabilität des Biokatalysators im 1 L Bioreaktor	105
3.4.6	Übertragung der Synthesemethode auf magnetisches Trägermaterial	109
3.4.7	Goldkatalyse im Durchfluss	112
3.4.8	Magnetische Wirbelschicht in der kontinuierlichen katalytischen Produktion von Gluconsäure	115
3.5	Zusammenfassung und Ausblick	121
4	Aufarbeitung von fermentativ gewonnenen Antibiotika	127
4.1	Einleitung und Zielsetzung	127
4.2	Theoretische Grundlagen	131
4.2.1	Lactam-Antibiotika	131
4.2.2	Adsorption	134
4.2.3	Hochgradienten Magnetseparation - Stand der Technik	138
4.3	Darstellung der Adsorbersysteme	143
4.3.1	Selektive Adsorbersysteme zur Aufarbeitung von β -Lactam Antibiotika	143
4.3.2	Selektive Adsorbersysteme zur Aufarbeitung von Cephalosporin C	145
4.4	Adsorptionsverhalten	149
4.4.1	Stabilität der Antibiotika und deren Abbauprodukte	149
4.4.2	Adsorption von Imipenem auf kommerziellen Adsorbersystemen	152
4.4.3	Adsorption von Imipenem auf der instrAction-Phase	153
4.4.4	Adsorption von Cephalosporin C auf kommerziellen Adsorbentien	160
4.4.5	Adsorption von Cephalosporin C auf Polymeren Mesoporösen Organosilikaten	165
4.4.6	Wiederverwertbarkeit der Adsorbersysteme	170
4.5	Optimierung des Hochgradienten Magnetseparators	173
4.5.1	Eingesetzte Filterkammern	173
4.5.2	Aufnahme von Durchbruchskurven und Berechnung der Filterkonstanten	176
4.5.3	Simulation der Gittermatrix innerhalb der HGMS-Filterkammer	178
4.5.4	Neukonstruktion der HGMS Filterkammer	180
4.6	Integration der Magnetseparation in den Antibiotikumsfermentationsprozess	187
4.6.1	Aufbau des Prozesses	187



4.6.2	Vorfiltration der Biomasse	191
4.7	Zusammenfassung	195
4.7.1	Adsorbersysteme	195
4.7.2	HGMS-Optimierung	196
4.7.3	Prozessintegration	197
5	Abschließende Diskussion und Fazit	199
6	Literaturverzeichnis	203
Anhang A	Synthesevorschriften	221
Anhang A 1	Superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel	221
Anhang A 2	Goldummantelung der Eisenoxidgrundpartikel	222
Anhang A 3	Funktionalisierungsprozess mit EDC und NHS.....	224
Anhang A 4	Magnetische Goldkatalysatoren auf Silicat-Trägern	225
Anhang A 5	Magnetische Goldkatalysatoren auf Aluminiumoxid-Trägern	227
Anhang A 6	Goldkatalysatoren mit unmagnetischen Al ₂ O ₃ -Trägern.....	228
Anhang B	Analytische Methoden.....	231
Anhang B 1	Ellman's Assay	231
Anhang B 2	HPLC-Methoden	233
Anhang B 2.1	HPLC Analytik von Zuckern	233
Anhang B 2.2	HPLC Analytik von Organischen Säuren.....	234
Anhang B 2.3	HPLC Analytik von Antibiotika.....	235
Anhang B 3	Glucoseoxidase (GOD) Assay.....	237
Anhang B 4	Fluoreszenzspektroskopie zur Proteinquantifizierung.....	238
Anhang B 5	IR-Spektroskopie der Gluconsäure aus der Zuckeroxidation	240
Anhang B 6	IR-Spektroskopie zur Adsorption von Cephalosporin C	242
Anhang B 7	PCD-Potential-Messung.....	243
Anhang B 8	Bestimmung der Reaktionsordnung	244
Anhang B 8.1	Differentialmethode.....	244
Anhang B 8.2	Integralmethode.....	246
Anhang B 9	Bestimmung der Verweilzeitverteilung und Raum-Zeit-Ausbeute	248
Anhang C	Reaktionsvorschriften	251
Anhang C 1	Hydrolyse von Cellulose im 2 ml-Eppendorf-Gefäß	251
Anhang C 2	Glucoseoxidation im Rührkessel	252
Anhang C 2.1	Oxidationsreaktion im 50 ml Falcon	252
Anhang C 2.2	Oxidationsreaktion im „Dosimat“ bzw. Titrator.....	252
Anhang C 2.3	Oxidationsreaktion im 500 ml Rührkessel	253
Anhang C 2.4	Oxidationsreaktion im 1 L-Miniforce-Reaktor	254



Anhang C 3	Adsorptionsisothermen.....	255
Anhang C 3.1	Adsorption von Imipenem	255
Anhang C 3.2	Adsorption von Cephalosporin C	255
Anhang C 3.3	Elutionen	256
Anhang D	Simulationen	257
Anhang E	Verwendete Adsorber- und Partikelsysteme	261
Anhang F	Verwendete Geräte	263
Anhang G	Verwendete Chemikalien.....	265
Anhang H	Verwendete Puffer und Lösungen	267
Anhang I	Angaben zur Person	269
Anhang I 1	Betreute Studien-, Diplom- und Masterarbeiten	269
Anhang I 2	Veröffentlichungsliste.....	269
Anhang I 3	Lebenslauf	272



1 Einleitung und Stand der Technik

Die magnetischen Nanopartikel haben in den letzten Jahren hohes Interesse in der Forschung geweckt. Die Anwendungsfelder in den verschiedenen wissenschaftlichen Disziplinen sind vielfältig und die Eigenschaften dieser Nanopartikel eröffnen erstaunliche Möglichkeiten für Technologien an der Schnittstelle zwischen Chemie, Physik und Biologie.^[1] Besonders im Bereich der Medizin wird den magnetischen Nanopartikeln ein hohes Potential zugeschrieben. Die Anwendungen reichen von bildgebenden Verfahren, z.B. MRI Magnetresonanz Imaging^[2,3], über die Krebstherapie mit Hilfe von Drug Delivery Systemen^[4], der magnetischen Hyperthermie^[5] oder Bindung an freien Krebszellen und deren Abtransport^[6] bis hin zum Biosensing bzw. der Bioanalytik^[7]. Intensiv diskutiert wird dabei zumeist die Toxizität der Nanopartikel, da hier die Langzeitfolgen noch nicht klar sind.^[8] Dennoch sind diese Technologien in der Entwicklung weit fortgeschritten. Einen guten Überblick über alle Anwendungen und eine Zusammenfassung aktueller klinischer Studien liefert Harivardhan et al..^[9]

Weitere Einsatzfelder außerhalb der Biomedizin, die bereits kommerziell genutzt werden, sind z.B. Speichermedien^[10,11,12], die eine sehr hohe Speicherdichte aufweisen (10 Tbit/inch²) oder in Form von Ferrofluiden als magnetische Kühlmittel, z.B. in Lautsprechern^[13,14]. Dies sind nur einige Beispiele aus den verschiedenen Disziplinen. In der Verfahrenstechnik ist die Verwendung der magnetischen Nanopartikel nur wenig beschrieben. In großtechnischen Prozessen sind kaum magnetische Partikel zu finden; eines der wenigen Beispiele sind Orica MIEX-Partikel, die zur Reinigung von Abwasser genutzt werden.^[15] Die magnetischen Nanopartikel sind hier in einer Harzmatrix eingebettet und auf der Partikeloberfläche befinden sich Ionentauscher-Gruppen. Weitere Anbieter wie Chemagen oder Chemicell bieten Magnetpartikel in kleinen Chargen mit verschiedensten Oberflächenfunktionalitäten an, da deren Einsatz meist nur im Labormaßstab stattfindet.^[89] Magnetseparatoren wie Magnet-Trommelseparatoren, Hochgradienten-Magnetseparatoren, Wirbelstromseparatoren oder magnetisch stabilisierte Wirbelschichten sind allerdings bereits in Großanlagen weit verbreitet und finden zumeist Anwendung in der Erzaufbereitung, Recyclingindustrie oder Petrochemie.^[16] Für die Anwendung im Bereich der Bioverfahrenstechnik wurden bereits Hochgradienten-Magnetseparatoren entwickelt und patentiert,^[17] die allerdings meist im Labormaßstab zur Proteinaufarbeitung eingesetzt werden. Andere Anwendungsfelder werden dabei vernachlässigt.



Diese Arbeit beschäftigt sich mit drei Anwendungsbeispielen magnetischer Partikelsysteme aus den Bereichen Hydrolyse, Katalyse und dem Downstream Processing und soll das breit gefächerte Potential der Magnettechnologie im Bereich der Bioverfahrenstechnik aufzeigen.

Die Nutzung nachwachsender Rohstoffe für die industrielle Produktion von Grund- und Feinchemikalien sowie die Gewinnung von Biokraftstoffen ist Teil der weißen Biotechnologie. Der erste Schritt zur Nutzung dieser Rohstoffe ist die Vorbehandlung zur Gewinnung von fermentierbaren Zuckern. Kapitel 2 beschäftigt sich mit einer möglichen Vorbehandlungsmethode der enzymatischen Hydrolyse des nachwachsenden Rohstoffes Cellulose zu Glucose. Als Enzym wird eine kommerzielle Cellulase eingesetzt die auf einen magnetischen Träger gebunden wird. Als Träger werden superparamagnetische Eisenoxidpartikel mit einer Goldschale verwendet. In der Literatur ist vielfach beschrieben, dass durch die Immobilisierung von Enzymen auf makroskopischen Trägern (heterogene Katalyse) die Aktivität im Vergleich zu gelösten Enzymen (homogene Katalyse) deutlich herabgesetzt ist. Gründe dafür sind zum einen der konformative Stress, dem das Protein ausgesetzt ist, zum anderen die Einschränkung der Beweglichkeit des Proteins in Lösung. Dieses Modellsystem der enzymatischen Hydrolyse dient der Untersuchung des Aktivitätsverlustes von Enzymen nach der Immobilisierung auf Nanopartikeln. Die kleineren Durchmesser der Nanopartikel könnten für eine höhere Beweglichkeit des Träger-Protein-Komplexes sorgen und dennoch die Rückgewinnung der Partikel ermöglichen. Somit würde diese Technologie die Schnittstelle zwischen homogener und heterogener Katalyse bilden. Desweiteren lassen sich anhand dieses Beispiels zwei Eigenschaften (Superparamagnetismus und Oberflächenplasmonresonanz) von Nanopartikeln demonstrieren, die zur Charakterisierung der Partikel genutzt werden können. Besonders die magnetische Komponente erleichtert die Rückgewinnung der Enzyme erheblich, sodass diese auch mehrfach in Hydrolysen eingesetzt werden können.

Die durch Hydrolyse eines Faserstoffes gewonnene Glucose kann nun im nächsten Schritt in Fermentationen zu einem Wertstoff verarbeitet werden, wie z.B. Bernsteinsäure, Bioethanol usw. Oder sie wird, wie in Kapitel 3 beschrieben, in der katalytischen Umsetzung zu Gluconsäure verwendet, welche wiederum weit verbreitet in der Lebensmittelindustrie eingesetzt wird. Großtechnisch wird die Gewinnung von Gluconsäure fermentativ durchgeführt. Der Einsatz von katalytisch aktiven Goldnanopartikeln stellt hierbei eine neue und vielversprechende Alternative dar. Die in Kapitel 3 vorgestellten Arbeiten übertragen die aus der Literatur bekannte Technologie der Trägerkatalysatoren auf magnetische Träger, wodurch die bisher im Batch-Prozess eingesetzten Trägerkatalysatoren in einen halb-



kontinuierlichen Prozess überführt werden können. Desweiteren wird in Kapitel 3 gezeigt, dass Nanopartikel oftmals vom Feststoff unterschiedliche Eigenschaften besitzen, so ist z.B. bei kleinen Partikeldurchmessern der Schmelzpunkt deutlich reduziert und das Gold im Nanometermaßstab katalytisch aktiv. Durch den Einsatz der Katalysatoren, die hochselektiv sind, werden die Aufarbeitungsschritte des Produktes zu einem einzigen Schritt reduziert. Die zumeist sehr aufwendige Aufarbeitung der Produkte aus der Reaktionslösung ist eine große Herausforderung in der Bioverfahrenstechnik und es wird versucht diese Prozessschritte so gering wie möglich zu halten. Diese Thematik wird in Kapitel 4 erneut aufgegriffen.

In vielen biotechnologischen Prozessen zur Herstellung von Pharmazeutika, Lebensmitteln oder Feinchemikalien stellt die Aufarbeitung des Produktes, das sogenannte Downstream Processing, einen wichtigen Prozessschritt dar. Kapitel 4 befasst sich mit der Aufarbeitung eines Antibiotikums mittels selektiver magnetischer Adsorbermaterialien. Die Arbeiten wurden von der DBU im Rahmen des Verbunds zur nachhaltigen (Bio)-Katalyse und integrierten Bioprozessentwicklung (ChemBioTec) gefördert. Als magnetische Komponente werden Eisenoxidnanopartikel, eingebettet in einer Silicat-Matrix, verwendet. Die hohe Selektivität der Partikeloberfläche soll durch polyvalente Wechselwirkung mit verschiedenen funktionellen Gruppen erreicht werden. Das Adsorptionsverhalten soll mit kommerziell erhältlichen Systemen verglichen und so die Vorteile gegenüber unspezifischer konventioneller Adsorbersysteme herausgearbeitet werden. Im Rahmen dieses Kapitels wird darüber hinaus auch die Integration der Aufarbeitung mittels selektiver Magnetpartikel in einem Fermentationsprozess diskutiert. Die Abtrennung der magnetischen Adsorber soll mit einem Hochgradienten-Magnetseparator erfolgen, der für biotechnologische Anwendungen weiter optimiert wird. Die Optimierung des HGMS erfolgt anhand von Separationsversuchen und Simulationen mit der Software COMSOL Multiphysics.

In einem abschließenden Kapitel werden die Ergebnisse aus den drei verschiedenen Anwendungsfeldern erneut kurz zusammengefasst und diese im Hinblick auf das Potenzial für eine großtechnische Anwendung beurteilt.





2 Enzymatische Hydrolyse von Cellulose

2.1 Einleitung und Zielsetzung

Die Gewinnung von Ethanol aus nachwachsenden Rohstoffen ist in aller Munde. So ist aktuell im italienischen Crescentino in der Region Piemont die weltweit erste Raffinerie für Biokraftstoffe der zweiten Generation, sprich der Gewinnung von Bioethanol aus Cellulose entstanden.^[18] Die Verzuckerung der Cellulosefasern zu fermentierbaren Zuckern erfolgt mit Enzymen der Firma Novozymes. Damit diese Prozesse wirtschaftlich sind, sind die Kosten für die Enzyme und Rohstoffe entscheidend und müssen so gering wie möglich gehalten werden. Laut dem Betreiber der Anlage Ghisolfi ist Biokraftstoff der zweiten Generation wettbewerbsfähig; allerdings gilt es auch hier die Prozesse zu optimieren und Kosten zu senken.

Eine Möglichkeit die Kosten zu senken wäre, die Enzyme in mehreren Hydrolysen einzusetzen; denn je nachdem welche Katalysatoren in einem Prozess eingesetzt werden, kann deren Rückgewinnung aus einer Reaktionslösung eine erhebliche Kostenersparnis sein. Dies gilt prinzipiell für alle katalytischen Prozesse. Durch die Bindung der Enzyme auf einem festen Träger wird dies ermöglicht, führt aber zu einem zusätzlichen Prozessschritt der Abtrennung. Der Einsatz von magnetischen Partikeln erleichtert hierbei im Vergleich zu herkömmlichen Trennverfahren wie Zentrifugation oder Filtration erheblich die Rückgewinnung. Bei der Immobilisierung von Enzymen auf makroskopischen Trägern kommt es allerdings zur Abnahme der Enzymaktivität. Bei schwer zugänglichen Substraten wie z.B. der Cellulose-Faser, ist diese Abnahme noch sehr viel gravierender und die Enzymaktivität beträgt nur noch ein Bruchteil derer nativer Cellulase. Grund hierfür sind zum einen Konformationsänderungen der Proteinstruktur durch die Bindung auf der Trägeroberfläche; aber auch die Einschränkung der Beweglichkeit der Enzyme reduziert die Enzymaktivität. Durch die Immobilisierung der Katalysatoren auf nanoskaligen Trägermaterialien soll der Schnittpunkt zwischen homogener und heterogener Katalyse untersucht und gezeigt werden, ob und welche Vorteile die Anwendung von Nanopartikeln dabei mit sich bringt. Die geringen Durchmesser der Nanopartikel von < 150 nm erschweren deren Rückgewinnung aus der Reaktionslösung; durch die magnetische Komponente, wird die Rückgewinnung deutlich erleichtert. Als Modellsystem dient die bereits erwähnte Hydrolyse von Cellulose durch das Enzym Cellulase, da dies auch am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik in verschiedenen Verbundprojekten Anwendung findet.^[19,20] Die verwendeten magnetischen Nanopartikel



wurden in einer vorgelagerten Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biophysik und medizinische Physik synthetisiert, charakterisiert und auch erste Immobilisierungsversuche mit Alkanthiolen durchgeführt. Einige dieser Ergebnisse werden für ein besseres Verständnis der Vorgänge bei der Enzymimmobilisierung gezeigt und mit der entsprechenden Literaturstelle markiert.

2.2 Theoretische Grundlagen

2.2.1 Hydrolyse von Cellulose

Cellulose ist der Hauptbestandteil von Pflanzenzellwänden und ist die meist verbreitetste organische Verbindung auf der Erde.^[21] Sie ist ein Polysaccharid bestehend aus mehreren hundert bis tausend linearen Ketten aus β -1,4 glycosidisch verknüpften Glucosemolekülen. Obwohl chemisch recht einfach aufgebaut, ist die Cellulose physikalisch sehr komplex, da sie aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Wechselwirkungen sowohl größere kristalline Strukturen als auch amorphe Regionen beinhaltet. Für die effiziente Hydrolyse der Cellulose werden verschiedene Cellulasen benötigt, die als individuelle Enzyme wirken oder in einem Multienzymkomplex dem sog. Cellulosom zusammengefasst sind.^[21,22] Die individuell wirkenden Enzyme werden von vielen Pilzen wie *Trichoderma reesei* produziert. Die drei Hauptenzyme dieser Hydrolyse sind Endoglucanasen, Exoglucanasen (in erste Linie Cellobiohydrolasen) und β -Glucosidasen, welche in Synergie zusammenarbeiten.^[21]

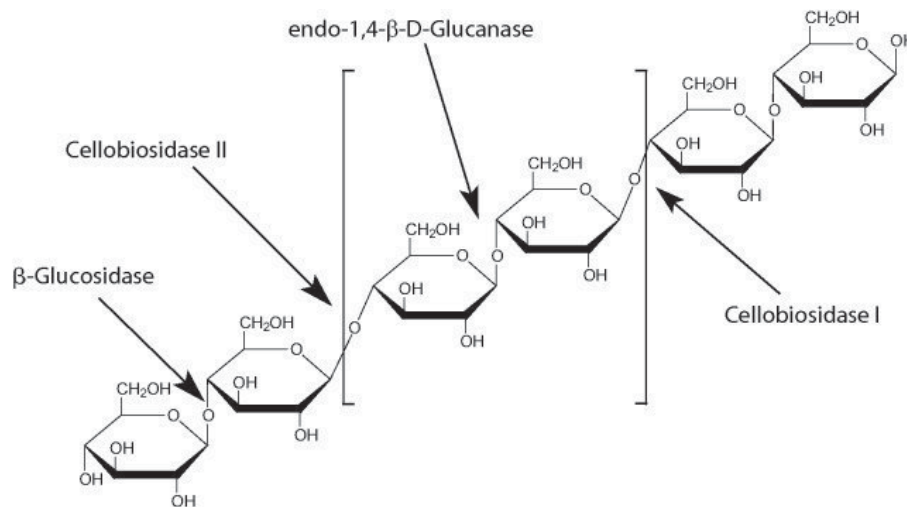


Abb. 1: Polysaccharidkette mit Angriffspunkten der verschiedenen Cellulasen von *Trichoderma reesei*^[23]

Endoglucanasen spalten die glycosidischen Bindungen in den amorphen Bereichen der Cellulosefaser zufällig, wodurch kürzere Celluloseketten entstehen, die wiederum für den Angriff von Exoglucanasen zugänglich sind. Bei den Cellobiohydrolasen unterscheidet man zwischen den Enzymen die vom reduzierenden (Cellobiosidase I) und denen die vom nichtreduzierenden Kettenende (Cellobiosidase II) angreifen.^[24] Diese Enzymklasse macht etwa 80 % der cellolytischen Enzyme von *Trichoderma reesei* aus und ist auch in der Lage in den kristallinen Bereichen der Cellulose wirken zu können.^[25] Beide Enzyme setzen das

Dimer Cellobiose frei, welches dann von β -Glucosidasen zu Glucose gespalten wird.^[26] Die verschiedenen Angriffsstellen sind in Abb. 1 zusammengefasst.

Die meisten Cellulasen von *Trichoderma reesei* besitzen eine große katalytische Domäne und eine kleinere Cellulose-bindende Domäne, die durch ein Linker-Peptid miteinander verbunden sind.^[25] Die katalytische Spaltung der glycosidischen Bindung wird in zwei Mechanismen aufgeteilt, welche in Abb. 2 dargestellt sind.^[27] Es handelt sich in beiden Fällen um eine Säure-Base-Katalyse, die durch zwei im aktiven Zentrum befindliche katalytisch aktive Carboxylgruppen gesteuert werden. Dies sind in erster Linie Aspartat- oder Glutamatreste.

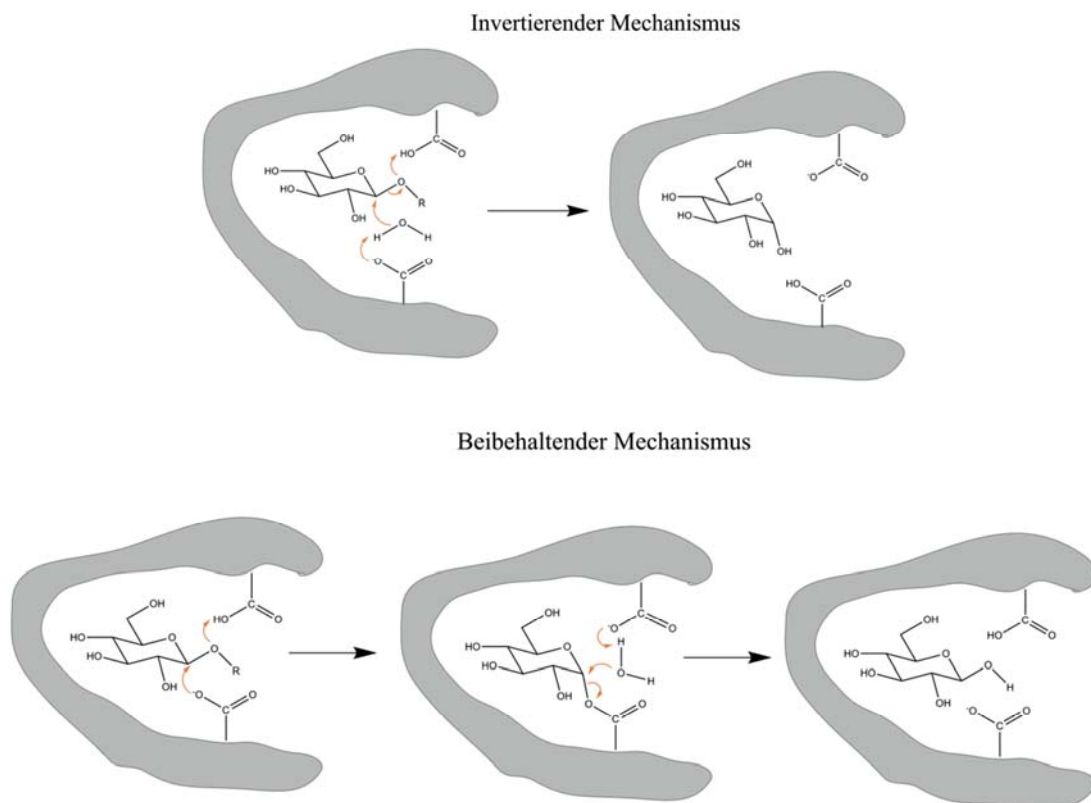


Abb. 2: Mechanismus der Substrathydrolyse unter Inversion der Konfiguration des Substrats und unter Retention der Konfiguration. Die Abbildung ist McCarter et al.^[27] nachempfunden.

Die Form des aktiven Zentrums kann für Endoglucanasen eine Rinnenform annehmen^[28], die es dem Enzym ermöglicht, in der Mitte der Polysaccharidkette optimal anzugreifen. Für Exoglucanasen zeigt sich das aktive Zentrum in einer Tunnelform^[29], wodurch ein Angriff der Cellulosefaser nur am Ende der Kette und nach Einfädeln in das katalytische Zentrum möglich ist. Abb. 3 zeigt Proteinformen der jeweiligen Enzymklassen.

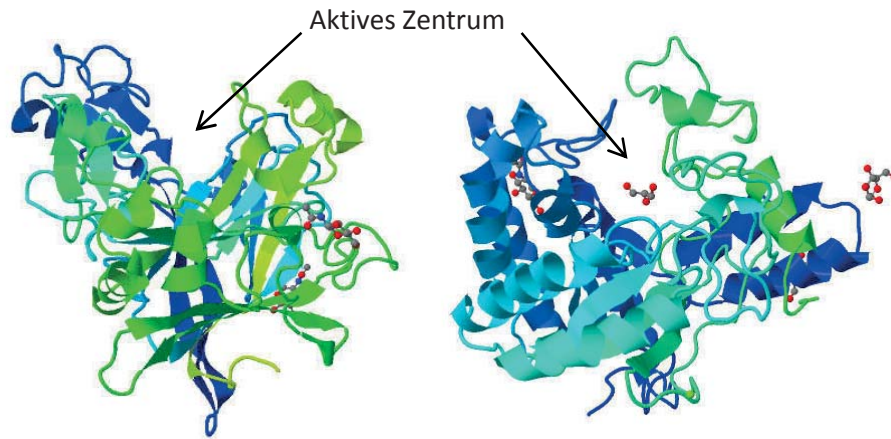


Abb. 3: Proteinstruktur der aktiven Zentren verschiedener Cellulasen. Links eine Endogluconase mit einer Rinnenform^[28] und rechts eine Exoglucanase mit Tunnelform^[29]. Die Abbildungen wurden der Proteindatenbank entnommen.

Eine der effizientesten und am besten charakterisierten cellulolytischen Pilze ist *Trichoderma reesei*. Die große Menge und Diversität der von ihm produzierten Cellulasen öffnet ein weites Feld an Anwendungen für dessen Enzympräparate, die auch in dieser Arbeit verwendet wurden. Sie werden in verschiedenen Feldern der Biotechnologie einschließlich der Biokonversion erneuerbarer Rohstoffe zu Biokraftstoffen^[30] und Feinchemikalien^[31]; in der Textilindustrie zur Steigerung der Qualität von Baumwolle und Leinenartikeln^[32] sowie in der Lebensmittel-^[33] und Papierindustrie^[34] eingesetzt.

Die Vielseitigkeit der Anwendungen dieser Enzyme macht die Cellulasen so interessant und es wird fortwährend nach Möglichkeiten der Verbesserung solcher enzymatischer Prozesse gesucht. Neueste Fortschritte in der Genomic, Proteomic und der Bioinformatik lieferten Zugang zu einer enormen Informationsbasis, um die Wahl des geeigneten Mikroorganismus und geeigneter Enzyme für die Biokonversion zu erleichtern. Ein Lösungsansatz ist die Steigerung der Enzymaktivität durch genetische Variation der Aminosäuren des katalytischen Zentrums^[35] und der substratbindenden Domäne.^[36] Zusätzlich haben die Entdeckung und Entwicklung von geeigneten Kultivierungsstrategien und Organismen zur Überexpression für die Enzymproduktion bereits die Kosten der Cellulaseproduktion deutlich verringert. Wie sich das auf die Gesamtprozesskosten auswirkt ist beispielhaft der Abb. 4 zur Herstellung von Ethanol aus Cellulose zwischen 1999 und 2005 zu entnehmen.^[37] Trotz dieser Anstrengungen ist das eingesetzte Enzym weiterhin ein großer Kostenfaktor, der in vielen Prozessen bis zu 50 % der Kosten ausmacht.^[34] Eine Bindung der Enzyme auf einem festen Trägermaterial ermöglicht eine Rückgewinnung der Katalysatoren aus der Reaktionslösung und somit den

wiederholten Einsatz in dem Prozess. Vor- und Nachteile dieser Methode werden im folgenden Kapitel diskutiert.

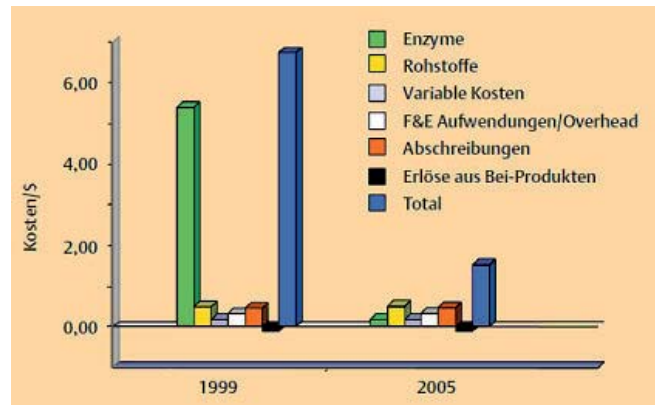


Abb. 4: Aufstellung der Kostenanteile bei der Produktion von Ethanol aus Cellulose zwischen 1999 und 2005.^[37]



2.2.2 Immobilisierte Biokatalysatoren

Die Anwendungsfelder für Biokatalysatoren sind vielfältig und breit gefächert, wie es zuvor am Beispiel der Cellulase diskutiert wurde. Die Verwendung von Enzymen in chemischen Prozessen ermöglicht hohe Aktivität, Selektivität und Spezifität in komplexen chemischen Reaktionen unter milden Reaktionsbedingungen.^[38] Daher ist das Engineering von Enzymen für industrielle Reaktoren ein großes aktuelles Forschungsgebiet. Allerdings sind die industriellen Anwendungen durch Instabilität der Enzyme und vor allem der Schwierigkeit der Rückgewinnung und Wiederverwendung der Enzyme in den Prozessen geprägt. Die Immobilisierung von Enzymen bietet hierbei eine mögliche Lösung dieser Probleme.

Die Definition bezeichnet Biokatalysatoren als immobilisiert, wenn sie durch chemische oder physikalische Methoden in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt worden sind.^[39, 40] Die Vorteile einer Immobilisierung sind einerseits eine einfache Separation der Enzyme aus der Reaktionslösung, was die Proteinkontaminationen des Produktes minimiert und somit den Aufreinigungsaufwand des Produktes verringert, andererseits kann durch die Wiederverwendbarkeit der Enzyme eine Kosteneinsparung erzielt werden, was im Hinblick auf die Konkurrenzfähigkeit enzymkatalysierter Prozesse einen wichtigen Faktor darstellt. Zusätzlich zur einfachen Handhabung und Wiederverwendbarkeit der Enzympräparate nach Immobilisierung wird auch die Lagerung vereinfacht und die Enzymstabilität gegenüber Hitzedenaturierung und anderer extremer Umgebungsbedingungen gesteigert;^[41] dies gilt besonders bei kovalent gebundenen Enzymen. Nachteile sind die zusätzlichen Kosten, die durch den Immobilisierungsprozess entstehen. Hierbei sollte besonders abgewogen werden, ob es sinnvoll ist, das vorliegende Enzym zu immobilisieren, da nicht jedes Enzym immobilisiert werden kann, weil es durch Immobilisierung von Proteinen zu erheblichen Aktivitätsverlusten kommt. Des Weiteren kann es bei zu großen Immobilisaten durch Diffusionslimitierung von Substrat und Produkt zu Problemen des Stofftransportes kommen. Demnach sollte bei der Wahl der Immobilisierung auf eine geringe Inaktivierung des Enzyms, geringe Immobilisierungskosten bzw. eine einfache Immobilisierungsmethode und gute Langzeitstabilität des Katalysatorkomplexes geachtet werden.^[42]

Die unterschiedlichen Immobilisierungsmethoden sind als Überblick in Abb. 5 zusammengefasst. Diese Einteilung wurde von einem internationalen Gremium 1971 vorgeschlagen.^[39, 40] Im Rahmen dieser Arbeit wird ausschließlich die Trägerbindung von Biokatalysatoren, sprich die Bindung des Enzyms an einen festen unlöslichen Träger genutzt und diskutiert.

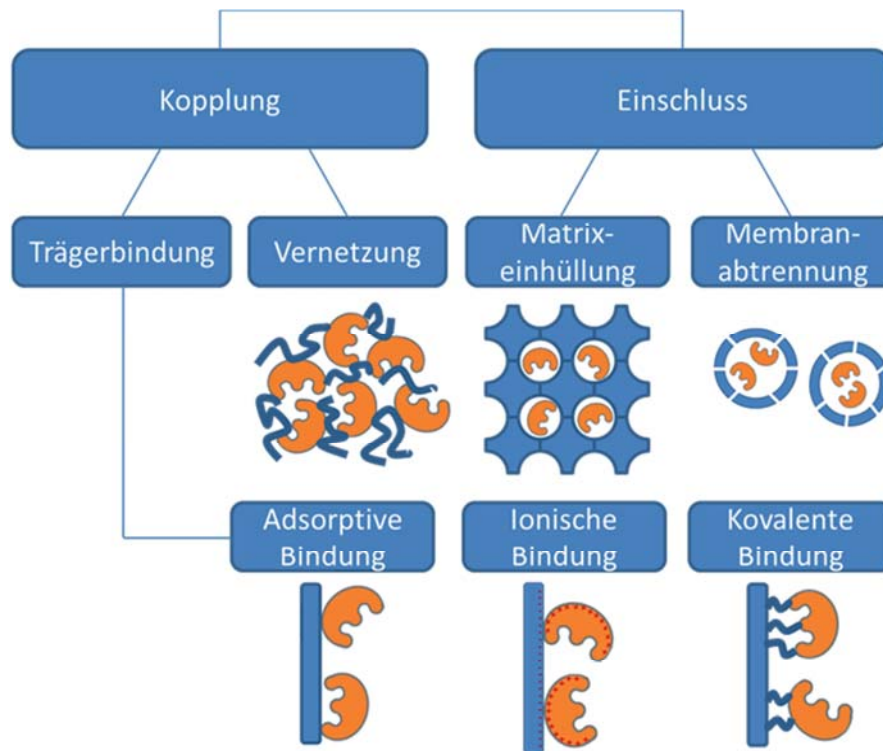


Abb. 5: Einteilung der verschiedenen Immobilisierungsmethoden. Abgewandelt nach Hartmeier^[39].

Als Träger können anorganische Stoffe wie Glas, Silicagel, Aluminiumoxid, Gold, organische Stoffe wie Kollagen, Cellulose, Stärke oder synthetische Stoffe wie Nylon oder Polyvinylalkohol dienen.^[43] Die Kopplung der Enzyme an einen Trägerstoff wird in adsorptive, ionische und kovalente Bindungen eingeteilt.

Die Adsorption basiert auf Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen Enzym und Trägermaterial. Obwohl es sich bei Wasserstoffbrücken-Bindung und hydrophoben Bindungen nicht um die physikalische Adsorption handelt, werden diese Wechselwirkungen auch unter dem Begriff Adsorption zusammengefasst. Die adsorptive Bindung von Biokatalysatoren ist eine schnelle und einfache Methode der Immobilisierung. Hierbei kommt es nur selten zu kopplungsbedingten Konformationsänderungen der Enzyme; Aktivitätsverluste treten daher kaum auf. Nachteilig bei dieser Methode ist die geringe Bindungsstärke. Bereits bei kleinen pH- oder Temperaturschwankungen löst sich die Bindung und das Enzym geht in Lösung über.^[43]

Bei ionischen Bindungen kommt es zu elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Trägermaterial und Biokatalysator. Dieses Verfahren ist ähnlich einfach durchzuführen wie die Adsorption. Zwar ist die Kopplungsstärke der ionischen Bindung stärker als die der Adsorption, jedoch ist sie immer noch schwach im Vergleich zur kovalenten Bindung.^[43]



Die kovalente Bindung ist eine relativ stabile irreversible Bindung zwischen Biokatalysator und Trägerstoff. Sie entsteht zwischen funktionellen Gruppen der Enzyme (z.B. -OH, -SH, -NH₂, -COOH) und Ankergruppen des Trägerstoffes. Nachteil dieser Immobilisierung ist eine häufig auftretende Verminderung der Aktivität des Biokatalysators.^[38] Diese Abnahme der Aktivität wird unter anderem verursacht durch sterische Behinderung, bei der aktive Zentren der Enzyme durch Abschirmungseffekte des Trägers und benachbarter Enzyme in ihrer Zugänglichkeit behindert werden oder durch Konformationsänderungen der Tertiärstruktur, die infolge der Bindung zwischen Enzym und Träger auftreten. Da sich die Nähe zur Trägeroberfläche also nachteilig auf die Aktivität des Biokatalysators auswirkt, lässt sich der konformative Stress auf das Enzym durch Einbringen eines Spacers (Abstandshalter) verringern. Diese Spacer sollen eine höhere Beweglichkeit und Zugänglichkeit des angekoppelten Biokatalysators ermöglichen.^[39] Die in diesem Kapitel beschriebenen charakteristischen Merkmale der unterschiedlichen Immobilisierungsformen werden im folgenden Kapitel anhand von Beispielen der Cellulase-Immobilisierung verdeutlicht. Diese Untersuchungen sollen die Wahl des Partikelsystems und der Immobilisierungsform für die hier vorgestellte Arbeit erleichtern.



2.2.3 Einsatz immobilisierter Cellulasen

Es gibt nur wenige Publikationen, die die Anwendung von immobilisierter Cellulasen referieren. Hauptgrund hierfür ist das unlösliche Substrat Cellulose. Dies kann durch Vorbehandlung und spezielle Modifikation in eine wasserlösliche Form z.B. Carboxymethylcellulose überführt werden. Als Träger für die Immobilisierung werden unporöse Strukturen bevorzugt, da hier die Diffusionseffekte bzw. Diffusionslimitierungen vernachlässigbar sind. Der Einsatz von nanostrukturierten Trägern ermöglicht eine höhere Beladungskapazität aufgrund des erhöhten Oberflächen-Volumen-Verhältnisses, eine verbesserte Löslichkeit bzw. Dispergierbarkeit des Enzym-Träger-Komplexes und eine geringere Massentransfer-Limitation.^[44] Durch den Einsatz von Nanopartikeln soll außerdem ein geringerer konformativer Stress für die Enzyme vorherrschen, so dass sie ihre native Form weitestgehend beibehalten.^[45, 46] Des Weiteren zeigen Nanopartikel aufgrund ihrer Größe Brown'sche Molekularbewegung und schränken somit das Enzym weniger in seiner Mobilität ein als dies mit μ -Partikeln als Träger der Fall ist. Eine Berechnung zur Brown'schen Molekularbewegung kann dem Anhang B 10 entnommen werden. Im folgenden Kapitel sind einige Publikationen zur Immobilisierung und Anwendung von Cellulasen auf Nanostrukturen zusammengetragen.

Die Physikalische Adsorption von Cellulase auf einem Trägermaterial zeigt zu geringe Bindungsstärken. Beispiele der physikalischen Adsorption von Cellulase sind die Adsorption auf Tonerde, bei der bis zu 20 % des adsorbierten Proteins (Beladungen bis 200 mg/g) noch vor Einsatz in der Hydrolyse von dem Trägermineral abgewaschen werden.^[47] Die Aktivität der Immobilisate sinkt auf etwa 70-80 % der nativen Cellulase, allerdings kann eine Steigerung der Lagerstabilität erzielt werden. Als weitere adsorptive Funktionalisierung von Cellulose wurden Teflonpartikel (215 nm) untersucht. In diesem Fall sank die Aktivität des Enzymkomplexes auf etwa 50 % der Aktivität nativer Cellulase.^[45] Großer Vorteil dieser Immobilisierungsform ist die geringe Konformationsänderung des Enzyms. Dies konnte auch anhand der Untersuchungen der adsorptiven Immobilisierung auf Aktivkohle bestätigt werden.^[46] Daoud et al.^[46] untersuchten ebenfalls den wiederholten Einsatz der Immobilisate in mehreren Zyklen. Die Aktivität der Cellulase reduziert sich nach 5 Zyklen auf 70 % des Anfangswertes, was wohl im großen Nachteil der physikalischen Adsorption begründet ist, dem Proteinleaching. In allen Fällen wurde als Substrat die lösliche Methylcellulose eingesetzt. Nicht nur die Physisorption der Enzyme zeigt ein starkes Proteinleaching sondern auch die Einbettung des Enzyms in eine Polymermatrix. So wird z.B. von Kumakura et al.^[48]



eine Immobilisierung des Enzyms auf Aluminiumoxid Partikeln mit umgebender Polymermatrix, in der die Cellulasen eingebettet sind, realisiert. Nach den ersten Zyklen werden etwa 20 % der Enzyme aus der Matrix ausgewaschen.^[48] Durch Steigerung des Vernetzungsgrades könnte hier das Proteinleaching minimiert werden. Dies hätte jedoch wieder den Nachteil des konformativen Stresses für das Protein und Substratlimitierungseffekte machen den Einsatz des immobilisierten Enzyms ineffizient. Um das Problem des Proteinleachings zu reduzieren kann alternativ die ionische Immobilisierung eingesetzt werden.

Die Natur der Oberflächenladung und das Ausmaß der Ladungsverteilung auf der Proteinoberfläche sind stark abhängig vom Lösungsmittel-pH. Aus diesem Grund sollten der Ionisationsgrad des Enzyms und die Oberflächenladung des Trägermaterials bei den vorliegenden Umgebungsbedingungen bekannt sein. Die elektrostatische Adsorption ist eine vielseitige Methode, die einfach auf ein breites Spektrum von Nanomaterialien so wie superparamagnetische Partikel^[49] oder Kohlenstoff-Nanotubes^[50] angewendet werden kann. Die inerte Natur der Eisenoxid Nanopartikel gegenüber biologischen Systemen erlaubt deren Einsatz in z.B. zellulären oder Drug-Delivery Systemen. Zusätzlich versprechen diese magnetischen Partikel eine einfache Möglichkeit der Wiedergewinnung und des erneuten Einsatzes der immobilisierten Enzyme über mehrere Zyklen. Auch hier konnte eine deutliche Verbesserung der pH-Stabilität sowie eine leichte Stabilisierung gegenüber hohen Temperaturen beobachtet werden. Ein großes Problem dieser magnetischen Partikelsysteme ist die Oxidation der Eisenkomponente und die damit verbundene Abnahme der magnetischen Abtrennbarkeit. Das zweite Beispiel, die Kohlenstoff-Nanotubes, sind aufgrund ihrer großen Oberfläche von 130 m²/g ein guter Kandidat als Träger für Biomoleküle. Die negativ geladenen Carboxyl-Gruppen auf der Trägeroberfläche interagieren mit den positiven Seitenketten (z.B. Aminogruppen) des Proteins. Es sind maximale Beladungen von 630 ± 40 mg/g beschrieben worden, die sowohl auf der Oberfläche als auch im Inneren des Partikels stattfinden.^[50] Die Aktivität bei Hydrolyse von 4-nitrophenyl- β -D-glucopyranosid der immobilisierten β -Glucosidase betrug nur noch 20 % der nativen Enzymaktivität, so dass dieses Trägermaterial für industrielle Anwendungen uninteressant wird.

Eine weitere Methode der Immobilisierung ist die Quervernetzung des Enzyms mit der Trägermatrix. Dies führt zu einer deutlich erhöhten Stabilität des Enzyms in mehreren Zyklen.^[51, 52] Nachteil hierbei ist allerdings die stark reduzierte Aktivität des Enzyms aufgrund des sterischen Stresses und der damit verbundenen Konformationsänderung sowie abhängig vom Substrat eine Stofftransportlimitierung aufgrund von Diffusionslimitierungen

durch die Trägermatrix. Durch die kovalente Bindung von Enzymen auf Trägeroberflächen sind diese Limitierungseffekte weitestgehend auszuschließen. Desweiteren wird diese Immobilisierungsform als sichere Methode angesehen, das Proteinleaching zu minimieren. Da die meisten industriell relevanten Prozesse die Proteindesorption so gering wie möglich halten wollen, um das komplette biokatalytische Potential des immobilisierten Enzyms zu erhalten, sollte dies bei der Wahl der Immobilisierungsmethode und des Trägers unbedingt berücksichtigt werden. Zur Immobilisierung von Cellulase auf einem festen Trägermaterial werden verschiedene chemische Methoden angewendet. Die am meisten verwendeten Bindungsreagenzien sind Carbodiimid-(EDC)-Derivate und Glutaraldehyd, die reaktive Gruppen nutzen um kovalente Bindungen zu schaffen.^[53] Die Identifikation und die Lage der reaktiven funktionellen Gruppen kann wichtig sein, da die Seitenketten des aktiven Zentrums eines Enzyms nicht für die Bindung an einen Träger genutzt werden dürfen.

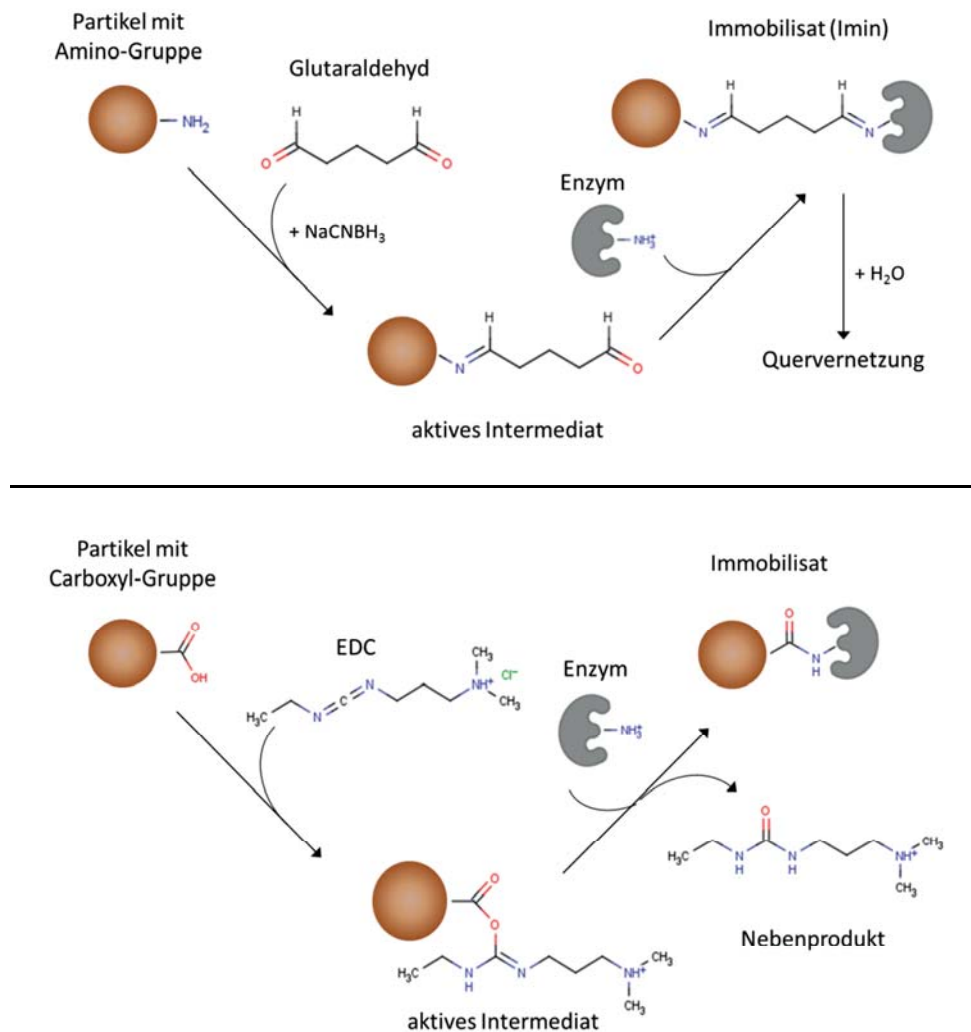


Abb. 6: Kovalente Immobilisierungsmechanismen: oben ist der Mechanismus der Bindung eines Enzyms auf einem Partikel mit Oberflächen-Aminogruppen; unten die Bindungsmethode mittels EDC auf einem Partikel mit Carboxyl-Gruppen auf der Oberfläche dargestellt.^[53]

Der allgemeine Mechanismus zur Bildung von kovalenten Bindungen mittels EDC oder Glutaraldehyd ist in Abb. 6 dargestellt. Die kovalente Immobilisierung geht meist mit einer Modifikation der Trägeroberfläche einher. Einen Überblick über die Immobilisierung von z.B. mesoporösen Silica-Beads mit Biomolekülen und deren Anwendungen liefert Giraldo et al.^[54] Hier wird auch beschrieben, dass die Modifikation der Silanol-Gruppen die Affinität zum Biomolekül steigert und somit die Immobilisierung erleichtert.

Bei der Verwendung von Gold als Trägermaterial ist diese oftmals aufwendige Technik nicht zwangsweise notwendig. Die Immobilisierung kann auch selbstorganisiert ablaufen, da Gold eine sehr hohe Affinität zu Thiolen hat. Gole et al.^[55] demonstrierten die selbstorganisierte Immobilisierung von Endoglucanase auf 5 nm großen Goldpartikeln. Sie berichten von einer nahezu gleichbleibenden Aktivität der Immobilisate im Vergleich zum nativen Enzym sowie einer gesteigerten Halbwertszeit der Enzymaktivität. Eine Kombination aus Thiolatbindung der Cysteinreste sowie Aminbindungen werden als Ursache für die Cellulaseanbindung zur Goldoberfläche vermutet.^[55] Nachteilig bei diesem Partikelsystem ist die schwierige Wiedergewinnung der Partikel. Die Herstellung der Partikel ist nicht kostengünstig. Sind die Partikel also nicht in mehreren Zyklen einsetzbar, sind sie für industrielle Anwendungen nicht interessant. Dennoch ist festzuhalten, dass die verwendeten Gold-Nanopartikel das Enzym offensichtlich nicht beeinflussen, trotz kovalenter Bindung. Es gibt einige Beispiele in der Literatur die eine deutliche Reduzierung der Enzymaktivität durch kovalente Bindung und dem damit verbundenen konformativen Stress beschreiben.^[56, 57, 58] Afsahi et al.^[58] vermuten, dass durch die eingeschränkte Beweglichkeit der immobilisierten Enzyme die Abnahme der Aktivität zu erklären ist. Um dieser Mobilitätsproblematik aus dem Weg zu gehen, setzen Garcia et al.^[59] langkettige Spacer-Moleküle wie Polyvinylalkohol (PVA) oder Polyethylenglycol (PEG) ein, die die Aktivität der immobilisierten Enzyme deutlich verbessern. Um nun für industrielle Anwendungen ein geeignetes Partikelsystem zu finden, sollte das Proteinbleaching so gering wie möglich gehalten werden. Somit entfallen die Physisorption und das Einbetten in eine Matrix. Die kovalente Bindung ist demnach die bevorzugte Methode; allerdings ist hier darauf zu achten, dass die Aktivitätsabnahme des Enzyms nicht zu groß ist. Die Immobilisierung mit EDC zeigte hier geringeren Einfluss, weshalb diese Methode auch im Rahmen der hier vorgestellten Arbeiten verwendet wurde. Im Gegensatz zu den anderen Anwendungsbeispielen zeigen die Goldnanopartikel von Gole et al. keinen Einfluss auf das immobilisierte Enzym. Dieser Ansatz sollte erneut aufgegriffen werden, um durch die Entwicklung eines wiederverwertbaren Systems, z.B. durch die Verwendung eines magnetischen Kerns, die Goldnanopartikel als Katalysatorträger auch für industrielle



Anwendungen interessant zu machen. Als magnetische Komponente sollte ein superparamagnetischer Kern eingesetzt werden, dessen magnetische Eigenschaften im folgenden Kapitel näher betrachtet werden.

2.2.4 Magnetische Eigenschaften von Eisenoxid-Nanopartikeln

Nanopartikel besitzen spezielle Eigenschaften, die mit denen der makroskopischen Festkörper oft nicht übereinstimmen. Der Superparamagnetismus gehört genauso wie die Plasmonresonanz, auf die im folgenden Kapitel näher eingegangen wird, zu den physikalischen Materialeigenschaften der Nanopartikel. Die folgende Darstellung der verschiedenen Formen des Magnetismus dient dem besseren Verständnis des superparamagnetischen Effektes. Auf eine ausführliche Beschreibung wird an dieser Stelle jedoch verzichtet und auf physikalische Lehrbücher verwiesen.^[60, 61, 62]

Festkörper, die ungesättigte magnetische Spins beinhalten, zeigen paramagnetisches Verhalten. Die einzelnen magnetischen Momente sind aufgrund thermischer Energie in alle Richtungen gleich verteilt; die Gesamtmagnetisierung beträgt Null. Durch das Anlegen eines äußeren Magnetfeldes richten sich die magnetischen Momente entlang dieses Feldes aus und es entsteht eine Gesamtmagnetisierung, die ungleich Null ist (siehe Abb. 7 a). Wird der Paramagnet aus dem Magnetfeld entfernt, kehrt dieser in den Ausgangszustand zurück.

Typisches Merkmal des Ferro- bzw. Ferrimagnetismus sind Weiß'sche Bezirke. Unterhalb einer materialspezifischen Temperatur der sogenannten Curie-Temperatur koppeln benachbarte Spins miteinander und es entstehen Domänen mit magnetischen Spins gleicher Orientierung (siehe Abb. 7 b). Für ferromagnetische Stoffe richten sich die benachbarten Spins parallel zu einander aus. Im Falle von Ferrimagneten, wie z.B. Magnetit oder Maghemit ist die Orientierung der Spins antiparallel. Die antiparallelen Spins besitzen jedoch ungleiche Momente, so dass diese sich nicht komplett kompensieren und somit Netto, wie auch bei Ferromagneten, innerhalb des Weiß'schen Bezirks ein magnetisches Moment entsteht. Wird ein äußeres Magnetfeld an diese Materialien angelegt, so richten sich die magnetischen Momente im Weiß'schen Bezirk beinahe gleichzeitig in Feldrichtung aus. Nach Abschalten des B-Feldes, bleibt unterhalb der Curie-Temperatur eine Restmagnetisierung erhalten.

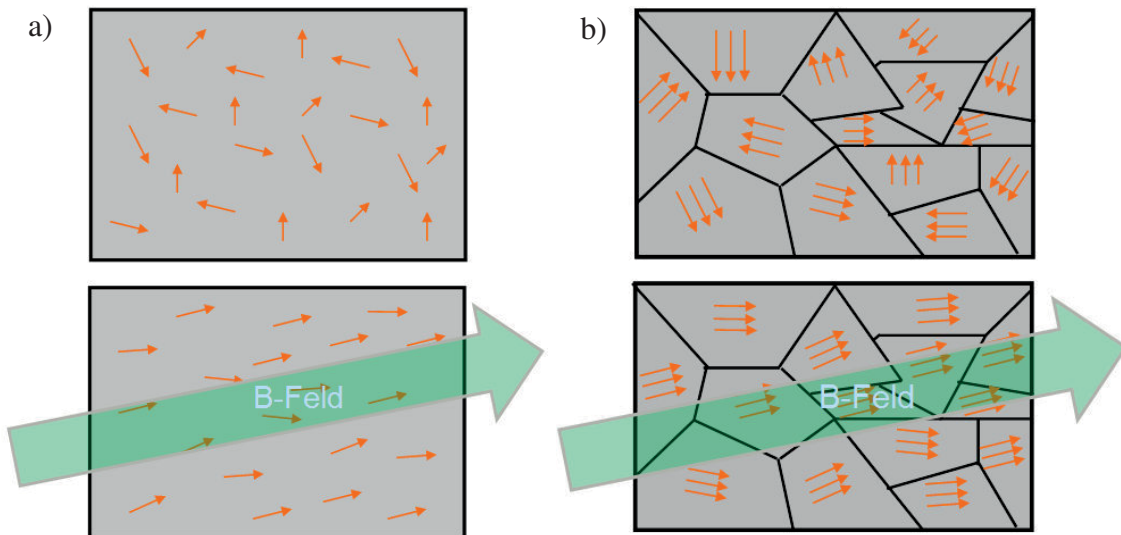


Abb. 7: a) Schematische Darstellung des paramagnetischen Verhaltens ohne (oben) und mit äußerem Magnetfeld (unten); b) Schematische Darstellung des ferromagnetischen Verhaltens; ohne und mit Magnetfeld. Auch nach Entfernen des Magnetfeldes verharren der Ferromagnet unterhalb der Blocking (Curie)-Temperatur in dieser Spinorientierung.^[75]

Für ferro- und ferrimagnetische Materialien gibt es einen kritischen Durchmesser, ab dem es energetisch nicht mehr günstig ist, mehrere Weiß'sche Bezirke auszubilden. Diese Größe ist materialabhängig; für Magnetit und Maghemit ist bei Raumtemperatur und einem Partikeldurchmesser < 10 nm mit superparamagnetischem Verhalten zu rechnen.^[63,64] Partikel dieser Größe besitzen demnach nur einen Weiß'schen Bezirk; dennoch ist die Gesamtmagnetisierung oberhalb der superparamagnetischen Blocking (Curie)-Temperatur Null. Grund hierfür ist, dass die magnetischen Spins bei Raumtemperatur fluktuieren, da die thermische Energie größer als die Anisotropieenergie ist, die benötigt wird, um die Orientierung der gekoppelten Spins umzuklappen. Im äußeren Magnetfeld richten sich die Spins entlang der Feldlinien aus (siehe Abb. 8). Wird das Magnetfeld wieder entfernt, kehren die Partikel in den Ausgangszustand zurück und es ist oberhalb der bereits erwähnten Blocking-Temperatur keine messbare Restmagnetisierung (Remanenz) vorhanden. Das bedeutet für superparamagnetische Kolloide, dass die Stabilität der Partikel in Lösung durch magnetische Effekte nicht negativ beeinflusst wird, auch dann nicht wenn sie mit einem Magneten manipuliert wurden, wie es für paramagnetische Partikel der Fall wäre. Aus diesem Grund ist im Rahmen dieser Arbeit ein superparamagnetischer Eisenoxidkern angestrebt, der einfach abgetrennt und in einem folgenden Anwendungszyklus einfach resuspendiert werden kann.

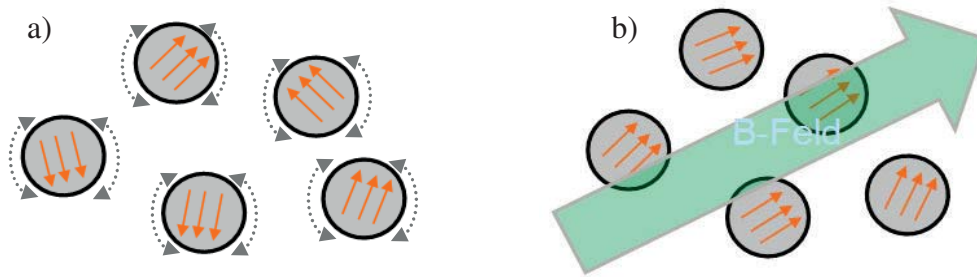


Abb. 8: Schematische Darstellung superparamagnetischer Partikel; a) ohne und b) mit Magnetfeld. Die Spins der Partikel sind bei Raumtemperatur delokalisiert, die äußere Magnetisierung ist null. Nach Anlegen eines magnetischen Feldes orientieren sich die Spins entlang des Magnetfeldes.^[75]

2.2.5 Optische Eigenschaften der Partikel

Die optischen Eigenschaften von Metall-Nanopartikeln werden seit 1857 beginnend mit den Forschungen von Michael Faraday zu kolloidalem Gold untersucht.^[65] Die theoretische Beschreibung der optischen Eigenschaften der Kolloide durch Gustav Mie beschreibt die Streuung und Absorption an einem kugelförmigen Metallteilchen anhand der Maxwell'schen Gleichungen.^[66] Das Modell von Gans erweitert die Beschreibung der optischen Eigenschaften für sphärische Partikel auf Ellipsoide.^[67] Darüber hinaus wurden viele Anstrengungen unternommen, die Theorie auf Partikel beliebiger Form zu erweitern um die Plasmonresonanzfrequenz vorherzusagen.^[68, 69, 70] Diese Theorien besonders die Mie-Theorie werden unter Anderem heute noch zur Berechnung der Partikeldurchmesser aus z.B. Laserbeugungsexperimenten herangezogen.

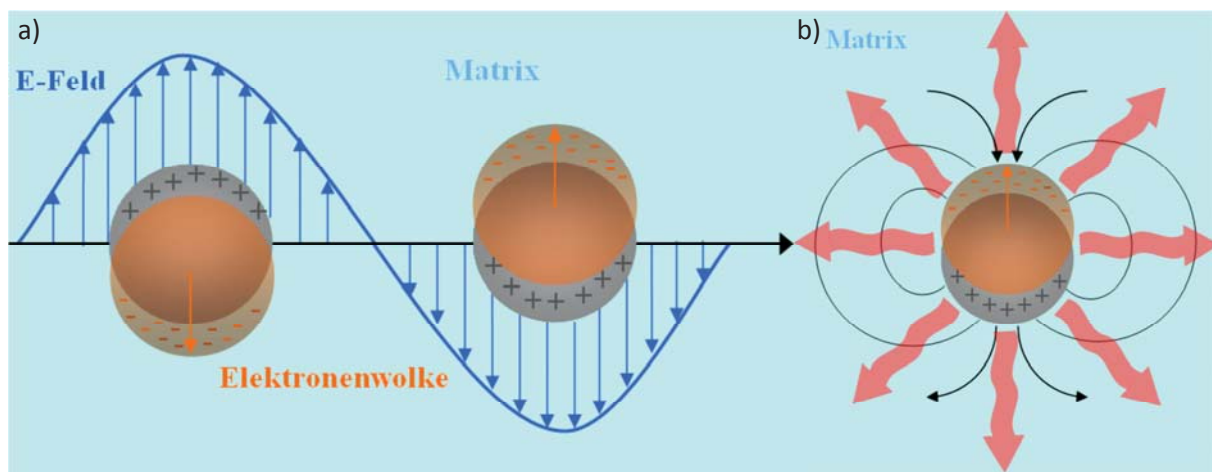


Abb. 9: Semiklassisches Modell der Plasmonresonanz; a) Trifft eine elektromagnetische Welle auf ein Nanopartikel, schwingen die Elektronenwolken gegen die Atomrümpfe. b) Diese Plasmonschwingung formt einen oszillierenden Dipol, der elektromagnetische Wellen abstrahlt. Die Abbildung ist Darstellungen der Referenz^[68, 69] nachempfunden.^[75]

Zur Beschreibung der Partikelplasmonen wird meist ein semi-klassisches Modell verwendet. Nanopartikel besitzen einen Partikeldurchmesser, der etwa in der Größenordnung der Eindringtiefe von elektromagnetischen Wellen in Metallen liegt, so dass das anregende Licht das Partikel komplett durchdringen kann. Dieses wiederum verschiebt im Inneren des Partikels die Leitungsband-Elektronen des Metalls relativ zu den ortsfesten positiv geladenen Gitteratomkernen. Es entsteht eine Polarisationsladung auf der Oberfläche des Clusters (siehe Abb. 9a)). Die Coulomb-Anziehung der negativen Elektronen und die positiven Ladung der Atomkerne erzeugt eine Rückstellkraft, die zur Oszillation der Elektronen gegen die Atomkerne führt. Zur mathematischen Beschreibung dieses Vorgangs wird der kollektiven Schwingung der Leitungsbandelektronen ein Quasi-Teilchen zugeordnet, das sogenannte

Partikelplasmon. In Resonanz mit der Eigenfrequenz dieser kollektiven Oszillation kann auch ein schwaches elektromagnetisches Feld zu einer hohen Plasmon-Intensität führen. Durch die wechselnden Oberflächenladungen entsteht ein oszillierender Dipol, der elektromagnetische Wellen der Resonanzfrequenz abstrahlt (siehe Abb. 9 b), die für Metallnanopartikel im UV/VIS-Bereich detektierbar sind. Neben der eben beschriebenen Dämpfung kommt es auch zu strahlungsfreien Dämpfungsprozessen wie Intra- und Interbandenübergängen, auf die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht näher eingegangen wird.^[71]

Die Plasmonresonanzfrequenz ist abhängig von der Größe und der Form des Partikels sowie von der Polarisierbarkeit des partikelumgebenden Mediums. Der Einfluss von Größe und Form der Partikel auf die Plasmonenresonanzfrequenz und auf die Linienbreite ist am Beispiel für Goldnanopartikel in einem Medium mit Brechungsindex $n = 1,5$ in Abb. 10 dargestellt.

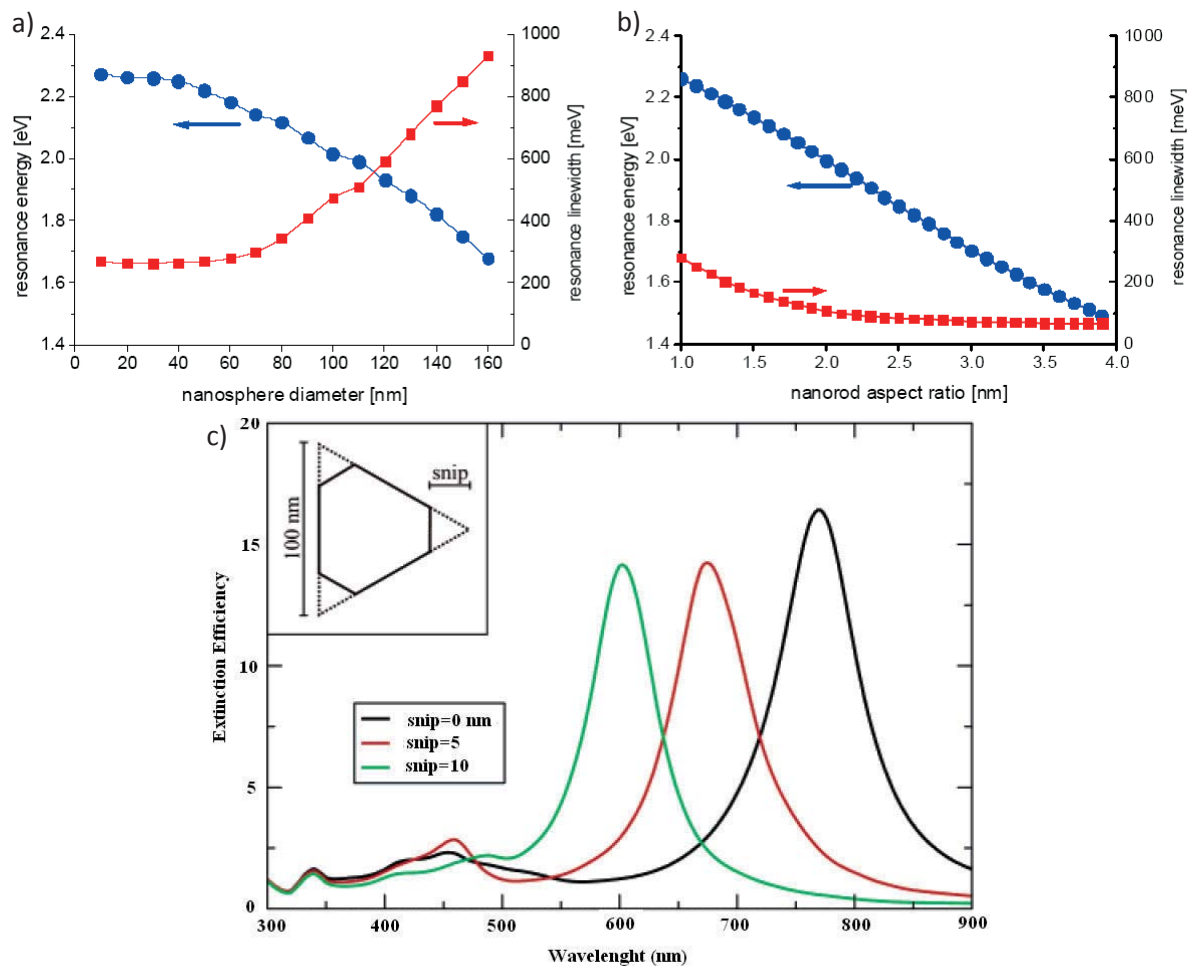


Abb. 10: Abhängigkeit der Plasmonresonanz von Größe und Form der Kolloidpartikel; a) Rot-Shift der Resonanzenergie bzw. Erhöhung der Bandenbreite in Abhängigkeit vom Partikeldurchmesser (nm),^[70] b) Abhängigkeit der Resonanzenergie bzw. der Bandenbreite (meV) von dem Verhältnis der Kantenlängen des Partikels,^[70] c) Abhängigkeit der Absorptionswellenlänge (nm) von der Dreiecksform des Partikels.^[68]

Die Abb. 10 a) zeigt die Ergebnisse für sphärische Goldpartikel mit wachsendem Durchmesser (20 nm - 160 nm). Mit zunehmender Größe kann eine Rotverschiebung der Resonanzfrequenz (rot-shift) und gleichzeitig eine Verbreiterung der Absorptionsbande beobachtet werden.^[70] Die Verbreiterung kommt von der zunehmenden strahlenden Dämpfung für größere Nanokugeln; die Rotverschiebung kommt von der zunehmenden Dämpfung und Retardierungseffekten.^[72] Zusätzlich werden bei wachsenden Partikeln, neben den oben beschriebenen Dipol-Plasmon-Moden, auch Schwingungen höherer Ordnung wie Quadrupol-Moden angeregt, bei denen sich die Hälfte der Elektronenwolke parallel, die andere Hälfte antiparallel zum angelegten Feld bewegt.^[68, 72] Dies wirkt sich besonders auf die Plasmonresonanz nichtsphärischer Partikel wie z.B. Nanostäben aus. In Abb. 10 b) sind die Resonanzfrequenzen für einen Gold-Ellipsoid mit variierendem Seitenverhältnis und in Abb. 10 c) die Resonanzfrequenzen für Gold-Dreiecke dargestellt. Diese Graphen verdeutlichen, dass je mehr sich die Form von der sphärischen Oberfläche entfernt, desto weiter verschiebt sich die Plasmonresonanzfrequenz zu größeren Wellenlängen.

Abb. 11 a) zeigt den Einfluss des Brechungsindex auf die Position der Resonanzfrequenz am Beispiel von 20 nm großen Partikeln. Der ansteigende Brechungsindex bewirkt wie auch bei zunehmenden Partikelradien eine Rotverschiebung der Resonanz. Grund für den Rot-Shift ist die Abschirmung der Oberflächenladungen durch die Polarisation des einbettenden Mediums. Für die Charakterisierung der Partikel ist demnach das Lösungsmittel ebenfalls von Bedeutung und muss für die Interpretation berücksichtigt werden.

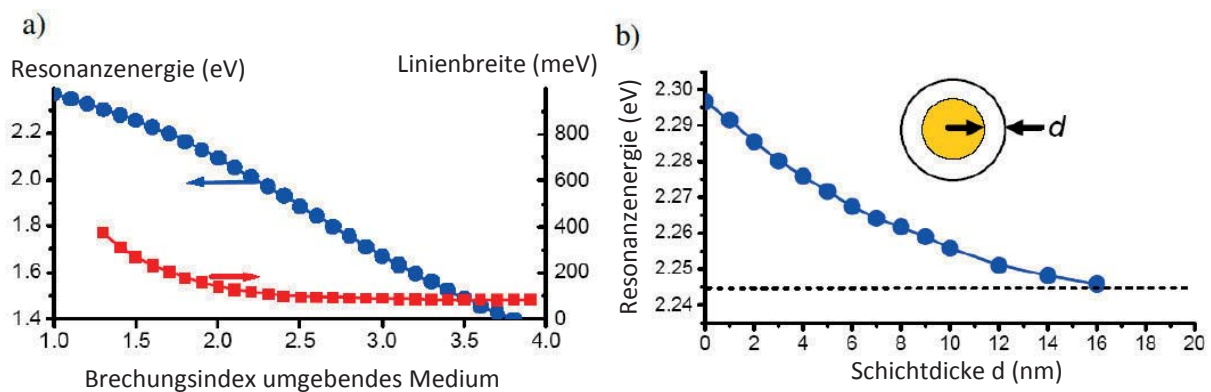


Abb. 11: Abhängigkeit der Plasmonresonanz von der Umgebung der Partikel; a) Abhängigkeit der Resonanzenergie bzw. der Bandenbreite von dem Brechungsindex des umgebenden Mediums, b) Abhängigkeit der Resonanzenergie von der Dicke einer umgebenden Schicht d (nm).^[70]

Ein wichtiger Punkt für die spätere Charakterisierung der Partikelsysteme nach Funktionalisierung ist, dass bereits kleine Layer eines anderen Brechungsindex um die Partikel grundlegenden Einfluss auf die Plasmonresonanz haben. Dies wird in Abb. 11 b) gezeigt. Dargestellt wird die Resonanzposition für 40 nm große Goldkugeln in Wasser



($n = 1,33$) mit einem dicker werdenden Layer eines Materials mit einem Brechungsindex von $n = 1,5$. Dieser Brechungsindex entspricht z.B. dem von Proteinen.^[73]

Neben den optischen Eigenschaften der Plasmonabsorptionsbande wird auch das starke elektromagnetische Feld um die Nanopartikel, welches sehr viel stärker sein kann als das Feld des anregenden Lichtes, zur Charakterisierung genutzt. Es verstärkt nichtlineare Effekte wie z. B. die oberflächenunterstützte Raman-Streuung (Surface Enhanced Raman Scattering = SERS). Auf diesen Effekt wird im Zusammenhang mit der Funktionalisierung und der Raman-Spektroskopie der Partikel noch einmal näher eingegangen.



2.3 Synthese und Charakterisierung der $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ -Trägerpartikel

2.3.1 Stand der Technik

In diesem Kapitel werden die für Enzymimmobilisierung verwendeten $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ -Partikel näher beschrieben. Die Synthese sowie einige Ergebnisse der Charakterisierung der Partikel (Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen und UV/VIS-Spektren) wurden bereits in der vorgelagerten Diplomarbeit angefertigt und sind als Stand der Technik zu betrachten.^[75]

2.3.1.1 Partikelsynthese

Als magnetischer Grundträger dienen superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel, die durch Fällung von Eisensalzen in Natronlauge hergestellt werden (genaue Synthesevorschrift siehe Anhang A.1).^[74] Um die inverse Spinell-Struktur des Magnetit zu erhalten, welches das Zielprodukt der Synthese darstellt, werden ein Teil Fe (II) und zwei Teile Fe (III) bei der Synthese eingesetzt. Die Partikel werden durch mehrmaliges Waschen mit Wasser von den Reaktionsrückständen befreit. Die Magnetpartikel werden nun mit Gold ummantelt. Die Goldschale wird durch eine oberflächenkatalysierte Reduktion von Goldsäure durch Hydroxylamin erzeugt. Der Reaktionslösung wird in mehreren Schritten iterativ Goldsäure und Hydroxylamin zugegeben. Diese schrittweise Ummantelung der Partikel verhindert die Bildung reiner Goldpartikel ohne magnetischen Kern. Zur Stabilisierung werden dem Kolloid Citrat-Ionen zugegeben (genaue Synthesevorschrift siehe Anhang A.2). Abb. 12 zeigt, wie sich die Partikellösung mit zunehmender Goldummantelung optisch verändert und eine rötliche Färbung erhält. Diese ist auf eine Festkörpereigenschaft zurückzuführen, die als Oberflächenplasmonresonanz bezeichnet wird (siehe Kap. 2.2.5.).



Abb. 12: Schrittweise Ummantelung der magnetischen Kerne mit einer Goldschale.^[75]

2.3.1.2 Charakterisierung der magnetischen Kerne

Die in 2.3.1.1 dargestellte Synthese der Eisenoxidpartikel durch Co-Präzipitation soll nach Lyon et al.^[76] und Morales et al.^[77] Partikeldurchmesser kleiner als 10 nm liefern. Das zu diesem Zeitpunkt zur Verfügung stehende REM (Abbildungen zu den Eisenoxidpartikeln siehe Abb. 13) konnte diese Partikelgrößen nicht auflösen, da deren Durchmesser nah der Auflösungsgrenze ist. Die Partikel stellten sich als große Agglomerate dar, was auf die Probenvorbereitung zurückzuführen ist. Da die Produkte dieser Fällungsreaktion jedoch bereits sehr gut untersucht und reproduzierbar herstellbar sind, kann auch bei den hier vorliegenden Partikeln von Durchmessern um 10 nm ausgegangen werden.

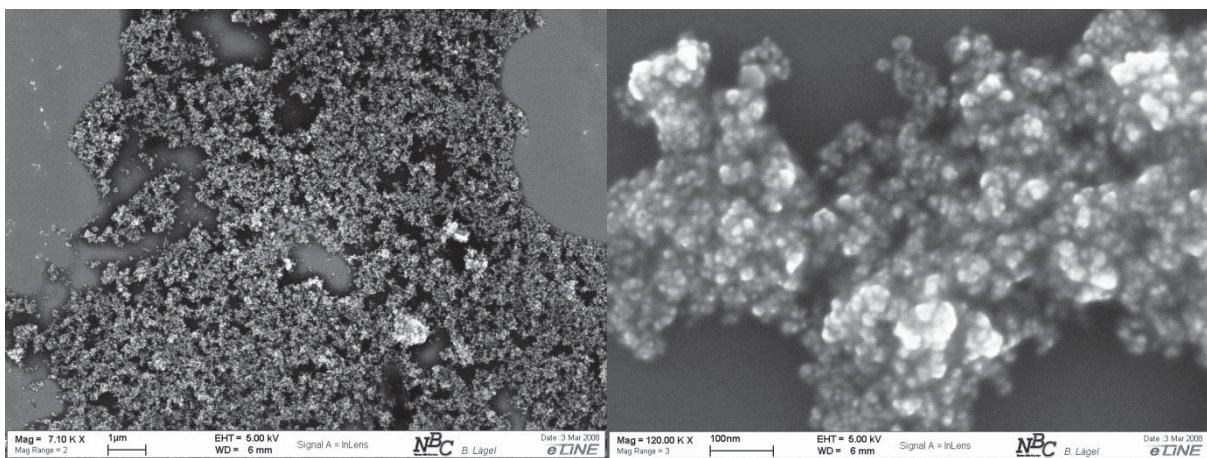


Abb. 13: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Eisenoxid-Nanopartikeln.^[75] Die Partikel stellen sich als Agglomerate dar, eine genaue Bestimmung der Partikeldurchmesser ist anhand dieser Aufnahmen nur schwer realisierbar.

2.3.1.3 Charakterisierung der Gold/Eisenoxid Trägerpartikel

Zur Charakterisierung und Überprüfung der Syntheseschritte wurden spektroskopische und elektronenmikroskopische Methoden eingesetzt. Bei der UV/Vis-Spektroskopie wird die in Kap. 2.2.5 erwähnte Oberflächenplasmonresonanz ausgenutzt. Mit Hilfe von sichtbarem Licht können die Elektronen der Partikel zu Kollektivschwingungen angeregt werden, was zu der rötlichen Färbung der Kolloide und einer Absorptionsbande im sichtbaren Spektralbereich führt. Die Absorptionsbande ist stark abhängig von dem Material, der Größe, Form und Umgebung der Partikel.^[69, 71, 72] Mit Hilfe der Spektren können also Rückschlüsse auf die Partikelcharakteristik gezogen werden. Abb. 14 zeigt eine Zusammenfassung der UV/Vis-Spektren der einzelnen Dekorationschritte. Zusätzlich ist als Vergleich das Spektrum eines reinen Goldkolloides gezeigt, welche nach einer leicht abgewandelten Methode von Turkevich^[78] hergestellt wurde. Dieses reine Goldkolloid wurde ebenfalls bei Immobilisierungsversuchen eingesetzt (siehe Kap. 2.4.1 und 2.4.2).

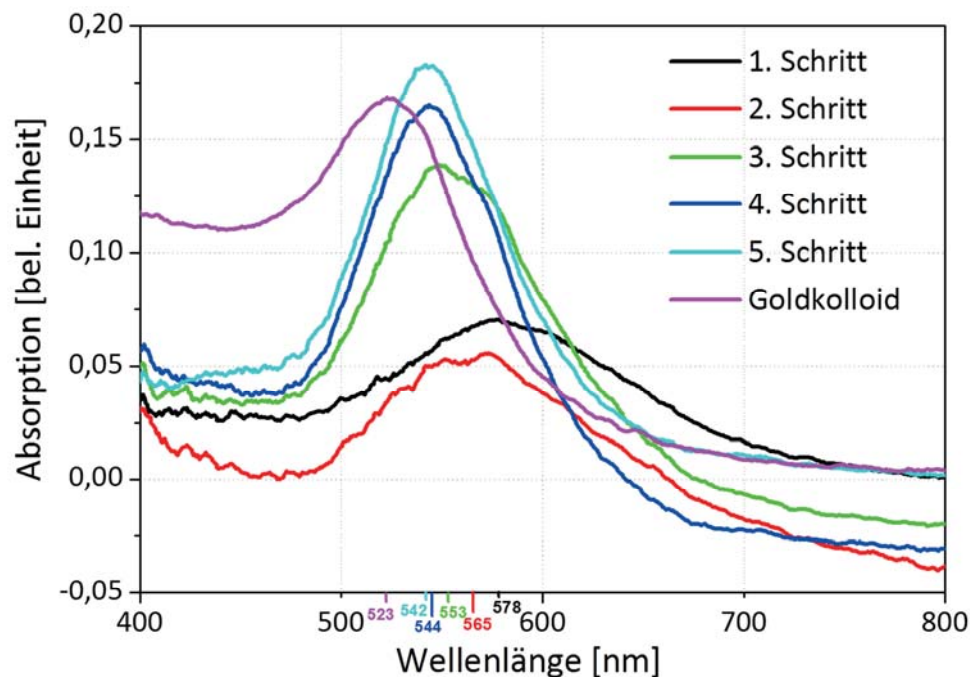


Abb. 14: Korrigierte UV/Vis-Spektren der Golddekorationschritte und Referenzspektrum eines reinen Goldkolloides: Nach der Isolierung der Absorptionsspektren von der Streuung ergeben sich Maxima zwischen 500 nm und 600 nm.^[75]

Die Absorptionsbanden in Abb. 14 werden mit jedem Dekorationschritt schmaler und das Maximum verschiebt sich mehr und mehr Richtung Resonanzfrequenz des reinen Goldkolloides (20 nm Partikeldurchmesser). Dies impliziert, dass mit jeder Zugabe an Goldsäure die synthetisierten Partikel immer mehr die Charakteristik eines reinen kugelförmigen Goldkolloides annehmen.

Um nun die anhand der Spektren gewonnene These zu verifizieren, wurden mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops die Partikel abgebildet. Abb. 15 zeigt Aufnahmen des ersten Dekorationsschrittes. Die Gold/Eisenoxid-Partikel sind hier als weiße Strukturen zu sehen. Die grauen Strukturen in der Umgebung sind in erster Linie Lösungsmittelrückstände oder auch vereinzelt undekorierte Eisenoxid Partikel. Eines der Partikel ist hier auch etwas vergrößert dargestellt und es wird sichtbar, dass diese Partikel eine Art Morgensternform zeigen.

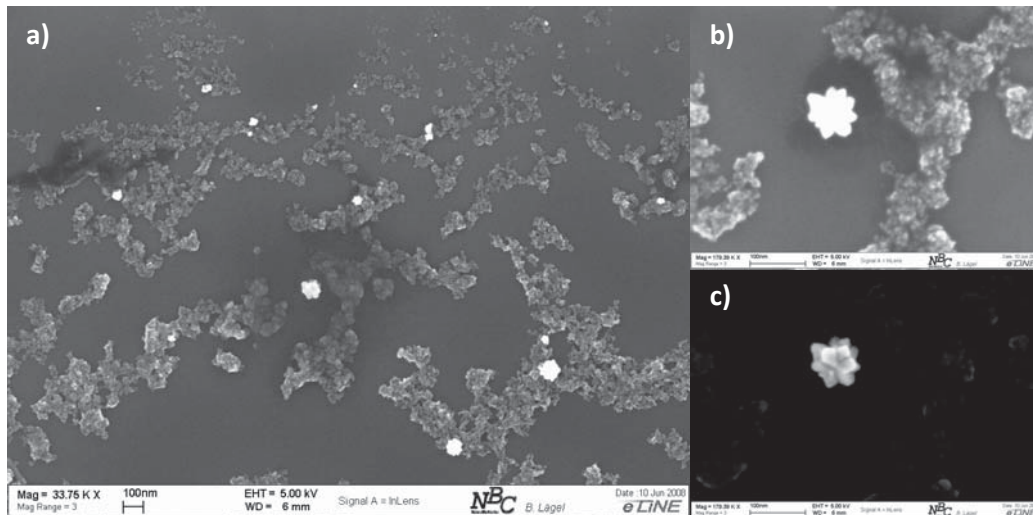


Abb. 15: Gold/Eisenoxid-Partikel 1.Schritt der Golddekoration a) morgensternförmige Partikel, b) Bildausschnitt aus a) eines einzelnen dekorierten Partikels, c) gleicher Bildausschnitt wie b) jedoch der Kontrast der Aufnahme wurde verändert. Der mittlere Partikeldurchmesser beträgt 51 nm.^[75]

Abb. 16 a) zeigt die Partikel des dritten Dekorationsschrittes. Hier haben die Partikel bereits eine rundere Form, wie es auch anhand der UV/Vis-Spektren erwartet wurde. Der fünfte Dekorationsschritt liefert sphärische Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 63 nm. (siehe Abb. 16 b)). In späteren Partikelchargen die von Frau Sonja Dillenberger im Rahmen ihrer Diplomarbeit^[276] hergestellt wurden und auch für die Immobilisierung der Cellulasen verwendet wurden, besaßen die Partikel einen doppelt so großen Durchmesser (siehe Abb. 17). Die Charakterisierung der Partikeldurchmesser dieser Partikelcharge erfolgte, unmittelbar vor der Immobilisierung mit Cellulase, mittels Laserbeugung am Lehrstuhl für Mechanische Verfahrenstechnik von Prof. Ripperger. Die Berechnung der Partikelgrößenverteilung basierte auf der Theorie von Mie (siehe Abb. 17). Für die Berechnung wurde der Brechungsindex von Wasser ($n = 1,33$), dem Lösungsmittel und der Brechungsindex von Gold ($n = 3,47 + i * 1,44$), dem Material der Partikeloberfläche eingesetzt.

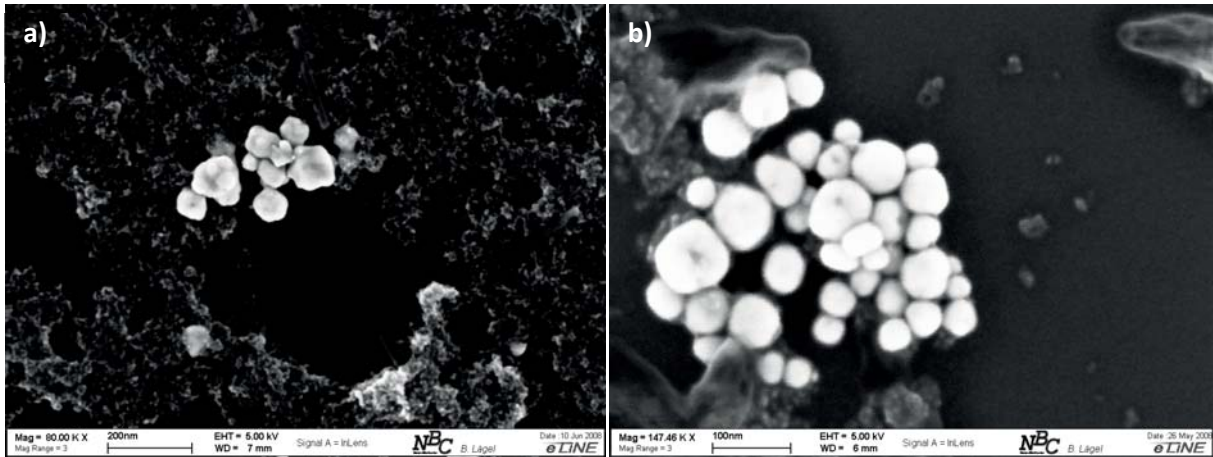


Abb. 16: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Partikel a) nach dem 3. Dekorationsschritt, Durchmesser 54 nm b) nach dem 5. Dekorationsschritt, Durchmesser 63 nm.^[75]

Die Theorie von Mie ist ausschließlich für kleine Partikel (Nanopartikel) anwendbar. Für größere Partikelsysteme wird die Fraunhofer-Beugung zugrunde gelegt. Der Übergang der beiden Theorien ist fließend. Aus diesem Grund sollten bei diesen Messungen die Auswertung immer mit beiden Berechnungen erfolgen und die Ergebnisse anschließend auf Plausibilität untersucht werden, was direkt in der Auswertesoftware erfolgen kann. Die Immobilisierung der Cellulasen erfolgt ausschließlich auf den Partikelsystemen mit größerem Partikeldurchmesser, deren Partikelgrößenverteilung in Abb. 17 dargestellt ist.

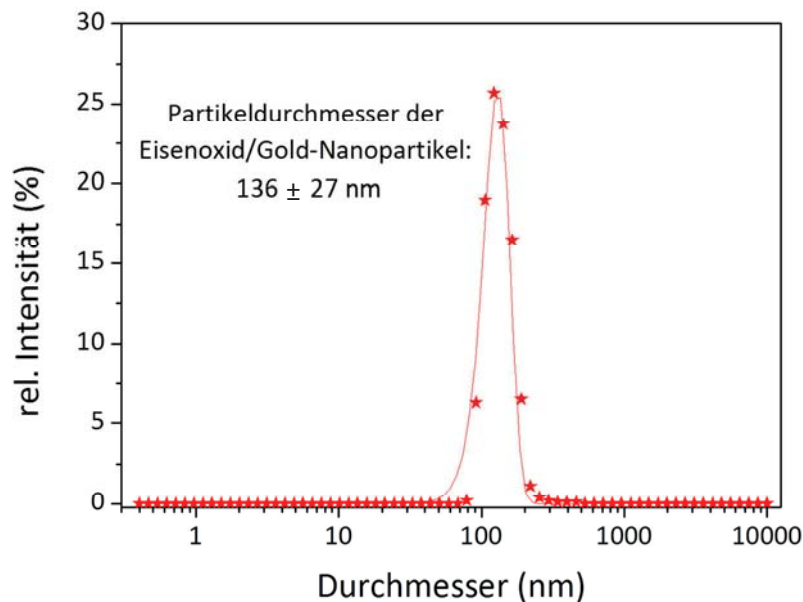


Abb. 17: Partikelgrößenverteilung der Eisenoxid/Gold-Nanopartikel; mit Hilfe der Laserbeugung wurde eine mittlere Partikelgröße von 136 ± 27 nm ermittelt.

2.3.2 Weiterführende Charakterisierung der Eisenoxid-Kerne

Um die magnetische Komponente der Trägerpartikel noch genauer einordnen zu können wurden weitere Untersuchungen der Eisenoxid-Kerne vorgenommen. In Abb. 18 ist die Magnetisierungskurve der Eisenoxid Nanopartikel dargestellt. Die Hysteresekurve wurde mit Hilfe eines Alternating-Gradient-Magnetometer (AGM) (Fa. Princeton Measurements, New York, USA) ermittelt und ist gemittelt aus dreimaliger Messung drei verschiedener Proben. Die Mittelwerte sind in Abb. 18 als blaue Kurve dargestellt. Der rote Vertrauensbereich beschreibt die Standardabweichung der verschiedenen Messungen. Im Bereich der Sättigungsmagnetisierung ist die größte Schwankung der Messwerte zu sehen. Unter den gewählten Synthesebedingungen konnte eine spezifische Sättigungsmagnetisierung von $43,1 \text{ A} \cdot \text{m}^2/\text{kg}$ für die verwendeten Eisenoxidkerne erreicht werden.

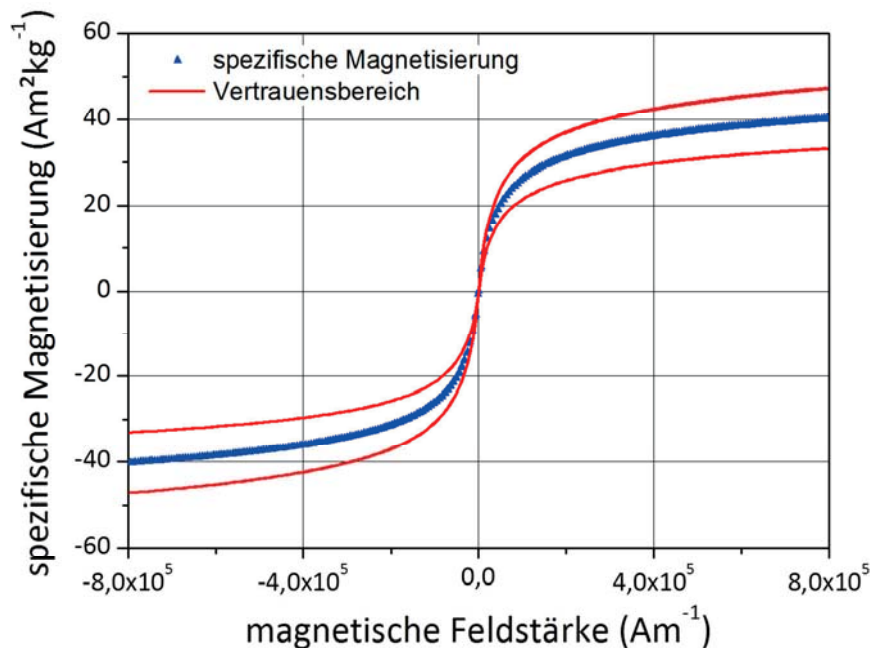


Abb. 18: Hysteresekurve der magnetischen Eisenoxidkerne. In blau ist die gemittelte Kurve aus dreimaliger Messung drei verschiedener Proben zu sehen. Im Mittel wird eine Sättigungsmagnetisierung von $43,1 \text{ A} \cdot \text{m}^2/\text{kg}$ erreicht. In rot ist die Standardabweichung aus den Messungen eingezeichnet und wird hier als Vertrauensbereich bezeichnet.

Die theoretische Sättigungsmagnetisierung für hochkristallines Magnetit bei Raumtemperatur beträgt $92 \text{ A} \cdot \text{m}^2/\text{kg}$.^[79,80] Die Tatsache, dass das synthetisierte Eisenoxid diesen Literaturwert nicht erreicht, ist zum einen den sehr kleinen Partikeldurchmessern zuzuschreiben. So werden Sättigungsmagnetisierungen von $59 \text{ A} \cdot \text{m}^2/\text{kg}$ (7 nm Durchmesser, 4 °K) und $50 \text{ A} \cdot \text{m}^2/\text{kg}$ (5,5 nm Durchmesser, 4 °K) für reines nanoskaliges Magnetit berichtet.^[80] Zum anderen spielt die Bildung von Nebenprodukten wie paramagnetische Eisenoxidhydroxid-

Verbindungen und Maghemit während der Synthese und Lagerung eine Rolle bei der Abnahme der Sättigungsmagnetisierung. Die in Abb. 18 dargestellte Hysterese zeigt kaum Remanenz und auch der Vertrauensbereich ist an dieser Stelle sehr schmal. Die Remanenz wurde zu $0,14 \text{ A} \cdot \text{m}^2/\text{kg}$ bestimmt, was lediglich $0,3 \%$ der Sättigungsmagnetisierung entspricht. Es kann also hier von einem rein superparamagnetischen Material ausgegangen werden, so dass die Bildung von Eisenoxidhydroxid-Verbindungen vernachlässigbar ist. Es könnte sich demnach um eine Mischung aus verschiedenen Eisenoxiden wie Magnetit und Maghemit handeln, was auch durch nachfolgende Untersuchungen mittels Mößbauer-spektroskopie bekräftigt werden konnte (siehe Abb. 19). Die Mößbauer-Spektren wurden von Herrn Heming Huang (Lehrstuhl für Biophysik und medizinische Physik Prof. Schünemann, TU Kaiserslautern) aufgenommen und ausgewertet. Die Messungen wurden an äquivalent hergestellten magnetischen Partikeln durchgeführt (Co-Präzipitation in Lauge) und veröffentlicht.^[81] Um die Darstellung der Spektren zu verstehen und interpretieren zu können muss zunächst die Kristallstruktur von Magnetit und Maghemit betrachtet werden. Beide Eisenoxide kristallisieren im inversen Spinell. Diese Struktur besteht aus zwei verschiedenen Untergittern, in denen sich die Sauerstoff-Atome einmal tetrahedral (A) und einem oktahedral (B) um das Eisen-Ion anordnen. Für Magnetit befinden sich auf der (A)-Position ausschließlich Fe^{3+} -Ionen. Auf der (B)-Position findet man hingegen zu gleichen Teilen Fe^{3+} und Fe^{2+} -Ionen.^[82] Für Maghemit hingegen findet man ausschließlich Fe^{3+} -Ionen in den Untergittern, so dass anhand der Oxidationsstufen der Eisen-Ionen auf die Zusammensetzung des Eisenoxid-Partikels geschlossen werden kann.

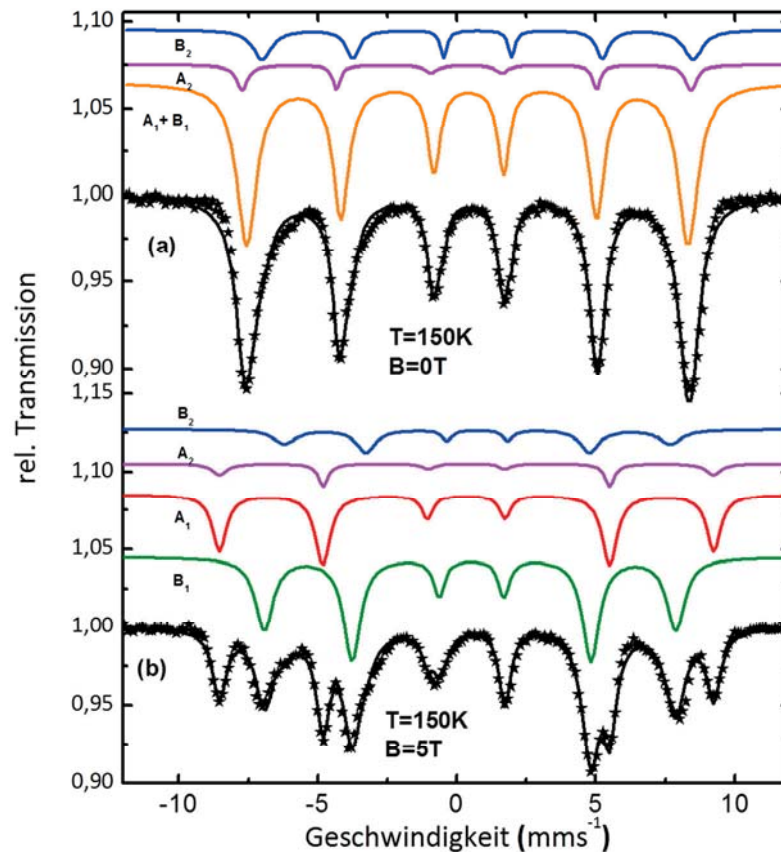


Abb. 19: Mößbauer-Spektren der magnetischen Kerne:^[81] Die schwarzen Sterne sind die Messpunkte und in Schwarz der Fit des Spektrums. In Farbe sind die verschiedenen Komponenten des Spektrums dargestellt, die den Oxidationsstufen des Eisens und den verschiedenen Gitterplätze zugeordnet werden können. In a) ist die Messung ohne äußeres Magnetfeld bei 150 °K und in b) das Spektrum bei 5 T äußerem Magnetfeld dargestellt.

Die Spektren der Eisenoxid-Nanopartikel wurden bei 150 °K aufgenommen. Um die Oxidationsstufen des Eisens zu identifizieren, wurden die Spektren einmal ohne und einmal mit äußerem Magnetfeld (5 T) gemessen. Die Mößbauer-Parameter, die die Informationen über die Eisenoxidationsstufen liefern, sind in Tab. 1 zusammengefasst. Das Verhältnis der Komponenten A und B von einem Drittel zu zwei Dritteln ist ein Hinweis auf die inverse Spinel-Struktur. Etwa 80 % des Spektrums werden von den Komponenten A_1 und B_1 dominiert, die typische Parameter für $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ zeigen. Die Komponente A_1 zeigt eine Isomeriewerschiebung für Fe^{3+} im Tetraeder-Gitter ($\delta = 0,35 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$), die Komponente B_1 für Fe^{3+} in oktaedrischer Koordination ($\delta = 0,51 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$).^[83] Die restlichen 20 % des Spektrums können Magnetit zugeordnet werden. Die Komponente A_2 zeigt die gleichen Parameter wie A_1 und entspricht somit der Fe^{3+} Ionen in tetraedrischer Anordnung. B_2 besitzt einen Isomeriewerschiebung der für $\text{Fe}^{2,5+}$ charakteristisch ist. Da die Elektronen in der Lage sind, zwischen den oktaedrischen Gitterplätzen der Fe^{2+} und Fe^{3+} Ionen zu springen, erhält man für dieses Untergitter eine nicht ganzzahlige Oxidationszahl des Eisens.^[84]

Tab. 1: Parameter der Mößbauer-Spektren.^[81]

B (T)	Komponente	rel. Fläche (%)	δ (mm/s)	B_{Hf} (T)
0	A_1+B_1	80,2	0,41	49,2
	A_2	6,6	0,35	50
	B_2	13,2	0,75	48
5	A_1	30,6	0,35	55,1
	B_1	51,1	0,51	45,9
	A_2	6,1	0,35	55
	B_2	12,2	0,75	43

Zusammenfassend lässt sich also über die Eisenoxidkerne sagen, dass es sich um eine Mischphase aus Magnetit (~ 20 %, Spektren mit Index 2) und Maghemit (~ 80 %, Spektren mit Index 1) handelt. Die Partikel zeigen einen superparamagnetischen Charakter (geringe bis keine Remanenz) und sind mit der hier vorliegenden Sättigungsmagnetisierung von $43,1 \text{ A} \cdot \text{m}^2/\text{kg}$ gut magnetisch separierbar. Mit diesen Eigenschaften kann hier zu Gunsten der Einfachheit der Synthese auf ein reineres Magnetit verzichtet und diese Eisenoxid Nanopartikel als magnetische Kerne für alle im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Partikelsysteme eingesetzt werden.



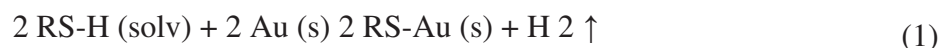


2.4 Immobilisierung von Cellulase auf Eisenoxid/Gold-Trägerpartikeln

Dieses Kapitel fasst Ergebnisse zur Immobilisierung der Nanopartikel zusammen. Die Immobilisierung durch Selbstorganisation mit Alkanthiolen war bereits Gegenstand früherer Arbeiten und ist mit der entsprechenden Literaturstelle markiert. Die Ergebnisse zu den Alkanthiolen sind wichtig für die spätere Immobilisierung der Cellulasen, da diese hier als Spacer für eine kovalente Bindung der Enzyme auf der Partikeloberfläche dienen. Neben der kovalenten Bindung der Enzyme auf Spacern wurde auch die selbstorganisierte Bindung der Enzyme direkt auf Goldoberflächen untersucht und alle Ergebnisse mit μ -skaligen Trägern verglichen.

2.4.1 Stand der Technik - Immobilisierung durch Selbstorganisation

Für die Funktionalisierung der in Kap. 2.3 charakterisierten Partikelsysteme wurden im Rahmen dieser Arbeit und früherer Arbeiten Alkanthiole genutzt, da die Präparation dieser Systeme sehr einfach ist und sehr stabile Self Assembly Monolagen (SAM) bildet. Dies kann durch einfache Inkubation der Partikel in einer Alkanthiollösung erfolgen (siehe Anhang A 3.). Da es Alkanthiole mit verschiedenen funktionellen Kopfgruppen gibt, eignen sie sich, um Ankergruppen für die Proteinimmobilisierung aufzubringen. Außerdem besitzen Proteine ebenfalls Thiolgruppen, so dass diese ersten Untersuchungen aus früheren Arbeiten Aufschluss über eine mögliche direkte Immobilisierung der Enzyme auf der Partikeloberfläche geben.^[75] Die Ankopplung der Thiole auf der Goldoberfläche erfolgt über die SH-Gruppe, welche eine sehr hohe Affinität zu Gold besitzt. Die Bildung der Monolagen durch Nonanthiol kann in zwei Schritte eingeteilt werden. Der erste Schritt ist die Adsorption auf der Oberfläche, welche innerhalb von wenigen Sekunden bis Minuten erfolgt. Der zweite Schritt ist die Selbstorganisation der Thiole. Diese Ordnung kann bis zu einigen Stunden dauern. Die Thiole bilden auf Goldoberflächen unter Abspaltung von Wasserstoff eine leicht polare Thiolat-Gold-Bindung:^[85]



Die Bildung der Monolage folgt in erster Näherung dem Langmuir-Gesetz. Der genaue Bildungsmechanismus wurde bereits mehrfach zum Beispiel mit Hilfe von NMR-Spektroskopie, Rasterkraftmikroskopie und SPR-Spektrometern,^[85,86] bestimmt und ist in Abb. 20 schematisch zusammengefasst. Zunächst physisorbieren die Thiole auf der Goldoberfläche. Dann spaltet sich die SH-Gruppe und es kommt unter Ausbildung der

Thiolat-Bindung zur Chemisorption (Abb. 20 A). Bereits nach kürzester Zeit sind mehr als 90 % der Oberfläche bedeckt. Es hat sich jedoch noch keine geordnete Schicht gebildet und die Moleküle liegen alle flach auf der Oberfläche auf (Abb. 20 B).

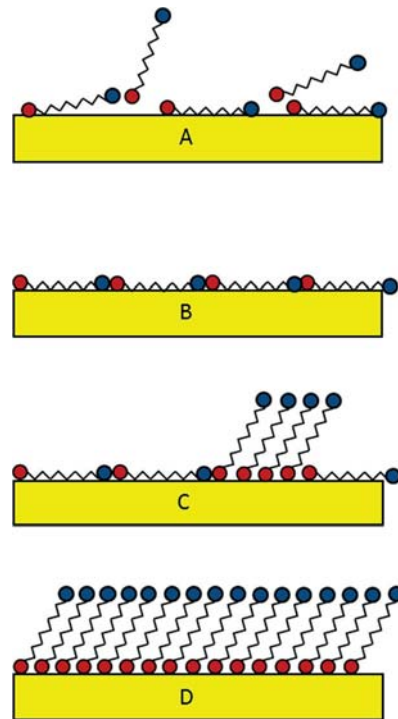


Abb. 20: Schematische Darstellung des Bildungsmechanismus von Self-Assembly-Monolagen: (A) Mobile Phase: Physisorption und Chemisorption der Thiole, Alkylketten sind frei drehbar. (B) Laying-down Phase: ~ 90 % der Oberfläche sind bedeckt. (C) Koexistenz von laying-down und standing-up Phasen: V.-d.-W.-Wechselwirkungen unterstützen das Aufrichten der Alkyl-Ketten. (D) Komplette Monolage.^[86]

An den Adsorptionsschritt schließt sich die Selbstorganisation an. Durch die geringen Abstände zwischen den Molekülen reichen die Van-der-Waals-Kräfte zwischen den Molekülen aus, um ein Aufrichten und Ordnen der Alkyl-Ketten zu bewirken (Abb. 20 C). Nach und nach verdichtet sich die Monolage und es werden noch weitere Thiole auf der Oberfläche gebunden, bis sich eine gleichmäßige Oberfläche gebildet hat und der Self-Assembly-Effekt in einem Energieminimum endet (Abb. 20 D). Die Alkyl-Ketten orientieren sich nicht senkrecht zur Oberfläche sondern sind um einen molekülabhängigen Winkel zur Oberflächennormalen geneigt. Der Self-Assembly-Prozess wird durch Kontaminationen auf der Gold-Oberfläche verlangsamt. Im Falle des verwendeten Kolloides könnten die stabilisierenden Citrate auf der Oberfläche die Funktionalisierung stören. Da jedoch die Affinität der Thiole zu Gold sehr hoch ist, werden die Citrate von der Oberfläche verdrängt. Dieser Effekt wurde mit Hilfe der Raman-Spektroskopie beobachtet (siehe Abb. 22). Die

veränderte Umgebung der Core/Shell-Partikel durch die Funktionalisierung mit den Alkanthiolen sollte sich außerdem wie bereits in Kap. 2.2.5 diskutiert in einer Verschiebung der Plasmonresonanzfrequenz widerspiegeln. Die Abb. 21 zeigt ein Spektrum der Citrat-stabilisierten Partikel vor und nach der Funktionalisierung (a) Goldkolloid b) magnetische Goldpartikel). Es ist eine Verschiebung des Absorptionsmaximums zu größeren Wellenlängen und eine Verbreiterung der Absorptionsbande zu sehen. Das Absorptionsmaximum für das Goldkolloid verschiebt sich von 523 nm nach 535 nm, die Bandenbreite nimmt von 53 nm auf 58 nm zu. Das Absorptionsmaximum für die Eisenoxid/Gold-Partikel hingegen verschiebt sich von 559 nm auf 584 nm und die Bandenbreite vergrößert sich von 84 nm auf 142 nm. Es kann also von einer erfolgreichen Funktionalisierung beider Partikelsysteme ausgegangen werden.

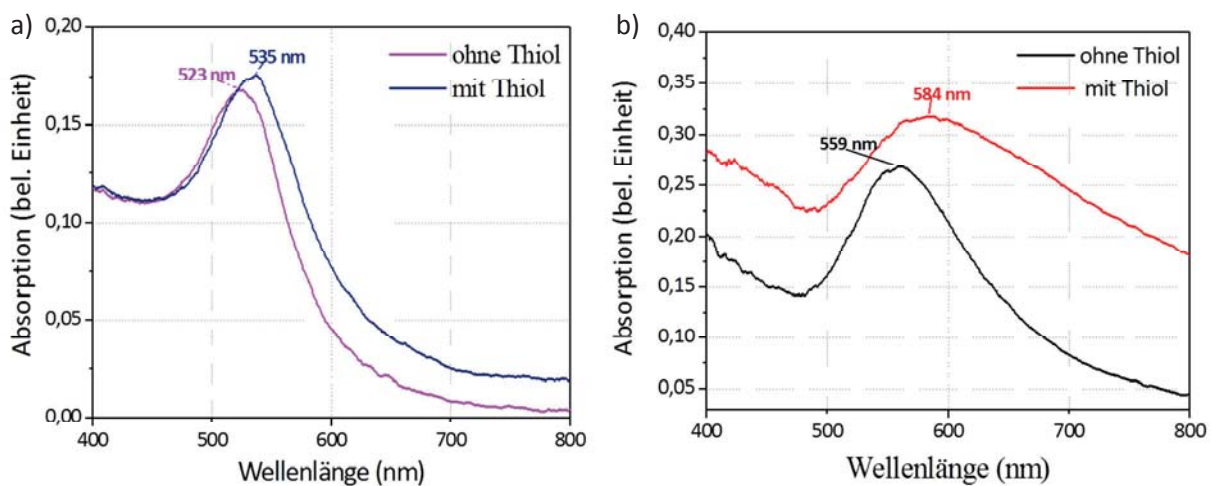


Abb. 21: UV/Vis nach Immobilisierung mit Thiol: a) zeigt die Verschiebung der Resonanzfrequenz nach der Immobilisierung des Goldkolloides; b) zeigt die synthetisierten magnetischen Goldpartikel.^[75]

Zur weiteren Charakterisierung der Oberfläche wurden wie bereits erwähnt Raman-Spektren aufgenommen. Hierbei werden mit Hilfe von Lasern (488 nm, 532 nm und 785 nm) Molekülschwingungen angeregt, die ein molekülspezifisches Spektrum liefern. Sind ramanaktive Moleküle auf der Oberfläche von Edelmetallkolloiden koordiniert, kommt es zu einer Verstärkung des Raman-Signals und es können bereits geringe Molekülkonzentrationen detektiert werden. Diese Form der Ramanspektroskopie wird auch als SERS bezeichnet und vereint die strukturellen Informationen der Raman-Spektroskopie mit einem sensitiven Detektionslimit, was die Raman-Spektroskopie von Einzelmolekülen ermöglichen kann.^[87] Der Mechanismus der oberflächenverstärkten Raman-Streuung ist noch nicht komplett verstanden, jedoch ist die allgemein geltende Meinung, dass mehrere Effekte zu dem verstärkten Raman-Signal führen. Es wird auch von der elektromagnetischen

(schwingungsanregendes EM-Feld ist Summe aus Laser und Plasmonschwingung) und der chemischen Verstärkung (Ladungstransferprozesse durch direkten Kontakt zwischen Oberfläche und Molekül) gesprochen.^[88] Um einen SERS-Effekt zu erhalten müssen die Partikel zu Plasmonschwingungen angeregt werden. Hierzu werden die Partikel teilagglomeriert und anschließend mit einem Laser der Wellenlänge 785 nm untersucht. In Abb. 22 a) ist das Spektrum von Citrationen zu sehen, die auf der Partikeloberfläche koordiniert sind. Im Spektrum b) wurde Citrat durch EDTA für die Stabilisierung der Partikel ersetzt und das Spektrum hat sich dem entsprechend verändert.

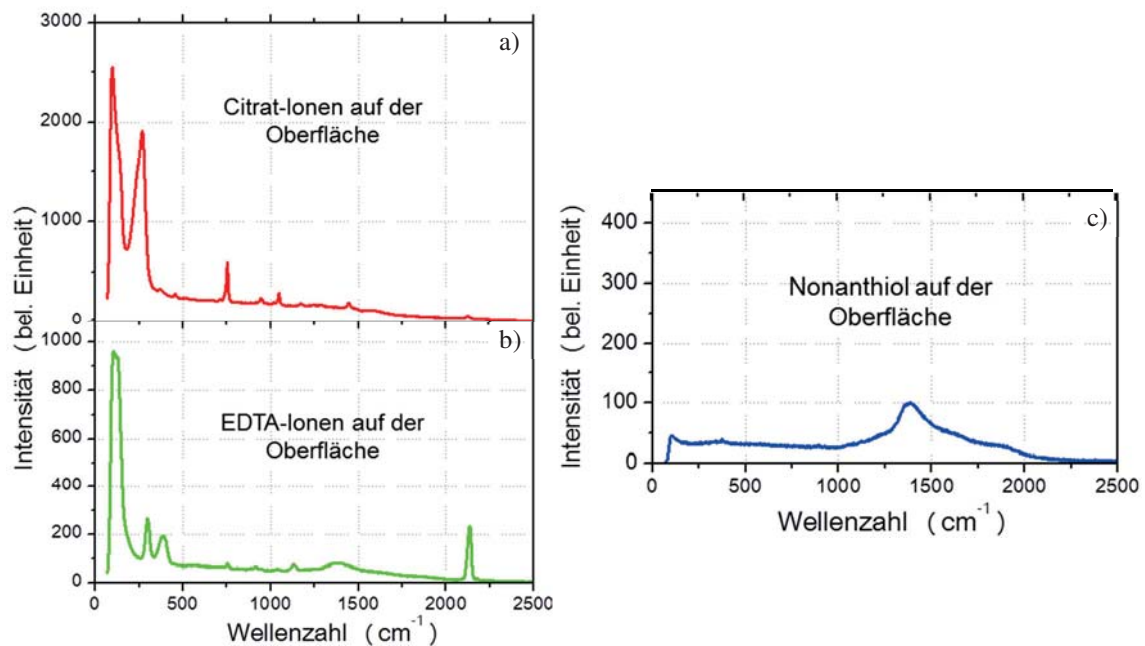


Abb. 22: Raman-Spektren vor und nach Immobilisierung mit Alkanthiolen.^[75] a) zeigt das Spektrum von Citrat welches auf der Goldoberfläche koordiniert ist, b) zeigt das Spektrum für EDTA. Nach der Funktionalisierung mit Nonanthiol verschwinden alle Ramanbanden des Spektrums, da Citrat bzw. EDTA von der Partikeloberfläche verdrängt wird.

Nach der Immobilisierung der Partikel mit Nonanthiol verschwinden im Raman-Spektrum die Banden der Citrationen aus dem Spektrum a), da das Nonanthiol die Citrationen von der Oberfläche verdrängt. Zurück bleibt nur die schwache Bande des Spektrums c), welche auf den Objektträger zurückzuführen ist (siehe Abb. 22 c). Die selbstorganisierte Funktionalisierung der Oberfläche mit Hilfe von Alkanthiolen ist somit möglich. Die Alkanthiole dienen in dem Modellsystem der Cellulosehydrolyse als Spacer und Ankergruppe für die Funktionalisierung mit Cellulase. Hierbei soll unterschieden werden, ob das Einbringen dieser „Abstandshalter“ zwischen Nanopartikel und Enzyme eine Aktivitätssteigerung nach sich zieht oder ob die selbstorganisierte Bindung der Enzyme ohne Spacer, welche im folgenden Kapitel diskutiert wird, auf der Partikeloberfläche vergleichbare Aktivitäten zeigt.

2.4.2 Selbstorganisierte Bindung von Enzymen

Da sich in Proteinen wie auch bei den zuvor betrachteten Alkanthiolen auch freie Thiolgruppen befinden ist eine direkte Immobilisierung der Enzyme auf einer Goldoberfläche ebenfalls denkbar. Diese wurde im Rahmen der Doktorarbeit anhand eines reinen Goldkolloides untersucht. Dem Goldkolloid wurde einfach eine Enzymlösung zugegeben und das UV/Vis Spektrum der Lösung beobachtet. In Abb. 23 ist das Absorptionsspektrum des reinen Goldkolloides mit einer Resonanzfrequenz von 523 nm in magenta dargestellt. In blau ist das Spektrum des Goldkolloides nach 10 min Inkubation mit Cellulase dargestellt. Genau wie in Abb. 21 a) ist ein Shift der Plasmonresonanzfrequenz zu größeren Wellenlängen (529 nm) und eine Verbreiterung der Absorptionsbande auf 55 nm zu sehen.

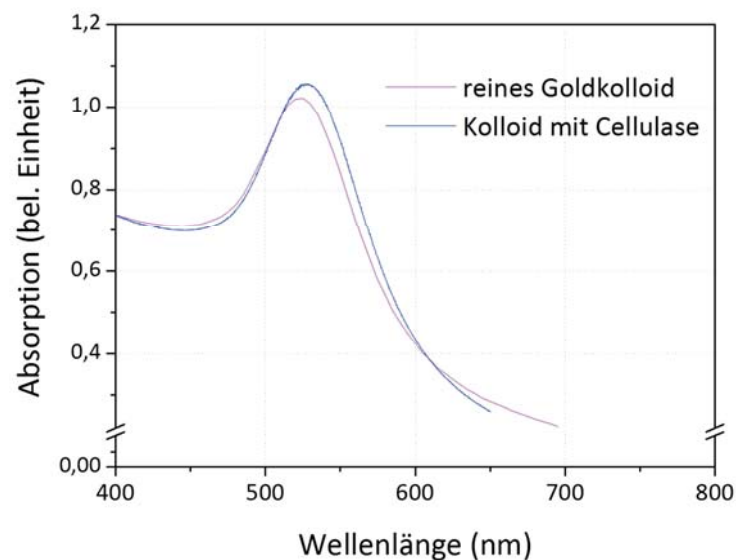


Abb. 23: UV/Vis-Spektren vor (magenta) und nach (blau) der direkten Immobilisierung von Cellulase auf einem eigens synthetisiertem reinen Goldkolloid. Genau wie bei der selbstorganisierten Immobilisierung der Alkanthiole in Abb. 21 a) verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Plasmonresonanz durch die Immobilisierung.

Nach einer Inkubationszeit von 20 h wurde erneut ein UV/Vis-Spektrum aufgenommen, was sich allerdings nicht von dem Spektrum nach 10 min unterscheidet. Die Sättigung ist somit bereits in den ersten Minuten erreicht. Aus den Untersuchungen zu den SAM mit Alkanthiolen ist bekannt, dass die Adsorption sehr schnell stattfindet aufgrund der hohen Affinität der Thiole zum Gold. Der für Alkanthiole anschließende Schritt der Selbstorganisation und Bildung einer geordneten Schicht entfällt bei der Bindung der Enzyme auf der Partikeloberfläche, womit der zeitlimitierende Faktor nur die innerhalb von Minuten stattfindende Bindung der Thiole auf der Oberfläche bleibt. Der Shift der Resonanzfrequenz



ist somit ein Hinweis auf erfolgreiche Immobilisierung der Enzyme auf der Partikeloberfläche. Die Quantifizierung der gebundenen Cellulase wird im folgenden Kapitel 2.4.3 behandelt.

2.4.3 Quantifizierung der Immobilisierten Cellulase

Aufgrund der Goldoberfläche der Nanopartikel ist es möglich, Proteine direkt auf der Oberfläche zu binden. Die Enzymimmobilisierung wird dadurch erheblich erleichtert. Die Immobilisierung direkt auf der Partikeloberfläche wurde mit einem reinen Goldkolloid verglichen und die optimale Immobilisierungstemperatur herausgearbeitet. Um jedoch auch die Nanopartikel mit den μ -Partikeln vergleichen zu können und um eine Aussage über den Vorteil der kleinen Partikelgröße und die somit gewonnene Beweglichkeit der Enzym-Partikel-Komplexe treffen zu können, wurden die Au/Fe-Partikel mit Spacern versehen. Dadurch erhält die Nanopartikel-Oberfläche Carboxyl-Gruppen als Ankergruppen für die Immobilisierung, wie es auch bei den μ -Partikeln der Fall ist. Die Immobilisierung erfolgt dann mittels EDC/NHS-Methode, wie in Abb. 24 dargestellt und in Anhang A 3 beschrieben ist.

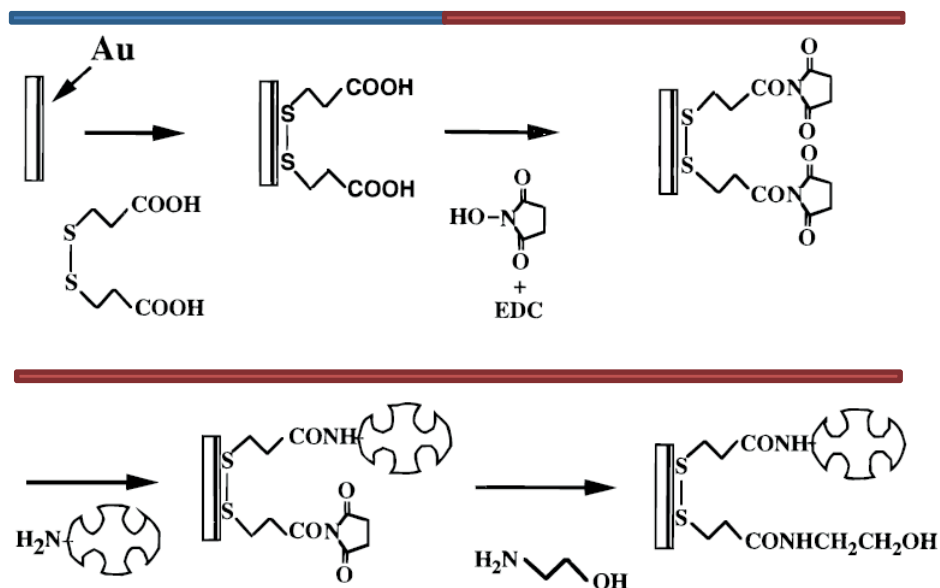


Abb. 24: Immobilisierung der Partikelsysteme mittels EDC/NHS-Methode: Der erste Schritt (blau markiert) wird für die Funktionalisierung (Spacer) der Gold-Nanopartikel benötigt. Die μ -Partikel sind bereits mit Carboxyl-Gruppen funktionalisiert und es entfällt der erste Schritt. Alle rot markierten Schritte werden sowohl für die μ -Partikel als auch für die Nanopartikel mit Spacern benötigt. Die Zugabe von NHS erhöht die Effizienz der Immobilisierung.^[89,90]

Die Menge an gebundener Cellulase wurde in beiden Fällen (direkte Bindung auf der Partikeloberfläche und Immobilisierungen über COOH-Gruppen auf der Partikeloberfläche) mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen ermittelt. Hierzu wurde die Proteinmenge im Überstand vor und nach der Immobilisierung der Enzyme bestimmt und aus der Differenz errechnet sich die Menge an gebundenem Enzym pro Gramm Partikel. Abb. 25 zeigt ein 3D-Fluoreszenzspektrum der verwendeten Cellulase.

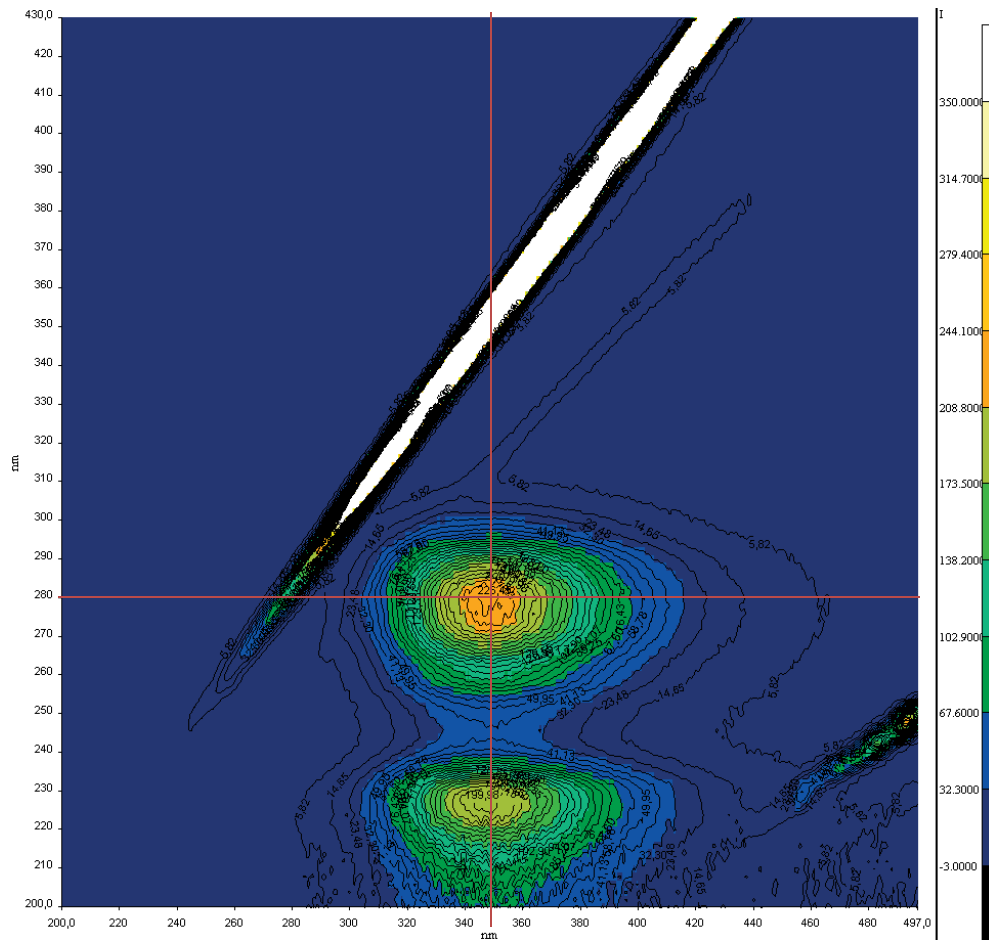


Abb. 25: 3D-Fluoreszenzspektrum der eingesetzten Cellulase. Dominiert wird das Spektrum von der Tryptophan-Fluoreszenz mit einer Adsorption von 280 nm und einer Emission bei 350 nm. Dieser für die Analytik verwendete Messpunkt ist in der Abbildung rot markiert.

Voraussetzung für die Fluoreszenz ist die Absorption von Licht. Proteine wie die hier verwendete Cellulase absorbieren und fluoreszieren im UV-Bereich. Die Absorption wird verursacht durch Peptidbindungen, aromatische Aminosäuren und Disulfidbrücken. Die Peptidbindung absorbiert sehr stark unterhalb von 230 nm; Disulfidbrücken zeigen eine schwache Absorption bei 250 nm und zwischen 250 und 320 nm ist das Absorptionsspektrum dominiert von Tyrosin und Tryptophan (Phenylalanin nur in geringem Maße).^[91] Die Fluoreszenz wird durch die Abgabe der absorbierten Strahlung der aromatischen Aminosäuren hervorgerufen. Diese wird durch die Tryptophan-Fluoreszenz dominiert, da die Quantenausbeute sowohl bei Absorption als auch bei Emission am größten ist. Phenylalanin zeigt dabei eine vernachlässigbare Fluoreszenz (~ 100-fach geringer als Tryptophan). Zusätzlich kommt es zur Fluoreszenzauslöschung, da Phenylalanin bei 280 nm emittiert und sowohl Tryptophan als auch Tyrosin bei dieser Wellenlänge adsorbieren. In Proteinen kommt es zudem oft zusätzlich zu strahlungsloser Energieübertragung von Tyrosin auf Tryptophan,

so dass auch das hier vorliegende Spektrum von der Fluoreszenz durch Tryptophan dominiert wird. Das Fluoreszenzmaximum der Tryptophan-Reste liegt bei 350 nm Emission und 280 nm Absorption, wie auch in Abb. 25 zu sehen. Die Fluoreszenzspektren der Überstände vor und nach der Immobilisierung zeigten keine Verschiebung des Absorptions- und Emissionsmaximums. Dies würde eintreten, sobald das Protein denaturiert und so das Tryptophan, welches eher im Proteininneren lokalisiert ist, nach außen gelangt. Das Protein wird demnach während des Adsorptionprozesses nicht durch Umgebungsbedingungen beschädigt und die Fluoreszenz kann zur Bestimmung der Konzentration der Proteine herangezogen werden. Die genau Vorgehensweise sowie eine beispielhafte Kalibration der Messung werden im Anhang B 4 dargestellt.

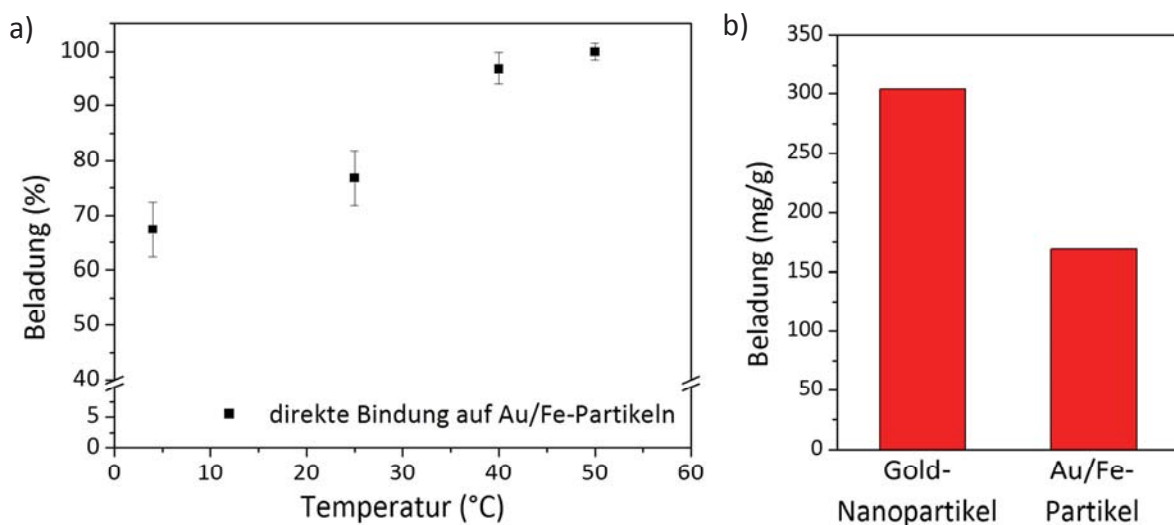


Abb. 26: Direkte Immobilisierung von Cellulase auf Gold-Oberflächen: a) temperaturabhängige Zunahme der Beladung auf den synthetisierten Au/Fe-Partikeln, welche ab 40 °C in Sättigung übergeht, b) Gegenüberstellung der maximalen Beladungen auf einem Goldkolloid und den Au/Fe-Partikeln, das Goldkolloid bindet doppelt so viel Protein auf der Oberfläche

Zunächst wurde die direkte Bindung der Cellulase auf einer Goldoberfläche, sprich Goldnanopartikeln und Au/Fe-Nanopartikeln untersucht. Abb. 26 a) zeigt die Temperaturabhängigkeit der selbstorganisierten Bindung des Proteins auf der Oberfläche der magnetischen Goldpartikel. Die gebundene Proteinmenge nimmt mit steigender Temperatur zu, bis sie ab 40 °C in Sättigung übergeht. Immobilisierungen mit Temperaturen > 50 °C wurden nicht durchgeführt, da laut Hersteller ab 60 °C die Cellulase denaturiert. Alle weiteren Funktionalisierungen wurden bei 40 °C durchgeführt.

Der Vergleich der maximalen Bindungskapazität des Goldkolloides mit dem magnetischen Au/Fe-Partikeln ist in Abb. 26 b) dargestellt. Die Gegenüberstellung zeigt, dass für Gold-Nanopartikel die Menge an gebundenem Enzym pro Gramm Partikel doppelt so groß ist

wie für die Au/Fe-Partikel, was auf eine größere Partikeloberfläche zurückzuführen ist. Theoretisch lässt sich die spezifische Partikeloberfläche des Goldkolloides unter Berücksichtigung des Partikelradius (10 nm) und der Dichte für Gold zu 15,2 m²/g berechnen. Für die synthetisierten Partikel ergibt sich unter der Annahme, dass die Partikel einen Goldanteil von 10 % besitzen und der Rest aus Eisenoxid besteht, eine Partikeloberfläche von 8,9 m²/g. Der Faktor der Oberflächenvergrößerung entspricht somit etwa der Beladungszunahme.

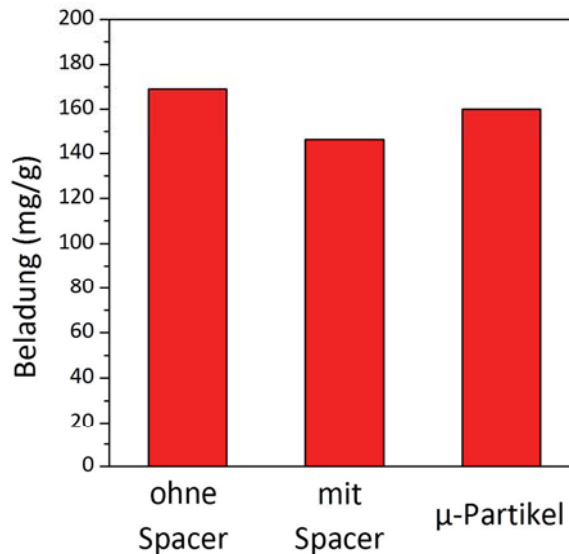


Abb. 27: Gegenüberstellung der Beladung der drei eingesetzten Enzym-Partikel-Komplexe. Trotz verschiedener Immobilisierungsmethoden zeigen alle etwa die gleiche maximale Beladung bei 40 °C. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus 3 Messwerten, der Fehler lag zwischen 1 und 4 mg/g und konnte somit nicht im Diagramm eingetragen werden.

Die Gegenüberstellung der maximalen Beladungen für direkte Bindung auf den Au/Fe-Partikeln (ohne Spacer), die Bindung mittels EDC/NHS-Methode auf den Au/Fe-Partikeln (mit Spacer) und auf den μ-Partikeln ist in Abb. 27 dargestellt. Durch Einführen der Spacer zwischen Protein und Partikeloberfläche nimmt die maximale Kapazität der Partikel leicht ab (etwa 14 %). Die Beladungen lassen sich hier nicht wirklich vergleichen, da durch die geänderte Immobilisierungsmethode die Beladung nicht länger allein durch die Oberfläche bestimmt wird sondern auch die Dichte an funktionellen Gruppen auf der Partikeloberfläche eine Rolle spielt. Gleiches gilt für den Vergleich der Au/Fe-Partikel mit den μ-Partikeln, die eine maximale Beladung von 160 ± 4 mg/g zeigten. Bei diesen Partikeln kommt noch hinzu, dass der Vergleich bezogen auf die Masse erfolgt. Prinzipiell besitzen Nanopartikel ein deutlich größeres Oberflächen-Volumen-Verhältnis als μ-Partikel, was demnach eine größere Beladung ermöglichen würde. Allerdings handelt es sich bei den hier verwendeten μ-Partikeln um PVA-Partikel, die eine geringere Dichte aufweisen und zumeist auch eine poröse Struktur

besitzen, die ihre Oberfläche vergrößern. So lässt sich lediglich zusammenfassen, dass die drei untersuchten Partikel-Enzym-Systeme eine maximale Beladung in der gleichen Größenordnung besitzen. Laut Herstellerangaben zu den μ -Partikeln und dem eingesetzten EDC/NHS-Immobilisierungsprotokoll,^[92] sollten Beladungen zwischen 5 und 20 mg/g erreichbar sein. Das Protokoll von Chemagen sieht bei der Immobilisierung eine Proteinkonzentration von 1 g/L vor. Bei diesen Konzentrationen wurde im Rahmen der hier vorgestellten Versuche das komplette Protein aus der Lösung auf den eingesetzten Partikeln gebunden, womit eine Aussage über die maximale Bindungskapazität und somit ein Vergleich der Träger nicht möglich wäre. Deshalb wurde hier für die Immobilisierung eine Konzentration von 10 g/L eingesetzt, was eine Steigerung der Beladung um den Faktor 10 bewirkt.

Der Vergleich mit der in Kap. 2.2.2 erwähnten Literatur zeigt, dass die maximale Beladung der Partikel vergleichbar ist mit der von Yan et al.^[47] untersuchten Physisorptionen auf Tonerde. Eine Physisorption auf Kohlenstoff-Nanotubes zeigte hingegen eine Beladung von 630 mg/g, was auf die große Oberfläche durch die poröse Struktur zurückzuführen ist. Bei den Beispielen der kovalenten Immobilisierung sind deutlich geringere Werte zu finden. So beschreiben Afsahi et al.^[58] für die Immobilisierung von Cellulase auf Silika mittels Glutaraldehyd Beladung bis zu 12,5 mg/g. Die hier verwendeten Partikel zeigten gesteigerte Kapazität um den Faktor 10. Daraus folgt, dass sowohl die magnetischen μ -Partikel der Firma Chemagen als auch die synthetisierten Eisenoxid/Gold-Nanopartikel hervorragende Eigenschaften für eine Immobilisierung zeigen. Die Chemagen-Partikel wurden in keinem der erwähnten Literaturstellen verwendet. Zu der Immobilisierung von Cellulase auf Chemagen-Partikel konnten keine Literaturstellen gefunden werden. In einem Abschlussbericht der DBU sind allerdings Untersuchungen zur Immobilisierung verschiedener Enzyme auf Chemagen-Partikel zusammengefasst.^[93] Hier gibt es Untersuchungen einmal zur Penicillinamidase mit Beladungen von 9,6 mg/g (EDC-Methode) und 55 mg/g (Glutaraldehyd) sowie Untersuchungen zu einer Lipase mit Beladungen von 230 mg/g (Glutaraldehyd) und 120 mg/g (EDC-Methode), welche auf den gleichen carboxylierten Partikeln wie unser Vergleichssystem (μ -Partikel) immobilisiert wurde. Die Beladung der hier verwendeten Cellulase und der beschriebenen Lipase liegen in der gleichen Größenordnung.



2.5 Modellsystem der enzymatischen Hydrolyse von Cellulose

2.5.1 Hydrolyse von Carboxymethylcellulose und fibröser Cellulose

Die in Kap. 2.4.3 hergestellten Enzym-Partikel-Komplexe wurden nun in einem Modellsystem eingesetzt. Zunächst wurde die Hydrolyse von Carboxymethylcellulose, einer in Wasser löslichen Cellulose durchgeführt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Enzymmenge so gewählt, dass alle Partikelsysteme das komplette Protein binden und so jeweils die gleiche Menge Enzym eingesetzt werden kann. Nach der Immobilisierung wurden die Partikel in mehreren Schritten gewaschen bis kein unspezifisch gebundenes Protein mehr eluiert und fluoreszenzspektroskopisch nachgewiesen werden konnte. Da die Carboxymethyl-cellulose sich komplett in Wasser löst und so keine Feststofffasern mehr in Lösung vorliegen, ist dieses Substrat für die Partikel leicht zugänglich. Dies erklärt die hohe Aktivität, die nach der Immobilisierung noch erhalten bleibt.

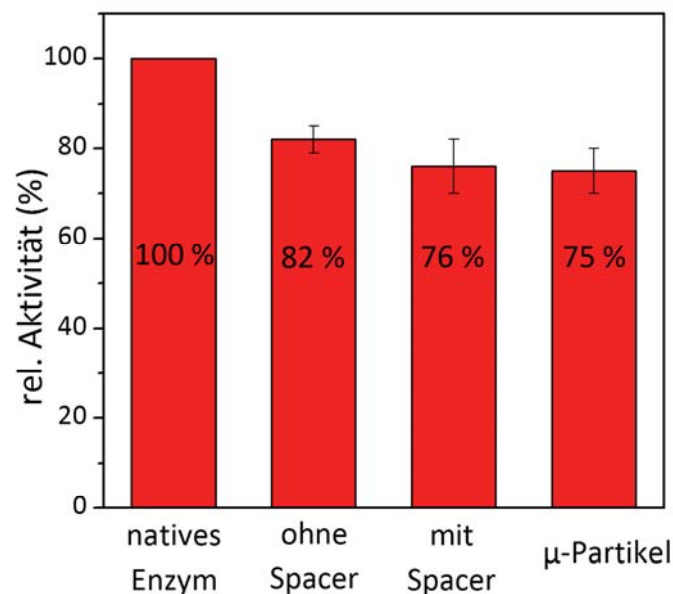


Abb. 28: Hydrolyse von Carboxymethylcellulose: Die vergleichende Gegenüberstellung der Partikelaktivitäten ist auf die Aktivität der nativen Cellulase normiert. Alle drei Partikelsysteme besitzen Aktivitäten von ≥ 75 %.

Mit 75 – 82 % der Aktivität nativer Enzyme entspricht dies der Aktivität wie sie von Yan et al.^[47] bei der Physisorption von Cellulase auf Tonerde beschrieben wurde, allerdings hier mit dem Vorteil der kovalenten Bindung und somit nur sehr geringem bis keinem Proteinbleaching. Für kovalente Partikesysteme sind in der Literatur deutlich geringere Aktivitäten beschrieben. Kitaoka et al.^[56] erreichen bei der Immobilisierung mittels EDC oder Glutaraldehyd-Methode lediglich 20 % Aktivität nativer Cellulase. Bei Afsahi^[58] und



Garcia^[59] hingegen wird von Aktivitäten zwischen 30 und 40 % nativer Cellulase berichtet. Bei allen Literaturstellen wurde ebenfalls Carboxymethylcellulose als Substrat eingesetzt. Beim Vergleich der Partikel mit und ohne Spacer in Abb. 28 ist die Aktivität nach direkter Bindung des Enzyms im Mittel um etwa 10 % höher. In Kap. 2.2.2 wurde die Erhöhung der Aktivität durch das Einbringen von Spacern diskutiert. Hier ist allerdings der gegenteilige Effekt zu beobachten. Grund hierfür sind die unterschiedlichen Immobilisierungsmethoden. Die direkte Bindung auf der Partikeloberfläche ist mit wenig konformativem Stress für das Protein verbunden. Das Protein kann in einer Pufferlösung gelöst werden, die z.B. den für das Protein optimalen pH-Wert besitzt. Bei pH 5, wie bei den hier vorgestellten Versuchen, ist die Affinität der Thiol-Gruppen derart hoch, dass die Bindung nicht beeinflusst wird. Bei Untersuchungen zur Bindungsgeschwindigkeit der Proteine auf Goldkolloid konnte nach 30 Minuten schon keinerlei Veränderung der Plasmonresonanz und somit keine Zunahme an gebundenem Protein mehr beobachtet werden. Wann genau die Sättigung erreicht ist, wurde allerdings nicht untersucht. In Kap. 2.4.1 wurde allerdings bereits erwähnt, dass der Bindungsschritt beim „Self Assembly“ im Bereich von Sekunden bis Minuten liegt. Bei der Bindung von Proteinen entfällt der Schritt des Aufrichtens und des Anordnens, so dass eine Sättigungsbeladung bereits nach einigen Minuten realistisch erscheint. Die Immobilisierungsdauer wurde dennoch auf 2 h festgelegt, um auch sicher den Gleichgewichtszustand erreicht zu haben und ähnliche Immobilisierungszeiten wie bei den anderen Partikelsystemen zu erreichen. Im Vergleich dazu ist der ständige Wechsel zwischen den Immobilisierungspuffern zur Bindung an den Carboxyl-Gruppen mit deutlich höherem konformativem Stress verbunden. Bei der Verwendung von carboxylierten Partikelsystemen ist von einer Zerstörung des aktiven Zentrums bzw. der funktionellen Gruppen nicht auszugehen. Die EDC/NHS-Methode könnte prinzipiell auch für die Immobilisierung von Enzymen auf Amino-Partikeln (Partikel mit NH_2 als funktioneller Gruppe auf der Oberfläche) eingesetzt werden. Dies würde speziell bei Cellulase wahrscheinlich zu einer höheren Aktivitätsabnahme führen, da die funktionellen Gruppen des aktiven Zentrums Carboxyl-Gruppen sind und so die Wahrscheinlichkeit der irreversiblen Inhibierung des aktiven Zentrums recht hoch ist. Unabhängig davon welche funktionellen Gruppen sich im aktiven Zentrum befinden, sind in Bezug auf die relative Häufigkeit der in der Proteinprimärstruktur vorkommenden Aminosäuren immer sehr viel mehr Carboxyl- oder Aminogruppen zu finden als Aminosäuren mit Thiolgruppen (siehe Tab. 2). Das Protein kann also an mehreren Stellen mit der Partikeloberfläche interagieren und wird so auch konformativem Stress ausgesetzt und verliert deshalb im Vergleich zu einer Immobilisierung über die Thiolgruppen an Aktivität.



Tab. 2: Mittlere relative Häufigkeit der in Proteinen vorkommenden Aminosäuren, **blau** markiert sind die Aminosäuren mit Thiolgruppen **rot** markiert mit Aminogruppen und **grün** mit Carboxyl-Gruppen:^[277]

Aminosäure	Buchstabencode	Polarität der Seitenkette	Rel. Häufigkeit [%]
Alanin	Ala	unpolar	9,0
Arginin	Arg	positiv	4,7
Asparagin	Asn	polar	4,4
Asparaginsäure	Asp	negativ	5,5
Cystein	Cys	polar	2,8
Glutamin	Gln	polar	3,9
Glutaminsäure	Glu	negativ	6,2
Glycin	Gly	unpolar	7,5
Histidin	His	positiv	2,1
Isoleucin	Ile	unpolar	4,6
Leucin	Leu	unpolar	7,5
Lysin	Lys	positiv	7,0
Methionin	Met	unpolar	1,7
Phenylalanin	Phe	unpolar	3,5
Prolin	Pro	unpolar	4,6
Serin	Ser	polar	7,1
Threonin	Thr	polar	6,0
Tryptophan	Trp	unpolar	1,1
Tyrosin	Tyr	polar	3,5
Valin	Val	unpolar	6,9

Für die Partikelsysteme mit Spacer und μ -Partikel, die auf der gleichen Immobilisierungsmethode beruhen, ist für Carboxymethylcellulose kein Unterschied in den Aktivitäten zu sehen. Dies liegt an dem leicht zugänglichen Substrat. Werden die Partikel jedoch bei der Hydrolyse eines schwer zugänglichen Systems eingesetzt wie zum Beispiel der fibrösen Cellulose, kann eine Steigerung der Aktivität für die Nanopartikel um etwa 35 % im Vergleich zu den μ -Partikeln beobachtet werden. Dieser Effekt ist wohl auf die geringeren Partikeldurchmesser zurückzuführen, so dass hier tatsächlich von einem Einfluss der Trägermorphologie bzw. der Beweglichkeit des Enzym-Träger-Komplexes auszugehen ist. Im Vergleich zum nativen Enzym reduziert sich die Aktivität allerdings dennoch sehr stark (siehe Abb. 29).

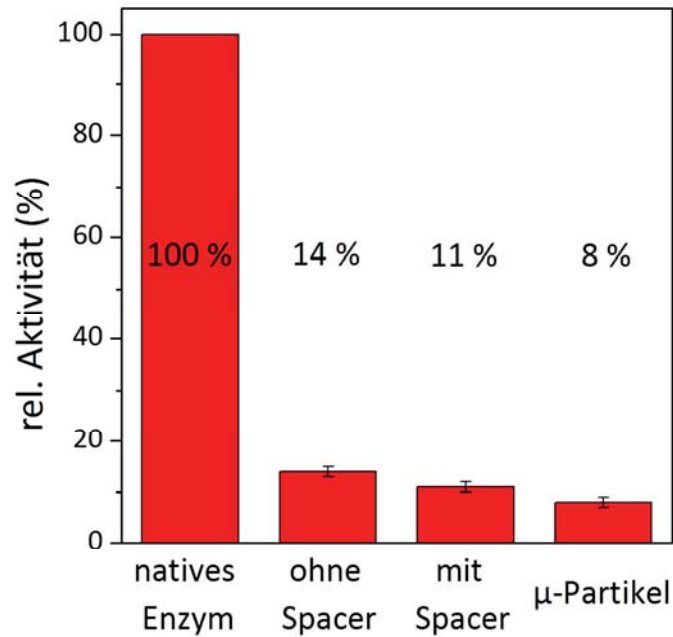


Abb. 29: Hydrolyse von fibröser Cellulose: Die Partikelaktivitäten sind deutlich niedriger als bei Carboxymethylcellulose. Die Aktivität der Nanopartikel ist dabei allerdings höher als für μ -Partikel.

Mit der Immobilisierung auf Nanopartikeln konnte also nicht wie bei Gole et al.^[55] beschrieben die Aktivität des nativen Enzyms komplett erhalten werden. Alle Hydrolysen wurden in einem 2 ml Eppendorfgefäß im Überkopfschüttler durchgeführt. Durch den hohen Feststoffanteil beim Einsatz von fibröser Cellulose könnte die Durchmischung des Reaktionsansatzes gestört sein. Versuche in größeren Ansätzen bzw. Reaktoren gewährleisten eine bessere Durchmischung und könnten so auch eine weitere Steigerung der Aktivität erzielen.

Ebenfalls nicht untersucht wurde, ob für die immobilisierten Cellulasen auch höhere Reaktionstemperaturen möglich wären, da Enzyme durch Immobilisierung oftmals auch in ihrer Temperaturtoleranz stabilisiert werden. Hinweise darauf, dass dies eventuell auch für das vorliegende System der Fall ist, konnten bei folgenden Versuchen der Hydrolyse in mehreren Zyklen gefunden werden.

2.5.2 Hydrolyse in mehreren Zyklen

Aufgrund der erhöhten Kosten durch die Partikelsysteme müssen, um tatsächlich wirtschaftlich sein zu können, die verwendeten Partikelsysteme über einen längeren Zeitraum stabil und für mehrere Hydrolysen einsetzbar sein. Jeder Hydrolyseversuch wurde bei 50 °C für 24 h durchgeführt und anschließend die im Überstand befindliche Menge an gebildeter Glucose bestimmt. Die Au/Fe-Partikel wurden für jede folgende Hydrolyse vom Überstand befreit, gewaschen und erneut eingesetzt; die Ansätze der nativen Cellulase wurden für jede Hydrolyse neu angesetzt. Die native Cellulase wurde einer Stammlösung entnommen, die bei 50 °C gelagert wurde, um die Stabilität des nativen Enzyms bewerten zu können. In Abb. 30 ist der Verlauf der Aktivitäten in mehreren Hydrolysezyklen dargestellt. Jede Hydrolyse reagierte 24 h bevor die Konzentration entstandener Glucose bestimmt wurde. Die Aktivität ist normiert auf die höchste Aktivität der nativen Cellulase. Die Aktivität der nativen Cellulase nimmt wie zu erwarten mit der Dauer der Lagerung bei 50 °C kontinuierlich ab und fällt zuletzt unter den absoluten Wert der Partikelaktivität.

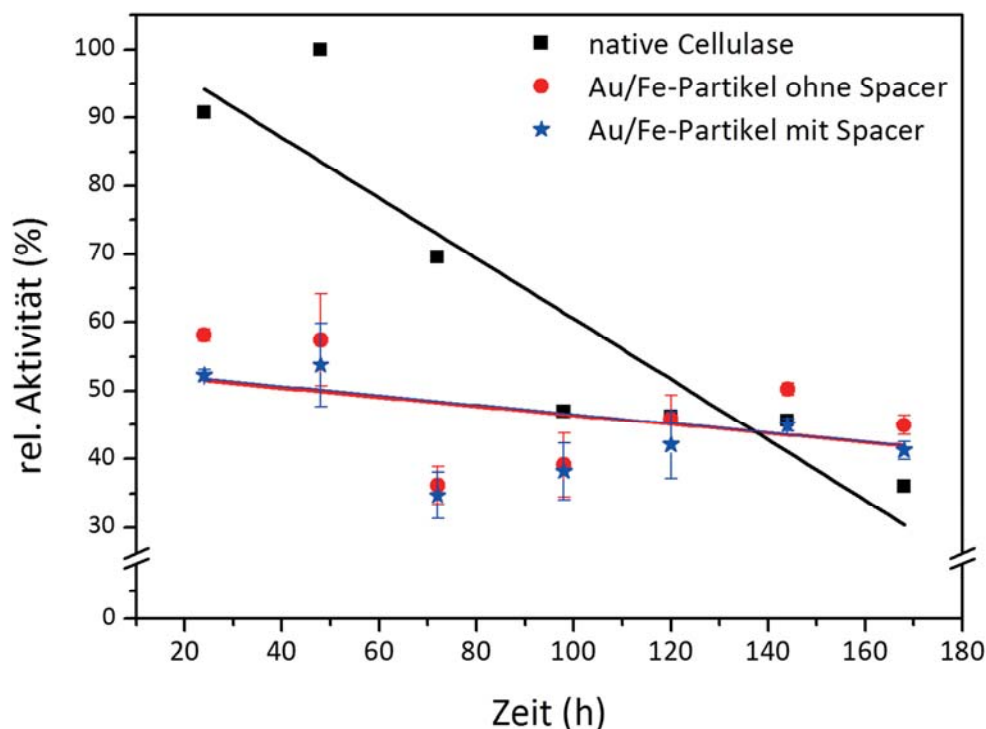


Abb. 30: Hydrolyse in mehreren Zyklen. Jeder Hydrolysezyklus dauerte 24 h; es wird der Verlauf der Aktivitäten von nativer Cellulase (schwarz), den Au/Fe-Partikeln mit (blau) und ohne Spacer (rot) betrachtet.

Die Abnahme der Enzymaktivität ist etwa siebenmal so schnell wie bei den Partikelsystemen. Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass ein wiederholter Einsatz der Partikel in der Hydrolyse ohne große Aktivitätsverluste möglich ist und eine deutliche Stabilisierung der

immobilisierten Enzyme vorliegt. Die Aktivität der Partikelsysteme mit und ohne Spacer fällt nach 7 Zyklen auf 77 % bzw. 78 % der Ausgangsaktivität. Das native Enzym besitzt über denselben Zeitraum betrachtet lediglich noch 33 % der Ausgangsaktivität. In Tab. 3 sind neben den Versuchsergebnissen noch in der Literatur veröffentlichte Angaben zur Restaktivität von Immobilisierter Cellulase nach mehreren Zyklen zusammengefasst.

Tab. 3: Gegenüberstellung der Partikelrestaktivitäten nach mehrern Zyklen verschiedener Literaturstellen und der Versuchsergebnisse.

Restaktivität (%)	Zyklen	Immobilisierungsart	Literatur
70	5	Physisorption	Yan ^[47]
90	3	Kovalente Bindung	Kiatoka ^[56]
40	4	Kovalente Bindung	Liao ^[57]
50	6	Kovalente Bindung	Garcia ^[59]
77	7	Au/Fe direkte Bindung	diese Arbeit
78	7	Au/Fe kovalente Bindung (EDC)	diese Arbeit

Die in der Literatur beschriebenen Aktivitäten zeigen meist größere Abbauraten als die hier eingesetzten Au/Fe-Partikelsysteme, allerdings ohne den Vorteil der möglichen magnetischen Abtrennung und Wiederverwertung. Es sind bei denen in der Literatur beschriebenen Verfahren aufwendige Filtrationsmethoden notwendig, die eine Trennung der Enzym-Partikel-Komplexe von anderen Feststoffen nur schwer ermöglichen. Im Folgenden sollten noch weitere Hydrolysezyklen gemacht werden um zu sehen, ob sich das System nicht noch weiter auf einen Wert einpendelt, denn in Abb. 30 sinkt die Aktivität der Partikelsysteme zunächst stärker, um sich dann zu erholen und sogar noch einmal leicht anzusteigen. Ein Upscaling der Versuche sollte auch das Schwanken der Messwerte besser kompensieren und somit aussagekräftigere Ergebnisse liefern können. Dennoch konnte auch mit den hier vorgestellten Versuchen im 2 ml Maßstab gezeigt werden, dass durch die Immobilisierung der Cellulase eine Stabilisierung des Enzyms erreicht werden konnte. Die magnetische Abtrennung ist dabei eine schnelle und technisch einfache Methode um die Partikel abzutrennen, zu waschen und in der nächsten Hydrolyse einzusetzen.



2.6 Zusammenfassung

Die hier vorgestellten Versuchsergebnisse zeigen eine erfolgreiche Immobilisierung der Cellulase auf eigens hergestellten Nanopartikeln. Die Nanopartikel besitzen einen superparamagnetischen Eisenoxidkern, der nicht wie zunächst angenommen ausschließlich aus Magnetit besteht, sondern vielmehr eine Mischphase aus Maghemit und Magnetit darstellt, wie es anhand von Mößbauerspektren und Magnetisierungskurven nachgewiesen werden konnte. Die hohe spezifische Sättigungsmagnetisierung von $43,1 \text{ A} \cdot \text{m}^2/\text{kg}$ der Nanopartikel ermöglicht eine schnelle Abtrennung der Partikel von der flüssigen Phase. Eine Goldschale um den magnetischen Eisenoxidkern dient hierbei zum einen dem Schutz der magnetischen Komponente vor Oxidation oder Zersetzung und zum anderen der direkten Immobilisierung auf der Partikeloberfläche. Als erste Immobilisierung wurde bereits in früheren Arbeiten die Eigenschaft der Selbstorganisation von Alkanthiolen auf Goldoberflächen ausgenutzt. Die SH-Gruppen der Thiole besitzen eine derart hohe Affinität zu Goldoberflächen, dass diese spontan organisierte Monolagen bilden. Zum Vergleich wurden bei diesen Untersuchungen neben den Au/Fe-Partikeln auch Goldkolloide mit Thiolen funktionalisiert. Die Bildung dieser Monolagen konnte mit Hilfe von UV/Vis- und Raman-Spektroskopie nachgewiesen werden.^[75] Hierzu wurde die Verschiebung der Plasmonresonanzfrequenz und der Surface Enhanced Raman-Effekt ausgenutzt.

Die erfolgreiche Immobilisierung von Thiolen auf der Partikeloberfläche lässt den Schluss zu, dass auch die Immobilisierung von Enzymen selbstorganisiert möglich ist. Außerdem können Alkanthiole mit Carboxyl- oder Amino-Gruppen als Anker (Spacer) für die Bindung von Enzymen mittels EDC/NHS-Methode genutzt werden. Als Modellsystem diente die Cellulase, welche auf den Au/Fe-Partikeln direkt (ohne Spacer) und indirekt (mit Spacer) gebunden wurde. Diese Enzym-Nanopartikel-Komplexe wurden in der Hydrolyse von Cellulose eingesetzt und ermöglichen durch die kleinen Partikeldurchmesser eine Kombination aus heterogener und homogener Katalyse. Als Referenzsystem für die heterogene Katalyse wurde die Cellulase auf magnetischen μ -Partikeln der Firma Chemagen immobilisiert.

Die gebundene Proteinmenge wurde mit Hilfe einer Bilanzierung von fluoreszenzspektrometrischen Messungen bestimmt. Die Enzymaktivitäten wurden anhand der während der Hydrolyse von Cellulose entstandenen Glucose qualitativ miteinander verglichen. Zunächst wurden die Immobilisierungsbedingungen für die etablierte EDC/NHS-Methode für Cellulase auf den Partikeln festgelegt. Dabei stellte sich heraus, dass die Menge an gebundener Cellulase mit steigender Temperatur zunimmt, bis sie ab $40 \text{ }^\circ\text{C}$ in Sättigung

übergeht. Alle weiteren Funktionalisierungen wurden somit bei 40 °C durchgeführt. Die maximale Beladung der Partikelsysteme lag für alle Partikel in der gleichen Größenordnung (zwischen 150 und 170 mg/g). In der Literatur sind für Cellulase auf Trägern zumeist geringere Beladungen zu finden. Bei Studien zu anderen Enzymen und vergleichbarer Partikelsysteme (Chemagen-Partikel) als Träger sind jedoch ähnlich Beladungen beschrieben. Die funktionalisierten Partikelsysteme konnten bei der Hydrolyse von Carboxymethylcellulose, einer in Wasser löslichen Cellulose, erfolgreich eingesetzt werden. Es wurden jeweils Partikelmassen im Äquivalent gleicher Enzymmengen eingesetzt. Die Immobilisierten Cellulasen zeigten Aktivitäten zwischen 75 % und 82 % der Aktivität nativer Cellulasen. Der Vergleich zwischen den μ -Partikeln und den Au/Fe-Partikeln mit Spacer zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Hydrolyse dieses für das Enzym leicht zugänglichen Substrates. Da hier die gleiche Immobilisierungsmethode verwendet wurde, kann demnach für Nanopartikel kein Vorteil basierend auf Morphologieunterschieden der Träger gefunden werden. Beim Vergleich der Aktivitäten der direkten Immobilisierung und der indirekten Immobilisierung auf Au/Fe-Partikeln, kann ein leichter Vorteil für die direkte Immobilisierung gefunden werden. Die Bindung des Enzyms auf der Trägeroberfläche mittels Thiolgruppen scheint einen geringeren konformativen Stress für das Enzym darzustellen. Die direkte Bindung des Enzyms auf der Oberfläche ist demnach nicht nur eine schnelle und einfache Methode der Immobilisierung, sie liefert auch höhere Aktivitäten als die kovalente Bindung mittels EDC/NHS-Methode.

Neben dem leicht zugänglichen Substrat Carboxymethylcellulose wurden die Partikelsysteme auch bei der Hydrolyse eines schwer zugänglichen Substrates einer fibrösen Cellulose eingesetzt. Hier kann eine Steigerung der Aktivität für die Nanopartikel um etwa 35 % beobachtet werden. Dieser Effekt wird auf die geringeren Partikeldurchmesser zurückgeführt, so dass tatsächlich von einem Einfluss der Trägermorphologie, bzw. der Beweglichkeit des Enzym-Träger-Komplexes ausgegangen werden kann. In der Literatur wird von einem nahezu kompletten Erhalt der Aktivität nach der Immobilisierung berichtet. Dies konnte mit der hier untersuchten Hydrolyse nicht erreicht werden. Grund hierfür könnte der Partikeldurchmesser sein. In der Literatur wurde ein Goldkolloid mit 5 nm Durchmesser verwendet, die eingesetzten Au/Fe-Partikel besitzen jedoch einen Partikeldurchmesser von 130 nm und sind somit um ein vielfaches größer als in der Literatur beschrieben. Um die These von Gole et al.^[55] zu überprüfen, sollten Versuche mit kleineren Partikeln gemacht werden. In der Arbeitsgruppe von Herrn Schünemann (Biophysik und medizinische Physik, TU Kaiserslautern), werden zurzeit magnetische Goldkolloide hergestellt, die mit BSA stabilisiert



wurden. Deren Durchmesser sind deutlich geringer und sollten, falls die Vermutung stimmt, eine nach Enzymimmobilisierung höhere Aktivität vorweisen. Die Herausforderung bei diesem Partikelsystem ist allerdings die Verdrängung des BSA von der Partikeloberfläche.

Weiterhin war die Stabilität der auf Au/Fe-Nanopartikeln immobilisierten Cellulase von Interesse und wurde mit der Stabilität nativer Cellulase verglichen. Hierzu wurden die Hydrolysen mehrfach hintereinander durchgeführt. Die native Cellulase wurde einer Stammlösung entnommen, die bei 50°C gelagert wurde. Nach 168 h ist die Aktivität der nativen Cellulase auf 33 % der Anfangsaktivität gesunken. Die Aktivität der immobilisierten Cellulase sank lediglich auf 78 %. Die Aktivitätsabnahme der nativen Cellulase ist demnach siebenmal so schnell wie die der Immobilisierte. Dies deutet auf eine gesteigerte Thermostabilität des Enzyms durch die Bindung auf einem Träger. Vergleiche mit der Literatur zeigen, dass das hier untersuchte System vielversprechende Eigenschaften zeigt, die gegenüber kommerziellen Trägersystemen gesteigerte Aktivitäten aufweisen, kombiniert mit der Möglichkeit, den Enzym-Träger-Komplex in mehreren Zyklen einzusetzen.

Im nächsten Schritt sollte dieses System im größeren Maßstab eingesetzt werden. In den 2 ml Eppendorf-Gefäßen, die für die Hydrolysen verwendet wurden, kann eine ausreichende Durchmischung des Hydrolyse-Ansatzes nicht gewährleistet werden, was wiederum den Umsatz zu Glucose negativ beeinflusst. Am Ende der Hydrolyse können die magnetischen Partikel mittels HGMS, welcher im Kapitel 4 näher behandelt wird, vom Hydrolyseansatz separiert werden und anschließend in einen neuen Ansatz hineingespült werden. Der Einsatz dieser Partikel wäre auch in der Vorbehandlung/Verzuckerung des Substrates als Vorstufe zur Bioethanol-Gewinnung denkbar. Hier werden bereits vermehrt z.B. SSF-Prozesse (Simultaneous Saccharification und Fermentation) diskutiert, die nach einer Vorbehandlung des Rohstoffes die enzymatische Verzuckerung der Cellulose während der Fermentation anstreben. Die Ethanol-Ausbeuten sind bei dem SSF-Prozess deutlich gesteigert, da die Verzuckerung der Cellulosefaser nicht durch Produktinhibierung (Glucose inhibiert β -Glucosidase, Cellobiose inhibiert Endo- und Exoglucanasen) gestoppt wird sondern der entstandene Zucker direkt vom Mikroorganismus in Ethanol oder einer andern Feinchemikalie verstoffwechselt werden kann.^[94,95,96] Ein entscheidender „Bottleneck“ in dieser zweiten Generation der Bioethanol-Produktion sind die Kosten der verwendeten cellulolytischen Enzyme. Der Einsatz Immobilisierter Enzyme und eine Separation der Katalysatoren mittels HGMS könnte hier einen Vorteil gegenüber anderer SSF-Prozesse bringen und sollte in ergänzenden Versuchen in Bezug auf Wirtschaftlichkeit untersucht werden.





3 Katalytische Oxidation von Glucose zu Gluconsäure

3.1 Einleitung und Zielsetzung

Neben dem Einsatz von Goldnanopartikeln als Träger für die heterogene Katalyse, welche in Kap. 2 behandelt wurde, können Goldnanopartikel auch selbst als Katalysator eingesetzt werden. Besonders vielversprechende Ergebnisse konnten bei der goldkatalysierten Oxidation von Glucose zu Gluconsäure erzielt werden.

Gluconsäure ist ein wichtiges industrielles Produkt und wird als Lebensmittelzusatzstoff, als milde Säure in der Metallbeize und in der Medizin aufgrund seiner guten Bioverfügbarkeit eingesetzt. Gewonnen wird die Gluconsäure in erster Linie mikrobiologisch durch Oxidation von Glucose mit *Aspergillus niger*. Das Potential einer katalytischen Umsetzung von Glucose zu Gluconsäure mittels geträgerter Goldnanopartikel wird wie bereits erwähnt in einigen aktuellen Veröffentlichungen untersucht und beschrieben. Ein Prozess zur kontinuierlichen, katalytischen Umsetzung von Glucose zu Gluconsäure stellt hierbei ein interessantes Forschungsfeld dar. Erreicht werden soll dies durch immobilisierte Gold-Nanopartikel in einer magnetischen Wirbelschicht. Die beschichteten Magnetpartikel sollen unter magnetischer Rückhaltung in einer Durchflusskartusche kontinuierlich Glucose umsetzen.

Im ersten Schritt muss zunächst die Synthese der Katalysatoren realisiert werden. Zwei verschiedene Synthesewege zur Bindung von Gold-Nanoclustern auf Partikeln mit magnetisierbarem Kern wurden im Rahmen dieser Arbeit näher betrachtet. In der ersten Synthese wurden Magnetit-Silicat-Partikel mit SH-Gruppen funktionalisiert, die durch Selbstorganisation in der Lage sind, ein Goldkolloid gewünschter Partikelform und -größe zu binden. Bei der zweiten Synthese wird um Eisenoxid-Partikel eine Aluminiumoxid-Schicht gelegt und anschließend mit Hilfe der „Deposition-Precipitation“-Methode auf der Partikeloberfläche Goldkatalysatoren ausgefällt. Die Partikelsynthesen werden mit verschiedenen Analysemethoden auf deren Partikelgrößenverteilung, Partikelform, elementaren Zusammensetzung, Oberflächenladung und funktionellen Gruppen der Oberflächen hin untersucht. Im Folgenden sollen die optimierten Partikel Einsatz in einer Wirbelschicht finden, in der die Partikel zurückgehalten werden und dennoch kontinuierlich katalytisch Glucose zu Gluconsäure umsetzen können.





3.2 Theoretische Grundlagen

3.2.1 Industrielle Gewinnung von Gluconsäure

Die Gluconsäure ist eine schwache organische Säure, welche durch eine Oxidationsreaktion aus Glucose gewonnen wird. Katalysiert wird diese Reaktion durch die Enzyme Glucoseoxidase oder Glucosedehydrogenase. Die Gewinnung erfolgt bereits seit mehreren Jahrzehnten hauptsächlich mikrobiologisch durch Fermentation. Begonnen hat es 1922 mit dem Bericht von Molliard^[97], in dem von einem Gluconsäurenachweis bei einer sauren Fermentation von *Sterigmatocystis nigra*, heute bekannt als *Aspergillus niger*, berichtet wurde. Später konnte die Gluconsäureproduktion auch für einige Bakterienspezies wie *Pseudomonas*, *Gluconobacter* und *Acetobacter* sowie verschiedene Pilzarten nachgewiesen werden.^[98] Studien von Bernhauer zur *A. niger* Fermentation zeigten, dass durch die Neutralisierung der Gluconsäure mit Calciumcarbonat hohe Produktausbeuten erzielt werden und die Fermentation stark pH-abhängig ist.^[99] Die aktuell genutzte kommerzielle Methode zur Herstellung von Gluconsäure ist eine Submersfermentation mit *Aspergillus niger* und basiert auf einem Prozess, welcher 1952 veröffentlicht wurde.^[100] Dieser beinhaltet eine Fed-Batch Kultivierung, der intermittierend Glucose zu gefüttert wird. NaOH dient hier der pH-Kontrolle. Der pH wird fortwährend zwischen 6 und 6,5 eingestellt und die Temperatur bei 34 °C gehalten. Die Produktivität dieses Prozesses ist sehr hoch, Glucose wird mit einer Rate von $> 13 \text{ g/(l} \cdot \text{h)}$ umgesetzt (95 % Umsatz der Glucose zu Gluconsäure).^[103] Der Oxidationsmechanismus sowie die beteiligten Enzyme der Fermentation sind in Abb. 31 dargestellt.

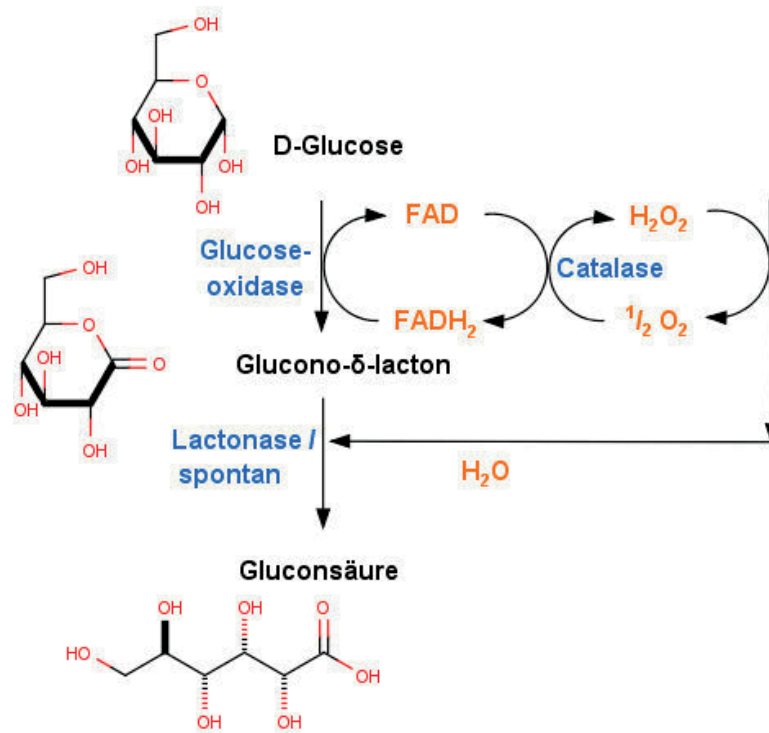


Abb. 31: Oxidationsmechanismus von Glucose zu Gluconsäure durch *Aspergillus niger*.^[98]

Zur Aufarbeitung der Gluconsäure aus dem Fermentationsmedium wird zunächst die Biomasse vom Überstand befreit. Dies kann mittels Zentrifugation erfolgen; in großen Prozessanlagen hingegen wird zumeist die Filtration bevorzugt. Die Biomasse wird in einem weiteren Fermentationsprozess wiederverwendet und kann so bis zu 8-mal eingesetzt werden.^[101] Anschließend wird dem Überstand des Fermentationsmediums z.B. Calciumhydroxid^[102] oder Calciumcarbonat^[103] zugesetzt, um die Gluconsäure als kristallines Calciumgluconat auszufällen. Die Zugabe von Natriumcarbonat und Natriumhydroxid liefert das für die Lebensmittelindustrie wichtige Natriumgluconat.^[103] Das Präzipitat wird mithilfe der Filtration von dem Fermentationsmedium befreit und durch Aufkonzentrieren und Trocknen als Salz gewonnen. Um die freie Säure zu erhalten, wird das Salz in einer Säure, z.B. Schwefelsäure resuspendiert. Dies führt zu einem Calciumsulfat-Niederschlag (oder Natriumsulfat), der mit einem erneuten Filtrationsschritt entfernt wird. Die nun frei vorliegende Gluconsäure wird mit Aktivkohle bearbeitet, um Farbverunreinigungen zu beseitigen. Der anschließende Aufarbeitungsschritt mit Ionentauschern wird zur Gewinnung der freien Säure und des Lactons verwendet. Abschließend werden die Produkte kristallisiert und getrocknet.^[104] Eine neuere Methode zur Gewinnung der Gluconsäure aus dem Fermentationsmedium ist das durch J. David Genders patentierte Verfahren mit Hilfe der Elektrodialyse.^[105] Inzwischen gibt es die verschiedensten Abwandlungen dieser Methode, die

von Xu und Huang zusammengetragen wurden.^[106,107] Aus diesen Untersuchungen ergaben sich Gesamtproduktionskosten unter Einsatz der Elektrodialyse von 0,32 €/kg.^[107] Die Abtrennung der Biomasse von der Fermentationsbrühe über Filtration ist allerdings auch bei diesen Verfahren notwendig und ein zeitintensiver Prozessschritt. Ein alternativer Produktionsansatz zur besseren Abtrennung und Wiederverwertung der Biomasse ist die Immobilisierung der Zellen. Als Trägermatrix diene hier z.B. Calciumalginat^[108], Glasoberflächen^[109] oder auch Aktivkohle^[110]. Da der Umsatz dieser Systeme sinkt, bestenfalls noch 5 g/(l · h) und auch nur etwa 80 % der eingesetzten Glucose zu Gluconsäure oxidiert wird, hat sich dieser Lösungsansatz bisher nicht durchgesetzt.^[111]

Die Gluconsäure und ihre Derivate haben wie bereits oben erwähnt ein breites Anwendungsfeld in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie. Einige Anwendungsbeispiele können der Tab. 4 entnommen werden.

Tab. 4: Zusammenfassung einiger Anwendungsfelder der Gluconsäure und ihrer Derivate:

Komponente	Anwendung
Gluconsäure	Bionade ^[112] , Konservierungs- und Säuerungsmittel in der Lebensmittelindustrie ^[113] , Zusatzstoff bei der Betonherstellung ^[114]
Natriumsalz der Gluconsäure	Konservierungs- und Säuerungsmittel in der Lebensmittelindustrie ^[113] , Backmittel ^[114] , Lederherstellung ^[119]
Calciumsalz der Gluconsäure	Pharmaindustrie Ernährungszusatz bei Calciummangel ^[115]
Gluconolacton	Reinigung industriell genutzter Gerätschaften ^[116] , verhindert Bildung von Milch- ^[117] und Bierstein ^[118] , Textilindustrie ^[118]
Eisensalz der Gluconsäure	Ernährungszusatz bei Eisenmangel ^[119]

Auf Grund der großen Anwendungsvielfalt der organischen Säuren repräsentieren diese die drittgrößte Kategorie der Fermentationsprodukte des Weltmarktes, direkt nach den Antibiotika und Aminosäuren. Der gesamte Marktwert für organische Säuren erreichte 3 Millionen \$ in 2009. Die Zitronensäure dominiert den Markt der organischen Säuren. Der Markt für Gluconsäure ist vergleichsweise kleiner, erreicht dennoch etwa 100.000 Tonnen weltweiter Produktion. Um den Marktwert der Gluconsäure einsortieren zu können, ist eine Aufzählung der wichtigsten mikrobiell hergestellten Produkte in Tab. 5 zusammengestellt.



Tab. 5: Wichtige mikrobiell hergestellte Produkte geordnet nach Mengenangaben und Angabe des Produktwertes:^[119,120]

Produkt	Weltjahresproduktion (t)	Produktwert (€/kg)
Bier	155 Mio.	2,50
Bioethanol	50 Mio.	0,4
Futterhefe	3 Mio.	0,33
Backhefe	2 Mio	0,8
L-Glutamat	1,5 Mio.	0,8
Zitronensäure	1,5 Mio.	1,00
L-Lysin	700.000	1,60
Milchsäure	250.000	1,80
Essigsäure	190.000	0,50
Gluconsäure	100.000	2,80
Gluconsäure (freie Säure)	~ 6.000	
Gluconolacton	~ 20.000	
Natriumgluconat	~ 70.000	
Calciumgluconat	~ 6.000	
Kalium-/Eisengluconat	~ 2.000	
Waschmittelenzyme	100.000	3
Vitamin C	95.000	8
L-Threonin	55.000	4
Antibiotika	30.000	150
Itaconsäure	15.000	6,50
L-Phenylalanin	15.000	8
L-Tryptophan	1.500	16
L-Arginin	1.000	16
Insulin	8	1.000
Vitamin B12	3	25.000



3.2.2 Katalytische Oxidation an Edelmetallkatalysatoren

Wie bereits im vorhergehenden Kapitel erwähnt, haben die Gluconsäure und ihre Derivate ein breites Anwendungsfeld in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie und damit einen recht hohen Marktanteil. Wie in Tab. 5 zu sehen, werden etwa 100.000 Tonnen Gluconsäure jährlich produziert, die fast ausschließlich biotechnologisch durch Fermentation von *Aspergillus niger* gewonnen werden. Der Nachteil der Fermentation ist, dass es keinen 100 %igen Umsatz gibt und auch die anschließende Aufarbeitung, sprich die Gewinnung der Gluconsäure aus der Fermentationsbrühe, mehrere Schritte erfordert. Als Alternative kann neben biotechnologischen Prozessen auch die chemische Katalyse zur Oxidation von Zuckern eingesetzt werden. Eugen von Gorup-Besánez beobachtet bereits 1861 die Bildung einer Säure aus Mannit in Gegenwart von Platin und brachte somit den Nachweis der chemischen Katalyse mittels Edelmetallen, der dann allerdings länger Zeit nicht mehr im Fokus der Untersuchungen stand.^[121] Erst in den 1960ern wurde die Platinkatalysierte Zuckeroxidation mehr systematisch studiert und die Reaktivitätsreihenfolge der verschiedenen funktionellen Gruppen von Kohlenstoffverbindungen aufgestellt. Die reaktivste Gruppe im Zuckermolekül ist gemäß dieser Selektivitätsregel die Aldehydgruppe.^[122] Die Studien zur Verwendung von Platin und Palladium geträgerten Katalysatoren beschreiben verschiedene Aktivitäten und Selektivitäten; dies lässt darauf schließen, dass die katalytische Eigenschaft nicht nur von der aktiven Komponente sondern auch von anderen Parametern wie Trägermaterial, Partikelgröße, Promotormetallen, Reaktionsbedingungen usw. abhängt. So beschreiben Abbadi et al. für einen 5 % Pt/C Katalysator eine Selektivität zwischen 30 % und 89 % abhängig vom pH-Wert,^[123] wo hingegen bei höheren Pt-Anteilen (5 % - 10 %) die Selektivität mit 60 % -70 % deutlich abnimmt.^[124] Vergleichende Studien zeigten, dass Pd/C-Katalysatoren höhere Selektivitäten und deutlich gesteigerte Aktivitäten gegenüber Pt/C besitzen.^[125,126,127] Spätere Publikationen beschrieben die Verwendung von heterogenen Platin und Palladium Katalysatoren, die mit den Promotormetallen Bismut (Bi)^[123,128] oder Blei (Pb)^[129] versehen sind. Diese Modifikation erhöht die katalytische Aktivität und die Langzeitstabilität, allerdings sinkt die Selektivität dieser Katalysatoren.^[130] Die gesteigerte Aktivität durch das Promotormetall wird auf eine geringere Vergiftung des Katalysators durch Sauerstoff zurückgeführt; allerdings wird durch den Promotor die Selektivität herabgesetzt und es entsteht Glucuronsäure anstatt Gluconsäure.^[123] Dencic et al. haben die Edelmetallkatalysatoren mit dem Enzym Glucoseoxidase verglichen und gezeigt, dass die Metallkatalysatoren deutlich geringere Aktivitäten besitzen.^[130] Einzige Ausnahme sind



Goldkolloidkatalysatoren, die in etwa eine katalytische Charakteristik wie die Glucoseoxidase aufweisen.

Gold war lange Zeit für die Katalyse uninteressant, da der Feststoff als inertes und unreaktives Metall bekannt war. In den 1980ern zeigten unabhängige Studien von Haruta zur CO-Oxidation bei niedrigen Temperaturen^[131] und Hutchings zur Hydrochlorierung von Ethin^[132], dass Goldkolloide, entgegen der bisherigen Meinung, für bestimmte Reaktionen sehr hohe Aktivitäten und Selektivitäten zeigten. Da ausschließlich Partikel mit einem Durchmesser < 10 nm katalytisch aktiv sind, handelt es sich hierbei um struktursensitive Reaktionen.^[133] Eine ausführliche Zusammenfassung aller Anwendungsmöglichkeiten geträgerter Goldkatalysatoren wurde von Hashmi und Hutchings zusammengetragen.^[134] Die selektive Oxidation von Alkoholen und Kohlehydraten wurde durch die Forschungen um die Arbeitsgruppe von Prati und Rossi begründet.^[135] So berichtet 2002 Biella z.B. von einem Goldkolloid, gebunden auf einem Kohlenstoffträger, der eine deutlich höhere Aktivität als Platin oder Palladium Katalysatoren mit einer nahezu 100 % igen Selektivität zu Gluconsäure zeigt.^[136] Allerdings ist für diese Partikel die Langzeitstabilität nicht gewährleistet, da bereits nach vier Einsätzen die Aktivität auf 50 % gesunken ist. Claus et al. berichten hingegen von stabilen Au/C Katalysatoren, bei denen kein Gold-Bleaching beobachtet wurde.^[133, 137]

In vielen Studien ist die Träger-Katalysator-Wechselwirkung ein entscheidender Faktor für die Kontrolle der Reaktion. Interessanterweise fanden Rossi und Mitarbeiter, dass Goldkolloid-Partikel allein sehr effiziente Katalysatoren für die Oxidation von Glucose zu Gluconsäure sind.^[138] Die Anfangsgeschwindigkeiten sind für das „nackte“ Goldkolloid unter gleichen Bedingungen identisch zu denen von Au/C Katalysatoren; dies bedeutet, dass das Trägermaterial für die Katalysatoraktivität nur eine untergeordnete Bedeutung hat. Da das Goldkolloid alleine jedoch schwer aus einer Reaktionslösung zurückzugewinnen ist, wurde auch in den folgenden Jahren weiter die heterogene Katalyse an Goldnanopartikeln bevorzugt eingesetzt. Jüngste Untersuchungen von auf Metalloxid (TiO₂ und Al₂O₃) geträgerten Goldkolloiden zeigen ausgezeichnete Eigenschaften in der Flüssig-Phasen-Oxidation. Diese Katalysatoren werden in der Oxidation verschiedener Pentosen^[139], Hexosen^[140] und Ethoxylaten^[141] eingesetzt. Der Einsatz dieser Goldkatalysatoren zeigt sehr hohe Aktivitäten und Selektivitäten ohne Verlust an Aktivität in wiederholten Einsätzen.

Diese Form der Trägerkatalysatoren werden von Thielecke^[142] in einem halbkontinuierlichen Reaktorsystem eingesetzt, welches später als Grundlage für eine von Südzucker aufgebaute Pilotanlage diente.^[143] Der Aufbau des Reaktorsystems ist in Abb. 32 dargestellt. Er besteht aus einem thermostatisierten Glasgefäß (1 L), bestückt mit einer pH-Elektrode, einem

Thermometer, einem Füllstandsmesser und einer Glasfritte für die Sauerstoffzufuhr. Der pH-Wert wird über die Zugabe von NaOH konstant bei pH 9 gehalten und die Reaktion wird bei 40 °C durchgeführt. Der Füllstand des Reaktors wird durch Zugabe von Substratlösung konstant auf 750 ml gehalten. Der Reaktionslösung wird kontinuierlich ein Teil entnommen, der zunächst über einen Ultraschallseparator geleitet wird, um bereits einen Großteil der Trägerkatalysatoren zurückzuhalten. Ein nachgeschalteter Separator trennt den restlichen Feststoffanteil vom Produktstrom. Die abgetrennten Katalysatoren werden im Anschluss über Peristaltikpumpen zurück in den Reaktor gepumpt.

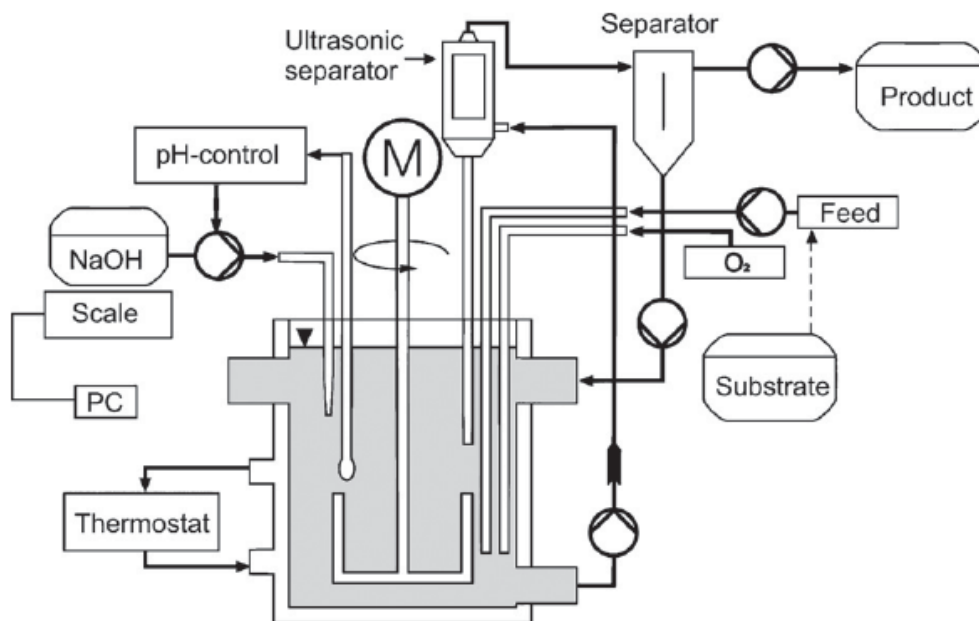


Abb. 32: Halbkontinuierliches Reaktorsystem für die katalytische Gewinnung von Gluconsäure aus Glucose. Bestückt ist der thermostatisierte Reaktor mit einer pH-Kontrolle, Sauerstoffzufuhr, einer Füllstandskontrolle mit Substratzufuhr und einem Filtersystem durch das kontinuierlich Reaktionslösung entnommen und der abgetrennte Feststoff zurück ins System geführt wird.^[142]

Es wurden unterschiedliche Reaktionsbedingungen untersucht (Variation der Verweilzeit und der Glucosekonzentration) mit denen Glucose-Umsätze zwischen 52 und 96 %, sowie Aktivitäten zwischen 167 und 245 mmol/(min·g_{Au}) erreicht wurden. Die verwendeten Katalysatoren wurden mit der Deposition Precipitation Methode hergestellt. Als Träger für die Goldnanopartikel dienen Aluminiumoxid Granulate mit einem Partikeldurchmesser zwischen 25 und 63 µm, da nur diese mit Hilfe des Separatinsystems zurückgehalten werden können. Mit diesem System konnte eine hohe Langzeitstabilität nachgewiesen werden. Vorteil gegenüber biotechnologischer Prozesse ist die einfache Gewinnung des Reaktionsproduktes; das Gemisch aus Glucose, Puffer und Gluconsäure des Produktstromes kann



einfach in einem anschließenden Aufarbeitungsschritt wie z.B. mittels Ionentauschers oder Elektrodialyse getrennt werden. Auch der vermeidliche Nachteil des teuren Katalysators Gold kann anhand dieser Experimente zerschlagen werden. Aufgrund der hohen Langzeitstabilität sind die Katalysatoren, einmal hergestellt, über einen langen Zeitraum einsetzbar. So wurde von Thielecke berechnet, dass die Herstellung von 1 kg Gluconsäure weniger als 0,3 €-Cent bezogen auf die Goldkomponente kostet. Da die Aufarbeitung in biotechnologischen Prozessen den größten Kostenfaktor darstellt und durch die Goldkatalyse kaum noch Aufarbeitungsschritte anfallen, kann diese Edelmetallkatalyse als gute Alternative für die Anwendung in industriellen Prozessen angesehen werden.

3.2.3 Katalytischer Mechanismus der Glucoseoxidation

Um katalytische Reaktionen gezielt steuern zu können, ist es sinnvoll die Vorgänge bei der Reaktion genau zu kennen. Die Reaktionskinetik beschreibt dabei den zeitlichen Verlauf einer Reaktion, sowie den Zusammenhang zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und den beeinflussenden Parametern. Bei der heterogenen Katalyse ist die Reaktionsgeschwindigkeit sowohl von der chemischen Reaktion (Mikrokinetik), als auch vom äußeren Stofftransport (Makrokinetik) abhängig. Bei Flüssigphasenoxidationen, wie der hier diskutierten trägerkatalysierten Glucoseoxidation, wird der Reaktionsverlauf demnach durch die Konzentration des Eduktes (Glucose) und des Katalysators beeinflusst, sowie durch die Umgebungsbedingungen Temperatur, pH-Wert, Trägermorphologie und Rührerdrehzahl.

Um den Einfluss der Makrokinetik zu minimieren, kann die Porendiffusion durch Beschränkung der Trägerkorngröße oder Porosität reduziert werden. Nachteil hierbei ist der Verlust an Oberfläche zum Aufbringen von Goldkatalysatoren, was durch eine Reduzierung des Partikeldurchmessers teilweise kompensiert werden kann. Die Dicke der Grenzschicht wird durch ausreichend starkes Rühren verringert, was die Filmdiffusion vernachlässigbar macht. Bei Rührerdrehzahlen höher als 900 rpm und einem Sauerstofffluss von 1600 ml/min ist die Reaktionsrate nicht durch den Massentransfer an der Phasengrenze limitiert, sprich die Diffusion bzw. Makrokinetik ist vernachlässigbar.^[133] Die chemische Reaktion beschränkt sich auf drei Teilschritte, die in Abb. 33 dargestellt sind; die Adsorption der Glucose auf der Goldoberfläche, die katalytische Umsetzung der Glucose zu Gluconsäure und der Desorption der Gluconsäure.

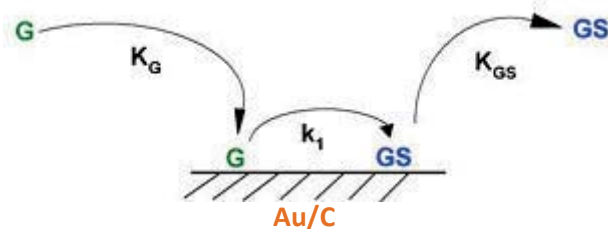


Abb. 33: Schematische Darstellung der D-Glucoseoxidation mittels Goldkatalysator basierend auf dem Langmuir-Hinshelwood-Modell. G = Glucose, GS = Gluconsäure.^[133]

Durch Variation der Reaktionsbedingungen (Glucosekonzentration und Katalysatormenge), entwickelten Claus et al. ein kinetisches Modell für Goldkatalysatoren, welches mit einem Ansatz der Langmuir-Hinshelwood-Gleichung modelliert wurde und sehr gut mit den realen Reaktionsverläufen übereinstimmen:^[133, 137]



$$-\frac{dc_G}{dt} = \frac{K_G \times k_1 \times c_G}{1 + K_G \times c_G + K_{GS} \times c_{GS}} \times c_{Au} + k_P \times c_G \quad (2)$$

c_G ; c_{GS} = Konzentration Glucose und Gluconsäure

K_G ; K_{GS} = Adsorptionskonstante von Glucose bzw. Gluconsäure

c_{Au} = Katalysatorkonzentration

k_1 = Geschwindigkeitskonstante der Oberflächenreaktion

k_P = Geschwindigkeitskonst für den Verbrauch von Glucose in Nebenreaktionen

Bezüglich des Reaktionsmechanismus gibt es verschiedene Modelle, von denen das aktuell am ehesten akzeptierte Modell für die Katalyse an Edelmetallkatalysatoren das von Mallat und Baiker ist. Dieses basiert auf dem Mechanismus der oxidativen Dehydrogenierung wie auch Gleichung (2), bei dem Sauerstoff als Wasserstoffakzeptor fungiert.^[144] Es wird postuliert, dass die Glucose in der Aldehydform an der Katalysatoroberfläche adsorbiert und unter Wasserstoffverlust zur Gluconsäure reagiert. Anschließend desorbiert das Säureanion und der Wasserstoff verbleibt an der Katalysatoroberfläche, bis er mit einem Wasserstoffakzeptor, hier z.B. Sauerstoff, reagiert (siehe Abb. 34).

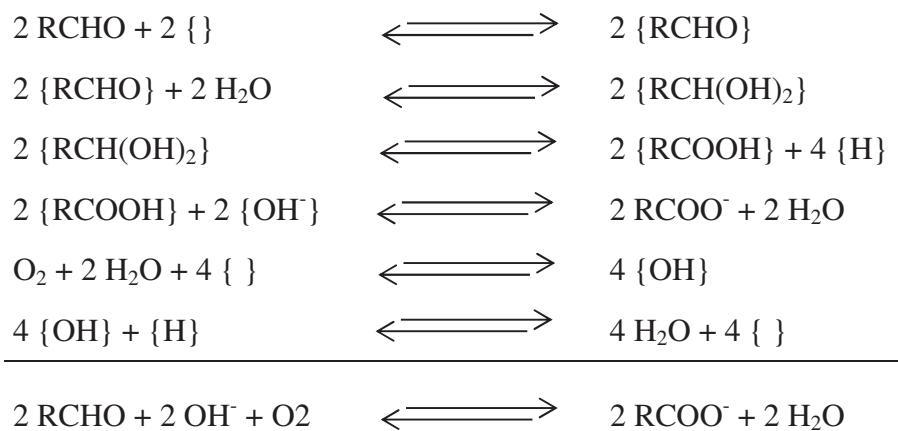


Abb. 34: Mechanismus der oxidativen Dehydrogenierung nach Mallat und Baiker.^[145] $\{ \}$ bezeichnet eine unbesetzte Adsorptionsstelle am Katalysator (aktives Zentrum), $\{ \text{XY} \}$ bezeichnet eine adsorbierte Spezies.

Da eine direkte Reaktion zwischen Sauerstoff und Glucose nicht stattfindet, müsste also auch unter Ausschluss von Sauerstoff bis zur Katalysatorsättigung bzw. in Gegenwart eines anderen Wasserstoffakzeptors Gluconsäure entstehen. Wieland bestätigte dies indem er Chinon und Methylenblau unter Sauerstoffausschluss für die Glucoseoxidation an Platin einsetzte und die gleichen Produkte erhielt wie mit Sauerstoff.^[146] de Wit et al. unterstützten

diese These indem sie die Glucoseoxidation unter Sauerstoffausschluss durchführten und den Nachweis von Wasserstoff in der Reaktionslösung erbrachten.^[147] Des Weiteren wurde als Bestätigung für das Vorliegen des Dehydrogenierungsmechanismus das Auftreten von hydrogenierten Produkten wie Sorbit gewertet, da diese nur auftreten können, wenn intermediär Wasserstoff auf der Katalysatoroberfläche vorhanden ist.^[137]

Diese Nachweise erfolgten alle an Platin oder Palladium Katalysatoren, ob dieser Mechanismus auch für Goldkatalysatoren gilt ist umstritten. Comotti und Beltrame aus der Arbeitsgruppe Rossi postulieren für das Goldkolloid einen anderen Reaktionsmechanismus. Da sie einen Nachweis der Bildung von Wasserstoffperoxid bringen konnten, vermuten sie einen Mechanismus in dem sowohl Glucose als auch Sauerstoff am Goldkatalysator adsorbiert werden und dort unter Bildung von Gluconsäure und Wasserstoffperoxid miteinander reagieren.^[135,138] Önal et al. hingegen können Hydrierungsprodukte wie Sorbit während der Reaktion nachweisen und gehen deshalb doch von einer oxidativen Dehydrogenierung aus.^[137]

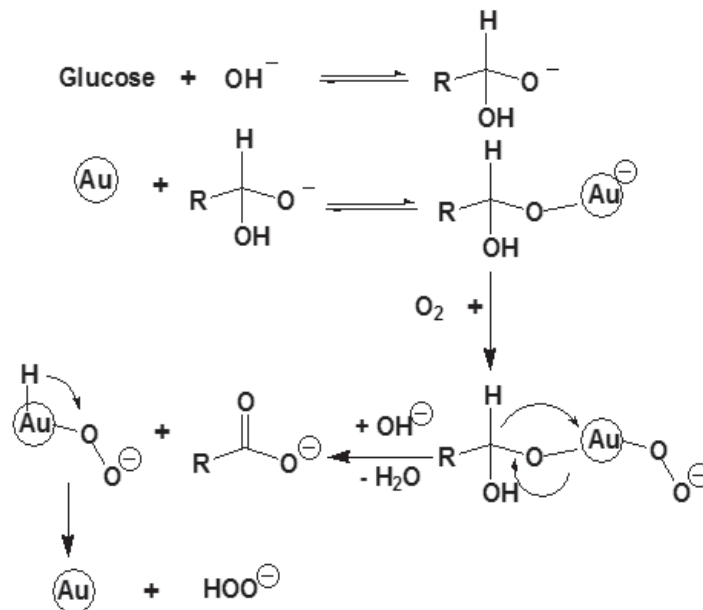


Abb. 35: Schematische Darstellung des postulierten Mechanismus der goldkatalysierten Glucoseoxidation.^[144]

Des Weiteren zeigte sich die Reaktionsgeschwindigkeit als nahezu unabhängig von der eingesetzten Glucoseanfängskonzentration. Die Oberflächenreaktion der adsorbierten Glucose zu adsorbierter Gluconsäure wurde als geschwindigkeitsbestimmender Schritt identifiziert.^[133] Die von Baatz bestimmten Reaktionsordnungen bezüglich Glucose und Sauerstoff liegen unter 0,5. Dies weist darauf hin, dass beide Moleküle aus einem adsorbierten Zustand heraus reagieren.^[144] Bei diesen Versuchen konnte ebenfalls Wasserstoffperoxid nachgewiesen



werden, dies wurde jedoch schon bei anderen oxidativen Dehydrogenierungen beobachtet und schließt somit diesen Mechanismus nicht aus. Das in Abb. 35 dargestellte Modell versucht alle Beobachtungen zu einem Modell zu vereinen und ist bis jetzt die aktuellste Beschreibung des Reaktionsmechanismus der goldkatalysierten Reaktion.

3.2.4 PCD (Particle-Charge-Detector)

Systeme mit Partikelgrößen kleiner $10\ \mu\text{m}$ finden, wie die zuvor beschriebene Goldkatalyse zur Gewinnung von Gluconsäure, heute immer mehr Anwendungen. Die Dispersions-eigenschaften kleiner werdender Partikel werden immer mehr durch deren Oberflächencharakteristik bestimmt. Eine Folge davon ist, dass kleine Partikel zur Agglomeration neigen. Bei feindispersen Systemen ist es also im Hinblick auf ihr Verhalten im Prozess oder das Verhalten als Produkt bei der Lagerung von Interesse, Partikelinteraktion zu provozieren oder zu unterdrücken, sprich Agglomeration oder Stabilisierung der Dispersion hervorzurufen.^[148] Diese Stabilisierung kann entweder sterisch mit Hilfe von Makromolekülen auf der Partikeloberfläche oder elektrostatisch erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit sind lediglich die elektrostatischen Verhältnisse auf der Partikeloberfläche von Interesse; diese geben nämlich nicht nur Aufschluss über die Stabilisierung der Partikel in Lösung, sie können auch für die Charakterisierung der Oberfläche herangezogen werden.

Besitzt ein Teilchen an der Oberfläche dissoziierbare Gruppen wie Carboxyl- oder Sulfatgruppen erhält das Partikel eine negative Oberflächenladung. Die dissoziierten Kationen umgeben das Partikel mit einer Wolke aus Gegenionen, die als diffuse Schicht bezeichnet wird. Diese kompensiert so die Oberflächenladung, so dass das Teilchen nach außen hin neutral erscheint und so nach außen abgeschirmt stabil in Lösung vorliegt. Werden von der Teilchenoberfläche negative Ionen abgegeben, so erhält das Teilchen eine positive Oberflächenladung und die diffuse Schicht besteht somit aus negativen Ionen. Bei der Anwesenheit unterschiedlicher funktioneller Gruppen erhält das Teilchen je nach pH-Wert des Dispersionsmediums und daraus resultierender Dissoziation eine pH-abhängige Gesamtladung. Unter Betrachtung zweier Punkte, einer weit entfernt vom Partikel, der ladungsneutral ist und der zweite Punkt auf der Partikeloberfläche, ergibt dies eine Spannungsdifferenz zwischen diesen Punkten. Es wird von einem Potential gesprochen, welches über diese Strecke abfällt. Das Potential auf der Partikeloberfläche wird auch als Nernst-Potential bezeichnet. Der Potentialverlauf wird mit dem Schichtenmodell nach Stern erklärt und ist schematisch in Abb. 36 dargestellt. Die Modellvorstellung von Partikeln in Elektrolytlösung nach Stern kombiniert hierbei die Vorstellung der festen Doppelschicht von Helmholtz mit der diffusen Schicht von Gouy und Chapman.^[149] Da die meisten Partikel eine negative Oberflächenladung besitzen, ist als Beispiel in Abb. 36 der Aufbau der Schichten bei negativer Oberflächenladung dargestellt.

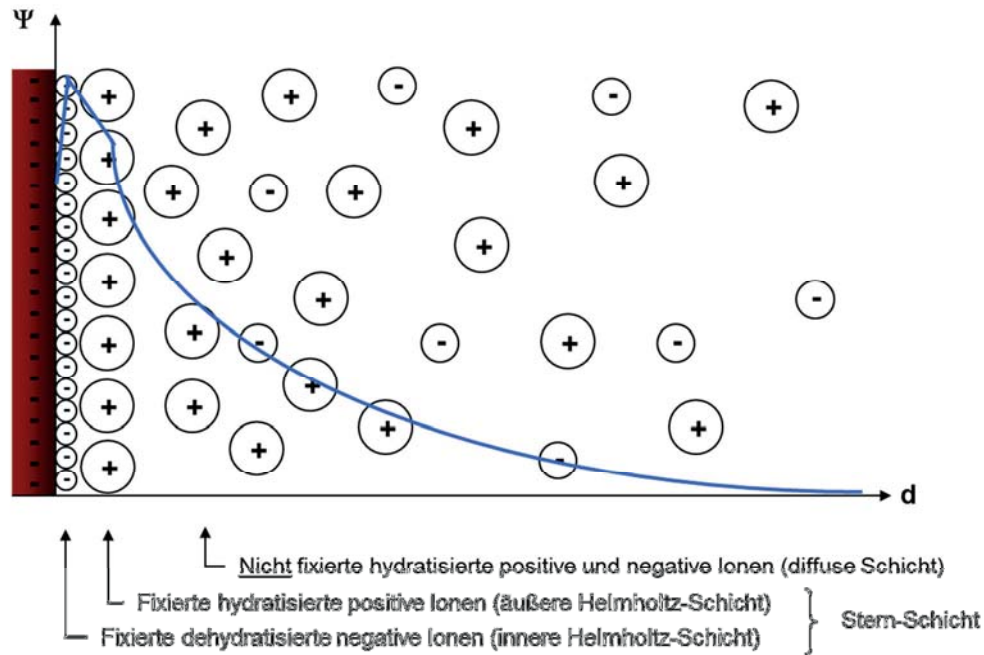


Abb. 36: Potentialverlauf im Schichtenmodell. In blau ist der Potentialverlauf in Abhängigkeit vom Abstand zum Partikel dargestellt. Zusätzlich sind die einzelnen Schichten des Modells zu sehen.

Die Adsorption von negativen Ionen auf einer negativen Oberfläche ist aus elektrostatischer Sicht nachteilig, kann jedoch durch die van-der-Waals Wechselwirkung zwischen Oberfläche und negativen Ionen erklärt werden. In der Regel besitzen negative Ionen eine weniger stark ausgeprägte Hydrathülle als positive Ionen. Somit sind sie weniger abgeschirmt und van-der-Waals Wechselwirkungen können sich besser ausbilden. Diese dominieren in geringen Abständen über die elektrostatischen Kräfte, daher kommt es trotz elektrostatischer Abstoßung zur Anlagerung von negativen Ionen. Während des Adsorptionsvorgangs streifen die negativen Ionen ihre Hydrathülle komplett ab, so dass die innere Helmholtz-Schicht aus dehydratisierten Ionen besteht. Auf die negative Monoschicht lagert sich eine zweite Monoschicht aus positiven Ionen auf. Die Ionen dieser Schicht sind ebenfalls fest fixiert, verlieren jedoch nicht ihre Hydrathülle. Hier erfolgt die Bindung via elektrostatischer Anziehung. Die innere und die äußere Helmholtz-Schicht wird zusammen als Stern'sche Doppelschicht bezeichnet. Die restlichen zur Kompensation der Oberflächenladung notwendigen Gegenionen umgeben das Teilchen wie bereits erwähnt als diffuse Schicht. Die Gegenionen der diffusen Schicht sind nicht fixiert, sondern unterliegen der Diffusion. Die Konzentration an positiven Gegenionen ist in geringen Abständen zur Teilchenoberfläche sehr hoch. Sie nimmt mit zunehmendem Abstand d von der Teilchenoberfläche ab, während gleichzeitig vermehrt negative Ionen auftreten (z.B. Cl^-). Die Konzentration an negativen

Ionen nimmt weiter zu, bis schließlich die Konzentration an positiven und negativen Ionen gleich ist. Der Ladungsausgleich gegenüber der Teilchenoberfläche ist abgeschlossen, die diffuse Schicht endet hier, die Spannung ist auf null abgefallen.

Die diffuse Schicht besteht aus nicht fixierten beweglichen Ionen. Bei der Diffusionsbewegung eines Teilchens kommt es deshalb aufgrund von Reibungskräften zu einem teilweisen Abstreifen der diffusen Schicht; das Teilchen ist somit nach außen hin nicht mehr neutral. Das an der Scherebene entstehende Potential wird als Zetapotential des diffundierenden Teilchens bezeichnet. Wird an eine Dispersion mit diffundierenden Teilchen ein elektrisches Feld angelegt, so erfahren die Teilchen eine Beschleunigung auf die entgegengesetzt geladenen Elektrode. Die Beschleunigung der Teilchen im elektrischen Feld führt zu einer Erhöhung der Teilchengeschwindigkeit. Nach dem Stokes'schen Gesetz ist die Reibungskraft proportional zur Geschwindigkeit der Partikel, was bei steigender Geschwindigkeit zu einer Erhöhung der Reibungskraft führt. Mit zunehmender Reibungskraft wird ein immer größerer Teil der diffusen Schicht abgestreift, was wiederum zu einer Zunahme der Potentialdifferenz an der Scherebene (Zetapotential) führt. Bei ausreichend hoher Teilchengeschwindigkeit wird nahezu die gesamte diffuse Schicht abgestreift. Ein Abstreifen der Stern-Schicht ist nicht möglich, da diese Ionen fest fixiert sind. Der maximale Wert des Zetapotentials wird demnach mit dem Stern-Potential gleichgesetzt.

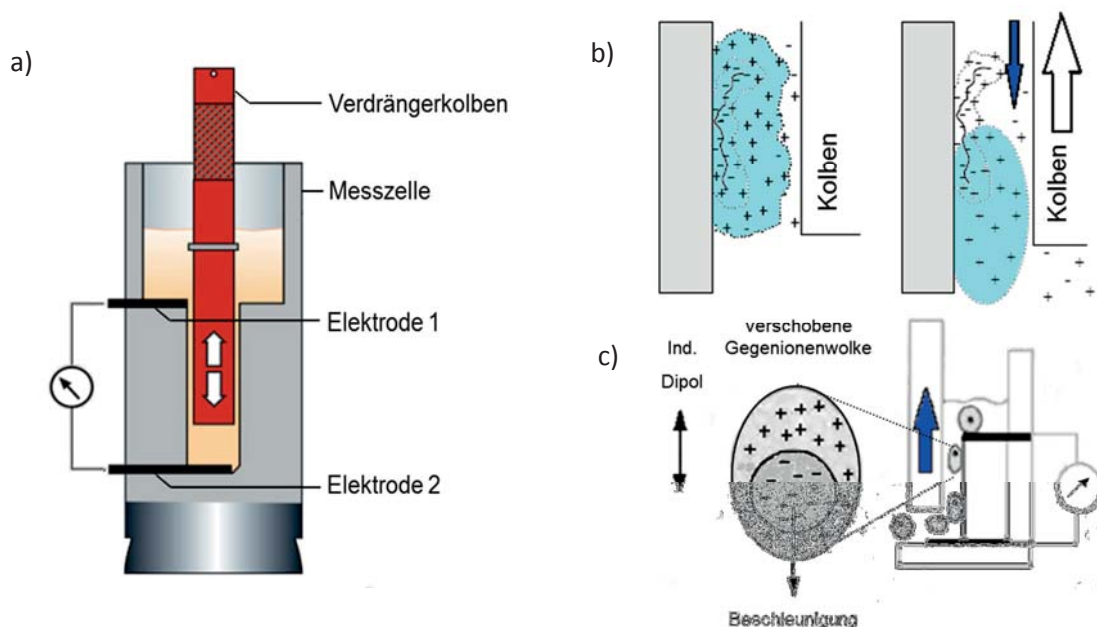


Abb. 37: a) Schematischer Aufbau der PTFE-Messzelle des Particle-Charge-Detectors,^[150] b) PCD-Signal durch Adsorptionseffekt, c) Strömungspotential erzeugt durch Dorn-Effekt.^[151]

Eine alternative Messmethode ohne elektrisches Feld zur Bestimmung der Oberflächenladungsverhältnisse ist der Particle Charge Detektor. Bei dieser Messmethode wird nicht das Zetapotential bestimmt, sondern das Strömungspotential oder PCD-Potential. Die Messzelle besteht aus PTFE mit eingepasstem Verdrängerkolben und ist in Abb. 37 schematisch dargestellt. Innerhalb der Messzelle befinden sich zwei Goldelektroden. Der Verdrängerkolben führt während der Messung eine periodische Bewegung mit einer Frequenz von 4 Hz durch, die zu einer oszillierenden Flüssigkeitsbewegung innerhalb der Messzelle führt. Dies wiederum bewirkt eine Abscherung der diffusen Schicht um die Partikel, was einen Wechselstrom erzeugt, der von den beiden Goldelektroden abgegriffen und als Messsignal registriert wird. Nach verschiedenen Signalverarbeitungsoperationen (Gleichrichten, Verstärken, Glätten) wird ein relativer Messwert angezeigt, der als Potential in mV ausgegeben wird. Der angeschlossene Titrator (Mettler Toledo) ermöglicht die Änderung des pH-Wertes durch Zugabe von HCl, bzw. NaOH und liefert so Titrationskurven des PCD-Signals in Abhängigkeit des pH-Wertes. Das Messsignal liegt zwischen ± 2500 mV und ermöglicht die Bestimmung des isoelektischen Punktes schnell, einfach und sensibel und kann so als Charakterisierungsmethode für die Partikeloberfläche herangezogen werden.^[151] Zur Entstehung des PCD-Signals gibt es zwei Modellvorstellungen. Als erstes der Adsorptionseffekt: dieser tritt meist bei Polymeren und Tensiden auf, die aufgrund von van-der-Waals-Wechselwirkungen auf der PTFE-Oberfläche am Kolben und der Messzellenwand adsorbieren. Durch die Kolbenbewegung kommt es zur Verschiebung und zum Teilabriss der diffusen Schicht, was dann das Messsignal erzeugt. Als zweites der Dorn-Effekt: er hingegen tritt bei Partikeln in Lösung auf und basiert auf dem Sedimentationspotential. Durch die Sedimentation des Partikels verschiebt sich die diffuse Schicht gegenüber dem Partikel und es wird ein Dipol induziert. Nur Sedimentation würde ein zu geringes Potential erzeugen. Die Kolbenbewegung verstärkt den Dorn-Effekt und erzeugt ein Vibrationspotential. Beide Modelle sind Grenzfälle; in der Praxis spielen beide Effekte eine Rolle.

3.3 Synthese und Charakterisierung geträgerter Goldkatalysatoren

3.3.1 Silanisierte Trägerpartikel

Der erste Ansatz, um einen magnetischen Goldkatalysator zu realisieren, war die Immobilisierung von Goldkolloid auf silanisierten magnetischen Partikeln. Eine Fällungsreaktion, wie bei den aus der Literatur bekannten Titan- und Aluminiumoxidträgern, ist bei einer SiO_2 -Oberfläche nicht möglich. Allerdings ist das Aufbringen von funktionellen Gruppen auf eine Silicat-Oberfläche oder direkt in die Silicat-Matrix einfach durchzuführen. Da Thiolgruppen eine hohe Affinität zu Goldoberflächen aufweisen (wie bereits in Kap. 2.4.1 diskutiert), können diese durch Zugabe eines Goldkolloides gewünschter Partikelform und -größe, durch Selbstorganisation die Goldnanopartikel auf der Silicat-Oberfläche binden und sind somit optimal für die Synthese der Katalysatoren geeignet. Die Silicat-Schicht um die magnetischen Grundpartikel wird mit Hilfe des Sol-Gel- oder auch Stöber-Prozesses realisiert (siehe Anhang A 4).^[152]

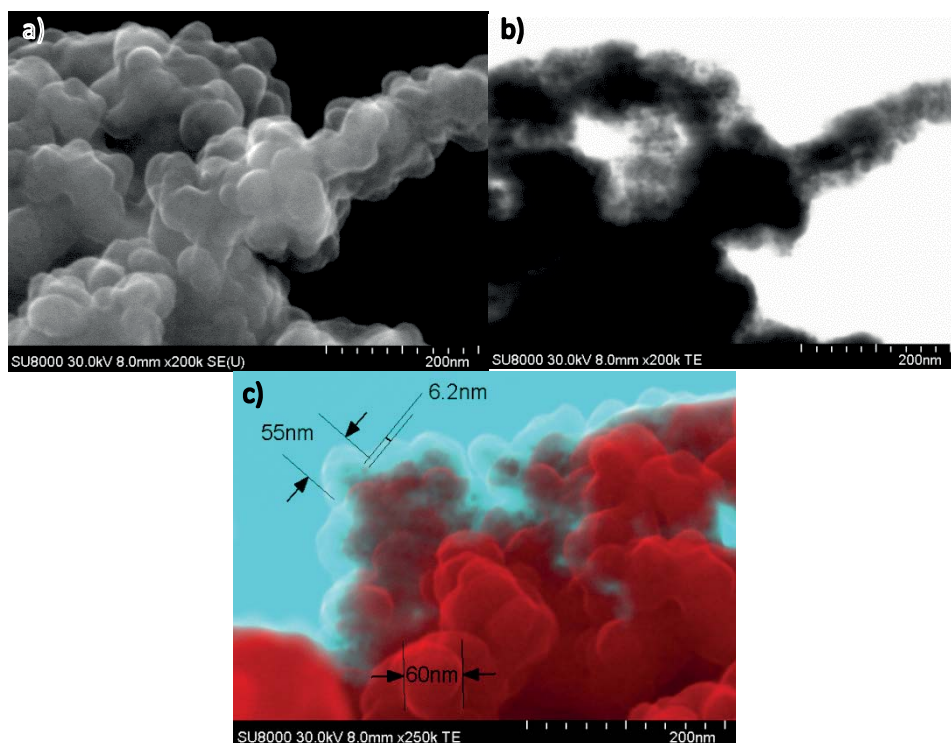


Abb. 38: Aufnahmen der eingesetzten Silicat-Partikel: a) Aufnahme der Silicat-Oberfläche (REM) b) Aufnahme des Transmissionselektronen-Detektors c) Falschfarben Aufnahme in Transmission.

Bei diesem Prozess dienen Orthosilicate wie Tetraethylorthosilicat (TEOS) als Precursor und werden im wässrigen Ammoniak in einer alkoholischen Lösung hydrolysiert und kondensiert. Die Hydrolyse und Kondensation laufen parallel ab und sind in Abb. 123 im Anhang A 4 näher beschrieben.^[153] Das Ammoniak komplexiert die entstandenen Partikel und verlangsamt so das Partikelwachstum. Dies führt dazu, dass Nukleation und Partikelwachstum voneinander getrennt werden, alle Partikel etwa gleich schnell wachsen und so eine monodisperse Partikelgrößenverteilung erreicht werden kann.^[154] Dies zeigte auch die Synthese der magnetischen Silicatpartikel (siehe Abb. 39). Die alkalische Hydrolyse des Precursors, wie bei dem Stöberprozess, führt zu eher großen Partikelkeimen, die durch sukzessive Zugabe von Tetraethylorthosilicat (TEOS) im Größenbereich von einigen nm bis μm einstellbar sind.^[154]

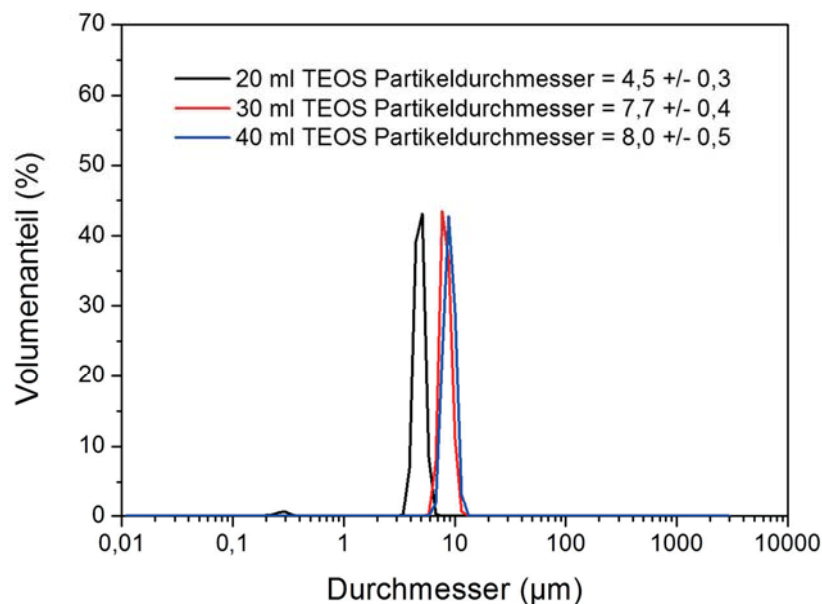


Abb. 39: Partikelgrößenverteilung magnetischer Silicatpartikel: Der Reaktionslösung wurde sukzessive TEOS zugegeben und die Partikelgrößenverteilung mittels Laserstreuung gemessen, die Auswertung erfolgte mittels Mie-Theorie. Die Stöber-Synthese ermöglicht Partikelgrößen mit geringer Varianz und einstellbaren Partikeldurchmessern.

Abb. 38 zeigt exemplarisch eine Aufnahme der Silicat-Partikel im Rasterelektronenmikroskop mit variablem Kammerdruck der Firma JEOL. Dieses Mikroskop besitzt einen zusätzlichen Detektor, der es ermöglicht, auch transmissions-elektronenmikroskopische Bilder der Proben aufzunehmen. Dies gestattet es, die magnetisierbaren Eisenoxidpartikel im Inneren der Silicat-Matrix sichtbar zu machen. Bei dieser Probe besitzen die einzelnen Silicat-Partikel einen Durchmesser von etwa 60 nm und die magnetischen Grundpartikel einen Durchmesser < 10 nm. Um nun die nötigen SH-Gruppen auf die Partikeloberfläche aufzubringen wurden verschiedene Silanisierungsmethoden untersucht:

- a) Nachträgliche Silanisierung der magnetischen Silicat-Partikel mit (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane,
- b) TEOS und (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane gleichzeitig während der Ummantelung der magnetischen Grundpartikel,
- c) Ausschließliche Verwendung von (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane zur Ummantelung der Eisenoxidpartikel.

Bei diesen verschiedenen Synthesebedingungen konnten SH-Gruppendichten zwischen 13 und 150 $\mu\text{mol/g}$ auf der Partikeloberfläche aufgebracht werden. Bestimmt wurde dies mit Hilfe einer leicht modifizierten Methode nach Ellmann (siehe Anhang B 1).^[155] Als optimal stellte sich Variante b) der Silanisierungsmethode heraus ($\approx 70 \mu\text{mol/g}$). Abb. 40 a) zeigt für die Silanisierungsmethode b) schematisch die Bildung der Silicat-Schicht um die Magnetpartikel. Die Silanisierungsmethode a) lieferte zu geringe Thioldichten von $> 10 \mu\text{mol/g}$; c) hingegen zeigte die größten Thioldichten ($> 130 \mu\text{mol/g}$). Allerdings kam es bei der Synthese zu einer Verklumpung der Partikel, die eventuell auf eine Bildung von Disulfid-Brücken zurückzuführen sein könnte. Dies macht die Synthese schwer handhabbar und liefert unregelmäßige Partikel undefinierter Partikelgröße.

Als silanisierte Träger wurden demnach im Folgenden Partikel der Silanisierungsmethode b) verwendet. Zur Goldimmobilisierung wurde ein kommerzielles Goldkolloid mit einem Partikeldurchmesser von $d = 5 \text{ nm}$ eingesetzt (0,01 % HAuCl_4 , Hersteller Sigma Aldrich). Die Bindung des Goldkolloides erfolgt wie bereits erwähnt selbstorganisiert, sprich durch einfache Inkubation des Goldes in Gegenwart der magnetischen Partikel mit Thiolgruppen. In Abb. 40 b) ist eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Katalysatoren auf Silicat-Basis zu sehen. Die weißen Punkte stellen hierbei die immobilisierten Goldnanocluster dar und sind nur vereinzelt auf der Partikeloberfläche auffindbar. Durch eine Erhöhung der Dichte funktioneller Gruppen auf der Partikeloberfläche sollte auch eine höhere Beladung der Magnetpartikel mit Goldclustern möglich sein.

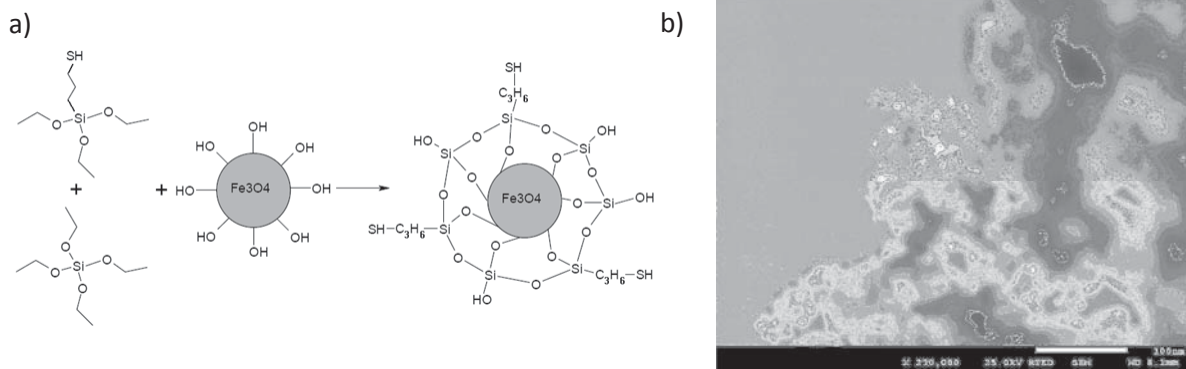


Abb. 40: a) Schematische Darstellung der Synthese von Eisenoxid/SiO₂/SH-Partikeln. Es ist möglich auf diesen Partikeln durch Selbstorganisation ein definiertes Goldkolloid zu binden; b) REM Aufnahme der Eisenoxid/Silicat/Au-Partikel. Es sind Au-Partikel (d = 5 nm) als weiße Punkte erkennbar.

Die einzelnen Syntheseschritte wurden mit Hilfe des Particle Charge Detectors (PCD), genau wie auch die Katalysatoren mit Al₂O₃-Trägern (siehe Kap. 3.3.2), charakterisiert. In Abb. 47 b) sind die Messungen der einzelnen Syntheseschritte zusammengefasst. Diese liefern die Isoelektrischen Punkte (IEP) der vorliegenden Partikelsysteme nach jedem Syntheseschritt, welche Aufschluss über die vorhandene Oberflächenladung geben. Der IEP verschiebt sich nach der Ummantelung der Eisenoxidpartikel von $5,3 \pm 0,1$ zu $3,3 \pm 0,2$, was einer SiO₂-Oberfläche entspricht (siehe Tab. 6). Sind SH-Gruppen auf der Oberfläche, verschiebt sich der IEP zu niedrigeren pH-Werten ($2,6 \pm 0,2$), da SH-Gruppen azider sind als die OH-Gruppen bei einem reinen Silicat. Nach der Zugabe des Goldkolloides kehrt der IEP zu einem Wert von $3,2 \pm 0,2$ zurück, was etwa dem IEP der SiO₂-Oberfläche entspricht. Dies lässt sich so erklären, dass durch die Goldpartikel die SH-Gruppen auf der Oberfläche durch Bildung von R-S-Au Bindungen abgesättigt werden und so nur noch die OH-Gruppen der Silicat-Oberfläche für den IEP relevant sind. In Abb. 47 b) wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit auf die Darstellung der Titrationskurve nach der Bindung des Goldes verzichtet, da dieser Verlauf fast genau dem für SiO₂ entspricht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nicht untersucht, ob die Verschiebung des pH-Wertes direkt proportional zur Menge bzw. Dichte an Oberflächen-SH Gruppen ist, da das Ellmann's Assay eine sehr einfache und zuverlässige Methode der Charakterisierung ist. Für andere funktionelle Gruppen wie z.B. Aminogruppen, für die die Bestimmung der Konzentration aufwendig ist, stellt diese Methode eventuell eine gute Alternative dar und könnte als schnelle und einfache Analyseverfahren zur Quantifizierung der Dichte an funktionellen Gruppen auf Partikeloberflächen verwendet werden.

3.3.2 Träger auf Aluminiumoxidbasis

Bei der zweiten Synthese wird auf die Eisenoxid-Nanopartikel ein Aluminiumnitrat gefällt, das durch Calcinierung eine geschlossene Aluminiumoxid-Schicht um die Magnetpartikel bildet.^[156] Die genaue Synthesevorschrift kann dem Anhang A 5 entnommen werden. Auf diese Aluminiumoxid-Schicht kann im Anschluss wie auf einem reinen Aluminiumoxid-Granulat Goldsäure gefällt werden, die nach einer weiteren Calcinierung aktivierte Goldnanopartikel auf der Oberfläche bildet.^[157]

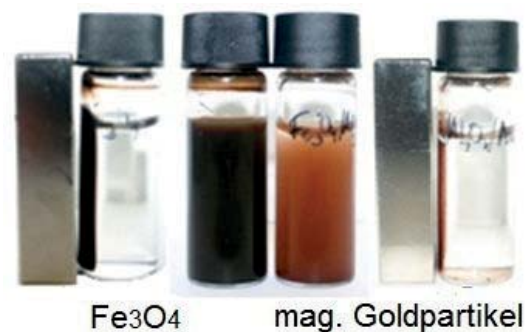


Abb. 41: Links: schwarze Eisenoxid Partikelsuspension in H₂O; rechts: Eisenoxidpartikel nach Goldfällung und Calcinierung. Beide Partikelsorten sind vollständig magnetisch abtrennbar, so dass der Überstand komplett klar wird.

Die Abb. 41 zeigt links eine schwarze Lösung der Eisenoxidpartikel und rechts die Partikel nach der Goldfällung und Calcinierung mit einer roten Färbung. Beide Partikelformen sind einfach separierbar und zeigen einen klaren Überstand. Dies deutet darauf hin, dass das Gold tatsächlich auf der Partikeloberfläche koordiniert ist und nicht als reines Kolloid im Überstand vorliegt. Die rote Färbung der Katalysatoren ist wiederum auf die Oberflächenplasmonresonanz der Goldcluster zurückzuführen, die bereits in Kap. 2.2.5 diskutiert wurde.

Die einzelnen Syntheseschritte werden mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie und der ortsaufgelösten energiedispersiven Röntgenspektroskopie (REM/EDX) charakterisiert. Abb. 42 zeigt einige dieser REM/EDX Aufnahmen, anhand derer die Bildung der Aluminiumoxidschale nachweisbar ist. Die eingefärbten Bilder stellen die ortsaufgelöste Verteilung der Elemente Eisen (Magenta), Sauerstoff (Grün) und Aluminium (Rot) dar. Alle drei Aufnahmen zeigen annähernd das gleiche Bild, was durch das übereinanderlegen der Bilder der Einzelemente und der Rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme noch verdeutlicht wird. Die Bildung einer geschlossenen Aluminiumoxidschale kann somit anhand dieser Methode bestätigt werden.

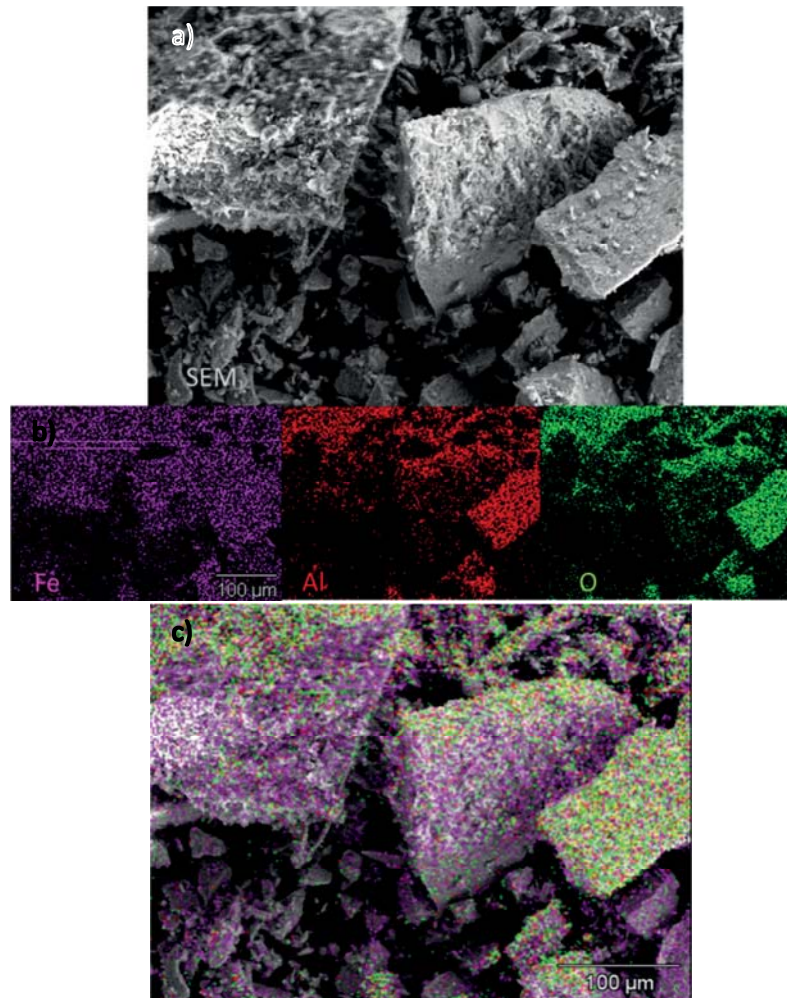


Abb. 42: REM/EDX Aufnahme der Eisenoxid/ Al_2O_3 -Partikel. a) REM-Aufnahme, b) EDX Aufnahme der Elemente Eisen, Aluminium und Sauerstoff, c) Kombination aus a) und b). Die ortsaufgelöste Elementaranalyse ermöglicht die Kontrolle der Syntheschritte; hier beispielhaft die Bildung der Al_2O_3 -Schicht.

Als nächster Syntheseschritt erfolgt die Goldfällung mittels Deposition Precipitation Methode, bei der sich durch anschließende Calcinierung die Goldcluster bilden. Die gebildeten Goldcluster könnten mit einem hochauflösenden Transmissionselektronenmikroskop dargestellt werden, welches allerdings zu diesem Zeitpunkt nicht zur Verfügung stand. Mit Hilfe der REM/EDX Messungen konnte allerdings das Element Gold nachgewiesen werden. In Abb. 43 a) ist erneut die ortsaufgelöste REM/EDX Darstellung zu sehen. Als Elemente sind Aluminium (Rot) und Gold (Hellblau) dargestellt. Abb. 43 b) zeigt das Röntgenspektrum der Probe aus a). Es sind erneut die Elemente Eisen und Sauerstoff aufgrund des magnetischen Kernes, Aluminium aufgrund der Aluminiumoxidschale, aber auch Gold zu finden, so dass auch hier von einer erfolgreichen Synthese ausgegangen werden kann. Der Goldanteil auf der Partikeloberfläche beträgt für dieses Beispiel lediglich 0,35 %, was anhand des Röntgenspektrums bestimmt werden kann. Die hier dargestellten

Katalysatoren wurden bereits in einer Katalyse erfolgreich eingesetzt; aus diesem Grund sind auch die Elemente Kalium und Natrium zu finden, da diese in der Reaktionslösung vorhanden sind und noch auf der Oberfläche adsorbiert vorliegen.

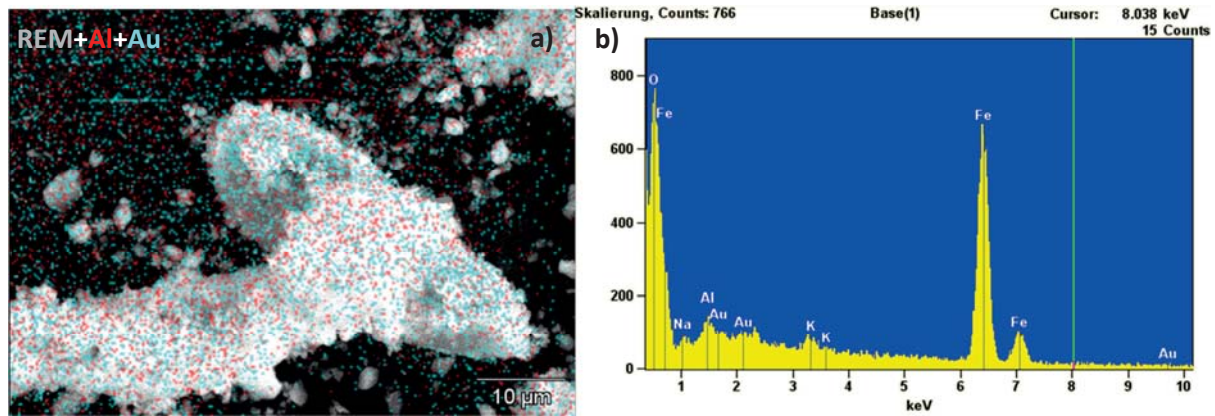


Abb. 43: a) REM-Aufnahme der magnetischen Gold-Katalysatoren nach dem Einsatz in der Katalyse. b) zeigt das Röntgenspektrum der Probe aus a). Es können Signale von Eisen, Sauerstoff, Aluminium, Gold, Kalium und Natrium gefunden werden.

Da die Nutzung des REM eine sehr aufwendige und teure Charakterisierungsmethode ist und so unmöglich nach jeder Synthese neue Proben vorbereitet und untersucht werden konnten, wurde für die Kontrolle der Syntheseschritte noch eine weitere Nachweismethode gesucht. Der Particle Charge Detector (PCD) stellt hierbei eine günstige und schnelle Alternative dar, mit der Oberflächenladungen untersucht werden können. Diese Messungen liefern den Isoelektrischen Punkt (IEP) der Partikel und lassen so einen Schluss auf deren Oberfläche zu. Der IEP der selbstsynthetisierten Magnetpartikel liegt bei $(5,3 \pm 0,1)$ und ist kleiner als der von Magnetit und liegt etwas oberhalb des IEP von Maghemit (siehe Tab. 6). Da Fe_3O_4 -Partikel nicht sehr stabil in Wasser sind, können diese aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit leicht zu Maghemit oxidiert werden.^[63,161,158] Prinzipiell kann davon ausgegangen werden, dass der Isoelektrische Punkt von Metalloxiden der gleichen Kristallstruktur mit der Ladung des Kations abnimmt.^[159] Da in Magnetit Fe^{2+} und Fe^{3+} Oxidationszustände koexistieren und in Maghemit ausschließlich Fe^{3+} -Ionen in der Kristallstruktur vorliegen, nimmt der IEP während der Oxidation von Magnetit zu Maghemit ab. Die synthetisierten Eisenoxidpartikel sind demnach eine Mischphase aus Magnetit und Maghemit wie es bereits in Kap. 2.3.2 diskutiert und hier erneut bestätigt wurde.

Tab. 6: Vergleich der Isoelektrischen Punkte der für diese Arbeit relevanten Stoffe zur Charakterisierung der einzelnen Syntheseschritte:

Stoff	IEP	Literatur
Magnetit (Fe_3O_4)	6,5-6,8	[160,161]
Maghemit (Fe_2O_3)	5,1	[161]
Hämatit (Fe_2O_3)	8,4-8,5	[160]
Aluminiumoxid (Al_2O_3)	9,1	[162,163]
Siliziumdioxid (SiO_2)	2,0-3,0	[164,165]

Die Funktionalisierung der Eisenoxid-Nanopartikel mit anorganischen Verbindungen (wie hier mit Aluminiumoxid) reduziert die Oxidation der Eisenoxide durch Bildung einer Schutzschale erheblich. Neben dem Erhalt der magnetischen Eigenschaft durch Verhinderung der weiteren Oxidation zu Hämatit z.B., wird durch die Funktionalisierung der Partikel die spezifische Eigenschaft der anorganischen Schutzschicht übernommen. Das Al_2O_3 hat den Vorteil, dass auf dessen Oberfläche leicht Goldcluster gebildet werden können.^[166] Bei der Partikelummantelung ist eine strenge pH-Kontrolle notwendig, da die Bildung der Al_2O_3 -Schicht von der Oberflächenladung der Eisenoxide abhängt. Der für die Synthese optimale pH-Wert liegt bei 7,5. Aus Abb. 47 a) wird ersichtlich, dass bei diesem pH die Oberfläche der Eisenoxidpartikel negativ geladen ist. Das Aluminiumnitrat bildet in Lösung partiell hydrolysierte Aluminiumionen, welche über eine hydrolytische Adsorption auf den negativ geladenen Hydroxyl-Gruppen der Eisenoxid-Oberfläche abgeschieden werden.

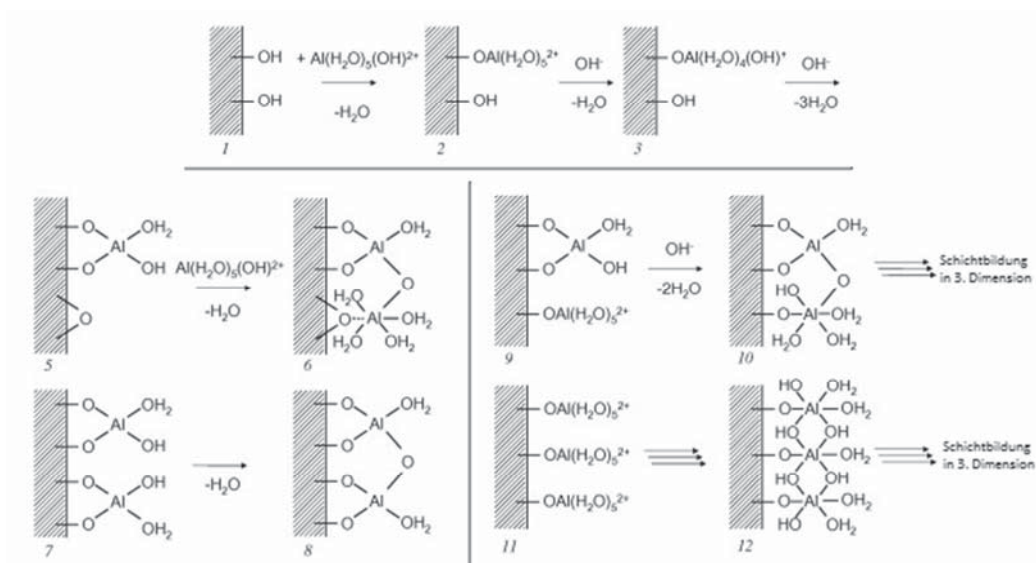


Abb. 44: Schematische Darstellung des Graftings von partiell hydrolysierten Aluminiumionen auf Hydroxyl-Gruppen. Es kommt nach und nach zu einer Akkumulation der verschiedenen Formen an hydrolysierten Aluminiumionen die dann über Kondensationsreaktionen der Hydroxyl-Gruppen ein Netzwerk um die Partikeloberfläche bilden.^[167]

Der Mechanismus der Schalenbildung ist anhand des Beispiels in Abb. 44, eines Aluminiumgraftings einer Silicat-Matrix dargestellt.^[167] Die thermodynamische Betrachtung der Bildung der hydrolysierten Aluminiumionen während der Aluminiumpräzipitation wird sehr ausführlich von Hayden dargestellt und ist gut mit der Darstellung in Abb. 44 vereinbar.^[168] Der anschließende Calciniierungsschritt führt zu einer Diffusion des Aluminiums in die Trägermatrix und einer Oberflächenaggregation zu einer Aluminiumoxid-Schale.^[167]

Nach der Calciniierung verschiebt sich der IEP zu $\text{pH } 9,0 \pm 0,1$, wie es auch anhand der Literatur (siehe Tab. 6) bei Bildung einer geschlossenen Schale zu erwarten war. Unterhalb des IEPs sind die Hydroxylgruppen des Aluminiumoxids protoniert, so dass die Oberflächenladung durch positiv geladene Hydroxylgruppen dominiert wird. Oberhalb des IEPs ergibt sich die negative Ladung der Oberfläche aus der Bildung von $(=\text{Al}-\text{O}^-)$ -Gruppen, die durch Dissoziation der Hydroxylgruppen der Aluminiumoxid-Oberfläche erzeugt werden.^[169] In Abb. 45 ist die Verteilung der Oberflächenladung in Abhängigkeit des pH-Wertes dargestellt. Bei einem pH von etwa 9 entspricht der Anteil der negativ geladenen Oberflächengruppen dem Anteil der positiv geladenen, so dass in Summe die Oberfläche des Partikels ungeladen vorliegt. Dass die selbstsynthetisierten Partikel nach der Calciniierung den erwarteten IEP bei pH 9 besitzen ist ein Hinweis darauf, dass die Al_2O_3 -Schicht komplett geschlossen ist, da sich sonst ein IEP zwischen 5,3 und 9,1 ergeben würde.

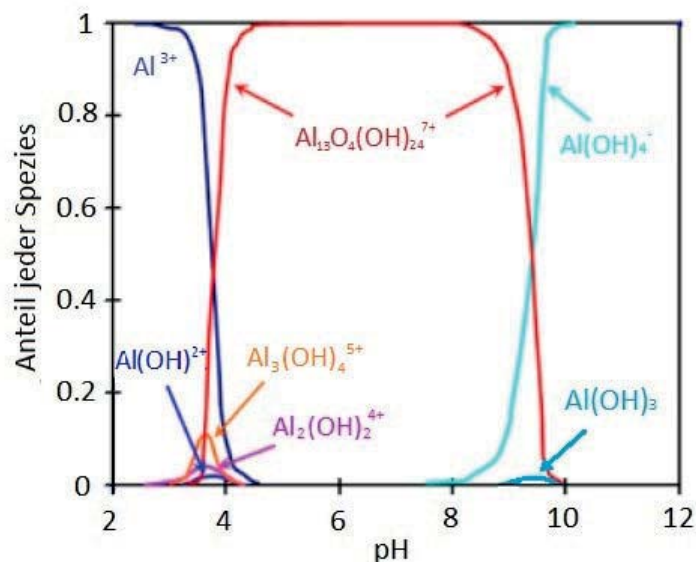


Abb. 45: Ladungsverhalten an der Aluminiumoxid-Wasser Grenzschicht, Anteil der verschiedenen Ladungsspezies in Lösung als Funktion des pH-Wertes für eine 1 M $\text{Al}(\text{III})_{\text{aq}}$ Lösung.^[170]

Durch die Goldfällung, der dritte Syntheseschritt, wurde der IEP von $9,0 \pm 0,1$ zu $4,3 \pm 0,1$ zurück verschoben. Dies ist auf die Citrationen auf der Partikeloberfläche zurückzuführen, die zur Stabilisierung des Goldkolloides auf der Partikeloberfläche koordiniert sind. Die Goldnanopartikel bedecken nicht die komplette Partikeloberfläche. Der hier ermittelte IEP ist der Punkt an dem die Ladung der deprotonierten Citronensäure-Moleküle gerade die Oberflächenladungen der nicht bedeckten Aluminiumoxidschale kompensieren.

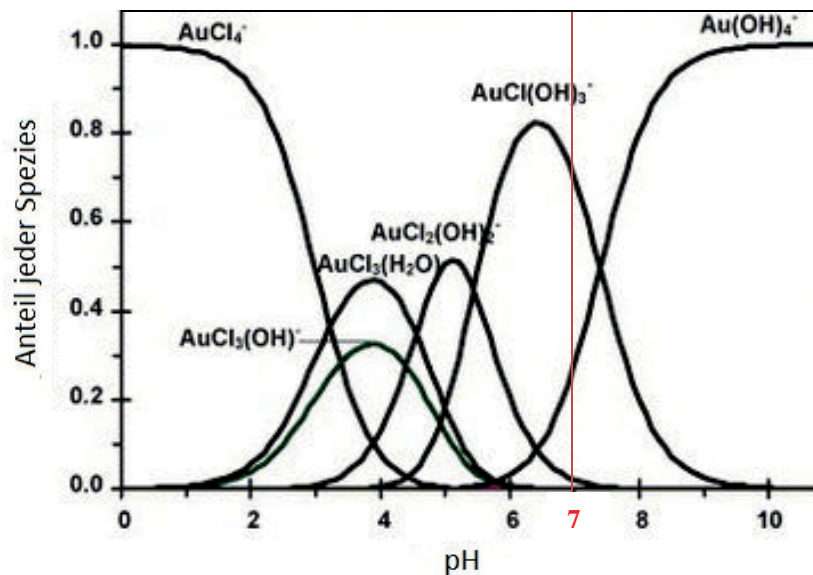


Abb. 46: Relative Konzentration von hydrolysierten Goldsäurekomplexen in Abhängigkeit des pH-Wertes der Lösung,^[171] berechnet mit den Gleichgewichtskonstanten von Nechayev;^[172] zusätzlich markiert ist pH 7 bei dem die Goldfällung durchgeführt wird.

Die Goldnanopartikel werden, wie bereits vorher im Text erwähnt, auf der Al_2O_3 -Schicht mittels der DP-Methode durch Zugabe einer Goldsäure-Lösung abgeschieden. Wie auch bei der Fällungsreaktion des Aluminiumnitrats auf den Eisenoxidpartikeln ist auch hier eine strenge Kontrolle des pH-Wertes notwendig. Das eingesetzte AuCl_4^- ist in Lösung nicht stabil und geht in andere hydrolysierte Goldspezies über. Abb. 46 zeigt die verschiedenen hydrolysierten Spezies die in Abhängigkeit des pH-Wertes aus der Goldsäure entstehen. Prinzipiell lässt sich zusammenfassen, dass mit steigendem pH-Wert die Chloridionen gegen Hydroxyl-Ionen ausgetauscht werden. Bei einem pH-Wert von 7 liegen in erster Linie die Spezies $\text{AuCl}(\text{OH})_3^-$ und $\text{Au}(\text{OH})_4^-$ vor und die Aluminiumoxidoberfläche trägt vorwiegend positive Ladungen. Die erste Wechselwirkung zwischen Träger und abzuscheidendem Ion ist demnach elektrostatisch.^[131] Im Anschluss reagieren die verschiedenen Goldspezies mit den OH-Gruppen der Aluminiumoxidoberfläche unter Austausch eines Cl^- -Ions oder einer OH-Gruppe.^[172,173] Um nun eine möglichst hohe Beladung zu erzielen, sollte der pH-Wert so eingestellt werden, dass die Spezies mit der höchsten Affinität vorliegt. Laut Lee et al. besitzt

$\text{AuCl}(\text{OH})_3^-$ die höchste Affinität und zeigt gemäß Abb. 46 ein Maximum bei pH 6-6,5.^[174] Die Fällung erfolgt allerdings nicht in diesem pH-Bereich, da hier auch $\text{AuCl}_2(\text{OH})_2^-$ Spezies vorliegen. Der Cl^- -Anteil sollte beim Calcinieren so gering wie möglich gehalten werden, da Cl^- -Ionen beim Calcinieren zur Bildung größerer Goldcluster führt. Auch freies Chlorid, das auf dem Träger adsorbiert, zeigt bei späterer Calcinierung hohe Mobilität und kann erneut eine Bindung mit Au eingehen.^[175] Es entstehen Au-Cl-Au Brücken-Bindungen, die zu großen Goldclustern mit geringer bis keiner Aktivität führen.^[176] Aus diesem Grund ist auch der Waschschrift vor der Calcinierung wichtig für eine optimale Katalysatorsynthese. Als Kompromiss zwischen hoher Affinität (hohe Goldbeladungen) und geringem Chlorid-Anteil (kleine Gold-Partikeldurchmesser) wird die Fällung bei einem pH von 7 durchgeführt. Die Zugabe von Citrat soll während der Calcinierung zu kleineren Goldpartikeln führen und damit die Aktivität steigern, da während der Calcinierung die thermische Zersetzung der Gold-Hydroxid-Ionen früher stattfindet als die Desorption und Veraschung des Citrats.^[177] Des Weiteren wird vermutet, dass die Citrat-Ionen mit den Chlorid-Ionen konkurrieren und so der Chlorid-Anteil bei der Calcinierung weiter reduziert wird.^[178] Auch wenn der genaue Wirkmechanismus des Citrates noch nicht abschließend geklärt wurde, konnte bei verschiedenen Synthesen durch Zugabe des Citrates eine Steigerung der Aktivität erzielt werden.^[144]

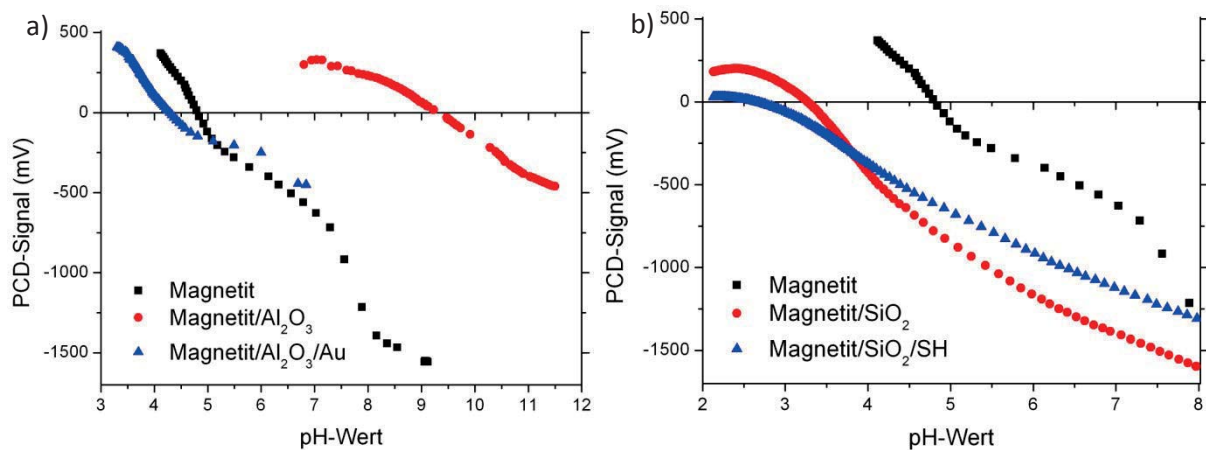


Abb. 47: PCD-Potential der a) Synthese mit Aluminiumoxid und b) der Silicat-Synthese. Die Veränderung der Partikeloberfläche lässt sich anhand der Verschiebung des IEP beobachten.



3.4 Katalytische Aktivität

3.4.1 Vergleich der magnetischen Katalysatoren

Nach der erfolgreichen Synthese der beiden magnetischen Partikelsysteme wurden diese in ersten Versuchen für die Umsetzung von Glucose zu Gluconsäure eingesetzt. Diese Versuche wurden im kleinen Maßstab in einem Rührgefäß mit Titration und Eintrag von Druckluft untersucht (Reaktionsbedingungen siehe Anhang C 2.2). Während der Reaktion würde durch die Bildung der Gluconsäure der pH-Wert kontinuierlich absinken. Dies wird durch die Zugabe von Natronlauge verhindert und somit der pH-Wert konstant gehalten. Damit ist die Menge an zutitrierter Natronlauge äquivalent zu der Menge an gebildetem Produkt, solange keine Nebenprodukte, die den pH-Wert beeinflussen, entstehen. Die Titrationskurven für die beiden magnetischen Partikelsysteme sind Abb. 48 zu entnehmen.

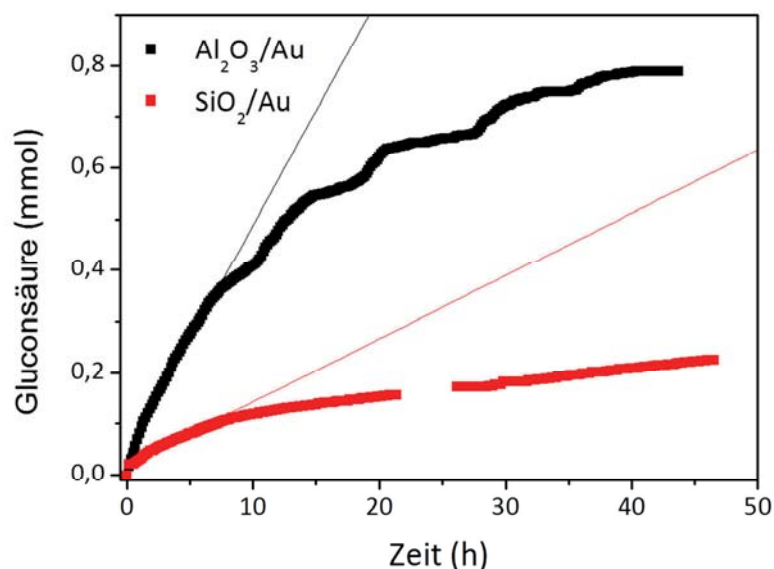


Abb. 48: Vergleich der Titrationskurven der magnetischen Al₂O₃/Au und SiO₂/Au Partikel. Die katalytische Umsetzung erfolgte bei 40 °C, pH 9. Die Partikel (1 g/L) wurden in 50 ml einer 100 mM Glucoselösung suspendiert. Die verwendeten Al₂O₃/Au-Partikel zeigen eine 4-fach höhere Aktivität als die SiO₂/Au-Partikel.

Zur Quantifizierung der gebundenen Menge an Goldkolloid wurde versucht, die Konzentration der Partikellösung anhand der Oberflächenplasmonresonanz des Goldkolloides zu quantifizieren. Nach der Inkubation der magnetischen Partikel in der Goldkolloid-Lösung konnte im UV/Vis-Spektrum keine Abnahme der Bande beobachtet werden. Eine Quantifizierung war demnach nicht möglich.

Da nicht bekannt ist, wie viel Gold sich tatsächlich auf der Partikeloberfläche befindet, wurde zum direkten Vergleich der beiden Katalysen die gleiche Partikelmenge eingesetzt (1 g/L).

Mit einem Glucose-Umsatz von 0,012 mmol/h für die SiO₂/Au-Partikel und 0,045 mmol/h für die Al₂O₃/Au-Partikel zeigten die magnetischen Goldkatalysatoren nicht die erhofften und aus der Literatur bekannten Aktivitäten für die Glucoseoxidation. Die Reaktion scheint nur sehr langsam abzulaufen und es entstanden die von Önal beschriebenen Nebenprodukte aus der Zuckerumlagerung, die in Abb. 50 noch einmal graphisch dargestellt sind. Durch HPLC-Analytik des Produktgemisches kann bestimmt werden, welche Nebenprodukte das Ergebnis eventuell verfälschen. Abb. 49 zeigt das Chromatogramm der ersten Charge von magnetischen Al₂O₃-Goldkatalysatoren.

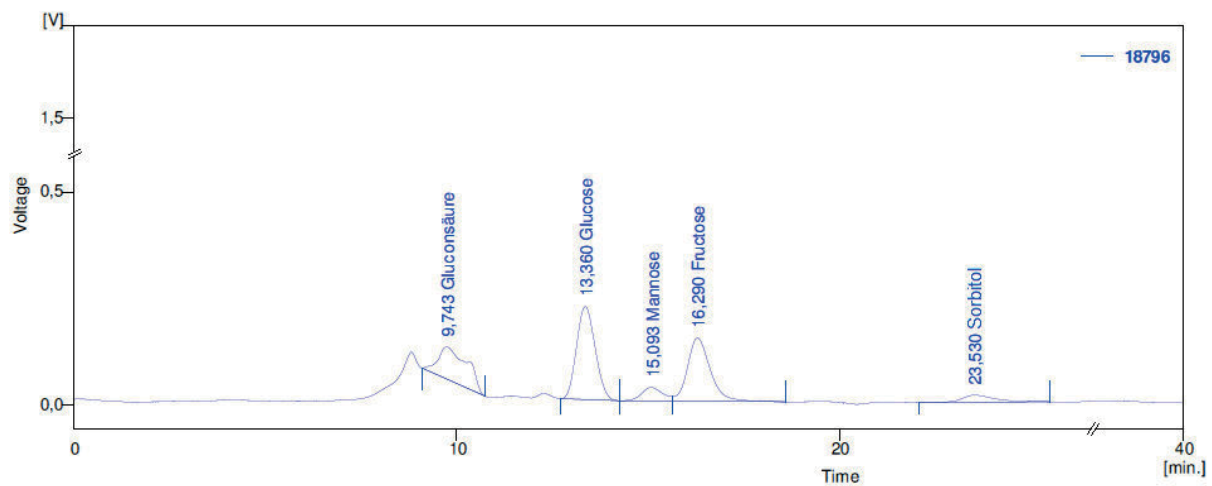


Abb. 49: Chromatogramm der Goldkatalyse mit der ersten Charge Goldkatalysatoren auf magnetischem Aluminiumoxid. Neben der eingesetzten Glucose sind außerdem Mannose, Fructose und Sorbitol aus Umlagerungsreaktionen des Zuckers im alkalischen Medium zu finden.

Vor Beginn der Katalyse ist lediglich ein großer Glucose Peak bei 13,3 min und ein kleiner Puffer-Peak bei 8,6 min zu sehen. Nach 24 h hat sich die Glucose Konzentration um etwa 10 % verringert und der Peak für Fructose erscheint bei 16,3 min. Außerdem erhält der Puffer-Peak eine leichte Flanke, die ein Hinweis auf Gluconsäure sein könnte. Nach 120 h ist der Glucose Peak auf etwa 45 % gesunken. Der Fructose-Peak hat deutlich zugenommen und Mannose bei 15,1 min ist erstmals nachweisbar. Der Puffer-Peak bleibt erhalten; allerdings ist ein zusätzlicher Peak bei 9,3 min erschienen. Nach 240 min (siehe Abb. 49) sind noch etwa 30 % Restglucose vorhanden sowie die dargestellten Nebenprodukte Mannose, Fructose und auch Sorbitol. Der Peak zwischen Puffer und Glucose hat sich leicht verschoben und besitzt nun ebenfalls eine Flanke (eventuell Mannonsäure). Die verwendete Säule zur Analyse der verschiedenen Zucker kann organische Säuren nicht auftrennen. Um also die entstandene Gluconsäure quantifizieren zu können, muss eine andere HPLC-Säule eingesetzt werden, sprich zur Quantifizierung der Glucoseabnahme und der Gluconsäurezunahme muss eine Probe zweifach vermessen werden. Diese ausführlichere Analytik wurde erst zur

Charakterisierung der Partikel nach Optimierung der Synthese vorgenommen (siehe Kap. 3.4.2), die Methoden sind dem Anhang B 2.1 und Anhang B 2.2 zu entnehmen.

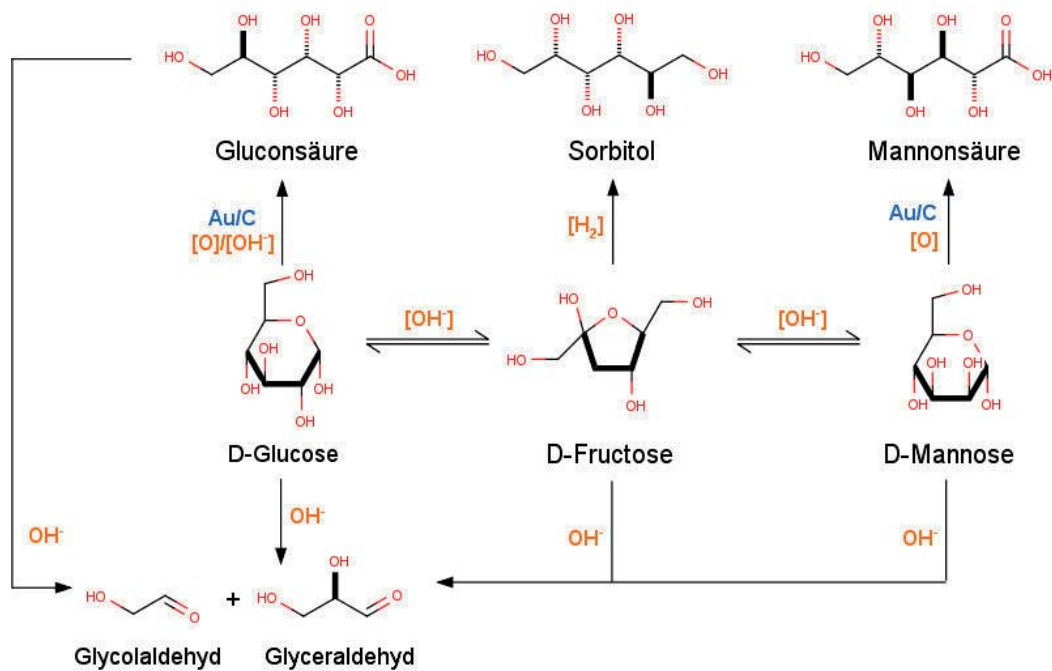


Abb. 50: Mögliche Produkte der Goldkatalyse nach Önal:^[137] Neben dem Hauptprodukt der Gluconsäure können auch noch andere ungewünschte Nebenprodukte auftreten. Hier dargestellt sind Zucker die aus Umlagerungsreaktionen der Glucose in alkalischem Medium entstehen.

Um prinzipielle Fehler in den Synthesen auszuschließen und die Problematik besser einzugrenzen und zu verstehen, wurde zunächst für die Silicat-Partikel untersucht, ob die verwendeten kommerziellen Goldnanopartikel überhaupt Aktivität zeigen. Gemäß den Studien von Rossi et al. ist die Aktivität der Goldpartikel unabhängig vom Trägermaterial,^[138] d.h. zeigt das reine Goldkolloid eine Aktivität für die Glucoseoxidation, die deutlich höher ist als bei den Immobilisierten Goldclustern, muss es einen Fehler in der Synthese der Kompositpartikel selbst geben, der die Katalysatoren inaktiviert. Der Verlauf der Katalyse des reinen Goldkolloides ist in Abb. 51 dargestellt. Anhand der Darstellung kann eine spezifische Aktivität des Goldkolloides von 4,17 mmol/(min · g_{gold}) und ein Glucose-Umsatz von 0,02 mmol/h bestimmt werden. Mirescu^[157] untersuchte die Aktivität von Goldkolloiden, die mit unterschiedlichen Polymeren in Lösung stabilisiert wurden. Einige zeigten keine Aktivität; die katalytisch aktiven Kolloide zeigten spezifische Aktivitäten zwischen 4,3 und 13,3 mmol/(min · g_{gold}). Das eingesetzte Kolloid liegt somit sogar leicht unterhalb der beschriebenen Aktivitäten. Durch die Zugrundelegung der Ergebnisse aus der Katalyse des reinen Goldkolloides und unter Annahme, dass die Aktivität durch die Immobilisierung nicht

beeinflusst wird, wie es auch in der Literatur beschrieben ist, kann die Beladung der Silicat-Partikel mit dem Goldkolloid zu 1,6 mg/g berechnet werden. Unter Berücksichtigung der zur Verfügung stehenden Trägeroberfläche, der Materialdichten und des Goldkolloiddurchmessers wird eine maximal mögliche Beladung der eingesetzten Silicat-Träger von 11,7 mg/g berechnet. Die Oberfläche der Träger ist somit etwa zu 14 % mit Goldkolloiden bedeckt. Die Erhöhung der Thiol-Gruppen-Dichte auf der Oberfläche könnte somit eine Erhöhung der Partikelaktivität bewirken. Um jedoch eine zu biotechnologischen Methoden konkurrenzfähige Aktivität zu erreichen, sollte das zu immobilisierende Goldkolloid selbst eine höhere Aktivität aufweisen.

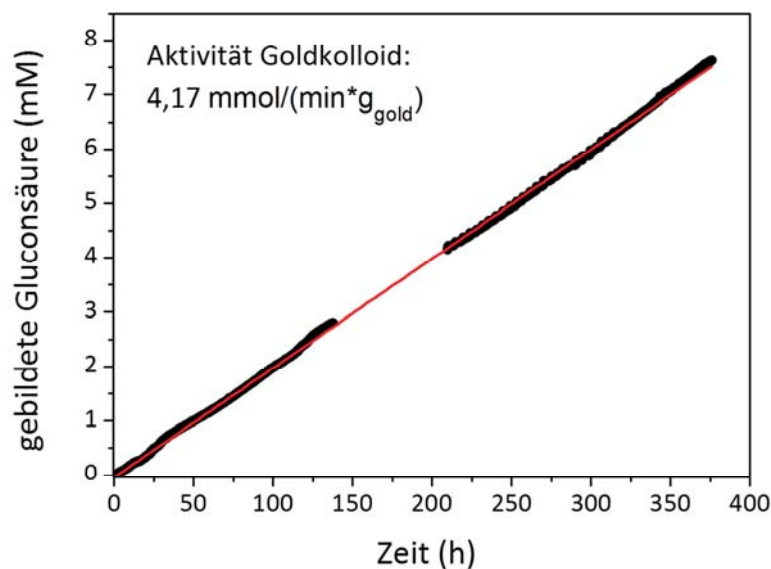


Abb. 51: Titrationskurve der Glucoseoxidation mit 0,08 mg Goldkolloid. Das Gold hat einen Partikeldurchmesser von 5 nm und ist mit Citrat und Natriumazid in Lösung stabilisiert. Die Titration zeigt einen linearen Verlauf und eine errechnete Aktivität von $4,17 \text{ mmol}/(\text{min} \cdot \text{g}_{\text{Gold}})$.^[179]

Da es sich bei den kommerziellen Goldpartikeln um Partikel mit einem Durchmesser von 5 nm handelt und die Partikelaktivität sowohl in Gasphasenreaktionen^[134] als auch in Flüssigphasenreaktionen^[138,144] stark abhängig von der Partikelgröße ist, ist die Verwendung von kleineren Goldkolloiden ein Ansatz zur Steigerung der Partikelaktivität. Hierzu wurde die Aktivität von kleineren Goldpartikeln (Durchmesser kleiner 1 nm) untersucht, die von der Arbeitsgruppe Biophysik und medizinische Physik (Prof. Schünemann) durch Herrn Heming Huang zur Verfügung gestellt wurden. Das kommerzielle Goldkolloid besitzt eine in Lösung stabilisierende Citrat- und Natriumazid-Schicht; die Partikel der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Schünemann sind mit Hilfe einer BSA-Schicht in Lösung stabilisiert. Um die Versuche parallel durchführen zu können wurden die Katalysen in Falcons angesetzt. Die genauen



Reaktionsbedingungen sind dem Anhang C 2.1 zu entnehmen. Durch die Verwendung der Falcons kann keine pH-Kontrolle und auch keine Sauerstoffzufuhr gewährleistet werden. Die Ergebnisse der einzelnen Versuche sind in Abb. 52 dargestellt. Die Au-BSA-Partikel zeigen das Potenzial zur katalytischen Umsetzung von Glucose zu Gluconsäure (siehe Abb. 52). Allerdings wurde neben der Zielkomponente eine weitere Säure im Überstand ermittelt, die vermutlich Glucuronsäure ist. Hierzu wurden Standards der Glucuronsäure als Vergleich herangezogen. Aber nicht nur die Selektivität reduziert sich, auch der Glucose-Umsatz konnte nur unwesentlich gesteigert werden. Grund für die geringe katalytische Aktivität und auch für den Selektivitätsverlust könnten die auf der Goldoberfläche koordinierten Moleküle bzw. das BSA sein. Da die magnetischen Partikel mit der Al_2O_3 -Schicht höhere Aktivitäten zeigten und auch aus der Literatur bekannt ist, dass höhere Aktivitäten realisierbar sind, wurde im Folgenden eine Optimierung der Synthesevorschrift auf Aluminiumgranulaten durchgeführt.

3.4.2 Syntheseoptimierung auf Al₂O₃-Trägermaterial

Die geringen Aktivitäten der magnetischen Al₂O₃-Partikel erforderten eine Optimierung der Reaktionsbedingungen. Hierzu wurde die Goldfällung zunächst auf unmagnetischen Granulaten durchgeführt. Diese Versuche sollten das Verständnis für die Fällungsreaktion steigern und mittels Screening die Partikelsysteme mit der höchsten Aktivität identifizieren. Die optimierten Reaktionsbedingungen sollten dann erneut auf die magnetischen Systeme übertragen werden.

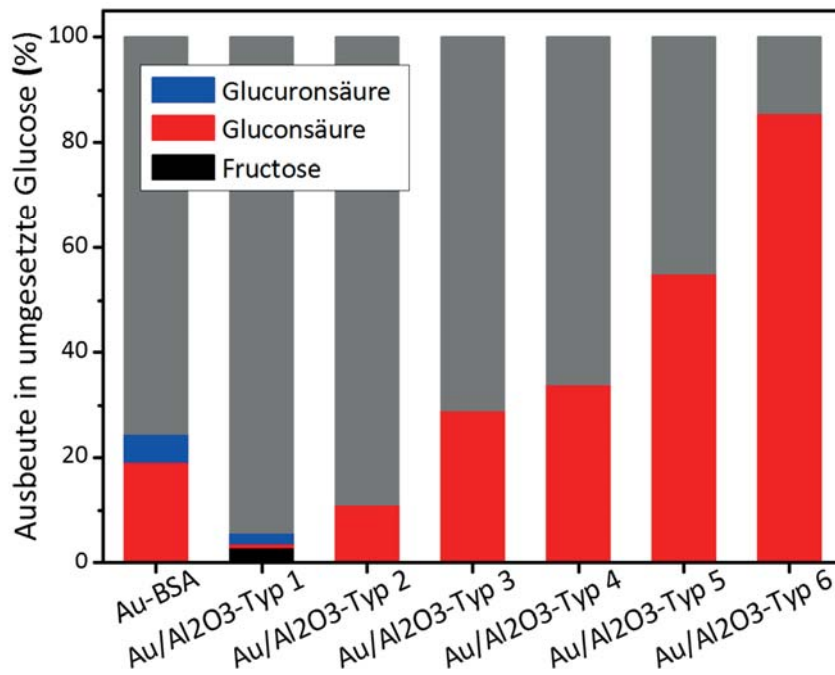


Abb. 52: Vergleich der Selektivitäten der Goldkatalysatoren Au/Al₂O₃ nach 92,5 h und Au-BSA nach 141 h (40 °C, 75 rpm, c_{Glucose} = 100 mmol/L, c_{Au/Al₂O₃} = 1 g/L, Typen 1-6 sind 0,58; 2,9; 5,8; 8,7; 11,6 und 17,4 mg_{Au}/g_{Al₂O₃}, c_{Au-Colloid} = 0,92 mg_{Au}/L).^[179] Mit steigendem Goldgehalt bei der Fällungsreaktion steigt auch die Ausbeute an Produkt und damit die Katalysatoraktivität.

In mehreren parallelen Synthesen wurde die Menge der zugegebenen Goldsäurelösung sukzessive erhöht (Typ 1 bis 8 Reaktionsbedingungen siehe Anhang A 6). Bei diesen Synthesen wurde nun genau darauf geachtet, dass nach der Fällung des Goldes die Partikel gründlich mit mehreren Waschschritten vom störenden Chlorid befreit werden. Außerdem wurde der Calcinierungsschritt in einem Trockenschrank durchgeführt, der im Gegensatz zu dem zunächst verwendeten Muffelofen für den benötigten Temperaturbereich (200 °C) besser geeignet und einstellbar war. Die Untersuchungen zu den Aktivitäten dieser neuen Partikelchargen wurden erneut in Falcons durchgeführt, um einen höheren Probendurchsatz zu ermöglichen. Die für die Ansätze Typ 1 bis Typ 6 gebildete Menge Gluconsäure ist in

Abb. 52 zu sehen. Die Selektivität und Aktivität der Au/Al₂O₃ des Typs 6 ist in diesem Versuch am höchsten. Bei Typ 1 wurde nur sehr wenig Gold eingesetzt, so dass auch nur wenige Goldpartikel auf der Oberfläche gebildet wurden. Dies führt zu einer geringeren Aktivität und Reaktionsgeschwindigkeit, was wiederum die GS-Selektivität beeinflusst, wobei die Nebenprodukte Fructose und eine weitere nicht näher definierte Säure (eventuell Glucuronsäure) entstehen. Daneben zeigen die Typen 2 bis 6 100 % GS-Selektivität, da keine Nebenprodukte gebildet wurden. Allerdings ist zu beachten, dass ein Großteil der Glucose nicht wiedergefunden werden konnte, was auf Kontaminationen durch Mikroorganismen zu erklären wäre. Bei zunehmender Goldsäuremenge steigt die Anzahl an Goldnanopartikeln (< 10 nm) auf der Trägeroberfläche, welche die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmen und was wiederum die kontinuierliche Zunahme der Produktausbeute erklärt. Der folgende Syntheseansatz sollte klären, ob eine weitere Erhöhung der Goldmenge die spezifische Aktivität der Partikelsysteme noch weiter steigern kann. Außerdem sollte durch Erhöhung der Katalysator-Konzentration „ci“ die Reaktionsgeschwindigkeit ebenfalls gesteigert werden. Die Ergebnisse aus den vergleichenden Versuchen der Partikel des Typs 6, 7 und 8 sind in Abb. 53 dargestellt.

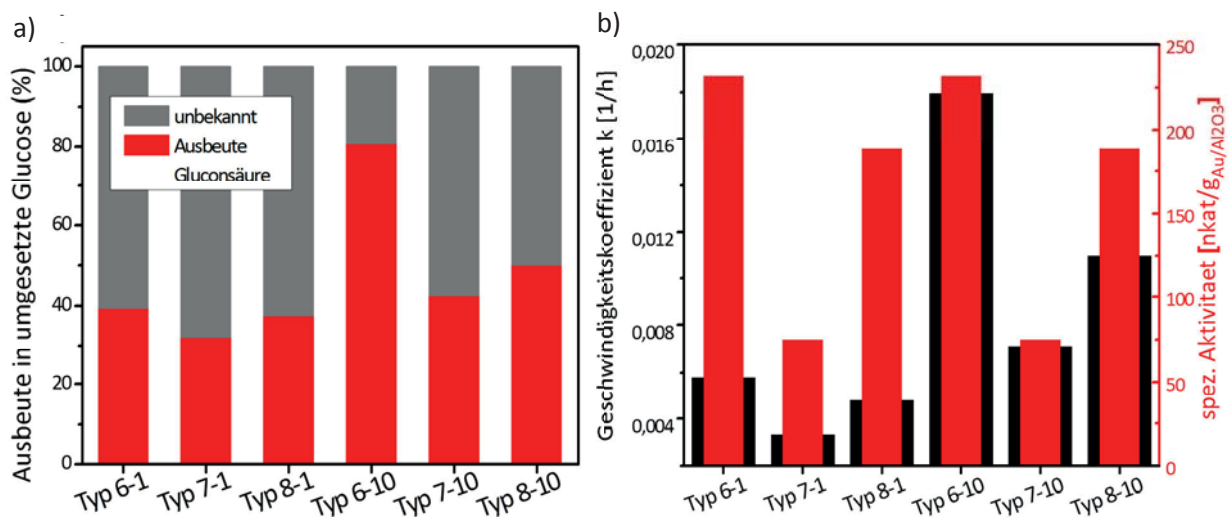


Abb. 53: a) Der maximale Gluconsäure-Umsatz von Typ X-1 und X-10 nach 53 h; b) Korrelation von Aktivität und Geschwindigkeitskoeffizient zwischen Typ X-1 und Typ X-10.^[179]

Im Hinblick auf die gebildete Menge Gluconsäure, kann durch die Erhöhung der Menge an Goldsäure während der Synthese keine weitere Steigerung der Katalysatoraktivität erreicht werden, sie nimmt sogar ab. Grund hierfür könnte eine Überfrachtung der Trägeroberfläche mit Gold sein, was während der Calcinierung zur Bildung großer Goldpartikel (>10 nm) führen könnte, die an der Katalyse nicht teilnehmen. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Baatz^[144] und Mirescu^[157] gemacht. Die Konzentrationsoptima variieren jedoch, da diese

stark abhängig von der Morphologie sprich der Korngröße und Porengrößenverteilung des Trägermaterials sind. Dies konnte anhand des folgenden Versuches deutlich gemacht werden. Das zuvor verwendete Granulat der Firma Süd-Chemie (jetzt Clariant) wurde mit einem Mörser zerkleinert, so dass das gleiche Trägermaterial einmal in granulierter und einmal in Pulverform vorlag. Beide Träger wurden mit der optimierten Fällungsmethode mit Gold versehen und anschließend mittels REM und EDX charakterisiert (siehe Abb. 54).

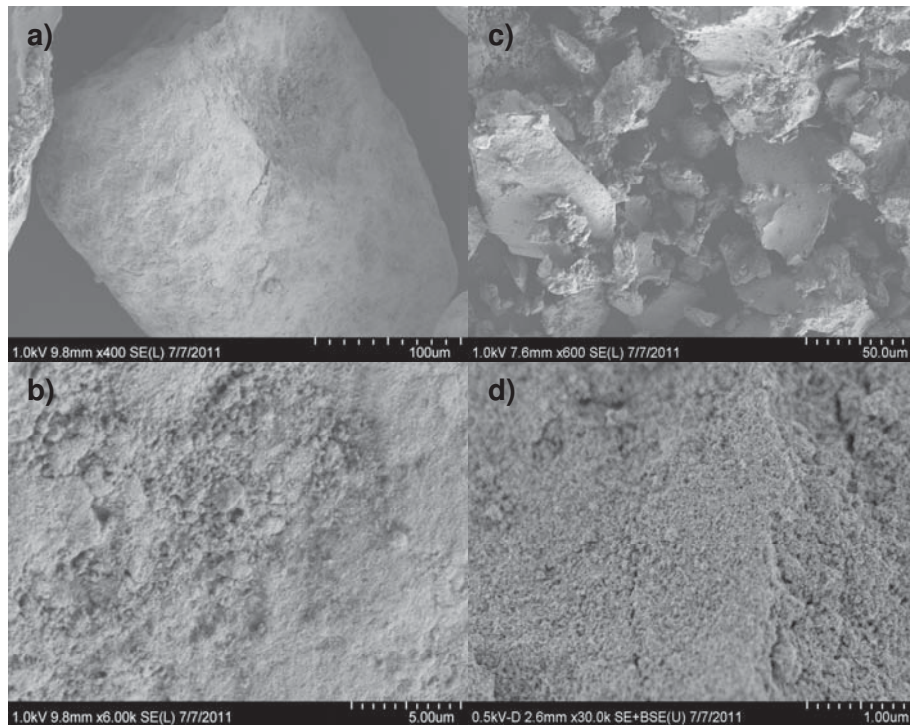


Abb. 54: REM Aufnahmen der granulierten a) + b) und pulverförmige c) + d) Trägermaterialien.^[179]

Die Partikelgrößen wurden mikroskopisch bestimmt. Der Durchmesser der Granulate liegt zwischen 218 μm und 491 μm , der des gemörserten Granulats zwischen 73 μm und 194 μm . Abb. 54 a) bis d) zeigt rasterelektronenmikroskopische Darstellungen der Granulatpartikel (a und b) und der zerkleinerten Al_2O_3 -Partikel (c und d). Die vergrößerte Aufnahme der Partikeloberfläche des Granulats stellt eine inhomogene poröse Oberfläche mit einer Porengröße von 0,1-1,5 μm dar (siehe Abb. 54 b). Im Gegensatz dazu zeigen die feinen $\text{Au}/\text{Al}_2\text{O}_3$ -Trümmer eine relativ homogene poröse Oberfläche mit 0,01-0,1 μm Porendurchmesser (siehe Abb. 54 d). Durch das Mörsern bilden sich Trümmer aus den Granulaten, die aufgrund von Reibungseffekten eine homogenere feinporige Oberfläche erhalten. Anhand der Röntgenspektren der EDX-Aufnahmen werden die Goldgehalte der granulierten und pulverförmigen Katalysatoren zu 1,37 % und 1,03 % bestimmt.

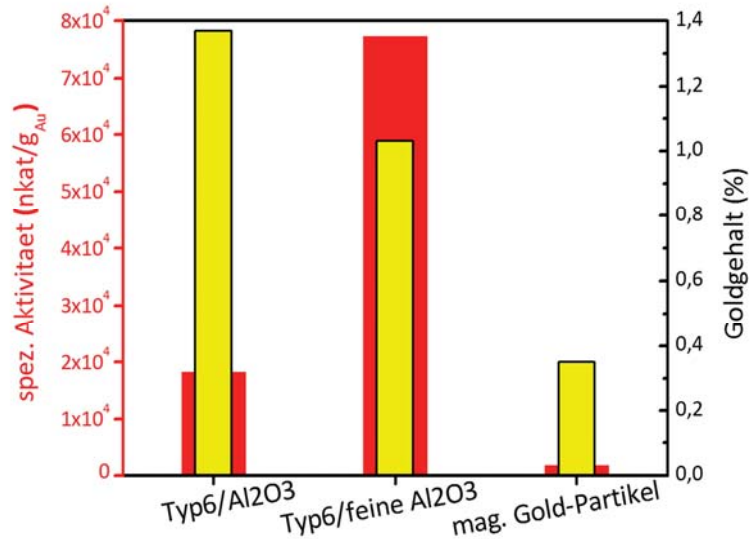


Abb. 55: Korrelation des tatsächlichen Goldgehalts (gelb) und der Aktivität (rot) von Au/Al₂O₃-Typ 6 und den magnetisierbaren Goldpartikeln (40 °C, 75 rpm, c_{Glucose} = 100 mM, c_{Katalysator} = 10 g/L und c_{Katalysator magn.} = 1 g/L).^[179]

Der Goldgehalt des granulierten Partikelsystems (1,37 %) ist höher als der des feinen Trägers (1,03 %), dennoch ist die Aktivität des pulverförmigen Katalysators 4-fach höher als die des granulierten (s. Abb. 55). Durch die feinere Morphologie des Trägers wird während der Fällungsreaktion eine größere Partikeloberfläche dem Gold zur Verfügung gestellt. Wie bereits bei den Versuchen zur optimalen Goldmenge herausgearbeitet, führt eine zu hohe Beladung der Oberfläche mit Gold zu größeren Goldclustern, die eine geringere Aktivität zeigen. Die Färbung der Katalysatoren weist im Falle der Granulate auf größere Cluster hin, da sich die Resonanzfrequenz der Oberflächenplasmonen und damit die Partikelfärbung mit größerem Partikeldurchmesser von Pink zu Violett verschiebt, wie es auch in Abb. 124 zu sehen ist. Damit lässt sich zusammenfassen, dass eine feinere Trägermorphologie zu aktiveren Katalysatoren führt, allerdings gleichzeitig die Rückgewinnung der Träger über Filtration erschwert wird. Um nun die Aktivität noch weiter zu steigern, werden die pulverförmigen Katalysatoren aus dem kleinen Maßstab in einen größeren überführt, in dem die Reaktionsbedingungen wie Begasungsrate und pH-Kontrolle besser beeinflusst werden können.

3.4.3 Reaktionsverlauf im 500 ml Maßstab

Im nächstgrößeren Maßstab wird die Reaktion mit Hilfe eines Dosimaten auf einem konstanten pH-Wert gehalten und durch Einleitung von Druckluft die Sauerstoffzufuhr gewährleistet (Aufbau siehe Anhang C 2.3). In Abb. 56 ist die Glucose-Abnahme und die Gluconsäure-Zunahme während der Katalyse dargestellt. Die einzelnen Messwerte wurden mittels HPLC analysiert (Methoden siehe Anhang B 2.1 und Anhang B 2.2). Nach etwa 200 min wurde die komplette Glucose zu Gluconsäure umgesetzt und es konnten keine Nebenprodukte in den HPLC-Chromatogrammen nachgewiesen werden. Die 100 % ige Selektivität zu Gluconsäure spiegelt sich auch in den bestimmten Geschwindigkeitskoeffizienten wieder.

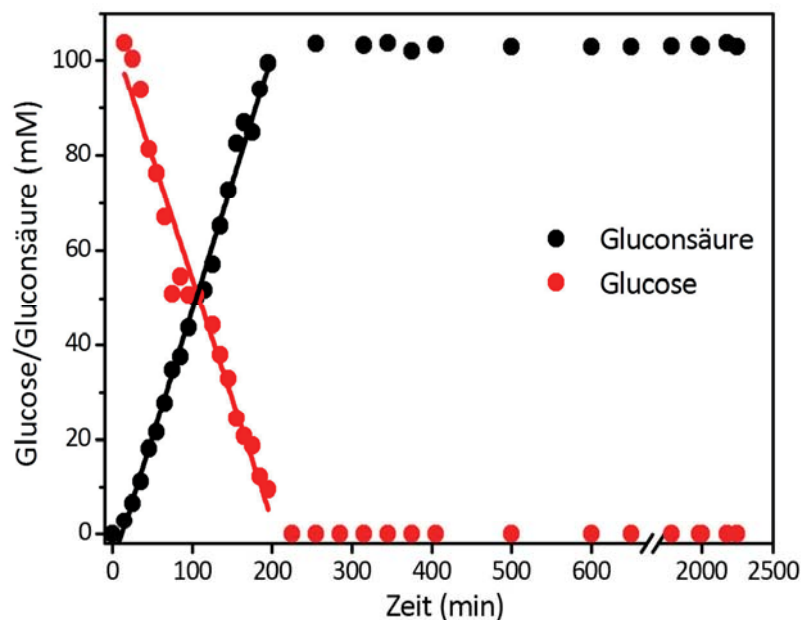


Abb. 56: Verlauf des Glucose-Abbaus und der Gluconsäure-Bildung im 500 ml Maßstab. Die Reaktion wurde mit den unmagnetischen Goldkatalysatoren (4 g/L und 100 mM Glucose) durchgeführt. Anhand der eingezeichneten Geraden wurden die Geschwindigkeitskoeffizienten der Teilreaktionen bestimmt.^[179]

Die anhand der Steigung in Abb. 56 bestimmten Koeffizienten sind mit $0,51 \pm 0,03 \text{ mmol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ für die Glucoseabnahme und $0,54 \pm 0,01 \text{ mmol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ für die Gluconsäurezunahme fast identisch. Somit wird mit der gleichen Geschwindigkeit Gluconsäure gebildet, mit der auch Glucose abgebaut wird. Die leichten Abweichungen sind auf Mess- und Auswertungenauigkeiten zurückzuführen. Anhand der Geschwindigkeitskoeffizienten wurde auch für diese Versuche die spezifische Aktivität der Katalysatoren bei konstanter Umgebungsbedingung berechnet (siehe Abb. 57). Dass die pH-Kontrolle ein

entscheidender Faktor für die katalytische Umsetzung ist, kann Abb. 57 entnommen werden. Bei einem der Versuche ist die pH-Kontrolle ausgefallen und somit lagen keine optimalen Reaktionsbedingungen vor. Durch die durchgängige pH-Kontrolle konnte eine Steigerung der Katalysatoraktivität von ca. 500 nkat/g_{Au} erzielt werden. Der alkalische pH-Wert verschiebt das Reaktionsgleichgewicht in Richtung des Produktes (der Zuckersäure). Bei der Wahl des pH-Wertes muss allerdings auch die Nebenreaktion der Zuckerumlagerung berücksichtigt werden (siehe Abb. 50), denn je alkalischer das Reaktionsmedium, desto schneller die Nebenreaktion zu D-Fructose und D-Mannose.^[180] Untersuchungen zum optimalen pH-Wert wurden von Baatz und Mirescu durchgeführt, die diesen Versuchen als Grundlage dienten. Dort wurde für die Oxidationsreaktion als optimale Reaktionsbedingung ein pH-Wert von 9 identifiziert und auch in folgenden Versuchen so eingesetzt.

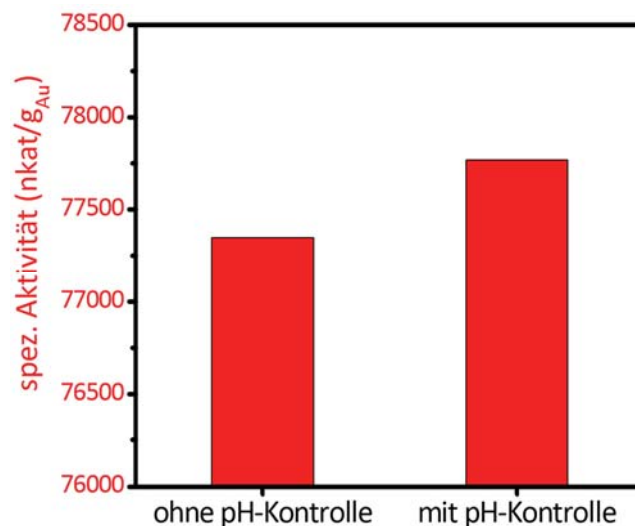


Abb. 57: Abhängigkeit der Aktivität des 1,03 % Au/Al₂O₃-Katalysators von dem Umgebungs-pH für die Oxidation von Glucose (pH 9, 40 °C, c_{Glucose} = 100 mM, c_{katalysator} = 1 g/L, mit/ohne Titration).^[179]

Wie bereits in Kap 3.2.3 erwähnt, gibt die Reaktionsordnung Aufschluss über den Reaktionsmechanismus. Abb. 58 zeigt die Selektivität und Aktivität in Abhängigkeit von der Anfangssubstratkonzentration. In diesen Versuchen hat die Glucosekonzentration keinen Einfluss auf die GS-Selektivität, die mit steigender Glucosekonzentration 100 % beibehält. Im Konzentrationsbereich bis 250 mmol/L liegt eine Reaktionsordnung von 1,0 vor. Für höhere Konzentrationen nähert sich die Reaktionsordnung immer mehr dem Wert null an. Im hier untersuchten Konzentrationsbereich von 250 mmol/L bis 1000 mmol/L wurde mittels Differentialmethode eine Reaktionsordnung von $n = 0,06$ bestimmt. Für den gesamten Konzentrationsbereich wurde eine Reaktionsordnung von $n = 0,32$ ermittelt. Die Differential-

methode sowie die dazugehörige Auswertung, sind im Anhang B 8.1 näher erläutert. Ähnliche Ergebnisse bezüglich der Reaktionsordnung sind von Baatz^[144] beschrieben. Hier wird ebenfalls von einer mit steigender Glucosekonzentration abnehmenden Reaktionsordnung berichtet. Für den gesamten Konzentrationsbereich bis 1000 mmol/L wurde mittels Differentialmethode eine Reaktionsordnung von 0,5 ermittelt. Die Abnahme der Reaktionsordnung über den gesamten Konzentrationsbereich deutet auf eine Adsorption der Glucose auf der Katalysatoroberfläche hin, wie es auch für den Mechanismus der oxidativen Dehydrogenierung (siehe Kap. 3.2.3) postuliert ist.

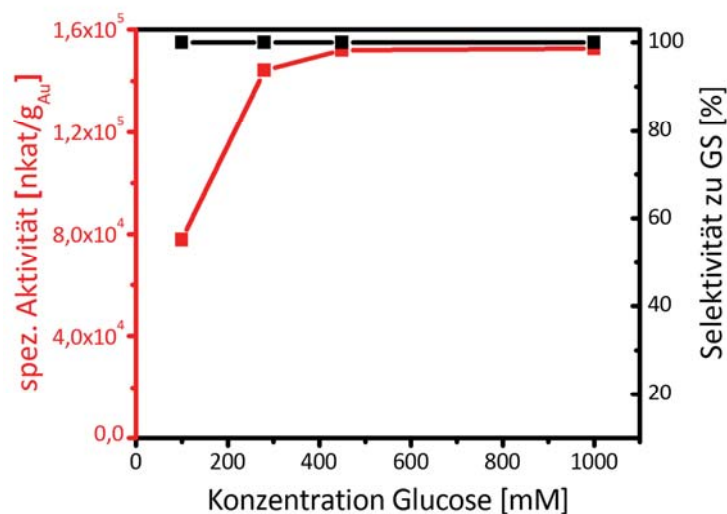


Abb. 58: Aktivität und Selektivität zu GS des 1,03 % Au/Al₂O₃-Katalysators (40 °C, pH 9, c_G = 100 mM, c_{Au} = 10 g/L, magn. Rühren und Luftzufuhr).^[179] Die Selektivität des Katalysators ist über den gesamten Konzentrationsbereich bei 100 %, die Aktivität geht mit steigender Substratkonzentration in Sättigung über.

Die hier vorgestellten Ergebnisse wurden alle in einem kleinen Reaktor durchgeführt, der keine geregelte bzw. überwachte Sauerstoffzufuhr besitzt. Es kann also bei diesen Systemen zu einer Sauerstofflimitierung, besonders im hohen Glucosekonzentrationsbereich und damit zu einer Vergiftung des Katalysators kommen. Die auf der Oberfläche adsorbierten Wasserstoffionen blockieren nach und nach immer mehr aktive Zentren (vergleiche Abb. 34), so dass keine Adsorptionsplätze für die Glucose vorhanden sind und die Aktivität des Katalysators abnimmt. Um diesem Effekt entgegenzuwirken, wird der Reaktionsansatz im Folgenden vergrößert und in eine 1 L Reaktor mit kontrollierten Umgebungsbedingungen überführt.

3.4.4 Upscaling in einen 1 L Bioreaktor

Der Übertrag des Reaktionsansatzes in den 1 L-Maßstab ermöglicht die Durchführung der Reaktion in einem Bioreaktor unter kontrollierten Reaktionsbedingungen. Neben konstanter Temperatur und pH-Wert kann hier auch ganz genau die Rührerdrehzahl (900 rpm) und die Luftversorgung (144 L/h) eingestellt werden. In Abb. 59 ist die Zunahme der Gluconsäurekonzentration der verschiedenen Reaktionssysteme während des Reaktionsverlaufs aufgetragen.

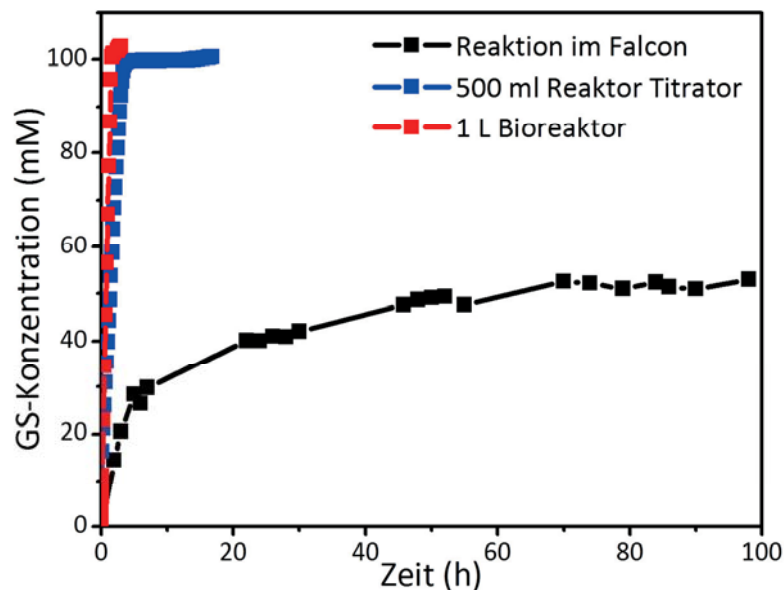


Abb. 59: Abhängigkeit der Geschwindigkeitskoeffizienten der Oxidation von Glucose zu Gluconsäure von der pH-Kontrolle und der Begasungsrate: Allgemeine Bedingungen: 40 °C, pH 9, $c_{\text{Glucose}} = 100 \text{ mM}$, $c_{\text{katalysator}} = 10 \text{ g/L}$; Schwarz: Falcon als Reaktionsgefäß ohne pH-Kontrolle und Begasung; Blau: kleiner Reaktor mit einem Titrator (pH-Kontrolle), keine bestimmte Begasungsrate und Drehzahl; Rot: Minifors mit pH-Kontrolle, eine 144 L/h Begasungsrate und 900 rpm Drehzahl).^[179]

In schwarz ist der Reaktionsverlauf im Falcon, also ohne Sauerstoffzufuhr und pH-Kontrolle dargestellt. Nach etwa 5 h und 30 % Umsatz fällt die Reaktionsgeschwindigkeit stark ab, die Reaktion wird deutlich limitiert. Limitierungsfaktoren sind der Sauerstoffmangel und der gesunkene pH-Wert. Der blaue Verlauf zeigt nach etwa 3,5 Stunden einen kompletten Umsatz der Glucose zu Gluconsäure. Durch die pH-Kontrolle und eine dauerhafte, wenn auch undefinierte Sauerstoffzufuhr kommt es nicht mehr zu der plötzlichen Limitierung der Reaktion und einer Steigerung der Aktivität um den Faktor 10, sowie einer Produktselektivität von 100 %. In Rot dargestellt ist der Verlauf der Katalyse im automatisierten Reaktor, der es ermöglicht, den pO_2 der Flüssigphase zu überwachen und gegebenenfalls die Rührerdrehzahl und so den Sauerstoffeintrag an die Reaktion anzupassen. Laut Baatz^[144] sollte, um eine

Sauerstofflimitierung zu vermeiden, der pO_2 nach Zugabe des Katalysators nicht unter 40 % Sauerstoffsättigung fallen, was mit Hilfe der pO_2 -Elektrode und der Prozesssteuerung von Sauerstoffzufuhr und Rührerdrehzahl überwacht bzw. geregelt wurde und somit eine weitere Steigerung der Katalysatoraktivität um den Faktor 2,4 ermöglichte.

Um nun die Reaktionsgeschwindigkeit und die Reaktionsordnung der drei dargestellten Reaktionen zu bestimmen, wird die Integralmethode verwendet. Hierzu werden die allgemeinen Geschwindigkeitsgleichungen 0., 1. und 2. Ordnung mit der Software Berkeley Madonna numerisch integriert und mit den experimentellen Ergebnissen verglichen. Die verwendeten Gleichungen sind der Tab. 18 im Anhang B 8.2 zu entnehmen.

Die Reaktion im Falcon wird wie bereits erwähnt von mehreren Faktoren limitiert (Sauerstoff, pH, Produktkonzentration,...). Dies erklärt, warum ein Fit 0. oder 1. Ordnung nicht möglich ist. Der Fit 2. Ordnung hingegen zeigt sehr gute Übereinstimmung mit dem Reaktionsverlauf im Falcon (siehe Abb. 60). Der Fit berücksichtigt die Sauerstofflimitierung in dem Falcon, unter Verwendung folgender Gleichung:

$$-\frac{d(c_{O_2})}{dt} = \frac{1}{2 \times (-k \times (c_{G;t=0} - c_G))} + k_{La} \times (c_{O_2}^* - c_{O_2}) \quad (3)$$

Zu Beginn der Reaktion wird von einer Sauerstoffsättigung des Puffers von $c_{O_2}^* = 0,21 \text{ mmol/L}$ ausgegangen. Für den Sauerstoffübergangskoeffizienten wurde ein Wert von $k_{La} = 35,8 \text{ h}^{-1}$ und für die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion $k = 0,3 \text{ mmol/(L} \cdot \text{h)}$ ermittelt. Die Konzentrationsverläufe der an der Reaktion beteiligten Moleküle sind in Abb. 60 dargestellt. Zu Beginn der Reaktion liegen sowohl Sauerstoff als auch Glucose in hohem Überschuss in Lösung vor, so dass die Reaktion substratunabhängig ist und somit einer Reaktion pseudo-0. Ordnung entspricht. Nach etwa 15 - 20 h ist der Sauerstoff in der Lösung komplett verbraucht und die Reaktion geht langsam in Sättigung über, da der Katalysator mit Wasserstoffionen auf der Katalysatoroberfläche vergiftet wird.

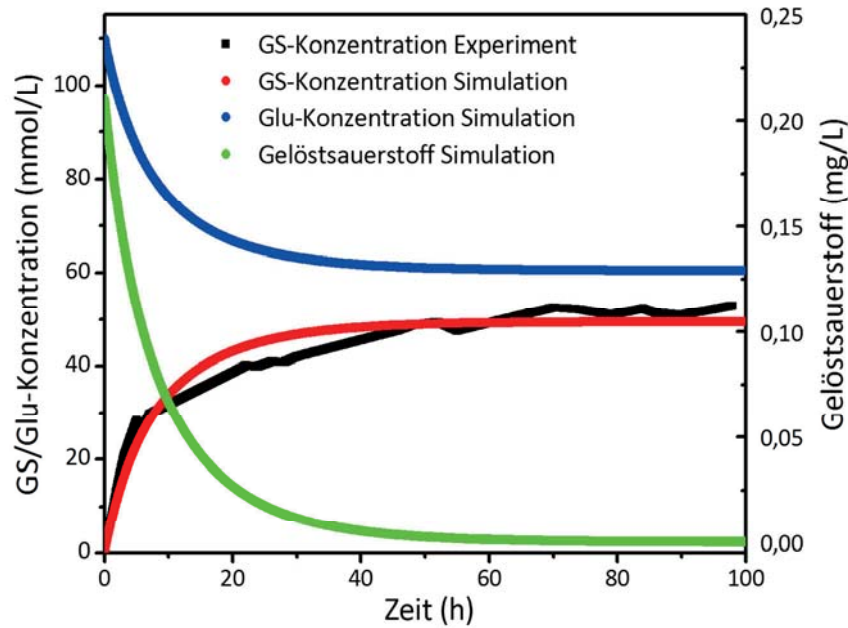


Abb. 60: Fit-Kurven der Reaktionsgeschwindigkeitsgleichung pseudo-2. Ordnung und experimentelle Kurve (schwarz) im 50 ml Flacon.^[179]

Für die Konzentrations-Zeit-Diagramme der beiden Reaktoren (500 ml Titrator und 1 L Bioreaktor) wurden zum Vergleich die Fehlerquadrate der Fits herangezogen. Die Fit-Kurve mit dem kleinsten Fehlerquadrat, spiegelt die Reaktionskinetik am besten wieder. Für beide Ansätze besaß der Fit 0. Ordnung die kleinsten Fehlerquadrate. Die Reaktionen mit Sauerstoffzufuhr sind also Reaktionen 0. Ordnung in Bezug auf die Glucose, wie es auch bei den Versuchen in Kap. 3.4.3 mittels Differentialmethode ermittelt wurde. Eine Zusammenfassung der ermittelten Fehlerquadrate (Tab. 19) und Beispielfits (Abb. 134) sind im Anhang B 8.2 zu finden. In Tab. 7 sind die spezifischen Reaktionsgeschwindigkeiten der Katalysatoren zusammengefasst. Ermittelt wurden diese aus den Anfangssteigungen der Konzentrations-Zeit-Diagramme.

Tab. 7: Reaktionsgeschwindigkeiten verschiedener Reaktorsysteme und Vergleich mit der Literatur

Reaktionssystem	Geschwindigkeit		Au	spez. Aktivität
	[mmol/(L · min)]	[mmol/(L · h)]		
-			[%]	[mmol/(L · h · g _{Au})]
50 mL Falcon	0,048	2,9	1,03	28,0
Titrationssystem	0.46	27,6	1,03	268,0
Reaktorsystem	1.17	70,2	1,03	681,6
Au/TiO₂ ^[139]	-	-	0,45	1680
Au/Al₂O₃ ^[166]	-	-	0,5	2910-7680
Bioprozess ^[103]	-	72,2	-	-



Im Hinblick auf die spezifischen Aktivitäten, konnten diese sukzessive gesteigert werden. Im Vergleich zur Literatur sind die hier vorgestellten Katalysatoren aber um den Faktor 3 - 10 schlechter. Grund hierfür ist eventuell die hohe Goldbeladung. Aus der Literatur ist bekannt, dass je geringer die Goldbeladung ist, desto kleiner sind die Goldcluster auf der Oberfläche und damit umso höher die Aktivität. Die in den Versuchen eingesetzten Katalysatoren besitzen eine zweifach höhere Beladung pro Gramm Träger. Durch den Einsatz noch feinerer Trägermaterialien, die magnetisch abgetrennt werden können, ist eine weitere Steigerung der Aktivität durch Bildung kleinerer Goldcluster auf der Trägeroberfläche denkbar. Der Vergleich der GS-Bildungsgeschwindigkeiten der eingesetzten Goldkatalysatoren mit der Bildungsgeschwindigkeit des Bioprozesses, der in der Industrie zur Gewinnung der Gluconsäure eingesetzt wird, zeigt, dass mit den synthetisierten Katalysatoren äquivalente Produktionsraten erzielt werden können. Dies macht die katalytische Gewinnung der Gluconsäure bereits jetzt zum konkurrenzfähigen Verfahren, besonders im Hinblick auf die einfache Aufarbeitung der Säure aus dem Reaktionsansatz. Der einzige Nachteil der Katalysatoren ist demnach der hohe Synthesepreis im Vergleich zur Biomasse. Um die Gesamtbilanz der Kosten wirtschaftlich zu halten, wird im folgenden Kapitel die Langzeitstabilität und somit der mehrfache Einsatz im Prozess untersucht.

3.4.5 Langzeitstabilität des Biokatalysators im 1 L Bioreaktor

Neben hohen Aktivitäten ist für einen katalytischen Prozess auch die Langzeitstabilität des Katalysators wichtig. Kritisch im Falle von Trägerkatalysatoren sind neben den Vergiftungsprozessen der Katalysatoren auch Abrieb- und Bleaching-Effekte die den Katalysator beeinflussen. Die Untersuchung zur Langzeitstabilität erfolgte im oben beschriebenen 1 L Bioreaktor. Nach komplettem Umsatz der Glucose zu Gluconsäure wurde dem Reaktionsansatz erneut Glucose zugegeben, um die gleiche Ausgangskonzentration zu erhalten. Nach dem ersten Einsatz nimmt die Katalysatoraktivität ab, vom zweiten bis zum zehnten Einsatz bleibt sie dann allerdings konstant. Die Selektivität zu Gluconsäure ist in dem ersten bis sechsten Ansatz nahezu 100 %.

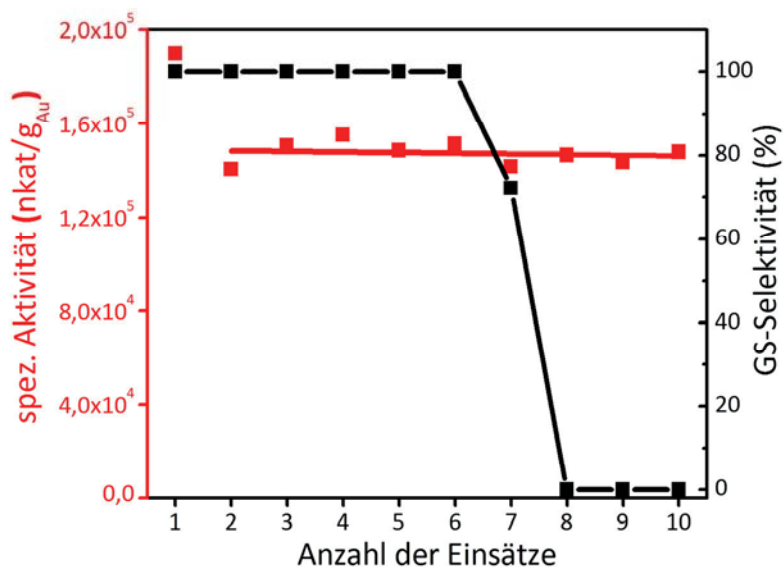


Abb. 61: Aktivität und Selektivität zu GS des 1,03 % Au/Al₂O₃-Katalysators bei der Untersuchung der Langzeitstabilität. Die Aktivität nimmt nach dem ersten Reaktionsansatz ab, bleibt dann aber konstant über 10 Reaktionsansätze. Die Selektivität ist bis zum sechsten Ansatz konstant bei 100 % und sinkt dann aufgrund von Produktsättigung stark ab.

Vom siebten bis zum zehnten Ansatz nimmt die Selektivität zu Gluconsäure allerdings deutlich ab; die Gluconsäurekonzentration ist nicht, wie es der Verbrauch an Glucose erwarten lässt, gestiegen. Nach dem zehnten Reaktionsansatz liegen nur noch etwa 90 % der erwarteten Gluconsäurekonzentration vor. Vergiftungsprozesse während dieser 10 Reaktionen können soweit ausgeschlossen werden, da der Glucoseumsatz konstant bleibt. Die Frage des Abriebs ist durch diesen Versuch nicht geklärt, da die Trägerkatalysatoren nicht aus dem Reaktor genommen wurden. Die Abnahme der Selektivität zu Gluconsäure lässt sich durch die Produktakkumulation erklären. Durch die Anhäufung der Gluconsäure in der Reaktions-

lösung kann es zur Bildung von unlöslichen Braunprodukten kommen, was auch zu einer optischen Verfärbung des Lösungsüberstandes führte. Die Braunprodukte entstehen dabei aus wiederholten Aldolkondensationen, die polymere Strukturen mit verzweigten Ketten verschiedener Länge bilden.^[144] Für einen Prozess im Batch wären also fünf Komplettumsätze von Glucose zu Gluconsäure möglich, bevor der Reaktionsansatz komplett neu erfolgen muss. Da die Trägerkatalysatoren während der Versuche nicht an Aktivität verloren haben, könnten diese erneut eingesetzt werden. Es empfiehlt sich, die Katalysatoren vorher zu calcinieren, um auf der Oberfläche adsorbierte Störkomponenten wie das während der Synthese eingesetzte Citrat zu entfernen. Eine kontinuierliche Entfernung der Gluconsäure aus der Reaktionslösung, z.B. über Ionentauscher, könnte die Selektivität und Aktivität für deutlich mehr Reaktionszyklen konstant halten.

Zur Identifikation des Katalyseproduktes, wurden IR-Spektren der Produkte herangezogen. Als Vergleichsstoff dient ein kommerziell erhältliches Natriumgluconat. Vor Beginn der Aufnahme der Produkt-Spektren wurden Spektren von Glucose, dem Substrat, dem Zielprodukt der Natriumgluconsäure (siehe Abb. 62 in blau) und einem möglichen Nebenprodukt der Glucuronsäure aufgenommen.

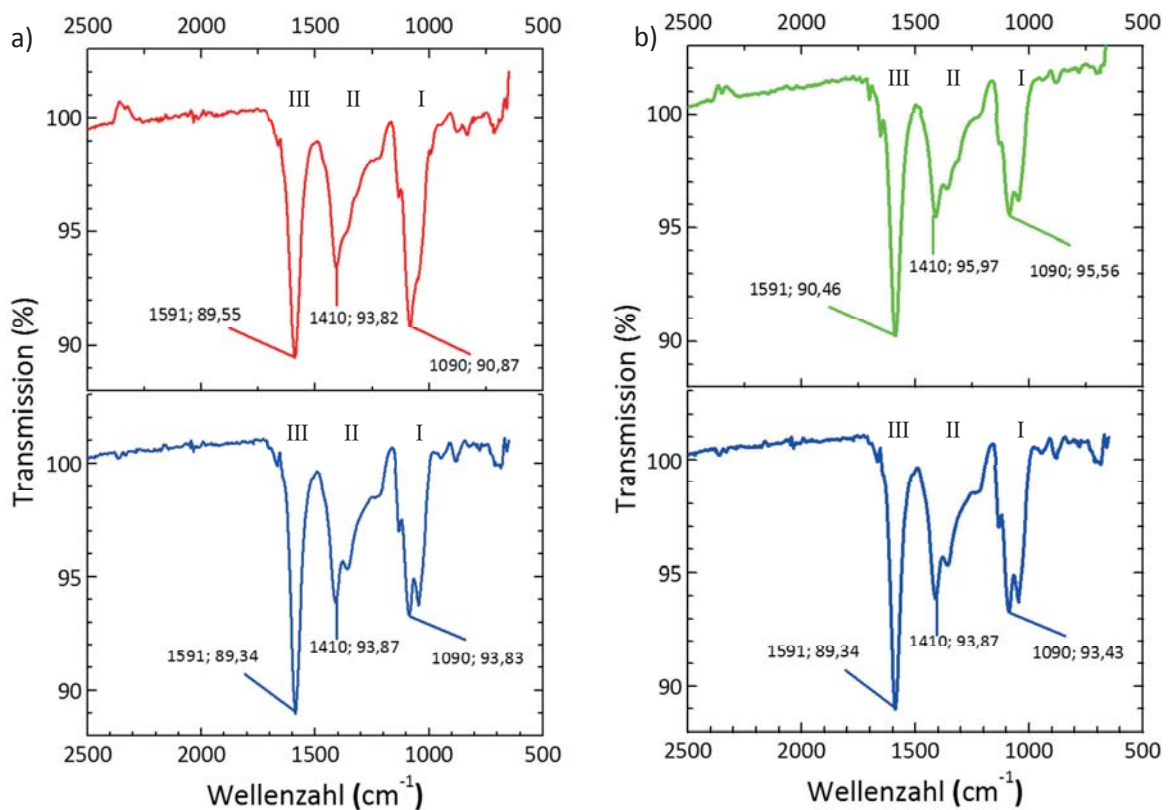


Abb. 62: Produktidentifikation und Vergleich der IR Schwingungsbanden des Produktes a) rot nach erster Reaktion und b) grün nach zehnter Reaktion. Die unteren Spektren zeigen eine kommerzielle Natriumgluconsäure (blau); alle Proben liegen jeweils in einer 1 M Lösung vor.

Von jedem Stoff wurden Proben einer 1 M Lösung angefertigt. Das genaue Vorgehen sowie die gemessenen Spektren sind im Anhang B 5 in Abb. 130 dargestellt. In Abb. 62 sind die IR-Spektren der Produkte nach der ersten Reaktion (rot) und der zehnten Reaktion (grün) dargestellt. Nach der Reaktion wurden Proben des Überstandes entnommen, zentrifugiert und im Anschluss gefriergetrocknet. Dies liefert ein weißes Pulver, das bei 100 % Selektivität ausschließlich Gluconsäure enthält. Aus diesem Pulver wurde anschließend eine 1 M Lösung angesetzt und auf den ATR-Kristall aufgetropft und gemessen. In den Spektren sind nun drei Bandenbereiche mit für Gluconsäure spezifischen Banden zu sehen. Der Bandenbereich I zeigt die CO und CC-Deformationsschwingungen der Gluconsäure.^[183] Dieser Frequenzbereich an sich ist nicht sehr spezifisch für GS, da in diesem Bereich auch Zucker oder Säurenebenprodukte CO und CC-Deformationsschwingungen besitzen. Besonders für Glucose ist auch bei geringen Konzentrationen in diesem Bereich eine hohe Absorption zu beobachten.^[181] Dies wird besonders für das Spektrum nach der ersten Reaktion sichtbar. Die Bande I zeigt im Standard einen Doppelpeak, der beim Produkt zu einem breiten Peak verschmilzt. Die Peakflächen dieser Bande (siehe Tab. 8) ist deutlich höher als bei den beiden anderen Spektren. Dies deutet auf eine Verunreinigung des Produktes hin. Bei der Verunreinigung handelt es sich wahrscheinlich um Glucose, die nicht vollständig umgesetzt wurde, da im Spektrum außer den drei Banden, keine weiteren Peaks erscheinen. Würde es sich bei der Verunreinigung um z.B. Glucuronsäure handeln, würde zwischen 1700 und 1730 cm⁻¹ die für Glucuronsäure sehr intensive und spezifische Bande der C=O Streckschwingung erscheinen.^[182] Nach der zehnten Reaktion ist die GS-Konzentration so angestiegen, dass nicht umgesetzte Glucose im Spektrum keine Rolle mehr spielt. Die Doppelbande erscheint wieder und die Peakfläche nimmt deutlich ab.

Tab. 8: Zusammenfassung der für GS spezifischen Banden inklusive Bandenzuordnung und Peakflächen:

Bandenbereich	I	II	III	Baseline (T %)
Wellenzahl (cm ⁻¹)	979-1169	1167-1487	1495-1684	–
Peakflächen				
Na-GS	691,47	980,2	764,36	100,8
1. Produkt	874,84	976,65	761,32	100,1
10. Produkt	613,96	956,61	771,99	101,4
Bandenzuordnung	$\delta_{CO} + \delta_{CC}$	ν_{COO} sym.	ν_{COO} antisym	–
Quelle	[¹⁸³]	[¹⁸⁴]	[¹⁸⁴]	–



Der Bandenbereich II zeigt für alle drei Spektren etwa die gleich Fläche. In diesem Bereich befindet sich die symmetrische COO-Streckschwingung.^[184] Dieser Bereich überlagert sich mit verschiedenen wenig intensiven Deformationsschwingungen der Glucose und ist somit nur bedingt aussagekräftig.^[181] Der Bandenbereich III zeigt die antisymmetrische Streckschwingung der Gluconsäure. Diese Bande ist eine alleinstehende Bande, in deren Bereich keiner der untersuchten Substanzen eine Schwingungsbande zeigt. Diese Bande ist demnach hochspezifisch und kann zur Bestimmung der Reinheit des Produktes herangezogen werden. Der Standard der Na-Gluconsäure besitzt eine Reinheit von 98 %. Die Auswertung der Peakflächen ergibt für das Produkt nach der ersten Reaktion eine Reinheit von 97,6 %. Sowohl Fehler in der Einwaage (welche durch Einwiegen von Substratmengen < 1 g minimiert werden) als auch Restzucker im Produkt verhindern eine 100 % ige Reinheit des Produktes. Nach der zehnten Reaktion konnte, wie bereits diskutiert, aufgrund geringeren Restzuckers die Reinheit auf 99 % weiter gesteigert werden. Auch ohne aufwendige Aufarbeitungsschritte ist also eine hohe Reinheit des Produktes erreichbar. Dies ist tatsächlich ein großer Vorteil gegenüber des großtechnischen Prozesses mittels Fermentation, bei dem eine aufwendige Aufarbeitung der Fermentationsbrühe ein großer Kostenfaktor darstellt. Die verwendeten Gold-Katalysatoren allerdings sind in ihrer Herstellung ebenfalls kostenintensiv. In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass die Katalysatoren mehrfach eingesetzt werden können und sich somit die Kosten für den Katalysator relativieren. Der Einsatz von magnetischen Partikeln würde die Rückgewinnung der Partikel aus der Reaktionslösung deutlich erleichtern und auch den Einsatz kleinerer Partikel ermöglichen, die für die Fällungsreaktion eine größere Oberfläche zur Verfügung stellen und so kleinere Goldcluster mit höherer Aktivität erlauben. Erste Versuche zur Realisierung eines magnetischen Katalysators wurden bereits in Kap. 3.4.1 diskutiert. Die während der Syntheseoptimierung gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der wichtigen Prozessschritte werden im folgenden Kapitel für die Synthese magnetischer Katalysatoren herangezogen.

3.4.6 Übertragung der Synthesemethode auf magnetisches Trägermaterial

Die nun optimierten Synthesebedingungen wurden auf die mit Al_2O_3 -ummantelten magnetischen Partikel übertragen. Besonders wurde darauf geachtet, dass so wenig Chlorid wie möglich vor dem Calcinieren auf der Partikeloberfläche adsorbiert wurde. Um dies zu erreichen wurde bei der Fällung auf einen konstanten pH geachtet (Titratoren zum Einstellen während der Reaktion) und nach der Fällung die Waschschriffe mittels Silbernitratfällung überwacht. Um einen Vergleich der beiden Synthesen zu ermöglichen, wurde parallel zur Goldfällung auf den magnetischen Partikeln auch eine erneute Goldfällung auf dem Al_2O_3 -Granulat durchgeführt. Für die Calcinierung wurde außerdem auf die korrekte Temperatur geachtet (200°C), da sowohl das Chlorid auf der Partikeloberfläche als auch die ungenaue Einstellung der Calcinierungstemperatur als Fehlerquellen für die ersten Syntheseversuche auf magnetischen Partikeln identifiziert wurden. Zur Charakterisierung der Katalysatoraktivität wurden beide Katalysatoren im kleinen Reaktor (siehe Anhang C 2.2) eingesetzt. Die Verläufe sind in Abb. 63 dargestellt.

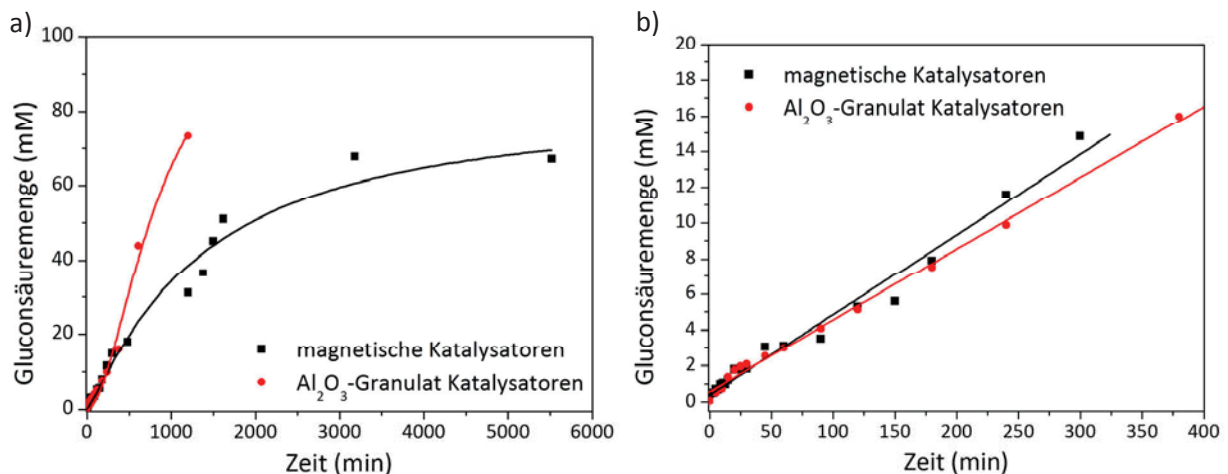


Abb. 63: Vergleich der Reaktion der magnetischen Katalysatoren und des Al_2O_3 -Granulates; a) zeigt den gesamten Verlauf, b) den Anfangsbereich der Reaktion. Die Katalysatorkonzentration betrug jeweils 1 g/L, die Glucosekonzentration 100 mM im 50 ml Rührgefäß (Reaktionsbedingungen Anhang C 2.2).

Auffällig bei den Verläufen ist, dass der Umsatz der magnetischen Partikel ab 1000 min deutlich zurückgeht. Grund hierfür ist der Ausfall der pH-Kontrolle, genau wie auch nach 2000 min. In Abb. 63 b) ist der Anfangsbereich der Reaktionen dargestellt, in dem sowohl die Sauerstoffzufuhr als auch die pH-Kontrolle beider Versuche noch intakt waren. Hier wird ersichtlich, dass beide Systeme etwa die gleichen Umsatzraten zeigen, eventuell auch leichte Vorteile beim magnetischen Katalysator zu sehen sind. Um eine tatsächliche Aussage über die Aktivitäten treffen zu können, müssen beide Katalysatortypen im 1 L Bioreaktor eingesetzt

werden, damit weder pH- noch Sauerstofflimitierungen die Reaktion beeinflussen. Dennoch kann an dieser Stelle von einer erfolgreichen Übertragung der Synthese auf die magnetischen Partikel ausgegangen werden. Im Vergleich zu den ersten Synthesen auf magnetischen Partikeln ist eine Umsatzsteigerung von 0,045 mmol/h auf 0,618 mmol/h sprich eine Steigerung um das 14-fache erzielt worden.

Der Überstand der Reaktion mit magnetischen Partikel wurde zur Produktidentifikation mittels HPLC-MS untersucht. Die verwendete Methode ist dem Anhang B 2.2 zu entnehmen. Die Untersuchungen ermöglichen die Identifikation der Moleküle in einem bestimmten Peak des HPLC-Chromatogramms anhand des Masse-Ladungsverhältnis.

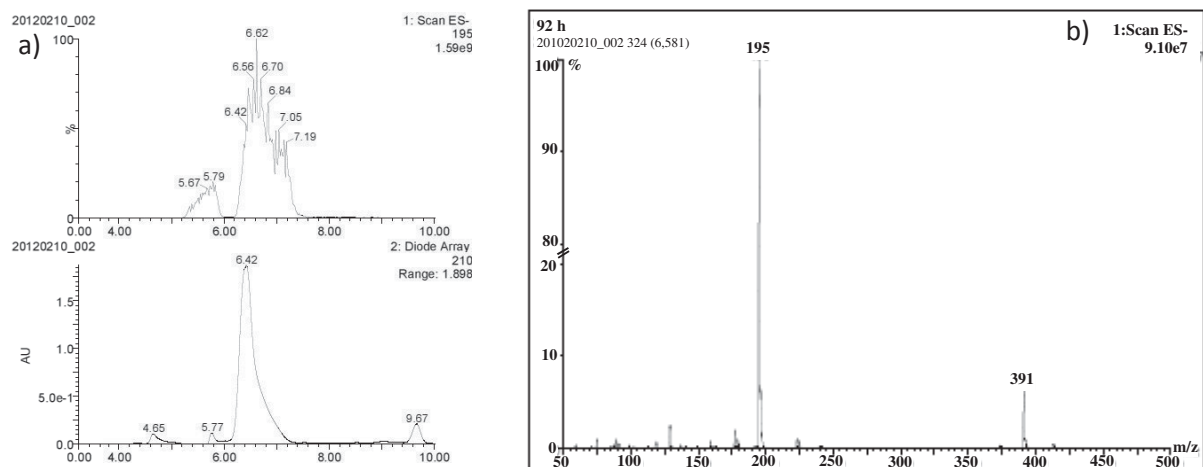


Abb. 64: Produktidentifikation mittels HPLC-MS: a) zeigt unten das Chromatogramm des Reaktionsüberstandes nach 92 h, der Peak bei 6,42 min wurde zur Konzentrationsbestimmung der Gluconsäure herangezogen; oben ist der Scan des Chromatogramms nach der Masse von Gluconsäure; b) zeigt einen Scan über alle Massen mit den für Gluconsäure spezifischen Massen-Ladungsverhältnisse von 195 und 391.

In Abb. 64 a) unten ist das Chromatogramm des Reaktionsüberstandes nach 92 h dargestellt. Der Peak bei 6,42 min entspricht der Retentionszeit von Gluconsäure und wurde somit für die Konzentrationsbestimmung verwendet. Die Abbildung darüber zeigt einen Scan des Chromatogramms nach dem Masse-Ladungsverhältnis der Gluconsäure. Die Gluconsäure besitzt eine Masse von 196 g/mol. Da zur Massenauftrennung die Moleküle ionisiert werden und die Gluconsäure nach der Ionisierung einfach negativ geladen vorliegt, ergibt sich ein m/z-Verhältnis von 195. Zur Überprüfung, ob in dem Peak noch weitere Massen sprich andere Moleküle zu finden sind, wurde bei 6,6 min ein Scan über alle vorhandenen Massen durchgeführt, wie in Abb. 64 b) dargestellt. Zu finden war in erster Linie nur die Masse 195, die der Gluconsäure entspricht. Zusätzlich ist die Masse 391 zu finden, die auch bei dem Standard erscheint. Dieses m/z-Verhältnis entspricht einem Gluconsäuredimer, der durch die Ionisierung entsteht. Somit ist die Gluconsäure als Produkt eindeutig identifiziert.



Sowohl die magnetischen als auch die Granulat-Trägerpartikel besitzen also ein hohes Potential in der Umsetzung von Glucose zu Gluconsäure. Sowohl die katalytische als auch die fermentative Gewinnung von Gluconsäure wird als Batch-Prozess durchgeführt. Um die Wirtschaftlichkeit des katalytischen Verfahrens weiter zu steigern, soll in den folgenden Kapiteln untersucht werden, ob es möglich ist den vorgestellten Batch-Prozess in einen kontinuierlichen Prozess zu übertragen.

3.4.7 Goldkatalyse im Durchfluss

Um einen kontinuierlichen Prozess für die Glucoseoxidation zu realisieren, wurden zunächst die synthetisierten unmagnetischen Katalysatoren in eine Chromatographie-Säule (UNO-Q1-Säule) gefüllt und so die katalytische Umsetzung der Glucose zu Gluconsäure untersucht. Der Ein- und Ausgange der Säule wird mit Sieben und Fritten versehen, um Partikelverluste zu reduzieren. Das Reaktionsvolumen der gefüllten Säule beträgt 1,02 ml und die mittlere Verweilzeit, die mit der Reaktionszeit gleichgesetzt wird, 52 s. Die Berechnung der mittleren Verweilzeit erfolgte über das erste absolute Moment, dies wird auch als Momentenmethode bezeichnet. Die Säule zeigt darüberhinaus eine axiale Rückvermischung von $5 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$. Näheres zu den Berechnungen sind im Anhang B 9 dargestellt.^[185] In Abb. 65 ist der Verlauf der Leitfähigkeit am Ausgang der Apparatur aufgetragen; einmal ohne Säule, um die Totzeit des Systems zu ermitteln und einmal mit der gepackten Säule. Als Tracer diente eine 5 M Natriumchlorid-Lösung.

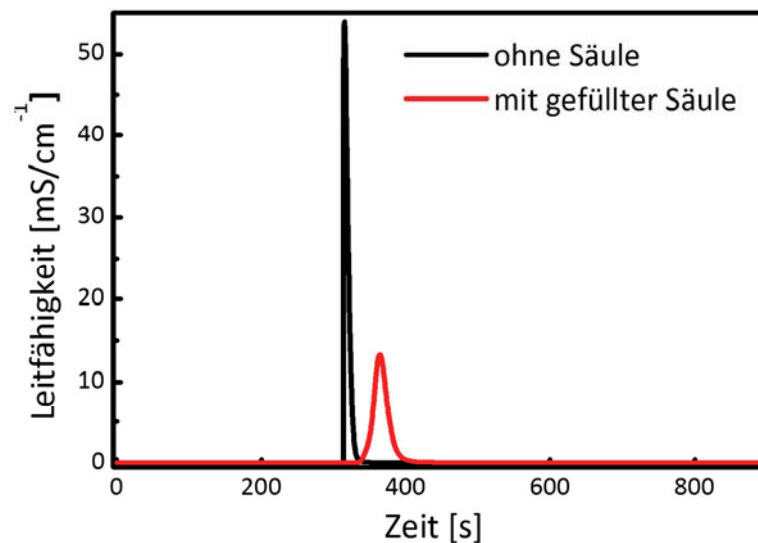


Abb. 65: Verlauf der Leitfähigkeit am Systemausgang nach Injektion einer 5 M Natriumchlorid-Lösung. In schwarz ist der Verlauf ohne Säule dargestellt, mit dem die Systemtotzeit bestimmt werden kann. In rot ist der Verlauf mit gefüllter UNO-Q1-Säule dargestellt, anhand dessen die Verweilzeitverteilung berechnet wird.

Vor Beginn des Versuches wird die Säule gründlich mit entionisiertem Wasser gewaschen. Die Reaktionslösung wird mit einer Flussrate von 1,5 ml/min immer im Kreis durch die Säule transportiert. Die Reaktionslösung wird, bevor sie in die Säule gepumpt wird, mit Sauerstoff versehen und der pH-Wert wird eingestellt. Nach dem Passieren der Säule wird mittels UV-Detektor bei 210 nm die Gluconsäurekonzentration ermittelt. Die Gluconsäurezunahme über die Reaktionszeit von 2624 min ist in Abb. 66 dargestellt. Es sind lediglich die Werte

dargestellt, nachdem die Lösung einmal komplett ausgetauscht wurde. Würde jeder Wert der UV-Detektion aufgezeichnet, wäre der Verlauf stufenförmig und würde die Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeit erschweren.

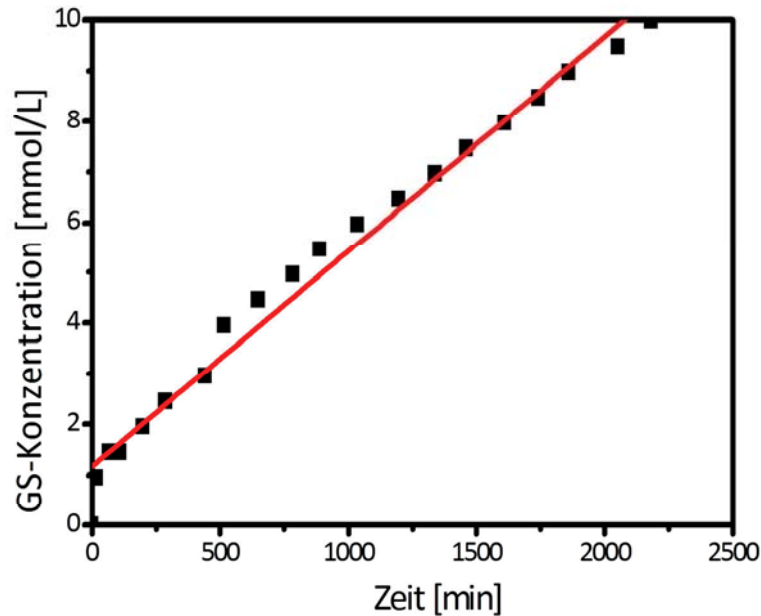


Abb. 66: Darstellung des zeitlichen Verlaufes der Gluconsäurekonzentration am Säulenausgang, bestimmt über die UV-Absorption der Gluconsäure bei 210 nm. Die rote Ausgleichsgerade liefert die Umsatzgeschwindigkeit dieses Reaktionssystems.

Anhand der in Abb. 66 dargestellten Geraden wurde eine Umsatzgeschwindigkeit von $2,7 \text{ mmol}/(\text{L} \cdot \text{h})$ und eine Raumzeitausbeute von $0,25 \text{ mmol}/(\text{L} \cdot \text{h})$ bestimmt. Die Raum-Zeit-Ausbeute ist im Vergleich zum Batch-Prozess im 1 L Bioreaktor ($\text{RZA} = 0,07 \text{ mmol}/(\text{L} \cdot \text{h})$) 3,5-fach höher (Berechnung siehe Anhang B 9). Die folgende Berechnung der Katalysatoraktivität zeigt an dieser Stelle, dass der Reaktor nicht optimal ausgelegt ist bzw. für diese Reaktion nicht geeignet ist. In der Säule befinden sich 1,2 g des Katalysators, woraus eine spezifische Aktivität von $1557 \text{ nkat}/\text{g}_{\text{Au}}$ berechnet wurde. Diese Umsatzgeschwindigkeit liegt in der Größenordnung der Versuche im 50 ml Falcon. Hier waren die Katalysatoraktivitäten stark von der Sauerstofflimitierung und dem pH-Wert gehemmt, was auch in der Säule ein Grund für die schlechten Aktivitäten war. Für eine weitere Steigerung wäre somit eine Optimierung der Begasung oder der Ersatz des Sauerstoffs durch ein anderes Oxidationsmittel notwendig. In der Säule kommt es zusätzlich zur Bildung von Flüssigkeitskanälen, so dass nicht alle Katalysatoren tatsächlich an der Reaktion teilnehmen. Der Vergleich der spezifischen Aktivität ist somit nicht sinnvoll. Es findet außerdem keine Durchmischung statt und die Filmdiffusion ist nicht mehr, wie im



Batch-Rührkessel, vernachlässigbar und beeinflusst die Aktivität der Katalysatoren somit zusätzlich. Der Einsatz eines Wirbelschichtreaktors schafft eine Durchmischung innerhalb der Säule, was die Filmdiffusion wieder reduziert und die Aktivität weiter steigert. Im folgenden Kapitel wird ein Prototyp eines Wirbelschichtreaktors vorgestellt, der unter Einsatz der magnetischen Katalysatoren für diese Anwendung eingesetzt werden könnte.

3.4.8 Magnetische Wirbelschicht in der kontinuierlichen katalytischen Produktion von Gluconsäure

Zur Realisierung eines magnetischen Wirbelschicht-Reaktors, wurde ein Prototyp entwickelt.^[186] Der prinzipielle Aufbau ist in Abb. 67 dargestellt. Die Apparatur ist als Kreislauf-System aufgebaut, bestehend aus zwei drehbaren Tellern mit jeweils vier Magneten, zwei Schrittmotoren, einem Reaktionsraum mit Partikel, einer Pumpe und einem Vorlagegefäß. Innerhalb des Vorlagegefäßes wird die pH-Steuerung, Temperierung und auch die Sauerstoffzufuhr stattfinden. Die Reaktionslösung und der Reaktor sind über verschiedene Schläuche miteinander verbunden. Die Drehgeschwindigkeit und Drehrichtung der beiden Teller wird über die zwei Schrittmotoren gesteuert, deren Einstellung mittels der Software Labview erfolgt.

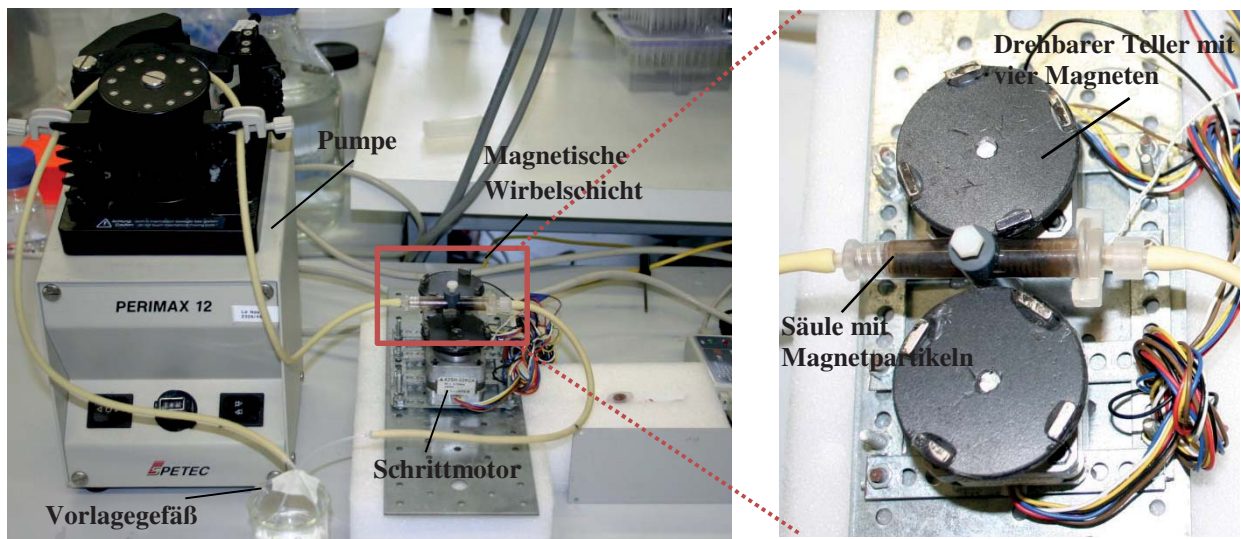


Abb. 67: Prototyp des magnetischen Wirbelschichtreaktors bestehend aus zwei drehbaren Tellern mit vier Magneten die mittels Schrittmotor entgegengesetzt gedreht werden. Zwischen den Tellern befindet sich eine 2,5 ml Durchflusskartusche, die magnetische Partikel enthält. Durch die Drehung der Teller werden die Partikel durchmischt und gleichzeitig in der Kartusche zurückgehalten.

Genau wie in Kap. 3.4.7 wurde zunächst die Verweilzeitverteilung des Substrates im Reaktionsraum bestimmt. Auch hier wurde als Tracer eine Natriumchloridlösung eingesetzt und die Leitfähigkeit am Reaktorausgang bestimmt. Die Verläufe der Leitfähigkeit einmal ohne Kartusche und einmal mit leerer Kartusche sind in Abb. 68 a) dargestellt. Die Flussrate beträgt 1,5 ml/min und liefert eine mittlere Verweilzeit von 286 s, was etwa 3 Bettvolumen (BV) der Kartusche entspricht. Anhand der Summenformel ist ablesbar, dass nach dem Tausch eines BV noch 68,5 % des Tracers in der Säule zurückbleiben. Der Verlauf der Leitfähigkeit zeigt ein starkes Tailing was auf eine hohe Rückvermischung zurückzuführen ist.

Die axiale Rückvermischung ist im Vergleich zur gepackten Säule mit $5 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ um zwei Zehnerpotenzen größer. Eine Erklärung für diesen Effekt zeigen die 2 D-COMSOL-Simulationen in Abb. 68 b) und c). Im Falle der leeren Kartusche (Abb. 68 c)) bildet sich nach Eintritt in den Reaktionsraum an der Stufe eine Verwirbelung, die für diese hohe Rückvermischung sorgen könnte. Bei gefüllten Säulen bilden sich im Durchfluss Kanäle, welche die Bildung einer solchen Verwirbelung verhindern. Durch die Verwendung der magnetischen Partikel könnte sich die Rückvermischung allerdings erneut anders darstellen.

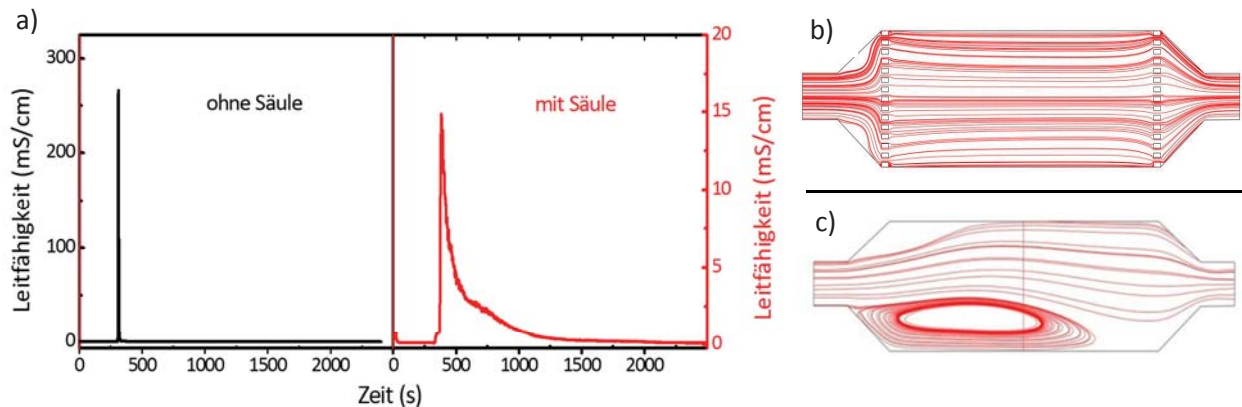


Abb. 68: Strömungsverhalten am Ausgang der Kartusche für die magnetische Wirbelschicht; a) Verlauf der Leitfähigkeit am Kartuschenausgang zur Ermittlung der Verweilzeitverteilung in der leeren Kartusche; b) vereinfachte COMSOL-Simulation des möglichen Strömungsverlaufes einer gepackten Säule. Die Strömung ist relativ gleichmäßig über die Säule verteilt, eine Verwirbelung ist nicht sichtbar; c) vereinfachte COMSOL-Simulation des Strömungsverlaufes einer leeren Kartusche. Beim Eintritt in den Reaktionsraum entsteht eine Verwirbelung, die zu einer großen Rückvermischung am Säulenausgang führt.

Im nächsten Schritt wurden die für den Prozess wichtigen Parameter, wie Magnetfeldfrequenz und zurückgehaltene Partikelmenge bei einem Fluss von $1,5 \text{ ml}/\text{min}$ bestimmt. Für die Versuche werden $2,5 \text{ ml}$ einer Magnetpartikellösung ($10 \text{ g}/\text{L}$) in die Kartusche eingefüllt. Das komplette System wird mit entionisiertem Wasser gefüllt und gespült, bis keine Luftblasen mehr vorhanden sind. Auf jedem Teller befinden sich, wie bereits erwähnt, vier Permanentmagnete in gleichmäßigem Abstand. Die Magnete beider Teller bewegen sich alternierend, d.h. immer nur ein Magnet befindet sich an der Kartusche, damit ein wechselndes Magnetfeld mit einer definierten Frequenz erzeugt wird. Nach der Kalibrierung der Schrittmotoren wurden die Drehrichtung (links oder rechts) und die Drehgeschwindigkeit in verschiedenen Versuchen variiert, um eine bestmögliche Rückhaltung und gleichzeitige Durchmischung der Partikel zu erzielen. Als optimale Einstellung für die Schrittmotoren wurde definiert, dass ein Teller nach links und ein Teller nach rechts dreht, jeweils mit 69 Schritten pro Sekunde, was einer Magnetfeldfrequenz von $0,5 \text{ s}^{-1}$ entspricht. Der Partikel-

austrag wurde mittels Messung der optischen Dichte beobachtet. Die optische Dichte am Ausgang der magnetischen Wirbelschicht wurde so lange beobachtet, bis die OD konstant bei Null angekommen war und damit keine weiteren Partikel mehr ausgetragen wurden. Die zurückgehaltene Menge an Partikeln wurde zu 12,9 mg bestimmt, was einer Katalysatorkonzentration von 5,2 g/L entsprechen würde. Da zum Zeitpunkt der Prozessauslegung keine ausreichende Menge magnetischer Katalysatoren zur Verfügung stand, konnte die Umsetzung in der magnetischen Wirbelschicht nicht durchgeführt werden und steht damit für folgende Versuche noch aus.

Zur Realisierung eines halbkontinuierlichen Prozesses der Gluconsäure-Gewinnung mittels magnetischer Wirbelschicht, wäre der in Abb. 69 dargestellte Prozessaufbau denkbar. Aufgebaut ist der Prozess aus zwei Kreisläufen. Auf der linken Seite befindet sich der Katalyse-Kreislauf. Hier wird die Substratlösung so lange im Kreis durch die magnetische Wirbelschicht gefördert bis eine definierte Produktkonzentration erreicht ist.

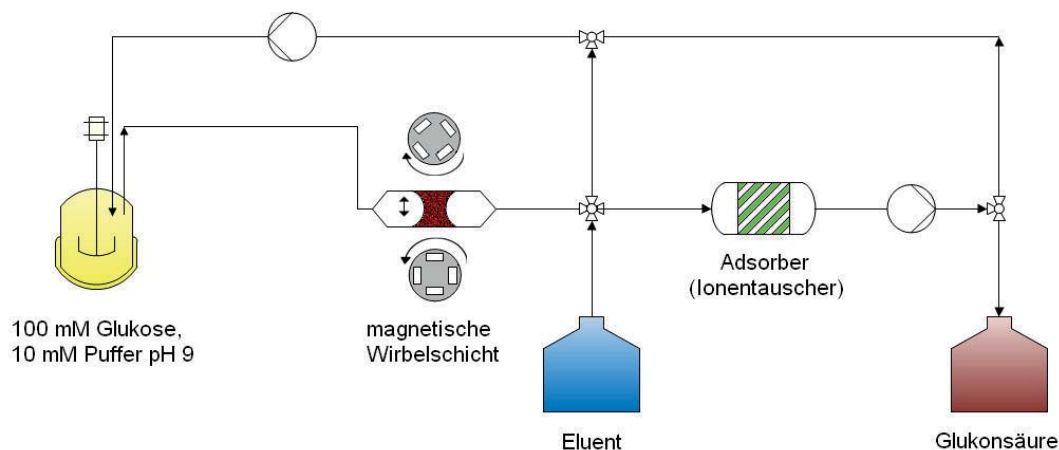


Abb. 69: Halbkontinuierlicher Prozess zur katalytischen Gewinnung von Gluconsäure aus Glucose mit Hilfe einer magnetischen Wirbelschicht. Die Trennung von Substrat und Produkt erfolgt in einer nachgeschalteten Aufreinigung mittels Ionentauscher.

Danach wird auf den zweiten rechten Kreislauf umgeschaltet, in dem die Trennung von nicht umgesetztem Substrat und Produkt erfolgt. Da es sich bei dem Produkt um eine Säure handelt und Nebenprodukte nicht vorhanden sind, bietet sich ein unspezifischer Ionentauscher an. Das nicht umgesetzte Substrat kann dann zurückgeführt und für die weitere Reaktion verwendet werden. In ersten Batch-Versuchen wurde die Verwendbarkeit des Ionentauscher im vorliegenden Puffer-System getestet. Die Bindung der Gluconsäure erfolgte auf dem starken Anionentauscher Amberlite IRA 400 im KPP-Puffer pH 6 und pH 9 bei 26 °C. Bei diesen Umgebungsbedingungen wurde bei pH 6 eine maximale Beladung von 135 mg/g und bei

pH 9 von 258 mg/g erreicht. Die dazugehörigen Sorptionsisothermen sind in Abb. 70 dargestellt.

Der Unterschied in der maximalen Beladung ist begründet in der Protonierung der Gluconsäure. In Abb. 70 b) ist die Verteilung der Spezies der Gluconsäure dargestellt; sie wurde mit dem Programm Chemaxon Marvin Sketch Version 5.3.1 berechnet.^[187] Bei pH 9 liegen 100 % der Gluconsäure negativ geladen vor. Bei pH 6 sind es nur 95 %, die restlichen 5 % sind neutral und gehen damit keine Wechselwirkung mit dem Ionentauscher ein und die Beladung sinkt.

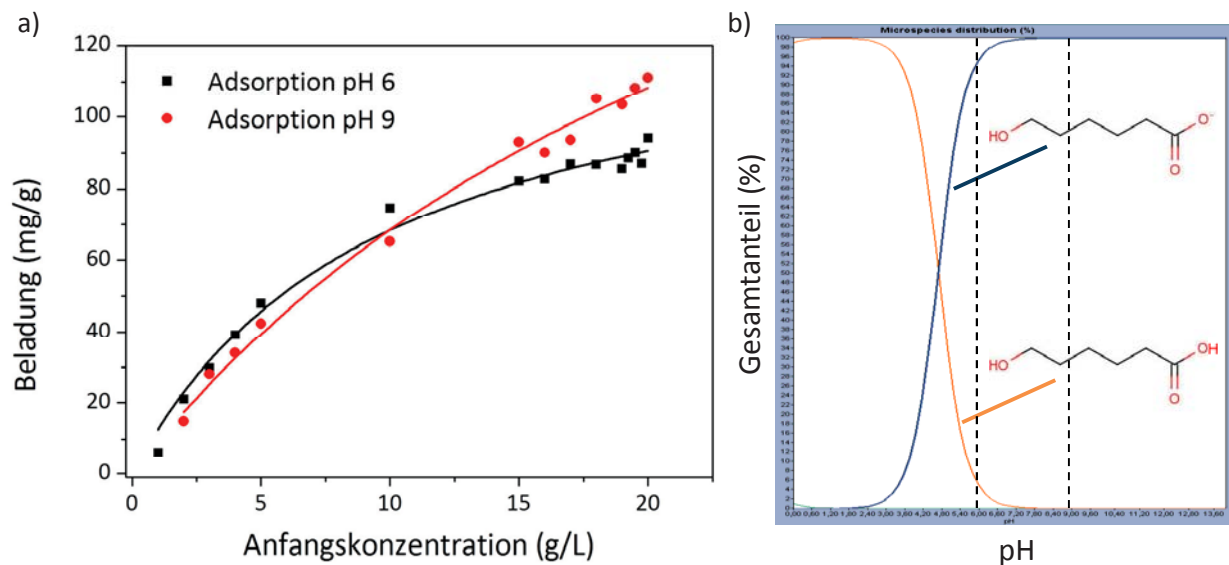


Abb. 70: a) Adsorptionsisotherme für Gluconsäure auf dem starken Ionentauscher Amberlite IRA 400 bei pH 6 und pH 9; Darstellung der Speziesverteilung der Gluconsäure in Abhängigkeit zum pH-Wert, die Verteilungen bei pH 6 und pH 9 sind mit gestrichelten Linien eingezeichnet.^[187]

Des Weiteren wurde eine Bindung im Gluconsäure (10 g/L)/Glucose (10 g/L)-Gemisch durchgeführt. Es wurden Beladungen von 70 mg/g für pH 6 und 80 mg/g für pH 9 erreicht. Dies entspricht den Werten der Beladung ohne Glucose. Die Glucose-Konzentration ist nach Inkubation mit dem Ionentauscher in keiner der Proben gesunken, demnach wurde auch keine Glucose gebunden. Die Glucose stört die Bindung der Gluconsäure nicht und kann wie bereits erwähnt nach dem Durchlaufen der Säule zur weiteren katalytischen Umsetzung in den Prozess zurückgeführt werden. Die Elution von der Säule kann mit einer einfachen Salzlösung erfolgen. Das erhaltene Eluat liefert nach einer Gefriertrocknung direkt das Produkt als Salz der Gluconsäure in ähnlicher Form wie bereits in Kap. 3.4.5 untersucht.

Die Verwendung der gezeigten magnetischen Wirbelschicht und einer ionischen Aufarbeitung der gewonnenen Gluconsäure, könnte einen katalytischen halbkontinuierlichen Prozess



ermöglichen. Die Prozessintegration steht noch aus, dennoch könnten weiterführende Experimente zeigen, dass dieser Prozess mit einer minimalen Anzahl an Prozessschritten ein sehr reines Produkt liefert und so einige Vorteile gegenüber der rein fermentativen Gewinnung besitzt.



3.5 Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Kapitel wurde die katalytische Eigenschaft von Gold-Nanopartikeln gezeigt. In der Literatur ist diese Eigenschaft bereits mehrfach für verschiedene Anwendungen beschrieben. Besonders die hohe Selektivität bei der Umsetzung von Glucose zu Gluconsäure macht die Anwendung der Goldnanopartikel zur Herstellung der sonst fermentativ gewonnenen Gluconsäure interessant.

Bei den ersten Synthesen mit magnetischen Goldkatalysatoren wurden zwei verschiedene Syntheseansätze untersucht. Beim ersten Ansatz wurden Goldnanopartikel auf einem magnetischen Silicat-Partikel aufgebracht. Die Bindung erfolgte durch Selbstorganisation an den zuvor in die Silicat-Matrix eingebrachten Thiolgruppen. Die verwendete Synthese war erfolgreich und mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie konnten die 5 nm Goldcluster auf der Partikeloberfläche nachgewiesen werden. Allerdings stieß die Synthese bei hohen Thiol-dichten auf Grenzen, da es während der Reaktion zur Verklumpung durch Bildung von Disulfid-Brücken kam. Um die Thiolgruppensdichte und damit die Menge an gebundenem Gold weiter zu erhöhen, muss die Synthese noch optimiert werden. Ein möglicher Ansatz wäre die Zugabe von DTT um die Bildung der Disulfidbrücken zu vermeiden. Abb. 71 zeigt schematisch die Spaltung der Disulfidbrücken durch Zugabe von DTT. In wie fern sich das DTT auf die Bildung des Silicat-Netzwerkes auswirkt, sollte in verschiedenen DTT-Konzentrationsansätzen untersucht werden. Anhand der IR-Spektroskopie kann überprüft werden, ob die Kondensation durch das DTT beeinflusst wird.

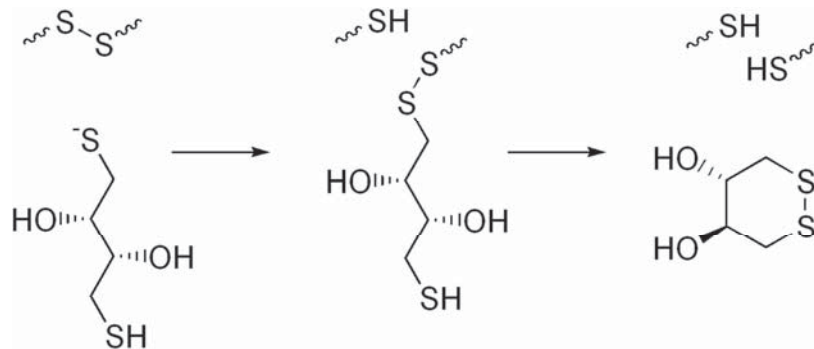


Abb. 71: Schematische Darstellung der Spaltung von Disulfidbrücken mittels Dithiothreitol (DTT).^[188]

Der zweite Syntheseansatz basiert auf einer Goldfällung auf einer Aluminiumoxid-Schicht. Hierzu mussten zunächst die verwendeten Eisenoxid-Nanopartikel mit einer Aluminiumoxidschicht versehen werden. Sowohl die Ummantelung der magnetischen Kerne mit Al_2O_3 als auch die Auffällung von Gold war erfolgreich und konnte mittels REM/EDX nach-



gewiesen werden. Die einzelnen Syntheseschritte wurden mittels PCD-Potential-Messung überwacht. Diese Messmethode gibt Aufschluss über die Oberflächenladung bei verschiedenen pH-Werten und ist somit gerade bei Fällungsreaktionen, bei denen der genaue pH-Wert eine wichtige Rolle spielt, eine gute Methode zur Kontrolle. Im Falle der Silicat-Partikel konnte mittels PCD-Signal die erfolgreiche Aufbringung der funktionellen Gruppen nachgewiesen werden. Diese Methode könnte auch bei der Quantifizierung von funktionellen Gruppen auf der Partikeloberfläche nützlich sein. Versuche hierzu wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, da sich SH-Gruppen sehr einfach und zuverlässig mittels Ellmann's Essay nachweisen lassen. Im Falle von Aminogruppen, die nur aufwendig nachzuweisen sind, könnte diese Methode einen echten Vorteil bringen.

Die beiden magnetischen Partikelsysteme wurden nach erfolgreicher Synthese in der Katalyse eingesetzt. Trotz des Nachweises von Gold auf der Partikeloberfläche beider Chargen waren die Aktivitäten der Katalysatoren sehr gering. Da für die Aktivität der Goldnanopartikel lediglich der Partikeldurchmesser und nicht der Träger eine Rolle spielt, wurde im Falle der Silicat-Partikel nach kleineren Goldkolloiden gesucht. Diese zeigten allerdings auch nicht die gewünschte Aktivität, sodass im Folgenden der Fokus auf die Goldfällung auf Aluminiumoxid stand. Im Nachhinein wird klar, dass die auf der Partikeloberfläche koordinierten Moleküle bzw. Proteine die Aktivität des Kolloides stark beeinflussen. In zukünftigen Versuchen sollte der Ansatz der Silikat-Partikel erneut aufgegriffen werden unter Einsatz der mit BSA-stabilisierten Goldpartikel. Nach der Bindung des Goldkolloides auf der Silikat-Oberfläche könnte durch Calcinierung die Goldoberfläche von Verunreinigungen befreit und so eine Steigerung der Aktivität und Selektivität dieser Partikelsysteme erreicht werden. Kritisch ist hierbei die Calcinierungstemperatur; denn die Goldnanopartikel besitzen mit sinkendem Partikeldurchmesser auch eine sinkende Schmelztemperatur. Dies könnte auch der Grund für die geringen Aktivitäten der magnetischen Aluminiumoxid Katalysatoren gewesen sein. Bei den ersten Synthesen mit magnetischen Goldkatalysatoren wurde nämlich für den Calcinierungsschritt ein Muffelofen verwendet. Der Temperaturbereich des Ofens beginnt bei 200°C und kann somit nicht so genau eingestellt werden. Aus diesem Grund wurde bei den Versuchen mit Muffelofen wahrscheinlich die Calcinierung bei Temperaturen über 200 °C durchgeführt. So wurde eventuell bei den ersten Synthesen eine Temperatur erreicht, die oberhalb der Schmelztemperatur des Goldkolloides lag und während der Calcinierung größere Partikelcluster gebildet hat, die eine niedrigere Aktivität aufweisen. Für die Syntheseoptimierung auf einem unmagnetischen Aluminiumoxid wurde zum Calcinieren ein Trockenschrank verwendet, der eine genaue Einstellung der Temperatur ermöglichte. Durch die



Variation der Goldsäuremenge bei der Synthese konnte eine weitere Steigerung der Aktivität erzielt werden. Besonders die bei der Fällung zur Verfügung stehende Oberfläche scheint die Bildung der Goldclusterdurchmesser zu beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass eine feinere Partikelstruktur und somit eine größere Oberfläche die Aktivität der Katalysatoren weiter steigert. Da die feine Partikelstruktur die Separation aus dem Reaktionsansatz allerdings erschwert, wird in der Literatur weiterhin auf Granulate zurückgegriffen. Die Verwendung von magnetischen Trägern lässt hier auch kleine Partikeldurchmesser zu. Durch die magnetische Komponente können diese Partikel jedoch weiterhin einfach aus der Reaktionslösung separiert werden. So konnten nach Übertragung der optimierten Synthesebedingungen auf den magnetischen Katalysator fast identische Aktivitäten im Vergleich zum unmagnetischen Träger erzielt werden. Die Aktivität im Vergleich zur ersten Synthese auf magnetischen Trägern konnte so um das 14-fache gesteigert werden. Die Synthese wurde auf das Aluminiumgranulat hin optimiert. Die Übertragung dieser Synthese auf den magnetischen Träger war zwar erfolgreich und zeigte eine Steigerung zur Ausgangssituation, allerdings haben die Versuche auch gezeigt, dass die Trägermorphologie bei der Synthese entscheidend ist. Aus diesem Grund sollte auch für den magnetischen Träger die optimale Menge an zugegebener Goldsäure in zukünftigen Versuchen ermittelt werden.

Die Versuche zur Syntheseoptimierung zeigten auch, dass die Umgebungsbedingungen der Katalyse ganz entscheidend für die Selektivität und Aktivität der Katalysatoren sind. Erst im 1 L Bioreaktor unter kontrollierten Bedingungen (pH = 9 und ausreichender Begasung) konnten mit den Katalysatoren Aktivitäten erzielt werden, die denen in der Literatur beschriebenen Aktivitäten nahe kommen. Der Umsatz der Glucose zu Gluconsäure lag mit $70 \text{ mmol}/(\text{L}\cdot\text{h})$ in der Größenordnung des Umsatzes der Gluconsäure-Fermentation ($72 \text{ mmol}/(\text{L}\cdot\text{h})$). Dies macht die katalytische Gewinnung der Gluconsäure in Bezug auf den Umsatz konkurrenzfähig zur Fermentation. Die Mehrkosten, die durch die aufwendige Synthese der Partikel entstehen, können durch die mehrfache Nutzung der Katalysatoren abgefangen werden. Der zehnmahlige Einsatz der Goldkatalysatoren zeigte keinerlei Einbuße in der katalytischen Umsetzung von Glucose. Lediglich durch die Bildung von Braunprodukten durch Akkumulation von Gluconsäure nahm die Selektivität im Verlauf der Versuche ab, bzw. die Gluconsäurekonzentration nahm nicht mehr weiter zu. Diesem Effekt könnte einfach durch Abtrennung der Gluconsäure entgegengewirkt werden. In weiterführenden Versuchen sollten die Katalysatoren in mehreren Ansätzen hintereinander eingesetzt, nach Beendigung der Katalyse vom Überstand befreit und in einem neuen Glucose-Ansatz eingesetzt werden. Mit diesem Versuche könnte auch untersucht werden, in

wie weit die Katalysatoren durch Abrieb ihre Aktivität verlieren. Sollte nämlich die Aktivität der Partikel durch störende Moleküle auf der Oberfläche abnehmen, kann durch einfache Calcinierung der Partikel die volle Aktivität zurück erlangt werden. Sollte nach der Calcinierung allerdings ein Teil der Aktivität verloren gegangen sein, ist ein Abrieb der Goldkomponente sehr wahrscheinlich.

Die Reinheit des Produktes aus den Versuchen im 1 L Bioreaktor wurde mittels IR-Spektroskopie und einem kommerziell erhältlichen Standard untersucht. Der Überstand nach der Katalyse wurde von den Katalysatoren befreit und mittels Gefriertrocknung zu einem Pulver verarbeitet. FTIR-ATR-Messungen zeigten eine Reinheit des Produktes von 99 %. Somit ist nach Ende der Katalyse die Aufarbeitung der Gluconsäure aus der Lösung auf einen einzigen Schritt nämlich die Gefriertrocknung reduziert. Diese Tatsache ist ein großer Vorteil der Katalyse gegenüber der Fermentation, denn hier sind meist mehrere Aufarbeitungsschritte notwendig, um ein reines Pulver zu erhalten.

Ein weiterer Bottleneck der Fermentation ist der Batch-Prozess an sich. Die Katalyse wurde bisher ebenfalls nur in Batch-Prozessen eingesetzt. Der Aufbau eines kontinuierlichen Prozesses könnte hier ein weiterer Werttreiber für diese Form der Gluconsäuregewinnung sein, indem die Raumzeitausbeute gesteigert wird. Zunächst wurden die unmagnetischen Katalysatoren in eine Säule gepackt und so im Durchfluss Gluconsäure hergestellt. Die Gewinnung der Gluconsäure war prinzipiell erfolgreich, allerdings nahm die Aktivität deutlich ab, was zur Bildung von Nebenprodukten aus der Zuckerumlagerung führte. Die Katalyse im Durchfluss besitzt viele Störfaktoren, wie geringer Sauerstoffeintrag und Diffusionslimitierung, da keine Vermischung mehr vorhanden ist und sich Flüssigkeitskanäle in der Säule bilden. Die Verwendung eines Wirbelschichtreaktors kann die Diffusionslimitierung durch Verwirbelung der Katalysatoren in der Wirbelschicht minimieren.

Um einen Wirbelschichtreaktor für diesen Prozess zu realisieren, wurde ein Prototyp mit magnetischer Wirbelschicht aufgebaut und charakterisiert. Die verwendete leere Kartusche zeigte mit einer mittleren Verweilzeit von 286 s eine hohe Rückvermischung. Die mittlere Verweilzeit mit magnetischen Partikeln in der Kartusche muss noch bestimmt werden. Bei einem Fluss von 1,5 ml/min konnten 12,5 mg Magnetpartikel im Reaktionsraum zurückgehalten werden. Dies entspricht einer Katalysatorkonzentration von 5,2 g/L. Da zu dem Zeitpunkt der Inbetriebnahme der magnetischen Wirbelschicht keine ausreichende Menge an magnetischen Katalysatoren zur Verfügung stand, konnte der komplette Prozess zur Umsetzung der Glucose zu Gluconsäure im Durchfluss noch nicht abschließend getestet werden. Der prinzipielle Aufbau eines Prozesses ist in Abb. 69 dargestellt. Aufgebaut wird



der Prozess aus zwei Kreisläufen, die katalytische Umsetzung und die Abtrennung des Gluconsäure mittels Ionentauscher. Im Katalyse-Kreislauf befindet sich ein Vorlagegefäß, in dem die pH-Kontrolle und Sauerstoffzufuhr sichergestellt wird. Um die Sauerstofflimitierung zu vermeiden, muss die Begasungsrate sowie die Durchflussrate möglichst hoch gehalten werden, damit es innerhalb des Reaktionsvolumens nicht zu einer Limitierung kommt. In der Feinabstimmung sollte also der Flüssigkeitsstrom und die Begasungsrate variiert werden. Allerdings ändert sich mit dem Fluss auch das Rückhaltevermögen der magnetischen Wirbelschicht, sodass auch hier die Drehgeschwindigkeit der Magnetteller erneut eingestellt werden muss. Ein anderer Ansatz, bei dem die Durchflussgeschwindigkeit erhalten bleiben kann, wäre die Verwendung eines anderen Oxidationsmittels als Sauerstoff, z.B. die Zugabe von H_2O_2 als Oxidationsmittel. Der Nachteil der gestiegenen Kosten muss dann anhand der Umsatzgeschwindigkeit abgewogen werden. Der zweite Kreislauf, die Aufarbeitung, kann mit einer Ionentauschersäule aufgebaut werden. Versuche im Batch konnten zeigen, dass bei einem pH-Wert von 9 eine Bindung der Gluconsäure möglich ist und die Gegenwart von Glucose die Bindung nicht beeinflusst. So kann das nicht umgesetzte Substrat in den Prozess zurückgeführt werden. Die Elution der Gluconsäure kann problemlos mit einer einfachen Salzlösung erfolgen und die Gefriertrocknung liefert das fertige Produkt. In ersten Versuchen könnten die beiden Kreisläufe getrennt voneinander betrachtet werden, um dann in weiterführenden Versuchen zu einem kompletten Prozess mit Umschaltung zwischen den Kreisläufen kombiniert zu werden. Sobald der Prozess komplett charakterisiert ist, könnte mit Hilfe von Simulationsprogrammen wie „SuperPro Designer“ oder „Aspen“ dieser Prozess mit der Fermentation verglichen werden, um die Wirtschaftlichkeit gegenüber zu stellen.





4 Aufarbeitung von fermentativ gewonnenen Antibiotika

4.1 Einleitung und Zielsetzung

Magnetische Partikel können nicht nur im Bereich der Katalyse eingesetzt werden, wie bereits in den vorherigen Kapiteln diskutiert wurde, sie besitzen auch ein großes Potential beim Einsatz in Downstream-Prozessen. Die ressourcenschonende Gewinnung von Antibiotika aus Fermentationsbrühen ist ein bereits vieldiskutiertes Problem und der Einsatz von magnetischen Adsorbersystemen zur Aufarbeitung soll im Rahmen dieses Kapitels betrachtet werden.

Antibiotika werden stark verdünnt in wässrigen Lösungen produziert. Sie sind schwer aus diesen Medien zu isolieren, da sie gut wasserlöslich sind und einen zwitterionischen Charakter besitzen. Ein weiteres Problem stellt das Medium selbst dar, aus dem die Lactame isoliert werden sollen. Neben Feststoffen beinhaltet diese Fermentationsbrühe für die Produktion essenzielle Zusätze, die ähnliche chemische und physikalische Eigenschaften aufweisen wie das Zielprodukt. Veröffentlichungen zu verschiedenen Aufarbeitungsstrategien schlagen die direkte Bindung der Antibiotika auf basischen Ionenaustauscherharzen oder aromatischen Adsorbentien vor. Beide Bindungsmethoden sind für β -Lactam-Antibiotika in wässrigen Lösungen einsetzbar, zeigen jedoch in Fermentationsmedien einige Schwächen, da u.a. die in der Fermentationsbrühe enthaltenen anorganischen Ionen zu unspezifischen Adsorptionen auf den Adsorberharzen führen. Somit ist ein gravierender Einbruch in der Adsorptionskapazität zu verzeichnen. Eine Kombination verschiedener Oberflächenfunktionalitäten auf einem Adsorber wurde angestrebt, um die Molekülspezifität der Wechselwirkung zwischen Antibiotikum und Adsorber zu erhöhen. Dies kann zu einer deutlichen Steigerung der Effizienz führen und somit Aufarbeitungsschritte und Lösungsmittel einsparen. Diese vom Kooperationspartner instrAction vorgeschlagene Technik zur Aufarbeitung wurde außerdem auf das Modellantibiotikum Cephalosporin C übertragen und in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Werner Thiel der Anorganischen Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern entwickelt. Es wurden magnetische Partikel auf Silicat-Basis mit großen Oberflächen synthetisiert. Dies sollte zeigen, ob diese Technik auch auf die Aufarbeitung anderer Antibiotika übertragbar ist.

Ziel des vom Deutschen Bund Umwelt (DBU) geförderten Projektes war somit die selektive Isolierung von fermentativ hergestellten β -Lactam-Antibiotika aus komplexen Stoffgemischen unter anschließender magnetischer Separation. Das Verfahren soll im frühen Stadium

der Aufarbeitung eingesetzt werden, um die hydrolyseempfindlichen Antibiotika zu stabilisieren und damit die Ausbeute an Produkt zu erhöhen. Durch die magnetische Separation in einem Hoch-Gradienten-Magnet-Separator (HGMS) ist eine einstufige Fest/Fest/Flüssig-Trennung und somit zusätzlich ein erheblicher Zeitgewinn im Downstream-Prozess beabsichtigt. Es kommt zu Einsparungen an Lösungsmittel und Energie innerhalb des Prozesses. Dies stellt in ökologischer und ökonomischer Hinsicht einen interessanten Aspekt dar. In Abb. 72 ist schematisch das angestrebte Verfahren dargestellt. Im ersten Reaktor ist die Fermentation dargestellt, in dessen Medium die Antibiotika vorliegen. Die Aufarbeitung erfolgt im zweiten Reaktor mittels der bereits erwähnten Partikel bzw. Adsorber auf die im Kap. 4.3 und 4.4 näher eingegangen wird.

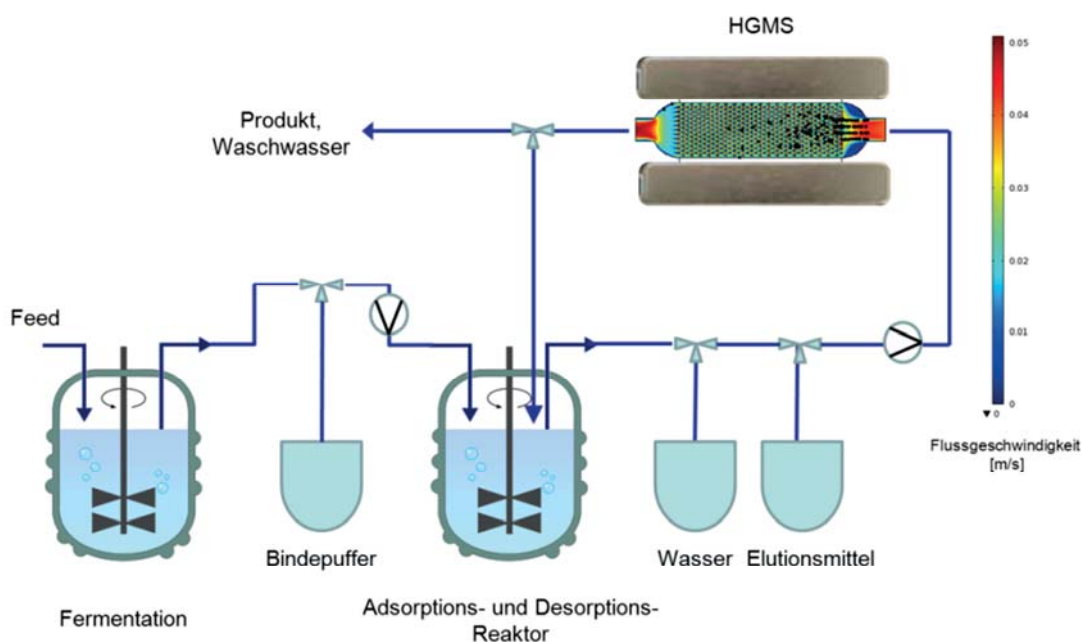


Abb. 72: Übersicht über den angestrebten Prozess von der Fermentation über die integrierte Aufarbeitung mittels selektiver Adsorbersysteme und der magnetischen Separation und Regeneration der magnetischen Partikel.

Die Synthese selektiver Rezeptorphasen für Lactam-Antibiotika wurde vom Projektpartner instrAction GmbH realisiert. Zur Identifikation des Adsorbers mit optimaler Bindungskinetik, bester Bindungskapazität, günstigsten Bedingungen für Elution und damit vollständiger Entfernung der Antibiotika wurden Trennversuche zur Bestimmung von Reinheit und Ausbeute des Zielprodukts in Modellmedien durchgeführt und Bindungseigenschaften sowie Hydrolyseprozesse mit Hilfe von HPLC-Methoden und photometrisch mittels UV/Vis-Spektroskopie charakterisiert. Nach Abschluss der Charakterisierung und Optimierung der Modellsysteme wurden einige Versuche zur Integration in den β -Lactam-Fermentationsprozess vorgenommen (siehe Kap.4.5). Hierzu wurden magnetostatische und fluiddynamische



Simulationen des Kammerinneren des HGMS durchgeführt und die Filtermatrix optimiert, um Tiefenfiltrationseffekte innerhalb der Kammer zu vermeiden. Die Integration dieses optimierten Separators in den Fermentationsprozess und die verschiedenen Schwierigkeiten der Umsetzung sind Gegenstand des letzten Teils dieses Kapitels.



4.2 Theoretische Grundlagen

4.2.1 Lactam-Antibiotika

Antibiotika sind von Pilzen oder Mikroorganismen produzierte Wirkstoffe, die das Wachstum oder die Vermehrung bestimmter Bakterien oder Mikroorganismen hemmen oder sie abtöten.^[189] Das erste bekannte β -Lactam-Antibiotikum war das Penicillin. Seine Entdeckung 1928 durch Alexander Fleming war ein Zufallsbefund.^[190] Die zunächst wenig beachteten Untersuchungen führten erst 1941 zu medizinisch verwendeten Präparaten, aufgrund deren Erfolge 1945 Fleming mit dem Nobelpreis belohnt wurde.^[191] Da Bakterien immer schneller Resistenzen gegen Antibiotika entwickeln, wurden seit der Anwendung des Penicillins verschiedene Lactam-Antibiotika untersucht und in der Therapie eingesetzt. Allen β -Lactam-Antibiotika ist der Lactamring gemein (siehe Abb. 73, blau markierter Ring). An diesem Ring sind verschiedene Fünf- oder Sechsringe gebunden, anhand derer die Klassifizierung der Lactamantibiotika vorgenommen wird. Die am häufigsten eingesetzten Lactam-Klassen sind die Penicilline und Cephalosporine. Diese Antibiotika besitzen eine hohe Wirksamkeit und eine geringe Toxizität gegenüber tierischen Zellen. Die Seitenketten der Antibiotika können mittels chemischer oder enzymatischer Methoden derivatisiert werden und ermöglichen so Variationen des Wirkungsspektrums, der pharmakologischen Eigenschaften und eine Erhöhung der Säurestabilität sowie der Stabilität gegenüber der β -Lactamase, dem Hauptenzym der bakteriellen Antibiotika-Resistenz.^[189] Aufgrund dieser hohen Variabilität sind die β -Lactam-Antibiotika die mengen- (etwa 70 % des Weltmarktes) und wertemäßig (etwa 50 % des Weltmarktes) wichtigsten Antibiotika.^[103, 189]

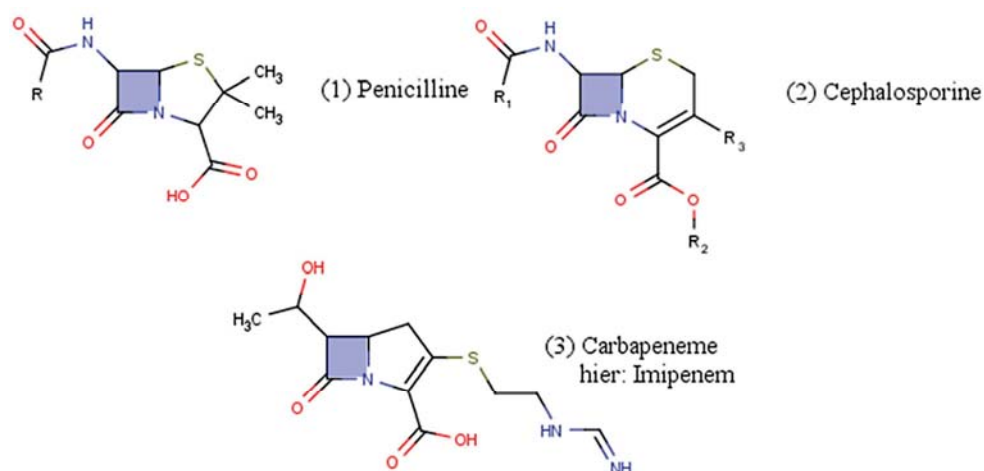


Abb. 73: Wichtigste Klassen der β -Lactam-Antibiotika; zu sehen sind Penicilline, Cephalosporine und Carbapeneme.

Die Cephalosporine haben etwa 50 % Anteil am gesamten Antibiotika-Markt. Cephalosporin C ist ein wichtiges Primärprodukt, aus dem halbsynthetische Cephalosporine mit verschiedensten Wirkungsspektren gewonnen werden. Cephalosporine werden z.B. von *Acremonium chrysogenum* gebildet und wurden erstmals 1956 als neue Klasse der β -Lactam-Antibiotika identifiziert.^[192] Diese Antibiotika weisen im Gegensatz zu Penicillin, eine hervorragende Breitbandwirkung gegenüber zahlreicher Gram-positiven und Gram-negativen Pathogenen bei guter Verträglichkeit auf. Sie sind deshalb die wichtigste Gruppe der Lactam-Antibiotika.

Die steigende Anzahl an Antibiotikaresistenzen forderte die Suche nach neuen Antibiotika-Klassen innerhalb der Lactam-Antibiotika. Die Carbapeneme sind vom Grundgerüst dem Penicillinen ähnlich, lediglich der Schwefel des Penamringes ist nach außen verlagert und eine zusätzliche Doppelbindung ist im Penamring vorhanden (siehe Abb. 73). Das Wirkungsspektrum ist ähnlich dem der Cephalosporine und umfasst somit sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Erreger. Das wichtigste Merkmal der Carbapeneme ist die hohe Stabilität gegen die Hydrolyse der meisten β -Lactamasen.^[193] Thienamycin war in den 1970ern das erste isolierte Carbapenem,^[194] gefolgt von dem 1984 erstmals in Deutschland eingesetzten Imipenem.^[193]

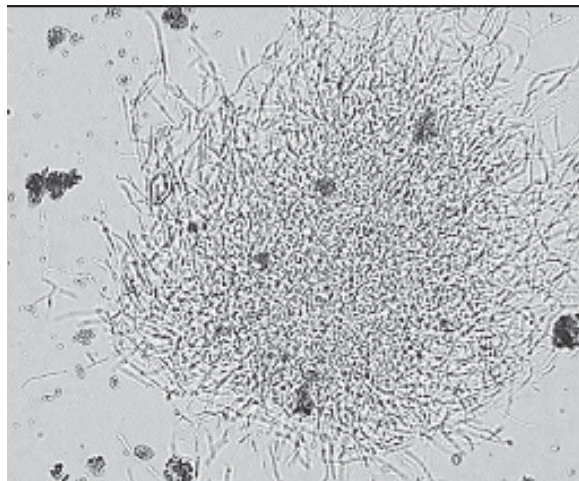


Abb. 74: Lichtmikroskopische Aufnahme in 400-facher Vergrößerung des verwendeten *Streptomyces fulvoviridis* 3N503 zur Gewinnung von beta-Lactam-Antibiotika.^[195]

Sowohl Cephalosporin C als auch Imipenem dienen im Folgenden als Modellantibiotikum für die Aufarbeitung mittels magnetischen Adsorbersystemen und der Hochgradienten-Magnet-Separation. Beide Antibiotika-Klassen werden großtechnisch von pelletbildenden, filamentös wachsenden Mikroorganismen gebildet. Abb. 74 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme von *Streptomyces fulvoviridis* 3N503. Streptomyceten wachsen, ähnlich dem Pilzwachstum,



zunächst fadenförmig ausgehend von einer Spore. Durch fortgesetzte Verzweigungen entstehen neue Seitenäste (auch Hyphen genannt), die daraus das Myzel aufbauen. Je nach Fermentationsbedingungen entstehen kugelförmige oder unregelmäßige Strukturen, die bereits erwähnten Pellets.^[196] Die Streptomyceten interagieren wegen ihrer verzweigten Struktur mit Feststoffen, was dazu führt, dass diese zwischen den Fäden festgehalten werden. Die fermentative Darstellung von Antibiotika wird üblicherweise als Batchverfahren durchgeführt. Für das Verfahren werden zwei Schritte benötigt: Biomasse-Generierung und Stressinduktion auf die Zellen, damit die sekundären Metaboliten produziert werden.^[197] Die Aufreinigung der Antibiotika aus den zumeist hochviskosen Medien muss für diese wasserlöslichen Moleküle in mehreren Schritten erfolgen. Neben der Filtration der Biomasse muss das Antibiotikum durch Adsorption, Ionenaustausch oder chemische Ausfällung aus dem Fermentationsmedium extrahiert werden. Die Adsorption ist somit ein wichtiger Prozessschritt in der Gewinnung von Antibiotika, auf den im nächsten Kapitel näher eingegangen wird.



4.2.2 Adsorption

Die Adsorption ist ein recht wenig verstandenes und schwer zu berechnendes Verfahren, birgt jedoch hinsichtlich der bisher erzielten Fortschritte auf diesem Gebiet ein recht hohes Potential für zukünftige Anwendungen. Eine der ersten großtechnischen Anwendungen der industriellen Adsorptionstechnik war die Entfärbung von Flüssigkeiten in der Textilindustrie unter Verwendung von Aktivkohle in der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts.^[198] Die Aktivkohle war auch besonders während des ersten Weltkrieges sehr gefragt als Filter für Gasmasken. In der neueren Zeit gewann besonders das Verfahren der chromatographischen Trennung zunehmend an Bedeutung. Da die Adsorptionstechnik immer mehr Einzug in die verschiedenen Lebensbereiche hielt, war auch die Forschung daran interessiert, die Vorgänge der Adsorption zu verstehen. Sie entwickelte immer genauere Modelle zur Vorhersage der Adsorptionsprozesse, darunter z.B. die Definition der Begriffe der Adsorptionsisotherme durch Ostwald (1885), die thermodynamische Beschreibung der Adsorption durch Gibbs (1876) und die Entwicklung verschiedener Adsorptionstheorien wie z.B. von Langmuir (1916), Brunauer-Emmet-Teller (1938) und Lewis (1950). Der Adsorptionsvorgang wird hier zumeist in mehrere Schritte unterteilt und ist stark abhängig vom verwendeten Adsorber, sprich dem Feststoff, auf dessen Oberfläche das Zielmolekül adsorbiert wird. Als erster Teilschritt wird der Stofftransport (Diffusion oder Konvektion) zur Phasengrenzschicht definiert. Anschließend erfolgt die Diffusion durch den Grenzfilm hin zur Adsorberoberfläche oder aber auch in die Poren des Adsorbers hinein. Die Adsorption selbst ist eine exotherme Gleichgewichtsreaktion, die bei der Kinetik meist vernachlässigt werden kann, da sie nicht den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt.^[199]

Grundsätzlich ist die Adsorption in Gasphasen- und Flüssigphasen-Adsorption unterteilt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich aus Flüssigkeiten adsorbiert, so dass sich dieser Teil nur mit der Flüssigphasen-Adsorption beschäftigt. Ein wichtiger Faktor bei der Adsorption in der flüssigen Phase ist der Partikeldurchmesser des Adsorbers. Hierbei gilt, je kleiner die Partikel sind desto kürzer sind die Diffusionswege und desto größer ist der Stoffaustausch, sprich desto schneller der Adsorptionsprozess. Zusätzlich zur Partikelgröße spielt die innere bzw. spezifische Oberfläche eine wichtige Rolle bei der Adsorption. Diese sollte möglichst groß gewählt werden, um dem Zielmolekül eine möglichst große Oberfläche zur Wechselwirkung zur Verfügung zu stellen. Dies kann die Kapazität des Adsorbers drastisch erhöhen, führt jedoch auch zu verlängerten Adsorptionszeiten aufgrund des hohen Anteils an Porendiffusion. All diese Faktoren müssen bei der Untersuchung der Adsorption berücksichtigt

werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die eingesetzten Partikelsysteme mit Hilfe der Laserbeugung und der Stickstoffadsorption nach dem BET-Modell untersucht und charakterisiert. Zur Betrachtung des Adsorptionsvorgangs in der flüssigen Phase werden Adsorptionsisothermen herangezogen. Die Isotherme beschreibt den Zusammenhang zwischen Adsorberbeladung und der Konzentration des Zielmoleküls in Lösung. Den Isothermen liegen verschiedene Modelle zugrunde, von denen einige in diesem Abschnitt kurz diskutierte werden.

Das einfachste Modell ist die Einkomponenten-Isotherme, bei der davon ausgegangen wird, dass nur eine Komponente des Systems mit dem Adsorber wechselwirkt. Die Henry-Gleichung postuliert einen linearen Zusammenhang zwischen Adsorberbeladung q und Molekül-Konzentration c :^[200]

$$q = k \times c \quad (4)$$

Diese Gleichung kann thermodynamisch nicht hergeleitet werden, ist demnach eine empirische Gleichung, bestätigt jedoch den Zusammenhang für kleine Konzentrationsbereiche. Soll der gesamte Konzentrationsbereich beschreiben werden, wird zumeist die Langmuir-Gleichung zugrunde gelegt:^[201]

$$q = q_{max} \times \frac{(k_1 \times c)}{(1 + k_1 \times c)} \quad (5)$$

Die Langmuir-Theorie wird auch als Basistheorie der Adsorption bezeichnet. Dabei wird angenommen, dass nur eine einzige Schicht der Zielmoleküle die ideale Oberfläche des Adsorbers belegt. Im Bereich hoher Konzentrationen nähert sich gemäß der Gleichung (5) die Beladung q asymptotisch der maximalen Beladung des Adsorbers q_{max} , während im kleinen Konzentrationsbereich der Isothermenverlauf in die Henry-Gleichung übergeht.

Ebenso häufig wie die Langmuir-Gleichung ist in der Literatur die Freundlich-Gleichung zur Beschreibung von Isothermen zu finden:^[202]

$$q = k \times c^{1/n} \quad (6)$$

Alle Potential-Funktionen können unter dem Sammelbegriff Freundlich-Isotherme zusammengefasst werden. Für $n = 1$ geht die Freundlich-Isotherme in die Henry-Gleichung über. Je größer n desto mehr geht die Freundlich-Isotherme in eine nichtlineare Form über, die auch als irreversible Isotherme bezeichnet wird, da in diesem Fall die Umgebungskonzentration des Moleküls für eine Elution auf annähernd null reduziert werden muss. Die

Freundlich-Gleichung wird z.B. zur Beschreibung der Flüssigphasen-Adsorption auf Aktivkohle benutzt und beschreibt irreversible Chemisorptionsprozesse hinreichend gut.^[203] Ein Nachteil dieser Isothermengleichung ist, dass nie eine Sättigungbeladung erreicht wird. Es wurde also nach einer Gleichung gesucht, die die Form der Freundlich-Gleichung besitzt aber ein Beladungslimit für hohe Molekülkonzentrationen erreicht. In vielen Anwendungen werden deshalb Kombinationen aus den Isothermen-Gleichungen von Freundlich und Langmuir gebildet; ein Beispiel ist die Sips oder auch Langmuir-Freundlich-Gleichung.^[204,205]

$$q = q_{max} \times \frac{(k_1 \times c)^{1/n}}{(1 + (k_1 \times c)^{1/n})} \quad (7)$$

Die äußere Form der Gleichung entspricht der von Langmuir, der Unterschied besteht in dem zusätzlichen Faktor n . Für $n = 1$ erhält man die Langmuir-Gleichung für eine ideale (homogene) Oberfläche. Zumeist ist $n > 1$, da es sich in realen Systemen nicht um eine homogene Oberfläche handelt; n beschreibt demnach die Heterogenität des Systems. Für Zeolithe z.B. nimmt n kleinere Werte an als für ein Adsorberpolymer, da die Porenstruktur der Zeolithe geordnet ist und somit auch die Bindungsstellen örtlich definiert sind. Für kleine Konzentrationsbereiche entspricht dieses Modell noch nicht dem Henry-Modell des linearen Zusammenhangs zwischen Beladung und Konzentration. Eine andere empirische Gleichung ist die Gleichung nach Toth.^[206,207]

$$q = q_{max} \frac{k \times c}{(1 + (k \times c)^n)^{1/n}} \quad (8)$$

Für $n = 1$ geht die Gleichung in die Langmuir-Gleichung über. Genau wie bei der Langmuir-Freundlich-Isothermen gibt der Faktor n die Heterogenität des Adsorber-Adsorbat-Systems an. Die Verläufe der unterschiedlichen Adsorptionsisothermen für die Modelle nach Freundlich, Langmuir-Freundlich und Toth sind in der Abb. 75 a) - c) zusammengefasst. Die Verläufe sind für die Gasphasenadsorption erstellt wurden, weshalb die x-Achse auch mit dem Druckverhältnis P/P_0 beschriftet ist, was allerdings im Falle der Flüssigphasenadsorption auf das Konzentrationsverhältnis übertragen werden kann. Für die untersuchten Adsorptionsisothermen wurde das Modell nach Sips zur Charakterisierung herangezogen.

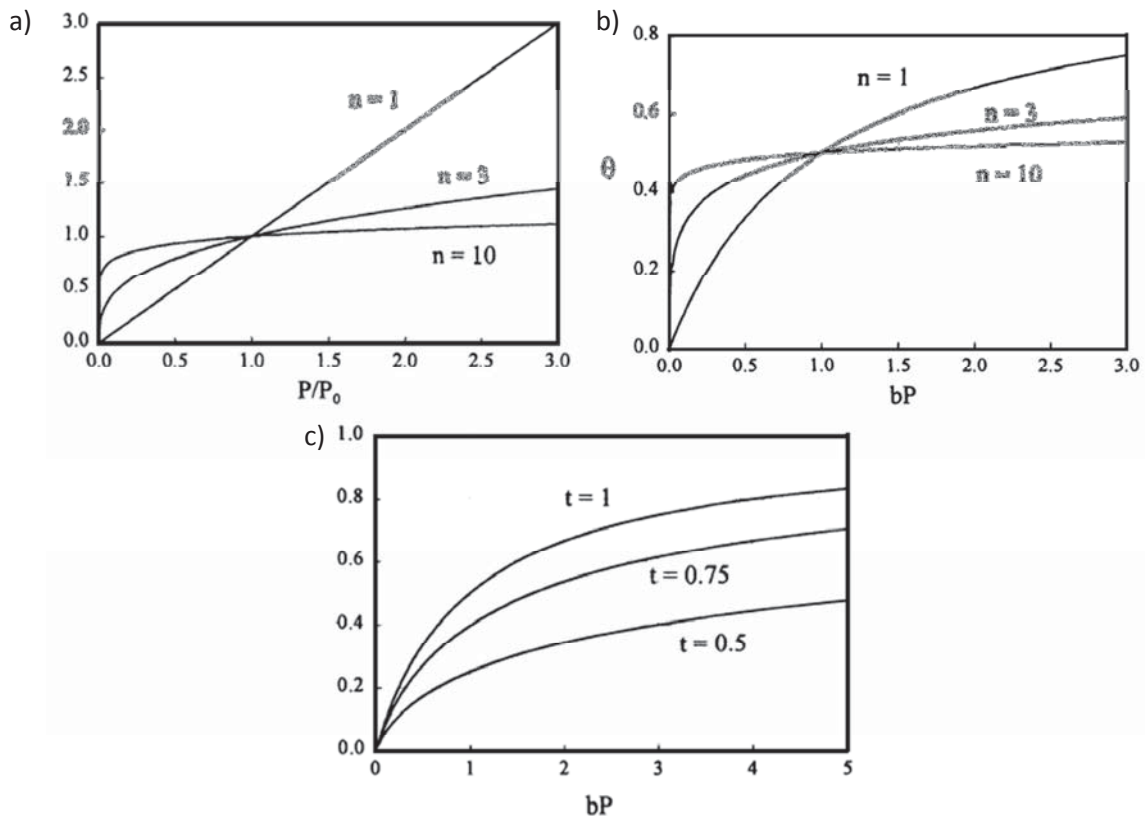


Abb. 75: Adsorptionsisothermen verschiedener Modelle:^[199] a) Plot der Freundlich-Gleichung, b) Langmuir-Freundlich bzw. Sips Gleichung, c) Toth Gleichung.



4.2.3 Hochgradienten Magnetseparation - Stand der Technik

Für die Aufreinigung bzw. dem sogenannten Downstream Prozess biotechnologischer Produkte werden mehrere Operationsschritte wie Zentrifugation, Präzipitation oder Chromatographie benötigt. Dies liegt in erste Linie an der hohen Komplexität und Viskosität der Fermentationsmedien, aus denen das Produkt in hoher Reinheit gewonnen werden muss. Die Produktausbeute nimmt mit jedem Aufreinigungsschritt zu; dies ist sehr zeitaufwendig und führt zu hohen Produktionskosten. Im Allgemeinen werden bis zu 80 % der Produktionskosten für den Downstream-Prozess benötigt.^[208]

Eine Möglichkeit, um die Anzahl der Operationsschritte zu reduzieren, ist die Verwendung magnetisierbarer Partikelsysteme, welche mehrere Aufarbeitungsschritte zu einem Ein-Schritt-Prozess zusammenfasst und so eine in-situ Aufreinigung des Produktes während der Fermentation ermöglicht. Unterschiedliche Funktionalisierungen der Partikeloberfläche, wie z.B. Antikörper, Aptamere oder Kombinationen aus ionischen und polaren Ankergruppen eröffnen eine breite Palette möglicher Zielprodukte. Durch das Anlegen eines äußeren magnetischen Feldes, können die auf den magnetisierbaren Partikeln selektiv gebundenen Produkte einfach von den unmagnetisierbaren Komponenten der Fermentationsbrühe (Mikroorganismen, Zelltrümmer, Sedimente, etc.) getrennt werden. Für die magnetische Filtration der Partikelsysteme wird ein sehr hoher Feldgradient benötigt. Dieser wird durch das Einbringen einer magnetisierbaren Matrix in ein starkes homogenes Magnetfeld erreicht, da durch die Magnetisierung der Matrix sich um die Matrixsegmente hohe Feldgradienten bilden.

Die Hochgradienten-Magnetseparation (HGMS) wird seit den frühen 70er Jahren untersucht und auch im Bereich der Abwasseraufarbeitung eingesetzt.^[218] Eine aktuellere Anwendung ist der Einsatz in Bioprocessen, speziell der Gewinnung von Bioprodukten aus Fermentationsbrühen.^[209,210,211,212] Bei diesen Betrachtungen ist es besonders wichtig, einen Kompromiss zwischen der magnetischen Separation und der Biomassepermeabilität bzw. der nicht-magnetisierbaren Komponenten, durch die Kammer zu finden. Der Artikel von Franzreb et al.^[213] gewährt einen guten Überblick über die Bioprozesse in denen eine Form der Hochgradienten-Magnetseparation zum Einsatz kommt. Des Weiteren definiert dieser Artikel die Spezifikationen, die ein HGMS erfüllen muss, um als Separationssystem in Bioprocessen Anwendung zu finden.^[213]

Für eine effiziente Separation magnetischer Partikel mittels HGMS wird ein Hintergrundmagnetfeld von mindestens 0,3 T oder größer benötigt. Die Separationsmatrix sollte

eine Partikelseparationskapazität von 100 kg/m^3 aufweisen. Es wird eine Effizienz der Partikelseparation von $> 99 \%$ bei hohen Flussraten $> 20 \text{ m/h}$ (25 ml/min für das vorliegende HGMS-System) sowie eine komplette Partikelresuspendierung von $> 98 \%$ bei den Wasch- und Elutionsschritten angestrebt. Die Wartung des Gerätes sollte einfach gehalten werden und die Aspekte des CIP berücksichtigen. Die Separationsmatrix muss einfach erreichbar und austauschbar gestaltet werden, um die bereits erwähnte Wartung einfach zu halten.

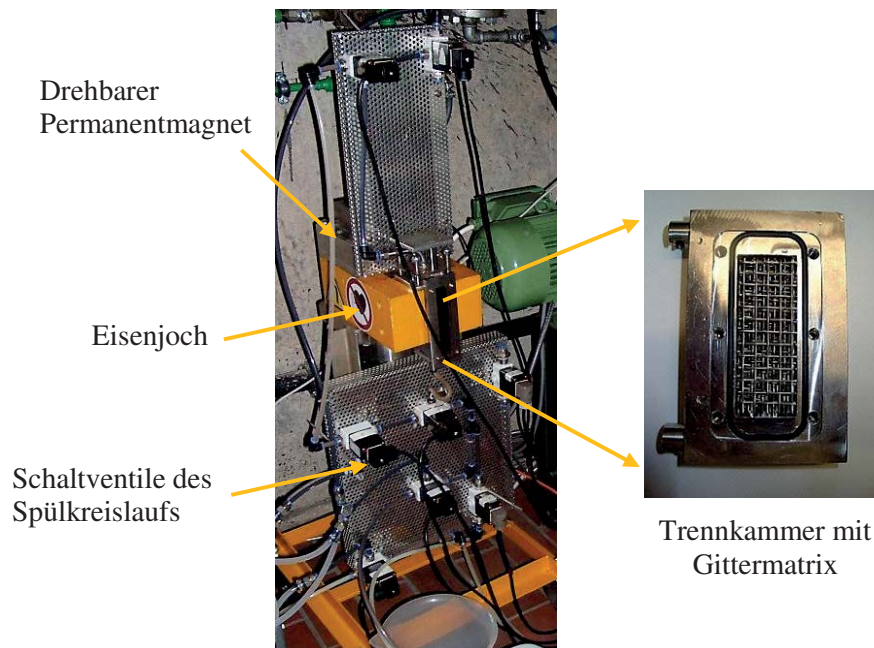


Abb. 76: Hochgradientenmagnetseparator (HGMS) für den Einsatz in biotechnologischen Systemen. Links ist der komplette Aufbau des Gerätes inklusive der Schaltventilen für die Spülzyklen zusehen. Rechts ist ein Foto der ausgebauten Separationskammer mit Gittermatrix dargestellt.

Das Forschungszentrum Karlsruhe hat bereits einige Anstrengungen unternommen, um ein HGMS für biotechnologische Anwendungen zu entwickeln.^[214,215] Eines dieser Geräte wurde von Herrn Prof. Kampeis des Umweltcampus Birkenfeld zur weiteren Optimierung zur Verfügung gestellt. Um die zuvor genannten Spezifikationen zu erreichen, konzentrieren sich die hier vorgestellten Optimierungen der Separation auf die Separationsmatrix. Hierzu wurden vom Forschungszentrum Karlsruhe bisher nur wenige Untersuchungen gemacht.

Bei den ersten Anwendungen der Hochgradienten-Magnetseparation wurde als Matrix Stahlwolle eingesetzt. Diese ungeordnete Separationsmatrix zeigt einige Nachteile gegenüber geordneter Systeme. So liegen z.B. einige Segmente der ungeordneten Matrix parallel zu dem angelegten Feld und tragen so nicht zu der Partikelseparation bei. Außerdem ist der Strömungswiderstand für ungeordnete Systeme höher als für geordnete Systeme, was einer Magnetseparation entgegenwirkt. Im Hinblick auf das Ausspülen der Matrix nach dem

Abschalten des äußeren Magnetfeldes zur Elution der Partikel wird diese durch die Verwendung geordneter Systeme erleichtert, was zu einer Einsparung an benötigten Lösungsmitteln führt. Zusätzlich erleichtert die Verwendung einer geordneten Anordnung von Matrix-Gittern die mathematische Beschreibung der Partikelseparation. Es wurden bereits einige mathematische Annäherungen gemacht, um die Partikelbewegung innerhalb der Kammer sowie den gesamten Separationsprozess zu beschreiben und gegebenenfalls vorherzusagen. Detaillierte Beschreibungen sind den Veröffentlichungen^[216,217,218] zu entnehmen.

In erster Linie sind drei Anordnungen von Gitterstäben, longitudinal, transversal und axial beschrieben (siehe Abb. 77). Die Arbeit vergleicht lediglich die letzten beiden Orientierungen, da das vorliegende HGMS eine longitudinale Anordnung nicht zulässt.

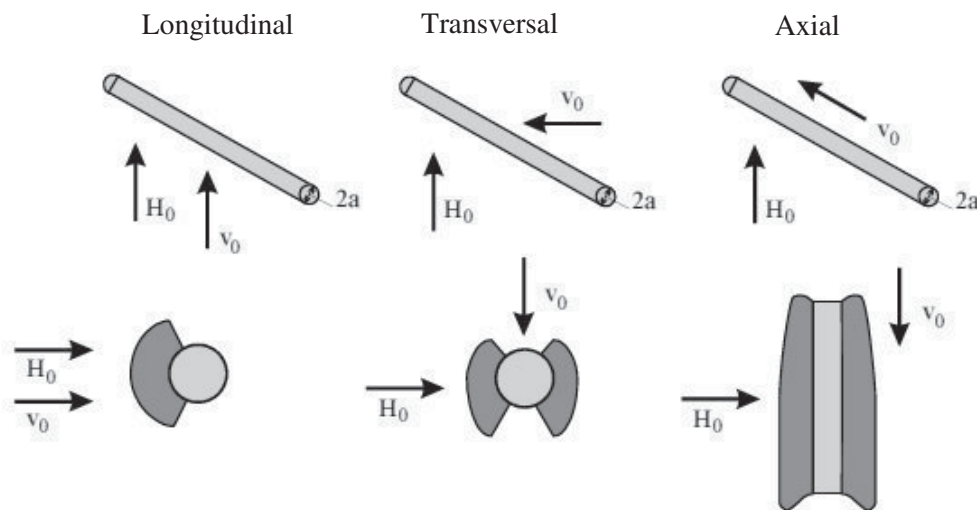


Abb. 77: Geometrische Grundkonfigurationen der Anordnungen zwischen Draht, Magnetfeld und Strömungsrichtung. Zusätzlich sind in dunkelgrau die zugehörigen Partikelanlagerungsbereiche dargestellt.^[218]

In der Literatur sind verschiedene Ansichten zu finden, welche Orientierung den höchsten Beitrag zur Partikelseparation leistet. Im Rahmen von vergleichenden Einzeldraht-Simulationen wurde für die transversale Orientierung der Filter eine deutlich höhere Effizienz der Separation verglichen zur axialen Anordnung errechnet,^[219] die folgenden Multidraht-Simulationen zeigten zwischen diesen beiden Anordnungen einen geringeren Unterschied in der Effizienz als basierend auf dem Einzeldraht-Modell erwartet, jedoch weiterhin einen Vorteil für die transversale Orientierung.^[218,220] Einige experimentelle Untersuchungen zeigten eine fast identische Effizienz der Separation für transversale und axiale Anordnungen.^[221]



Um diese teilweise widersprüchlichen Aussagen in der Literatur einordnen zu können, wurde als Teil der hier präsentierten Arbeit anhand von FEM-Simulationen und Separationsexperimenten untersucht, welche Orientierung für den vorliegende HGMS optimal ist. Außerdem wurde ein Konzept zur Optimierung der HGMS-Matrix für biotechnologische Prozesse mit integrierter Magnetseparation erarbeitet. Hierfür wird eine qualitative Beschreibung der Einflüsse der Gitterparameter auf den Feldgradienten und die Biomasserückhaltung benötigt. Diese Einflüsse wurden anhand der Finite Elemente Methode (FEM) unter Berücksichtigung von Fluidodynamik und Magnetostatik mit Hilfe der Software COMSOL Multiphysics simuliert. Dieses entwickelte Simulationsmodell ermöglicht die Variation und den Vergleich verschiedener Gitterparameter wie die Drahtanordnung oder die relativen Abstände zwischen den Gitterstäben. Um die gefundenen Simulationsmodelle in Separationsversuchen zu bestätigen, wurden speziell gefertigte Separationskammern eingesetzt, die eine Änderung der erwähnten Gitterparameter ermöglicht.



4.3 Darstellung der Adsorbersysteme

4.3.1 Selektive Adsorbersysteme zur Aufarbeitung von β -Lactam Antibiotika

Die Synthesen dieser selektiven Adsorberphasen wurde vom Kooperationspartner instrAction GmbH durchgeführt, dessen Technologie mit einigen Patentfamilien geschützt ist.^[222] Der erste Schritt bei der Suche nach einer selektiven Adsorberphase auf Basis der Netzwerktechnologie der instrAction GmbH ist ein Screening der Phasenbibliothek, in diesem Fall von über 200 Säulen. Bei der Wahl der Bedingungen wurden Ionenstärke und pH-Wert des Mediums imitiert. Durch die Wahl der Liganden sind ionische, lipophile, Wasserstoffbrückenbindungen und π - π -Wechselwirkungen auf einer einzigen instrAction Phase möglich.^[223] Im nächsten Schritt wird auf einem porösen Träger, z.B. Kieselgel, eine Polymerschicht aufgebracht, die ein stabiles, eingeschränkt flexibles Netzwerk bildet.

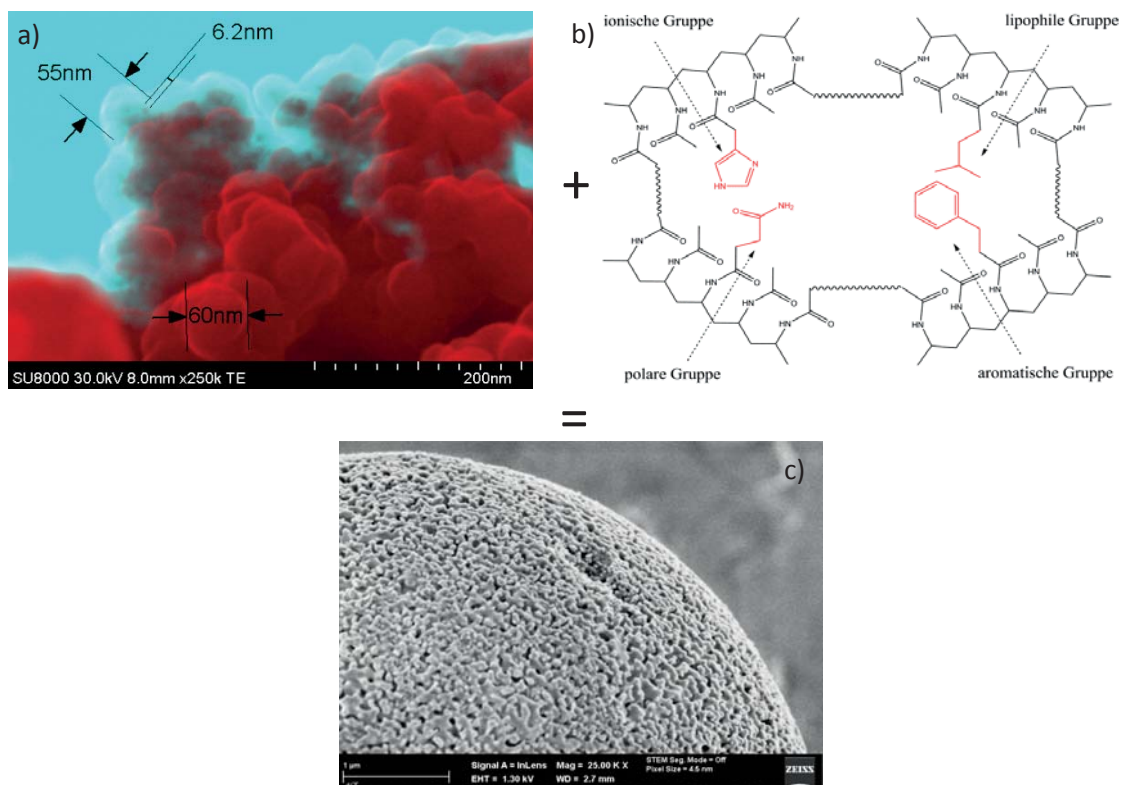


Abb. 78: Synthese selektiver, magnetischer Adsorbermaterialien durch den Kooperationspartner instrAction: a) zeigt ein mögliches magnetisches Trägermaterial zur Aufbringung des Polymernetzwerkes, in welches anschließend unterschiedliche funktionelle Gruppen eingebracht werden (siehe b)), c) zeigt exemplarisch die instrAction Phase ND 11490.

In dieses Netzwerk werden dann im nächsten Syntheseschritt die zuvor mittels Screening ausgewählten funktionellen Liganden aufgebracht. Die hohe Selektivität wird durch eine



multivalente Wechselwirkung des Zielmoleküls mit den funktionellen Liganden der Adsorberoberfläche erreicht. Diese Polyvalenz ist besonders in der Biologie bekannt, z.B. bei der Bindung von Mikroorganismen oder Antikörper an Zelloberflächen. Sie ermöglicht eine sehr feste Bindung durch die Zusammenführung verschiedener funktioneller Gruppen, was eine Vervielfältigung der bestehenden Wechselwirkung und somit eine Erhöhung der Selektivität herbeiführt.^[224] Die Affinität zum Zielmolekül wird demnach durch die Ligandendichte, das Netzwerk und die multivalenten Wechselwirkungen bestimmt. Auf Grundlage dieser Untersuchungen wurden neue Phasen entwickelt, die sowohl aromatische Wechselwirkungen als auch ionische Gruppen enthalten. Es wurden verschiedene Phasenmotive untersucht, die jeweils eine instrAction interne Nummer tragen. Eine Zusammenfassung der verwendeten Adsorber ist dem Anhang E zu entnehmen.

Der Vergleich mit verschiedenen kommerziell erhältlichen Partikelsystemen durch Adsorptionsisothermen sowie Selektivitätsstudien ist Basis zur weiteren Optimierung der selektiven unmagnetischen Adsorberphase. Da die selektiven instrAction-Phasen auf verschiedenen Trägern aufgebracht werden können, ist auch ein magnetischer Träger möglich. Erste Versuche mit einem magnetischen unporösen Trägermaterial lieferte kein stabiles Polymernetzwerk. Die optimierte Adsorberphase wurde gegen Ende der Projektlaufzeit auf magnetische makroporöse Silicat-Partikel der Firma Chemicell aufgebracht und in Adsorptions- und Selektivitätsstudien untersucht. Die Ergebnisse sind in Kapitel 4.4.3 und Kapitel 4.4.6 dargestellt.

4.3.2 Selektive Adsorbersysteme zur Aufarbeitung von Cephalosporin C

Um zu überprüfen, ob das Prinzip der Affinitäts- und Selektivitätssteigerung (InstrAction-Technologie) durch Einsatz mehrerer funktioneller Gruppen auf einem Adsorbersystem auch auf weitere Antibiotika übertragbar ist, wurden periodisch mesoporöse Organosilicate (PMO) eingesetzt. Die Synthese der PMO erfolgt durch Herrn Dirk Schaffner der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Werner Thiel (Anorganische Chemie TU KL). Als Modellantibiotikum dient das Cephalosporin C (CPC), welches ein wichtiges fermentativ gewonnenes Vorprodukt vieler halbsynthetischer Cephalosporine ist und dessen Absorptionsverhalten bereits mehrfach in der Literatur untersucht wurde.^[225,226,227]

Mesoporöse Materialien werden von vielen Arbeitsgruppen seit ihrer Entwicklung Anfang der 90er Jahren auf ihre möglichen Anwendungen in der Katalyse, Adsorption oder Chromatographie hin untersucht.^[228] 1999 gelang es mit der Entwicklung der periodisch mesoporösen Organosilicate die hohe Variabilität der organischen Chemie mit der thermischen Stabilität und den robusten Eigenschaften eines anorganischen Silicates zu vereinen.^[229,230,231] Für dessen Synthese wird typischerweise eine Silicium-Vorstufe eingesetzt und unter starkem Rühren einer basisch wässrigen Lösung zugesetzt. Nach Hydrolyse des Silicium-Precursors tritt dieser in strukturgebende Wechselwirkung mit den kationischen Enden des Templates und durch Kondensation entsteht das Silicium-Netzwerk. Als Silicat-Vorstufe wurde 1,4-Bis(triethoxysilyl)benzol eingesetzt; die für diese Arbeit relevante Reaktion ist in Abb. 79 dargestellt.

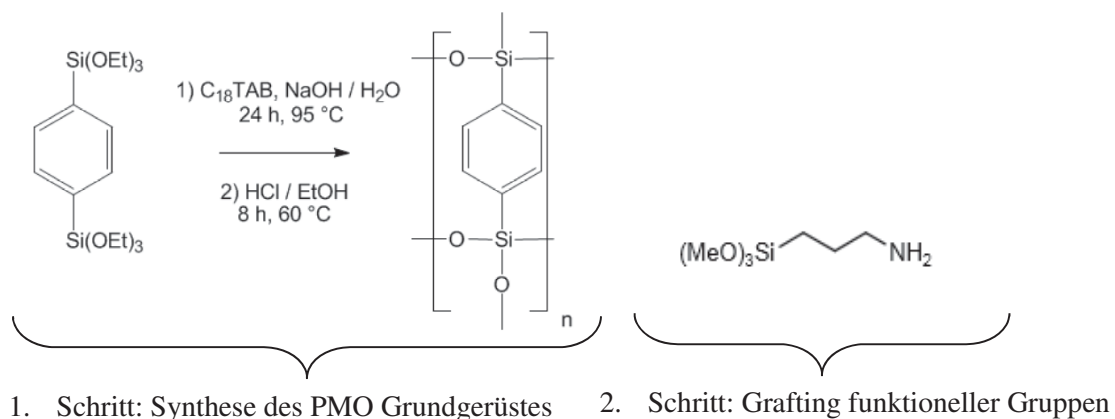


Abb. 79: Herstellung des Grundgerüstes der PMO. Dargestellt sind die zwei Reaktionsschritte. Im ersten Schritt entsteht das Grundgerüst mit den Aromaten als erste funktionelle Gruppe, im zweiten Schritt wird nachträglich eine Aminogruppe in das Polymernetzwerk eingebracht.^[232]

Die Hydrolyse und Kondensationsschritte laufen so lange parallel ab, bis das gesamte Material komplett durchkondensiert ist und auf der Silicat-Oberfläche nur noch OH-Gruppen vorhanden sind. Anschließend wird durch thermische Zersetzung oder wie in Abb. 79 dargestellt, durch Extraktion die Templat-Moleküle in den Poren entfernt. Nach der Entfernung des organischen Templates verfügen die Materialien über eine Fernordnung der Poren. Abb. 80 fasst die verschiedenen Schritte der Synthese und auch die Entstehung dieser Fernordnung zusammen. Neben den Reaktionsbedingungen wie Temperatur oder Reaktionszeit spielt natürlich auch die Wahl der Template sowie deren Konzentrationsverhältnis zum Precursor eine entscheidende Rolle. Hier kommen meist ionische langkettige Tenside zum Einsatz, wie z.B. Octadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB), die unter Einhaltung bestimmter Bedingungen (Temperatur, Konzentration, Lösungsmittel, pH,...) sphärische Micellen bilden. Diese Micellen ordnen sich wiederum in stäbchenförmige Micellen mit konstantem Durchmesser an (etwa die doppelte Länge der Alkylkette) und in Gegenwart der Organosilicat-Vorstufe unterliegen diese Tenside einem Selbstorganisationsprozess, der dann zur Bildung einer flüssigkristallinen Phase führt.^[233] Die Hydrolyse und Kondensation der Vorstufe in dieser Phase ergibt das geordnete, periodische Hybridmaterial, das nach Entfernen des Tensids zugängliche Poren einheitlicher Größe und Gestalt aufweist.

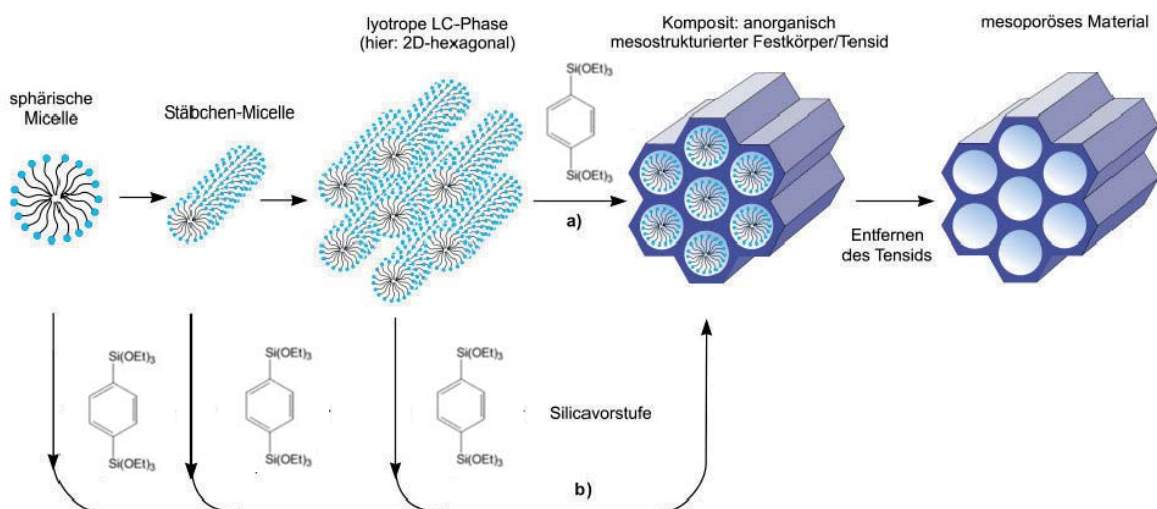


Abb. 80: Schematische Darstellung des Bildungsprozesses mesoporöser Materialien durch strukturdirigierende Tenside; (a) echter Flüssigkristall-Templat-Mechanismus, (b) kooperativer Flüssigkristall-Templat-Mechanismus.^[234,235,236]

Die OH-Gruppen auf der Silicat-Oberfläche eignen sich in einem anschließenden Schritt sehr gut, nachträglich organische Ankergruppen für die spezifische Adsorption aufzubringen. Hierzu wird eine andere Silicat-Vorstufe verwendet, z.B. mit einer endständigen Amino-Gruppe. Es wird auch von Synthesen berichtet, bei denen beide Silicat-Vorstufen in einer Ein-

Topf-Reaktion zum PMO umgesetzt werden.^[237] Diese Methode der nachträglichen in-situ Modifikation oder auch Grafting genannt, eignet sich jedoch sehr gut, um das optimale Verhältnis zwischen aromatischer Ankergruppe und Amino-Gruppe zu screenen, was auch bei den hier verwendeten PMO gemacht wurde. Des Weiteren hat diese Methode den Vorteil, dass alle organischen Ankergruppen auf der Oberfläche des PMO lokalisiert sind, sprich nicht in dem Silicat-Netzwerk gefangen sind und somit auch für die Adsorption zur Verfügung stehen.

Um die so gewonnenen Adsorber auch separieren zu können, ist es möglich, superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel in das PMO einzubetten. Die Arbeitsgruppe von Herrn Thiel hat dies bereits erfolgreich im Rahmen eines Projektes zur Palladium-Katalyse^[238] und auch zur katalytischen Epoxidation von Olefinen^[239] durchgeführt. Die magnetischen PMO wurden im Rahmen dieser Projekte elektronenmikroskopisch charakterisiert (siehe Abb. 81). Die Adsorptions- und Selektivitätsstudien der unmagnetischen PMO sind in Kapitel 4.4.5 und Kapitel 4.4.6 dargestellt.

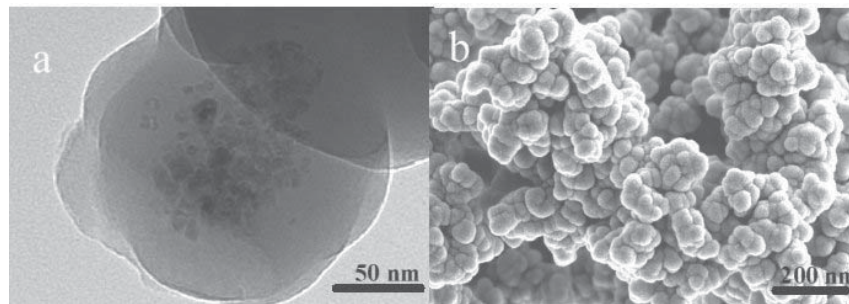


Abb. 81: Elektronenmikroskopische Charakterisierung der magnetischen PMO: a) die Darstellung eines einzelnen magn. PMO Partikels mittels High Resolution TEM ermöglicht die Visualisierung der eingelagerten magnetischen Eisenoxid Partikel, b) Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Oberfläche der magnetischen PMO.^[240]



4.4 Adsorptionsverhalten

4.4.1 Stabilität der Antibiotika und deren Abbauprodukte

Zur Optimierung der Adsorptionsparameter ist es notwendig die Stabilität der Antibiotika bei den verschiedenen Bedingungen, insbesondere pH-Wert und Temperatur, zu kennen. Hierzu wurden Abbaustudien mit den β -Lactam-Antibiotika Imipenem und Cephalosporin C durchgeführt.

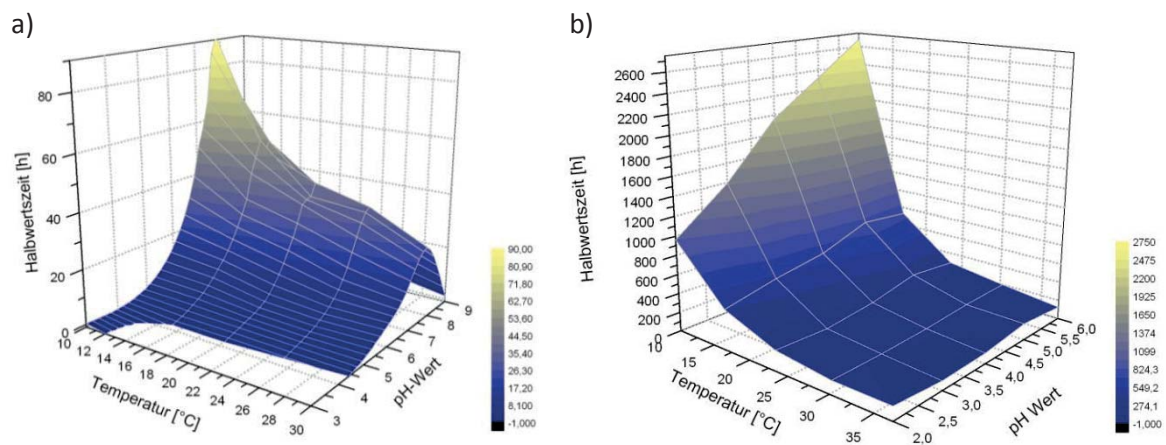


Abb. 82: Abbauntersuchungen von a) Imipenem und b) Cephalosporin C. Aufgetragen sind Temperatur gegen pH-Wert und Halbwertszeit in Stunden.

Aus Abb. 82 a) geht hervor, dass der Abbau von Imipenem stark vom pH-Wert abhängig ist und ein pH-Optimum von 7,9 aufweist. Dies entspricht dem isoelektrischen Punkt des Antibiotikums. Für Cephalosporin C ist in dem untersuchten pH-Bereich kein direktes pH-Optimum erkennbar. Die ermittelten Halbwertszeiten nehmen nur zum neutralen Bereich hin leicht zu (siehe Abb. 82 b). Für Cephalosporin C ist in erster Linie die Temperatur entscheidend für den Abbau des Antibiotikums. Eine Adsorption des Imipenems ist im sauren pH-Bereich somit nicht realisierbar, da hier der Abbau zu schnell verläuft. Eine Aufarbeitung sollte demnach eher im alkalischen Milieu stattfinden, womit die Verwendung von schwach basischen Ionenaustauschern entfällt, da diese nur im pH-Bereich von 1-7 einsetzbar sind. Der Vergleich der beiden Antibiotika miteinander zeigt, dass das Cephalosporin C deutlich stabiler ist und keine der bestimmten Halbwertszeiten unter 100 h liegt. Bei Imipenem stellt sich dies anders dar; hier tritt keine Halbwertszeit oberhalb von 100 h auf. Dieser deutlich schnellere Abbau des Imipenem erschwert die Suche nach einem Partikelsystem zur Aufreinigung.

Die Abbauprodukte der Antibiotika sind vielfältig und wurden für die bessere Interpretation der HPLC-Chromatogramme genauer betrachtet. Der Abbau von Imipenem in wässrigen Lösungen wird von Smith et al. übersichtlich zusammengefasst.^[241] Das in Abb. 83 dargestellte Schema zeigt hier die hydrogenkatalysierte Entstehung von Di- und Trimeren im sauren Milieu. Außerdem sind die verschiedenen Wege der hydroxydkatalysierten Aufspaltung des Lactamringes dargestellt. Dieses Schema dient als Grundlage für die Identifikation der Abbauprodukte mittel HPLC-MS und UV-Detektor.

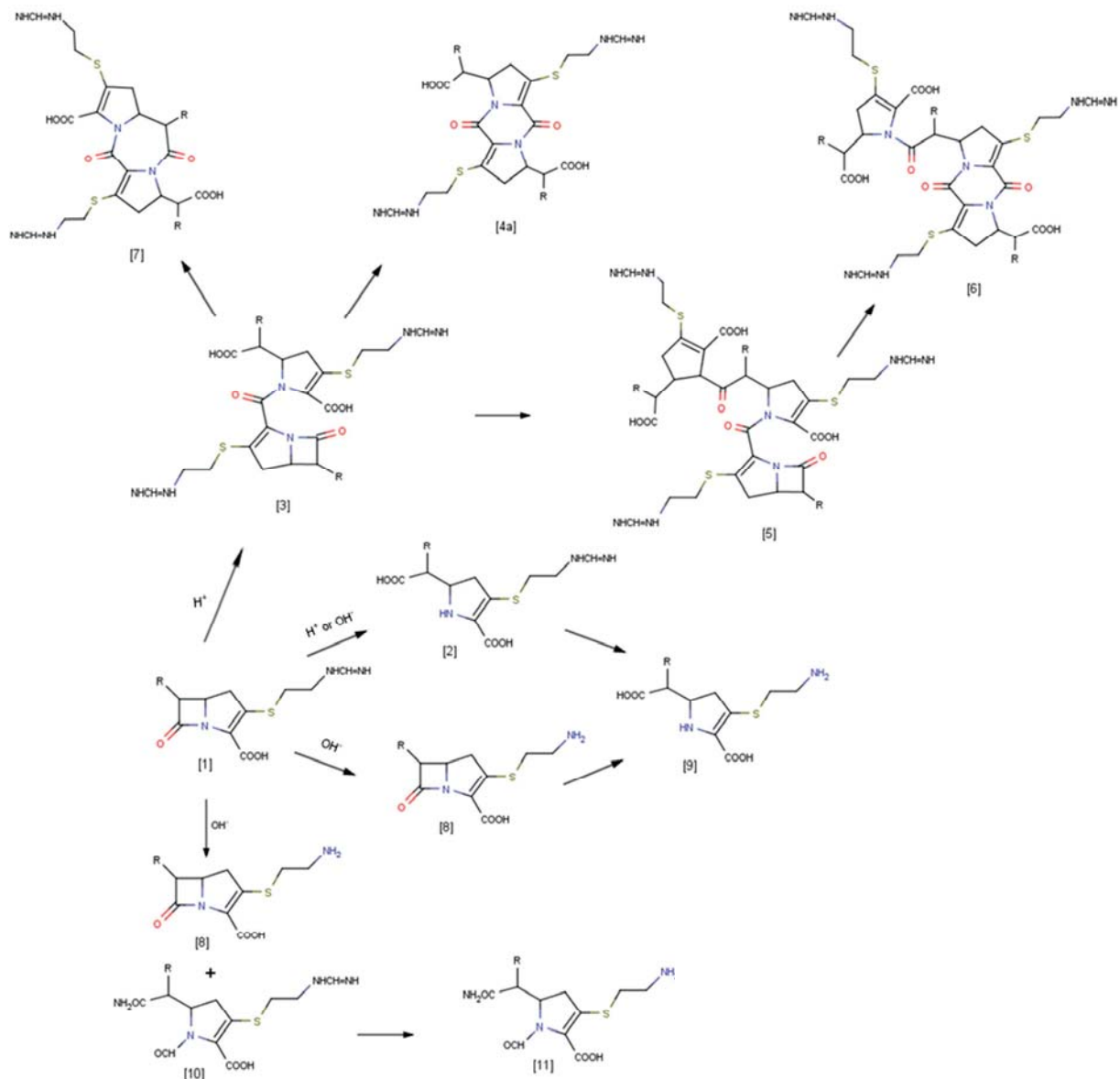


Abb. 83: Schema des Imipenem[1]-Abbaus in wässrigen Lösungen. H^+ -katalysiert entstehen Di- und Trimere des Antibiotikums, OH^- -katalysiert wird der Lactamring aufgespalten ohne Dimerisierung.^[241]

Das Cephalosporin C hat neben dem β -Lactamring auch noch die Ester-Gruppe der Acetyl-Seitenkette als potentiellen Angriffspunkt für die Degradation. H^+ -Ionen, OH^- -Ionen und Wasser degradieren das CPC zu dem entsprechenden Deacetyl-Derivat und weiter zum Lacton. Diese Abbauprodukte des CPC sind auch in den Chromatogrammen zu finden und in Abb. 84 dargestellt.

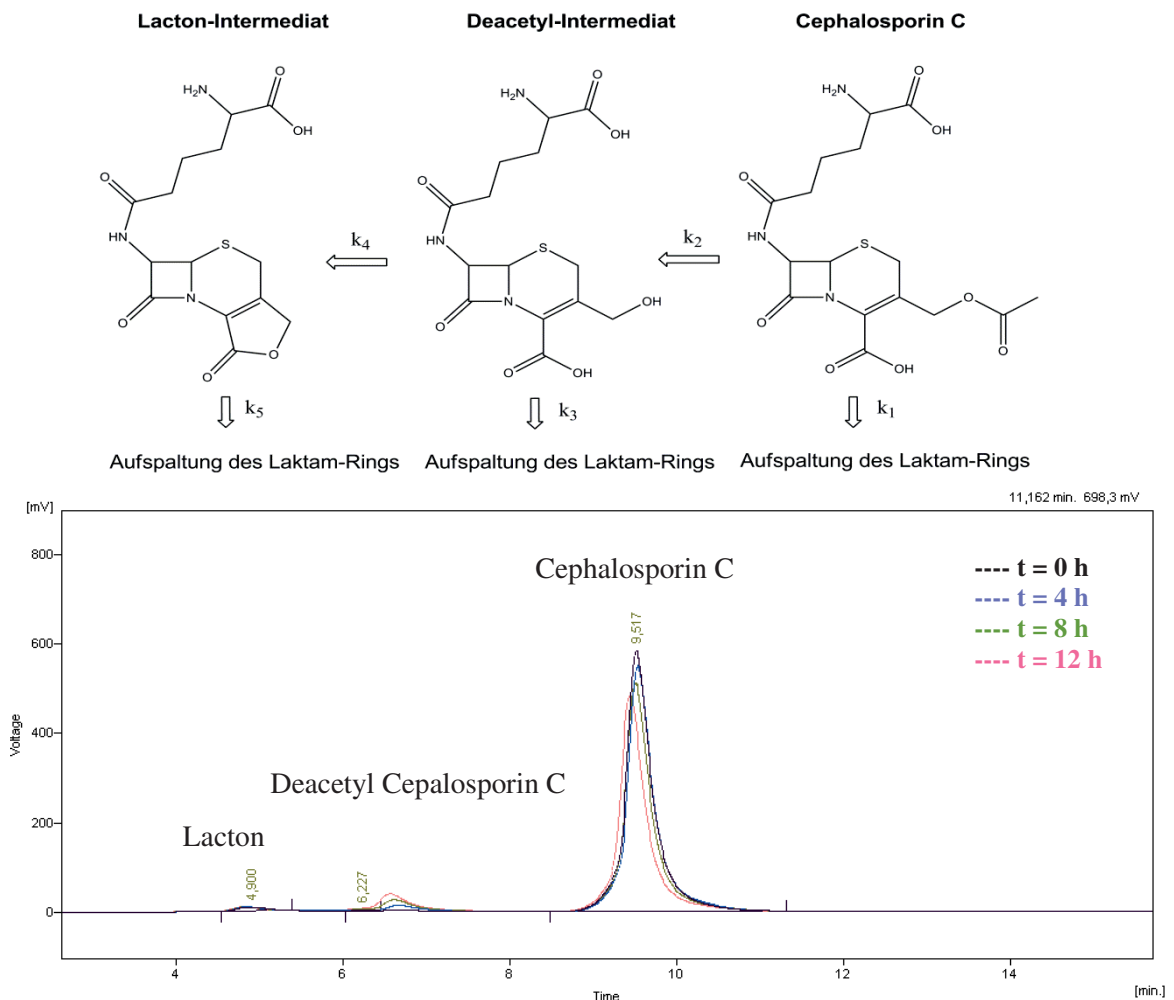


Abb. 84: Untersuchungen mittels HPLC zum Abbau des Cephalosporin C über einen Zeitraum von 12 h.

Die Untersuchungen des Abbauverhaltens zeigen, dass bei Raumtemperatur ($25\text{ }^\circ\text{C}$) im pH-Bereich von 2 bis 6 deutlich weniger als 1 % Cephalosporin C abgebaut wird und demnach die Abnahme der Antibiotikumkonzentration in Gegenwart des Adsorbers ausschließlich auf Adsorption schließen lässt.

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse zur Adsorption von Imipenem und anschließend die Untersuchungen zur Übertragbarkeit der hier gewonnenen Thesen auf andere Antibiotika wie Cephalosporin C, welches hier als Modellantibiotikum dient, dargestellt.

4.4.2 Adsorption von Imipenem auf kommerziellen Adsorbersystemen

Für Imipenem wurden verschiedene Referenzsysteme des kommerziellen Marktes untersucht. Eine Bindung auf schwachen Ionentauschern (IRA 67) ist nicht möglich, da das Imipenem bei pH-Werten unter sieben zu instabil ist (siehe Kap. 4.4.1). Eine Bindung auf IRA 400, einem starken Ionentauscher, wurde für verschiedene pH-Werte (7, 8, 9) untersucht. Eine Abtrennung bei Raumtemperatur war dabei kaum möglich. Bei einer Temperatur von 10 °C konnten die in Abb. 85 dargestellten Sorptionsisothermen aufgenommen werden.

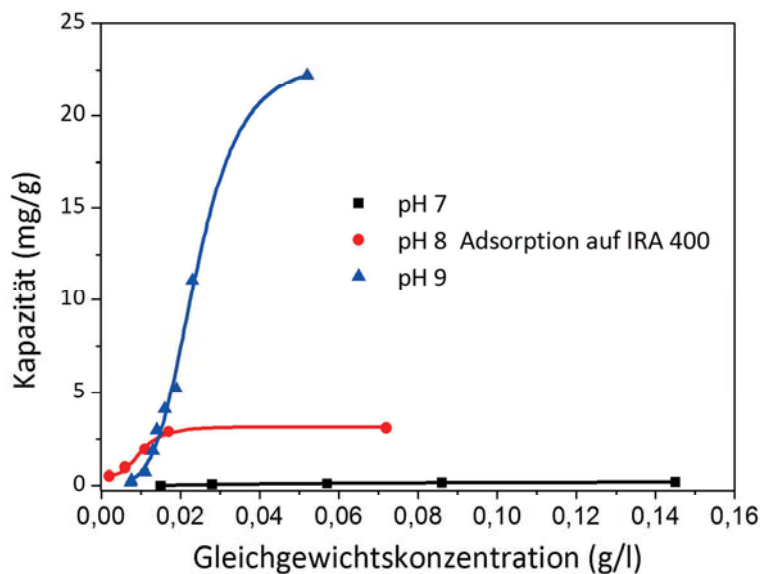


Abb. 85: Wechselwirkung von Imipenem mit dem kommerziellen Adsorber IRA 400 Sorptions-temperatur $T=10^{\circ}\text{C}$.^[242]

Bei pH 7 wurde eine maximale Kapazität von 0,45 mg/g , bei pH 8 3,3 mg/g und bei pH 9 von 24,7 mg/g erreicht. Da der Isolektrische Punkt von Imipenem bei 7,9 liegt, war auch erst ab einem pH-Wert von 8 eine signifikante Wechselwirkung mit dem Sorbent zu erwarten. Eine weitere Erhöhung des pH-Wertes ist nicht empfehlenswert, da hier das Imipenem wiederum zu instabil wird. Als weiterer Adsorber wurde XAD 4 bei Raumtemperatur (25 °C) untersucht, welcher Maximalbeladungen von 4 mg/g (pH 8) erreichte. Eine Aufarbeitung des Imipenem mit kommerziellen Adsorbentien ist aufgrund der hohen Instabilität des Imipenems nur mit großem energetischen (Kühlung auf unter 10 °C) und Korrekturmittelaufwand (Einstellen des pH-Wertes) möglich. Eine Adsorberphase, die unter Fermentationsbedingungen eingesetzt werden kann und das Antibiotikum so vor der Degradation schützt, besitzt also großes Potential im Downstream-Prozess des Imipenem.

4.4.3 Adsorption von Imipenem auf der instrAction-Phase

Das Adsorptionsverhalten der von der instrAction GmbH synthetisierten Adsorberphasen wurde anhand von Adsorptionsisothermen charakterisiert. Abb. 86 zeigt die Adsorptionsisotherme von Imipenem auf den Phasen ND11490 (auf Silicagel), CV11005 (magnetischem Silicat) und ND11835 (magnetisch, endcapped); die genaue Erklärung zu den Adsorbernummerierungen ist Anhang E zu entnehmen. Die Adsorption ist bei Raumtemperatur ($T = 25\text{ °C}$) und einem pH von 7,5 mit einer Stunde Reaktionszeit durchgeführt worden. Keiner der untersuchten kommerziellen Adsorber war in der Lage bei diesen Bedingungen eine signifikante Adsorption zu zeigen. Durch das Aufbringen des Adsorberpolymers auf magnetische Silicat-Partikel (ND11490 zu CV11005) sinkt die maximale Beladung der Adsorber pro Gramm Partikel deutlich. Grund hierfür ist die geringere Menge an Adsorberpolymer, die auf die magnetischen Partikel aufgebracht werden kann und auch der Unterschied in den Partikeldichten (Kapazität ist hier bezogen auf Gramm Partikel), die das Ergebnis beeinflussen.

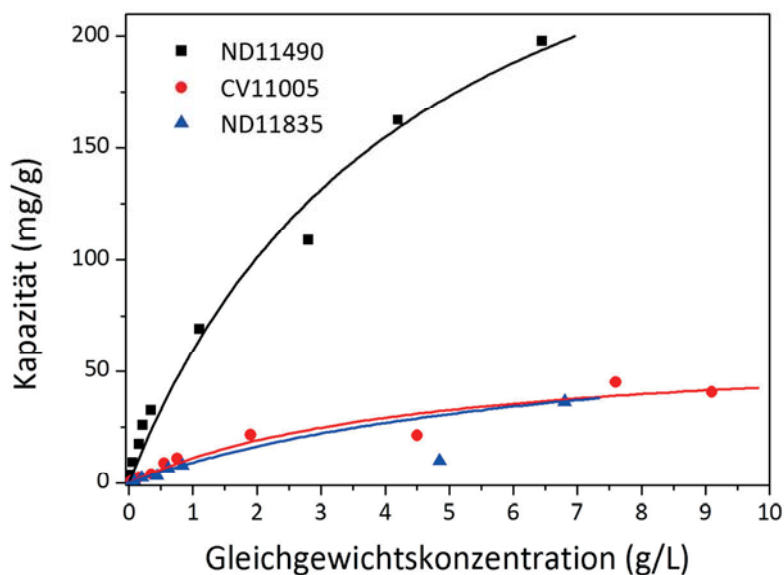


Abb. 86: Adsorptionsisothermen für Imipenem auf den magnetischen und unmagnetischen Adsorberphasen der InstrAction GmbH.

Ein weiteres Problem, das sich im Laufe des Projektes ergab, war eine durch die Adsorber beschleunigte Degradation des Antibiotikums, es erfolgte also nicht die erhoffte Stabilisierung des Antibiotikums auf der Oberfläche des Polymers. Dieser Abbau des Imipenem konnte unter Einsatz von HPLC-Analytik beobachtet werden, da in den Chromatogrammen nach der

Adsorption zusätzliche Banden (5,7; 8,3 und 10,5 min) erschienen. Ein solches Beispielchromatogramm ist in Abb. 87 dargestellt.

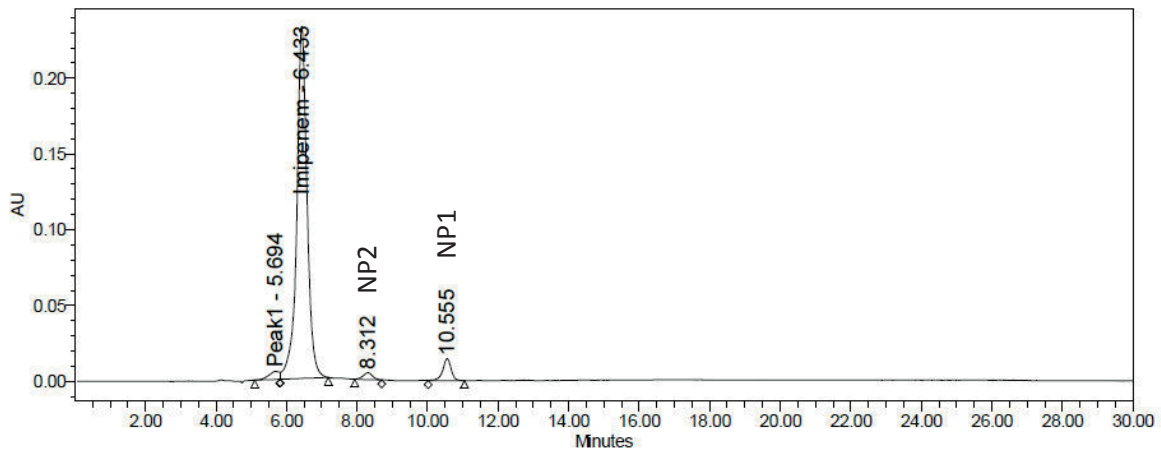


Abb. 87: Chromatogramm des Überstandes nach 1 h Inkubation des instrAction-Adsorbers in Imipenemlösung.

Da die Entstehung der Abbauprodukte kontinuierlich erfolgt, kann das Erreichen des Gleichgewichtes der Adsorption nicht eindeutig ermittelt werden und eine zeitliche Darstellung des Adsorptionsvorgangs des Imipenem auf den instrAction-Phasen ist somit nicht möglich. In folgenden Versuchen wurde die Abnahme der Imipenemkonzentration bei Inkubation mit dem Adsorber über einen Zeitraum von 4 h mittels HPLC untersucht und parallel die Entstehung der Abbauprodukte verfolgt (siehe Abb. 88).

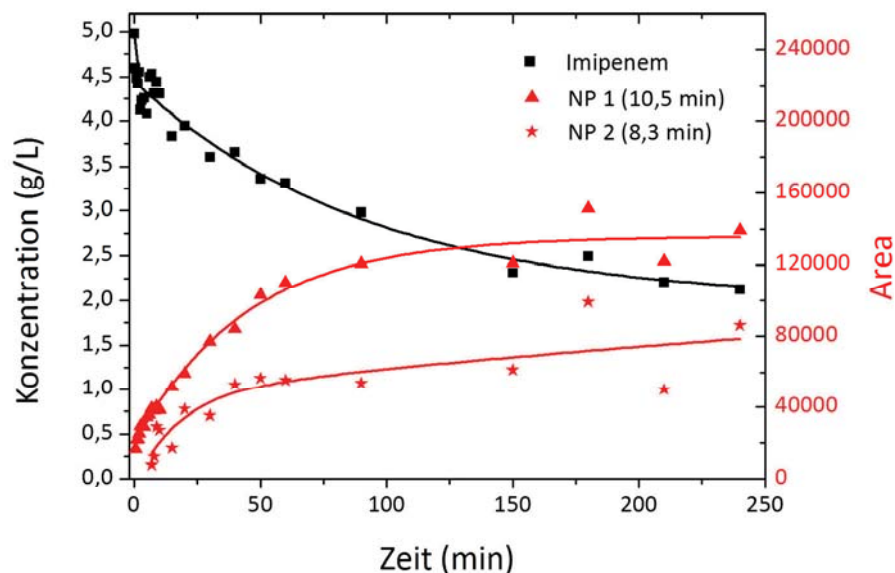


Abb. 88: Abnahme des Imipenems im Überstand während der Adsorption und Entstehung von Nebenprodukten (NP).

Die Konzentration des Imipenems nimmt bereits in den ersten 2 Minuten schnell linear ab und geht dann in eine exponentielle Abnahme über, die mit dem Verlauf der Entstehung der Abbauprodukte (NP1 und NP2) angenähert werden kann. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Adsorption in der linearen Phase bereits fast vollständig abgeschlossen ist. Dies deutet auf eine gesteigerte Affinität der Adsorber zum Antibiotikum hin und bestätigt somit die in Kapitel 4.3.1 diskutierte Steigerung der Affinität durch Polyvalenz.

Die genaue Menge an entstandenem Nebenprodukt kann anhand obiger Messungen nicht ermittelt werden, da keine Standards der Abbauprodukte zur Verfügung stehen und die Nebenprodukte ihr Absorptionsmaximum nicht wie Imipenem bei 300 nm sondern bei 311 nm und 289 nm haben. Allerdings konnte die zeitliche Entwicklung des Produktabbaus beobachtet werden (siehe Abb. 88). Das Abbauprodukt bei 8 min Retentionszeit (NP2) ist ein Abbauprodukt, das auch bei einfacher Inkubation des Antibiotikums in Adsorptionspuffer, jedoch mit geringerer Entstehungsrate, auftritt. Das Abbauprodukt bei 10 min (NP1) hingegen entsteht nur bei der Inkubation mit dem Adsorber in diesem Maße. Es muss sich hierbei demnach mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine Degradation handeln, die durch den Adsorber katalysiert wird. Durch eine Maskierung der Aminogruppen auf der Adsorberoberfläche soll diese Degradation des Zielmoleküls minimiert werden.

In einer weiteren Partikelcharge (ND11835) wurden die restlichen Aminogruppen auf der Adsorberoberfläche durch Acetylierung blockiert, da vermutet wurde, dass eventuell diese Aminogruppen für die Degradation verantwortlich sind.^[243] Die Versuche mit Adsorbentien des gleichen Phasenmotives mit blockierten Aminogruppen werden im Folgenden als „end-capped“ bezeichnet.

Die Acetylierung der Aminogruppen beeinträchtigt die Adsorption des Antibiotikums nicht. Der Vergleich der Adsorptionsisothermen der Chargen ND11835 (endcapped) und CV11005 (nicht endcapped) in Abb. 86, zeigt einen annähernd identischen Verlauf bzw. die gleichen maximalen Kapazitäten. Die Aminogruppen scheinen im Fall von Imipenem an der Wechselwirkung zwischen Adsorber und Zielmolekül nicht beteiligt zu sein. Anschließend wurde die Entstehung der Abbauprodukte in Gegenwart der verschiedenen Partikelchargen betrachtet und miteinander verglichen. Beide Verläufe der Abbauprodukte NP1 und NP2 sind für die Partikelsysteme ND11835 und CV11005 annähernd deckungsgleich.

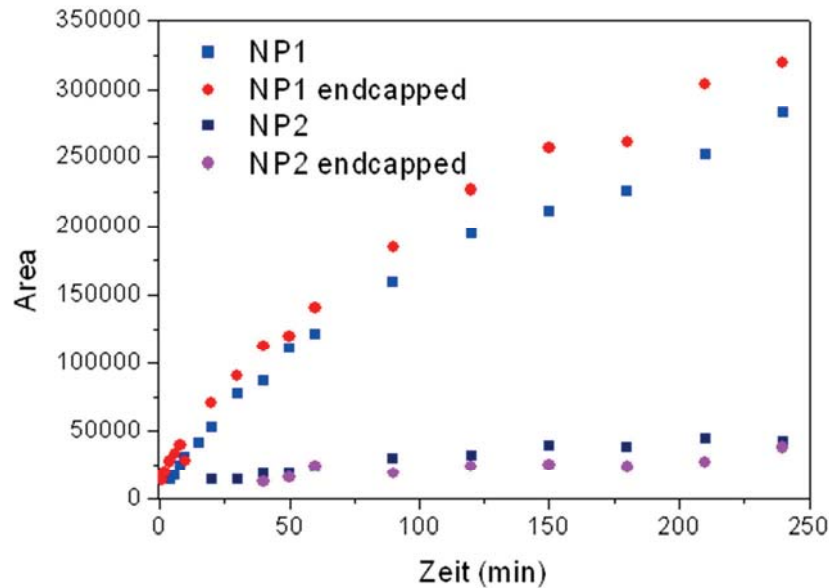


Abb. 89: Entstehung der Abbauprodukte während der Inkubation des instrAction-Adsorbers in einer Imipenem-Lösung, als Vergleich zwischen den Adsorbentien mit und ohne Acetylierung der Aminogruppen.

Die Acetylierung der Aminogruppen kann den Abbau des Antibiotikums nicht verringern und kann somit als zusätzlichen Syntheseschritt entfallen. Da die Aminogruppen nicht für den beschleunigten Abbau des Antibiotikums verantwortlich sind, kann nur eine der funktionellen Gruppen auf der Adsorbentoberfläche zu dem gesteigerten Abbau führen.

Neben der Adsorption wurde auch das Eluat mittels HPLC untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Imipenem von den Adsorbentien eluiert werden kann, allerdings sind auch im Eluat die durch den Adsorbentien entstandenen Abbauprodukte zu sehen. Neben den beiden Abbauprodukten NP1 und NP2, die während der Adsorption beobachtet wurden, erscheinen im Überstand nach der Elution mit 1 M NaOAc / Ethanol / H₂O auch höhermolekulare Di- und Trimere des Imipenems (siehe Massenscan in Abb. 90).

Mit Hilfe von HPLC-MS konnten einige Abbauprodukte identifiziert werden. Bei NP1 und den Abbauprodukten ab einer Retentionszeit von 13 min handelt es sich wahrscheinlich um Dimere oder sogar Trimere des Imipenems. Deren Entstehung ist säurekatalysiert und durchläuft verschiedene Zwischenstufen, wie den Untersuchungen von Smith et al. zu entnehmen ist.^[241]

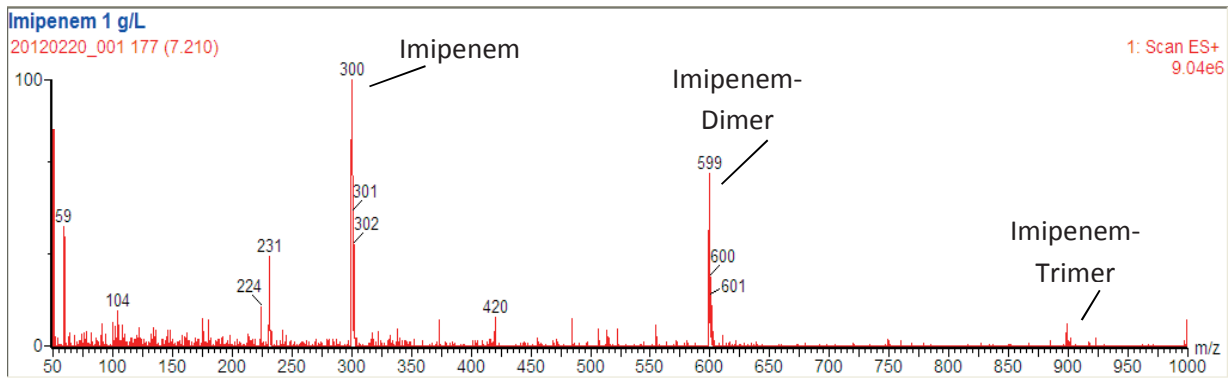


Abb. 90: Massenscan des Imipenem Eluates. Neben dem Masse-Ladungsverhältnis für Imipenem ($m/z = 300$) sind auch Vielfache des Imipenems ($m/z = 599$ oder 898) zu sehen, die auf eine säurekatalysierte Dimerisierung des Antibiotikums schließen lässt.

Des Weiteren konnte noch das Abbauprodukt bei einer Retentionszeit von 6,4 min identifiziert werden (siehe Abb. 91), welches ebenfalls bereits durch Smith et al.^[241] beschrieben ist. Die Abbauprodukte deuten demnach auf eine säurekatalysierte Degradation des Imipenems hin. Aus den Studien des Abbauverhaltens von Imipenem bei verschiedenen pH-Werten (siehe Kap. 4.4.1) ist bereits die schnelle Degradation des Antibiotikums im sauren pH-Bereich bekannt und in Verbindung mit den Ergebnissen aus den HPLC-MS Messungen wurden die auf der Oberfläche befindlichen Sulfonsäuregruppen für die beschleunigte Degradation in Betracht gezogen. Die Inkubation des Imipenem in einer Toluolsulfonsäurelösung (TSS) bestätigt diese Vermutung. Die Abbauprodukte beider Chromatogramme stimmen überein, wie Abb. 91 zu entnehmen ist.

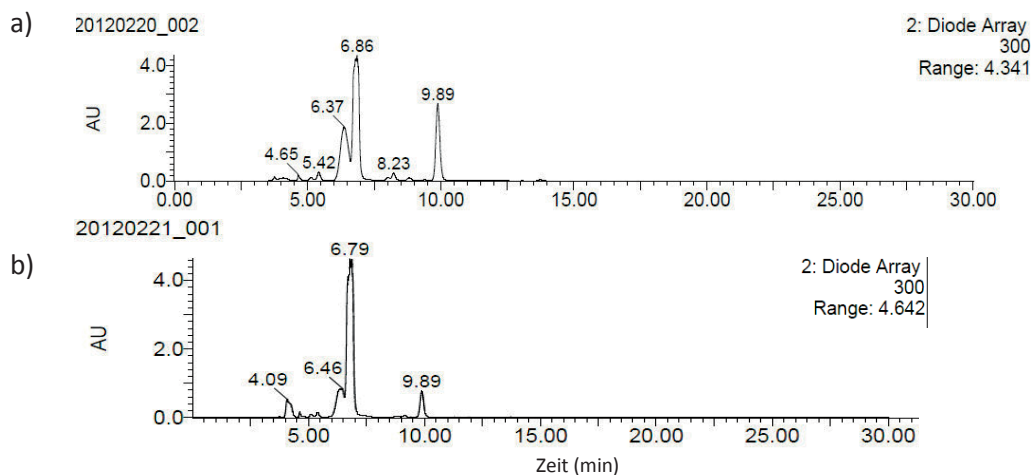


Abb. 91: Chromatogramm von Imipenem und den entstandenen Abbauprodukten a) nach Adsorption mit einer Reaktionszeit von 2 h und anschließender Elution, b) nach Inkubation für 4h in einer TSS-Lösung (pH 7). Die Chromatogramme zeigen die gleichen Abbau-Produkte.

Eine neue Partikelcharge (ND12195) ohne Sulfonsäuregruppen wurde hergestellt und mit der Adsorptionsisotherme von CV11005 verglichen. Die neue Partikelcharge zeigte deutlich geringere Kapazität als die Phase CV11005. Außerdem wird die Dispergierbarkeit der magnetischen Partikel in Wasser herabgesetzt, was den späteren Einsatz in der Reaktor-kaskade (siehe Kap. 4.6.1) unmöglich macht, da die Partikel an der Reaktorwand adsorbiert wären und nicht mittels HGMS separiert werden könnten. Eine Eliminierung dieser funktionellen Gruppe, um die Degradation des Antibiotikums zu verringern, muss aus diesen Gründen ausgeschlossen werden. Um die Partikelchargen mit Sulfonsäuregruppen (CV11005) trotz beschleunigtem Produktabbau nutzen zu können, wurde in den folgenden Versuchen die Adsorptions- und Elutionszeit auf 10 min reduziert.

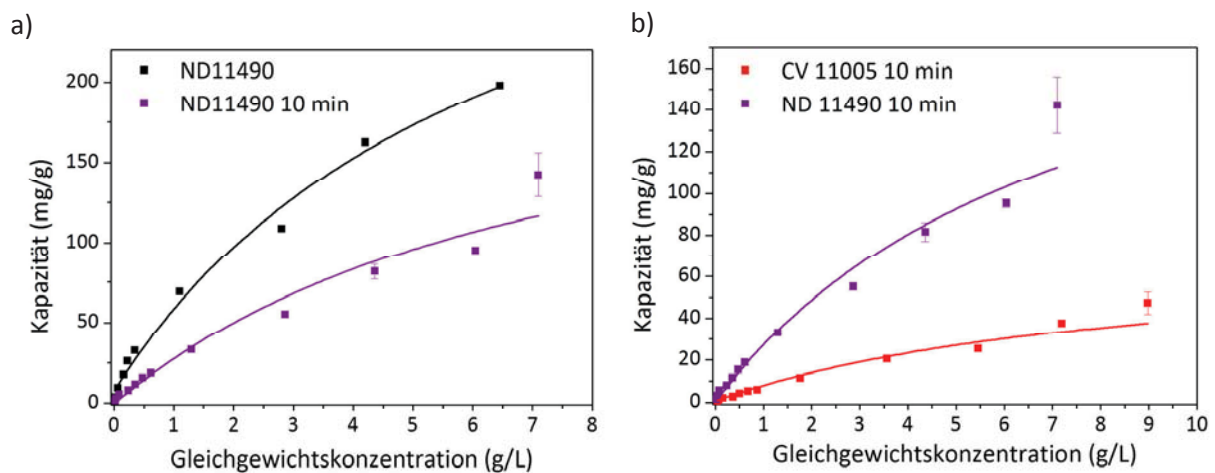


Abb. 92: Adsorption von Imipenem auf ND 11490 und CV 11005 mit einer Reaktionszeit von zehn Minuten. a) zeigt den Vergleich bei 60 min und 10 min Reaktionszeit von ND11490, b) zeigt den Vergleich der magnetischen zur unmagnetischen instrAction-Phase, beides bei 10 min Reaktionszeit.

Die maximale Kapazität nimmt im Vergleich zu einer Reaktionszeit von 60 Minuten um 40 % ab (vergleiche Abb. 92a), da die Beladungen aus der Differenz der Überstände vor und nach der Inkubation berechnet wurden und durch die verringerte Inkubationszeit der Fehler durch die Degradation des Antibiotikums entfällt. Die k_1 -Werte liegen allerdings weiterhin in der gleichen Größenordnung, da durch die Verringerung der Reaktionszeit trotzdem das Reaktionsgleichgewicht erreicht wird und nur der Einfluss des Antibiotikumabbaus reduziert wird. Der Vergleich zwischen der instrAction-Phase ND 11490 und CV 11005 zeigt, dass die maximale Kapazität der magnetischen Träger auf 30 % gesunken ist (siehe Abb. 92 b). Die Spektren des Mediumüberstandes nach der Adsorption und Elution zeigen weniger bis keine Abbauprodukte, so dass die Adsorption aus dem realen Fermentationsmedium nun mit diesen Versuchsparametern durchgeführt werden kann.

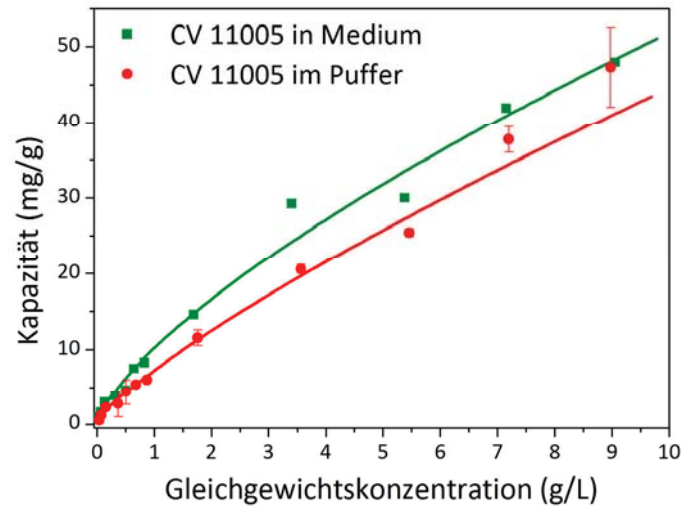


Abb. 93: Vergleich der Adsorption von Imipenem auf CV 11005 im Puffer und im Medium mit einer Reaktionszeit von 10 Minuten.

In Abb. 93 ist ein Vergleich zwischen den Adsorptionsisothermen bei Reaktion im Puffer und im Fermentationsmedium dargestellt. Bei der Aufnahme der Isothermen im Medium konnte kaum ein Einfluss auf die Adsorptionskapazität beobachtet werden. So sind die maximale Beladung und der k_1 -Wert leicht gestiegen, was allerdings noch im Rahmen der Messungenauigkeit zu betrachten ist. Dies lässt erneut auf eine sehr hohe Affinität des Moleküls zur Adsorberoberfläche schließen und ist mit keinem der unspezifischen kommerziellen Systeme zu erreichen. Eine weitere Reduzierung der Reaktionszeit könnte die Abbauprodukte weiter verringern, ist aber im Hinblick auf die Integration der Adsorbersysteme inklusive HGMS in den Fermentationsprozess nicht mehr möglich. Im Folgenden Kapitel soll die durch Polyvalenz erreichte Erhöhung der maximalen Beladung und Affinität des Zielantibiotikums zur Adsorberoberfläche auf weitere Antibiotika übertragen werden. Das Modellantibiotikum ist das bereits erwähnte Cephalosporin C.

4.4.4 Adsorption von Cephalosporin C auf kommerziellen Adsorbern

Die vielversprechenden Ergebnisse der Adsorption von Imipenem auf den instrAction Phasen, lieferten den Anstoß, das Prinzip der multivalenten Adsorption auch auf andere Antibiotika zu übertragen. Wie bereits in Kap. 4.3.2 erwähnt beschäftigt sich die Arbeitsgruppe um Herrn Werner Thiel mit PMO Partikeln, die es ermöglichen, variabel funktionelle Gruppen in das Silicatgerüst einzubringen. Zu Vergleichszwecken wurden auch auf dem Markt verfügbare Partikel betrachtet. Als kommerziell verfügbare Adsorbersysteme für das Modellantibiotikum Cephalosporin C wurde ein aromatischer Adsorber (XAD 4), ein schwacher Ionentauscher (IRA 67), ein starker Ionentauscher (Orica) und magnetisierbare starke Ionentauscher (Orica MIEX) untersucht. Diese Partikel wurden ausgewählt, da sie bereits in der Literatur für vergleichbare Aufarbeitungswege beschrieben sind.^[244,245] Die für das Imipenem entwickelte instrAction-Phase wurde ebenfalls auf Adsorption von Cephalosporine C getestet, da auf deren Oberfläche sowohl aromatische als auch ionische Gruppen zugrunde liegen.

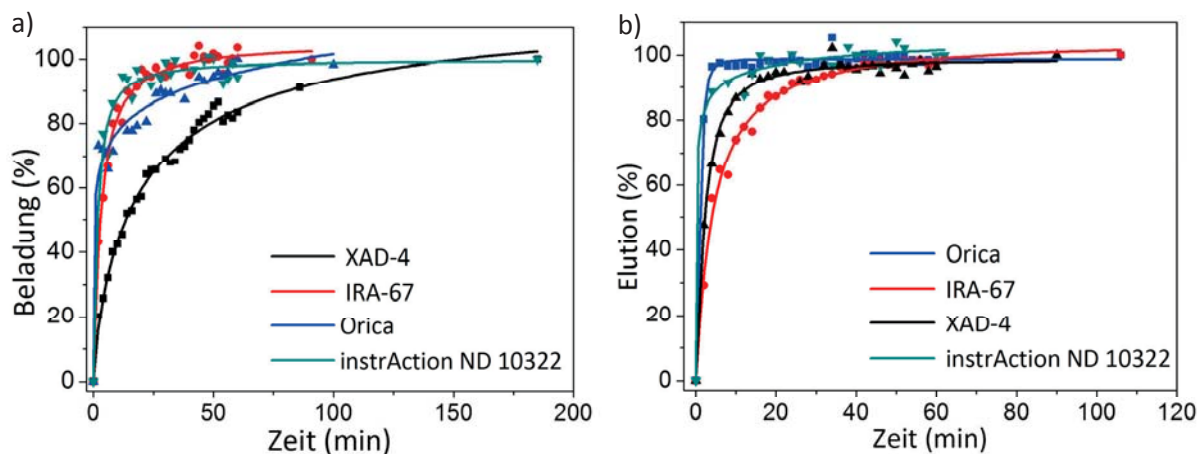


Abb. 94: Adsorption und Elution von Cephalosporin C auf kommerziellen Adsorbersystemen normiert auf die Endkonzentration im Gleichgewicht. a) zeigt den zeitlichen Verlauf der Adsorption bis zur Sättigung. Der hoch poröse aromatische XAD 4 benötigt am längsten um die Sättigung zu erreichen, der schwache Ionentauscher und die instrAction-Phase erreichen zuerst die Sättigung. b) zeigt das Elutionsverhalten der Adsorber. Der starke Ionentauscher eluiert am schnellsten, der schwache Ionentauscher am langsamsten.^[246]

Zunächst wurden zeitliche Untersuchungen der Adsorption durchgeführt (siehe Abb. 94 a). Zu sehen ist, dass für die porösen XAD 4 Partikel eine längere Adsorptionszeit benötigt wird als für die Ionentauscher. Dies lässt sich durch die Porendiffusion erklären. Für die beiden Ionentauscher ist kaum ein Unterschied in der Adsorptionszeit zu erkennen. Die instrAction-Phase zeigt sogar die schnellste Adsorption. Die Anfangssteigung der in Abb. 94 a) dargestellten Graphen gibt Aufschluss über die Affinität des Antibiotikums zur Adsorbentoberfläche. Demnach würde die instrAction-Phase die höchste Affinität besitzen, obwohl

diese Adsorber für Imipenem ausgelegt wurden. Um für alle Adsorber gleiche Bedingungen zu schaffen, wurde anhand dieser Adsorptionsuntersuchungen über die Zeit eine Verweilzeit der Adsorber in Antibiotikallösung von 60 Minuten festgelegt.

Die Elution erfolgt deutlich schneller als die Adsorption (siehe Abb. 94 b). Die Ionentauscher sind hier nicht mehr mit XAD 4 vergleichbar, da ein anderes Elutionsmittel eingesetzt wurde. Es ist allerdings festzustellen, dass bei gleichen Eluenten der schwache Ionentauscher längere Elutionszeiten aufweist. Für die nachfolgenden Adsorptionsversuche wurde eine Elutionszeit von 60 Minuten festgelegt. Diese könnte jedoch für eine nahezu vollständige Elution auf 30 Minuten reduziert werden. Die Elution des β -Lactam-Antibiotikums konnte von den XAD Adsorbentien mit > 90 % Wiederfindung durchgeführt werden. Die Ionentauscher zeigen hingegen Elutionen zwischen 60 % und 80 %. Die Elutionsmittel sind dem Anhang C 3.3 zu entnehmen. Eine Reduktion des Methanols bei der Elution von XAD 4 wäre denkbar und im Hinblick auf eine Einsparung an Lösungsmittel wünschenswert.

Für eine Aufarbeitungszeit von 2 h sind unter den gegebenen Bedingungen Verluste von Cephalosporin C durch Hydrolyse im wässrigen Überstand zu vernachlässigen, da für diesen Zeitraum ein Abbau des Antibiotikums von < 0,5 % bestimmt wurde. Unter Anwendung der genannten Adsorptions- und Elutionszeiten wurden Adsorptionsisothermen bei 25 °C und verschiedenen pH-Werten aufgenommen. Der Verlauf aller Isothermen kann genau wie im vorherigen Kapitel mit einer Langmuir-Freundlich-Isothermen beschrieben werden. In Abb. 95 a) sind die Adsorptionsisothermen für XAD 4 bei pH 3 und pH 4 dargestellt. Da es sich bei XAD 4 um einen unpolaren Adsorber handelt, sind die größten Maximalbeladungen in der Nähe des isoelektrischen Punktes (IEP) des zu adsorbierenden Moleküls zu erwarten. Da Cephalosporin C einen IEP von 2,7 besitzt, ist für einen pH 3 im Vergleich zu pH 4 auch eine höhere Beladung zu erwarten (siehe Abb. 95 a). XAD 4 zeigt im Vergleich zu den anderen untersuchten Adsorbentensystemen die größte Maximalbeladung, was auf die große Oberfläche dieses Adsorbentens und die Porosität zurückzuführen ist (siehe Tab. 9).

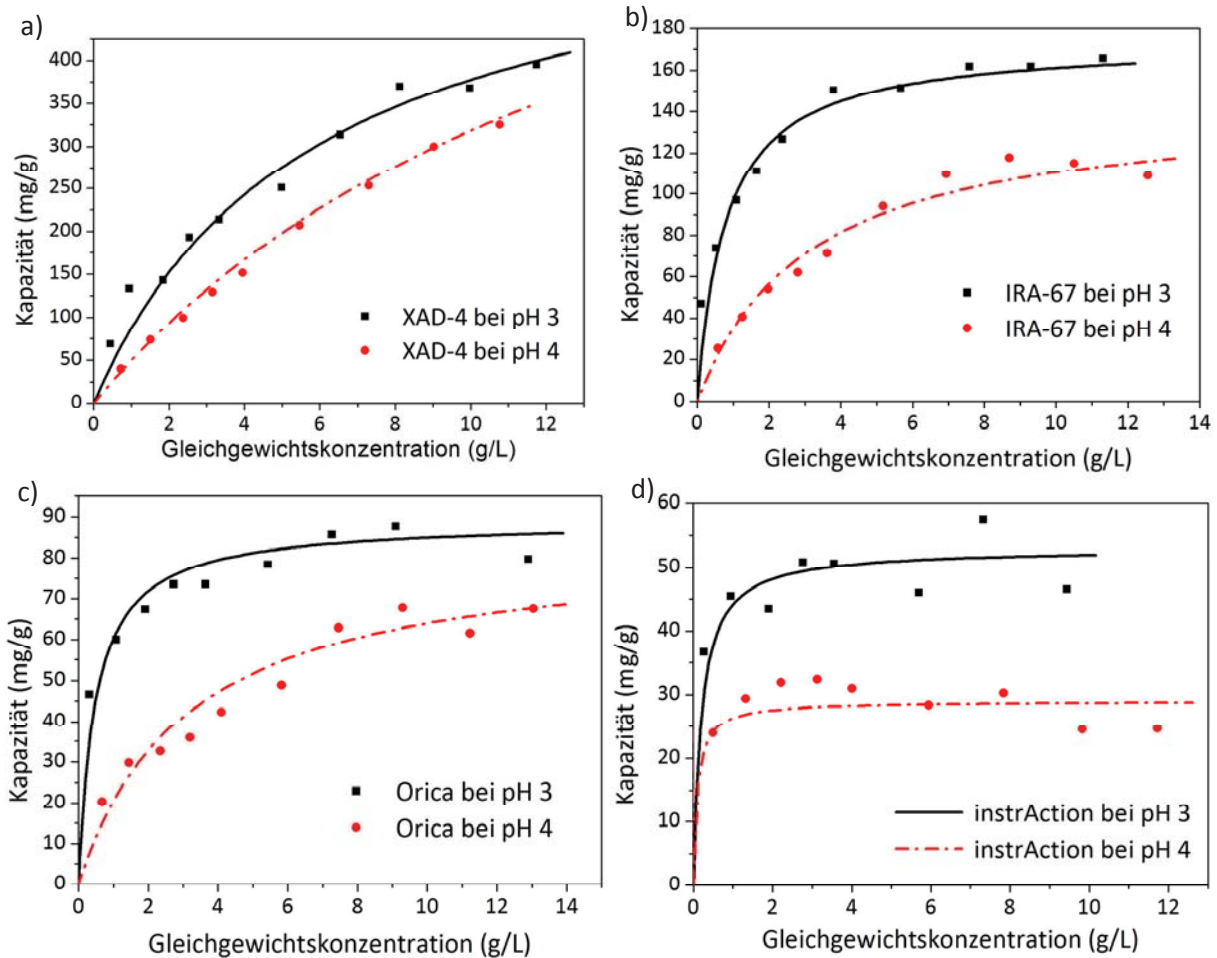


Abb. 95: Adsorptionsisothermen von CPC auf kommerziellen Partikelsystemen im 0,1 M Natriumacetat/NaOH Puffer bei 25°C, pH 3 und pH 4; a) XAD-4; b) IRA-67; c) MIEX Orica.^[246]

Durch den Fit der Isothermen kann der Faktor k_1 ermittelt werden (siehe Gleichung (7) und Tab. 9), welcher einen Hinweis auf die Affinität gibt.^[247] Demnach ergibt sich für die instrAction Phase die höchste und für XAD 4 die geringste Affinität, wie es auch bei den Untersuchungen über die Zeit (Abb. 94 a) zu sehen war. Im Hinblick auf die Beladung q_{max} in Bezug auf die Oberfläche, ist auch hier der schwache Ionentauscher deutlich effizienter als der unpolare Adsorber. Für die Separation der zukünftigen magnetisierbaren selektiven Adsorber im HGMS werden Partikeldurchmesser von etwa 1 μm und kleiner benötigt. Durch die Derivatisierung der Partikeloberfläche kann es dazu kommen, dass die Partikelporen kleiner werden bis hin zu einer nanoporösen Oberfläche. Aus diesem Grund ist eine Betrachtung der Adsorption bezogen auf die Fläche des Adsorbers hier sinnvoll. Diese wurden im Rahmen von BET-Messungen für alle eingesetzten Adsorber bestimmt. Die Werte für q_{max} sind Tab. 9 zu entnehmen.

Tab. 9: Messdaten der spezifischen Oberflächen verschiedener Adsorber, sowie daraus berechnete Maximalbeladung q_{max} in Bezug auf die Adsorberoberfläche:^[246]

Proben	spez. Oberfläche [m ² /g]		q_{max} [mg/g]	k_1	Q_{max} [mg/m ²]
XAD-4	851,32	pH 3	545	0,17	0,64
		pH 4	325	0,08	0,38
IRA-67	0,72	pH 3	174	1,3	241,77
		pH 4	153	0,35	213,12
MIEX	4,88	pH 3	84	2,2	17,18
		pH 4	85	0,32	17,41
instrAction	99,29	pH 3	51	5,1	0,51
		pH 4	29	5,0	0,29

Bei diesen Untersuchungen zeigte die instrAction-Phase geringere Beladungen als die Ionentauscher trotz höherer Affinität. Als Trägerpartikel wurde Kieselgel eingesetzt, welches eine große Oberfläche aufgrund der Porosität besitzt. Das Polymer der nachträglichen Derivatisierung belegt nicht die komplette Oberfläche des Kieselgels sondern verankert sich nur in den Poren des Trägers, so dass die hohe Affinität, die in den Isothermen und der zeitlichen Beladung beobachtet werden, nur auf diese Derivatisierung bezogen ist.

Die Experimente der Adsorptionsisothermen von CPC auf verschiedenen Adsorbentien im Puffer wurden auf eine Adsorption aus dem Fermentationsmedium bei pH 3 übertragen. Die Adsorptionsisothermen im Fermentationsmedium sind in Abb. 96 dargestellt und wurden mit den Ergebnissen im Puffersystem verglichen. Die Adsorptionsaffinität von CPC nimmt für alle Adsorbentien außer für den starken Ionentauscher im Fermentationsmedium ab. Die massenspezifische Maximalbeladung q_{max} im Medium von XAD 4 und den starken Ionentauschern (Orica) reduziert sich um 50 %, die Maximalbeladung des schwachen Ionentauschers allerdings erreicht bei hohen CPC-Konzentrationen gleiche Werte wie im Puffersystem. Für die instrAction-Phase zeigt sich im Gegensatz zu Imipenem in Gegenwart des Mediums eine deutliche Abnahme der Affinität und eine leichte Abnahme der maximalen Beladung. Das Adsorptionsverhalten ähnelt sehr dem des schwachen Ionentauschers, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Wechselwirkung von ionischen Gruppen dominiert.

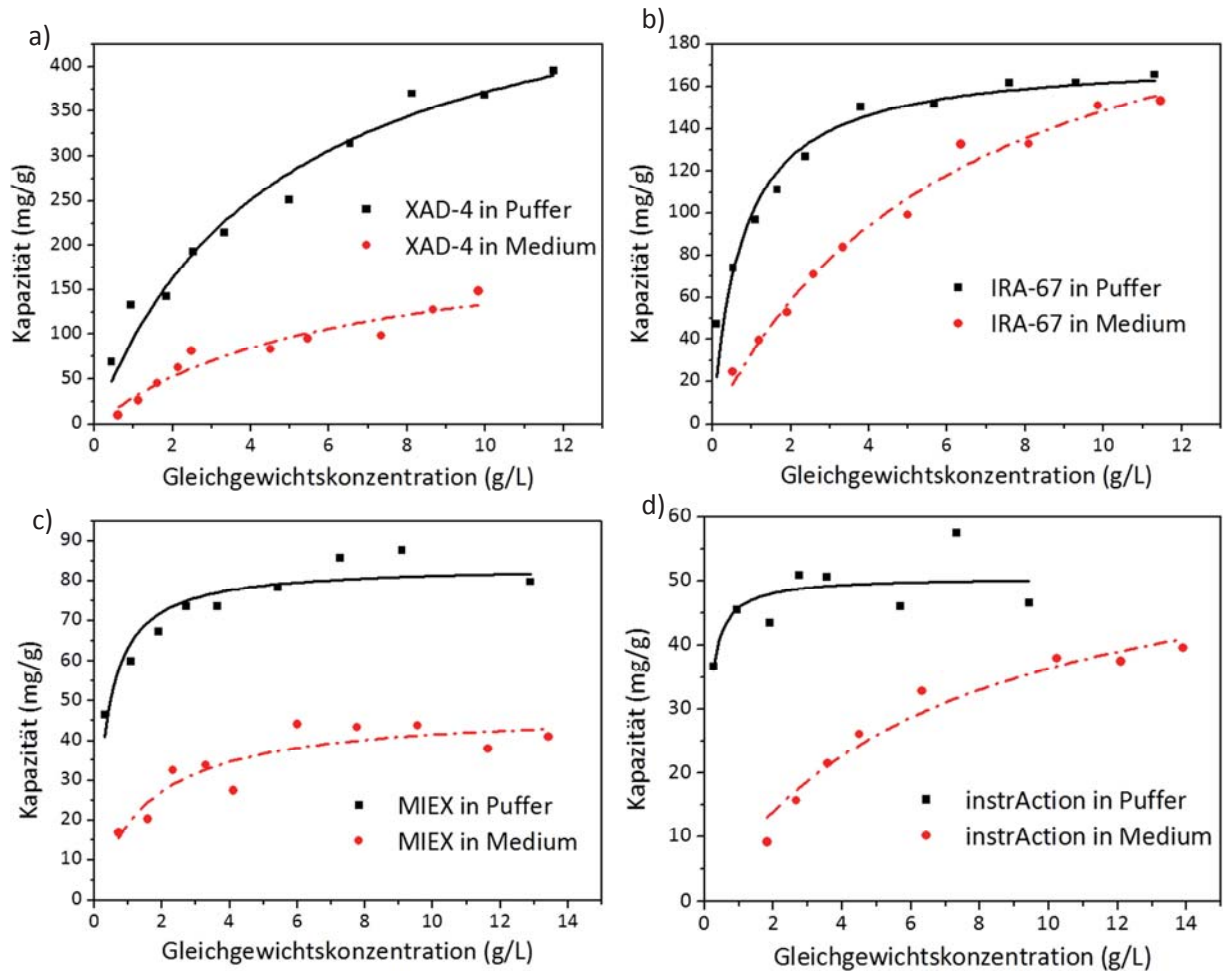


Abb. 96: Vergleich der Adsorptionsisothermen von CPC auf verschiedenen Adsorbentien in 0,1 M Natriumacetate / NaOH Puffer und Fermentationsmedium bei 25°C und pH 3, a) Adsorptionsisotherme von XAD 4; b) Adsorptionsisotherme von IRA 67; c) Adsorptionsisotherme von MIEX;^[246]

Das beste Adsorptionsverhalten in Bezug auf Beladung pro Fläche in Gegenwart des Mediums zeigten bei diesen Untersuchungen demnach die schwachen Ionentauscher. Mit den synthetisierten PMO ist es möglich große Oberflächen zu erzeugen. Theoretisch sollten also durch das Aufbringen von schwachen Ionentauschern auf eine große Oberfläche große Beladungen erzielt werden. Durch die Kombination der schwachen Ionentauschern mit aromatischen Gruppen sollten aufgrund der Polyvalenz auch hohe Affinitäten der Adsorbentensysteme erreichbar sein.

4.4.5 Adsorption von Cephalosporin C auf Polymeren Mesoporösen Organosilikaten

Die hier verwendeten Polymeren Mesoporösen Organosilikate (PMO) wurden, wie bereits in Kap. 4.3.2 erwähnt, von Herrn Dirk Schaffner der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Werner Thiel synthetisiert. Eine Zusammenfassung der verschiedenen PMO Adsorber ist in Anhang E zu finden. Die Adsorber besitzen als Liganden aromatische Gruppen und Aminogruppen, die als schwache Ionentauscher fungieren. In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung und Aktivierung der funktionellen Gruppen notwendig ist. Die Vorbehandlung ist ebenfalls in Anhang E dargestellt. In Abb. 97 sind die verschiedenen Adsorptionsisothermen dargestellt. Die Adsorber mit dem Ligandenverhältnis 1:1 zeigt bei hohen Antibiotikumkonzentrationen die größte Kapazität (siehe Abb. 97 a) und außerdem die höchste Affinität, was anhand der Steigung in Abb. 97 b) ersichtlich wird. Alle PMO mit Mischphasen zeigen ähnliche Affinitäten, lediglich der Adsorber mit ausschließlich aromatischen Gruppen (1:0) zeigt deutlich geringere Beladungen und Affinitäten, wie es auch nach den Ergebnissen zur Untersuchung der kommerziellen Systeme zu erwarten war, denn XAD 4 zeigte die geringste Beladung pro Fläche (siehe Tab. 9). Der Verlauf der Isothermen erreicht im untersuchten Konzentrationsbereich keine Sättigung. Es deutet darauf hin, dass die Adsorption nicht nur durch die Bildung einer Monolage zu erklären ist, sondern dass auch Porenkondensation eine Rolle spielen könnte. Da nur wenig Adsorbermaterial vorlag, war dieser Punkt nicht abschließend zu klären.

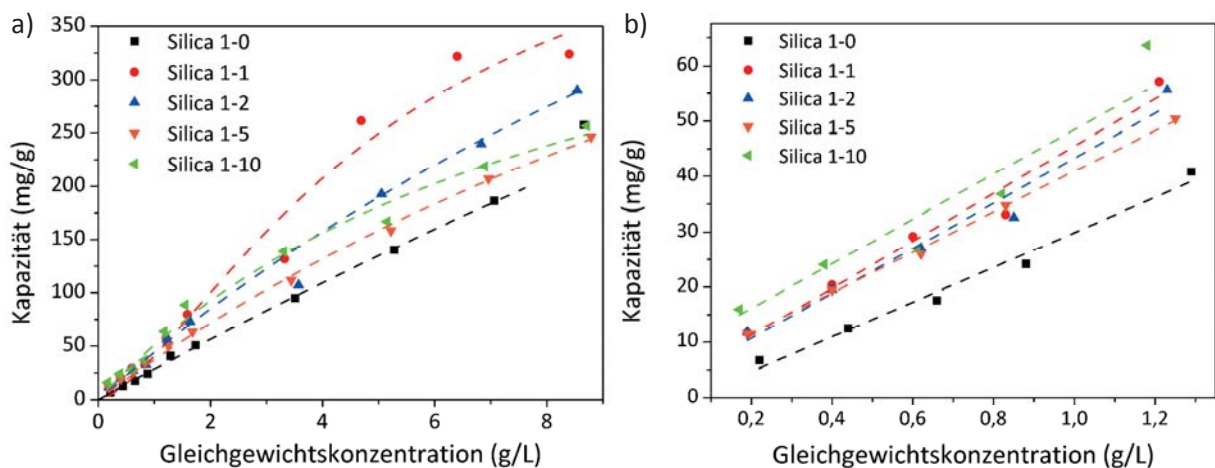


Abb. 97: Adsorptionsisothermen von CPC auf PMO. Untersucht wurden Adsorber mit verschiedenen Verhältnissen an aromatischen und ionischen Liganden. a) kompletter Konzentrationsbereich; für hohe Antibiotikumkonzentrationen wurden die höchsten Beladungen bei einem Verhältnis von 1:1 erreicht. b) kleiner Konzentrationsbereich; nur geringer Unterschied in den Affinitäten der Mischphasen, aber auch hier zeigt der Adsorber mit Ligandenverhältnis 1:1 die höchste und 1:0 die geringste Steigung.^[248]

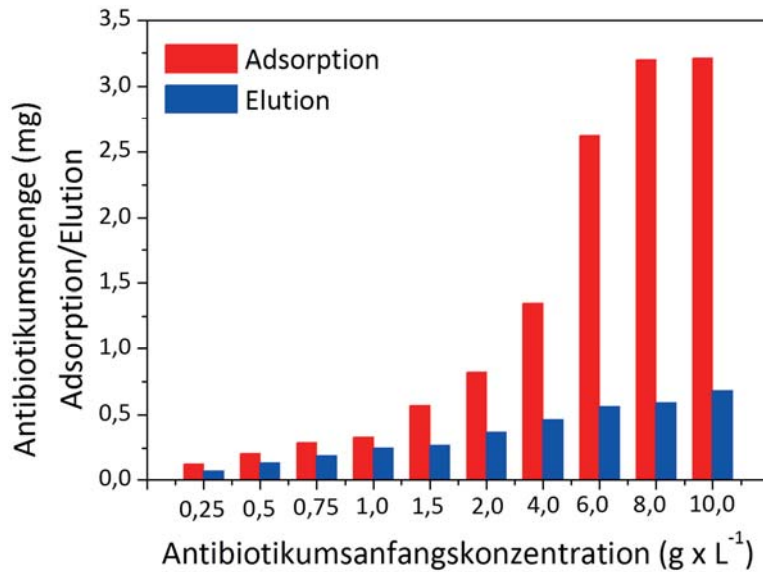


Abb. 98: Vergleich der Menge an adsorbiertem und eluiertem Antibiotikum bei verschiedenen Anfangskonzentrationen. Mit steigender Menge an adsorbiertem Antibiotikum sinkt der prozentuale Anteil an eluiertem Antibiotikum.

In Abb. 98 ist die adsorbierte Menge Antibiotikum der eluierten Menge bei verschiedenen Anfangskonzentrationen gegenübergestellt. Es wird ersichtlich, dass bei hohen Antibiotikumskonzentrationen der prozentuale Anteil an eluiertem Antibiotikum stark abnimmt. Mit einer mehrfachen Elution kann auch hier noch etwas mehr des Antibiotikums eluiert werden. Warum der hier verwendete Eluent allerdings nicht in der Lage ist, das Antibiotikum komplett zu eluieren, ist nicht klar. Eine Erklärung könnte Abb. 103 liefern in der eine irreversible Bindung des Cephalosporins an den Aminogruppen des Adsorbers dargestellt ist.^[249]

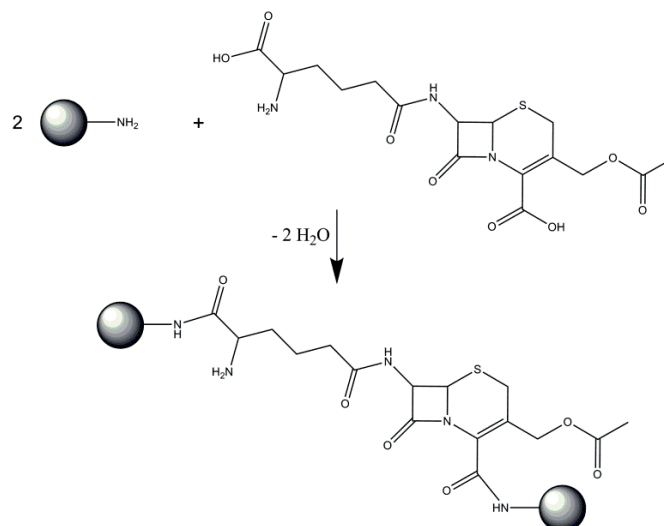


Abb. 99: Mögliche kovalente Bindung des Cephalosporin C an Aminogruppen auf der Partikeloberfläche.

Bei der dargestellten irreversiblen Bindung bleibt der Lactam-Ring intakt. Sollte nach dem Elutionsschritt das Antibiotikum aufgrund dieser Bindung auf dem Adsorber zurück bleiben, sollte die charakteristische Schwingungsbande der C=O Streckschwingung des Lactam-Rings im IR-Spektrum des Adsorbers zu sehen sein. In Abb. 100 a) ist das IR-Spektrum des gelösten Cephalosporin C dargestellt und die dazugehörigen mittels Dichtefunktionaltheorie (DFT) berechneten IR-Spektren. Die DFT-Rechnungen wurden von Herrn Johannes Ernst mittels GAUSSIAN durchgeführt.^[250] GAUSSIAN View ermöglicht neben der Visualisierung der Spektren auch eine Darstellung der Schwingungsanimationen. In Abb. 100 b) ist die Schwingung bei 1753 cm^{-1} dargestellt, welche der besagten C=O Streckschwingung entspricht.

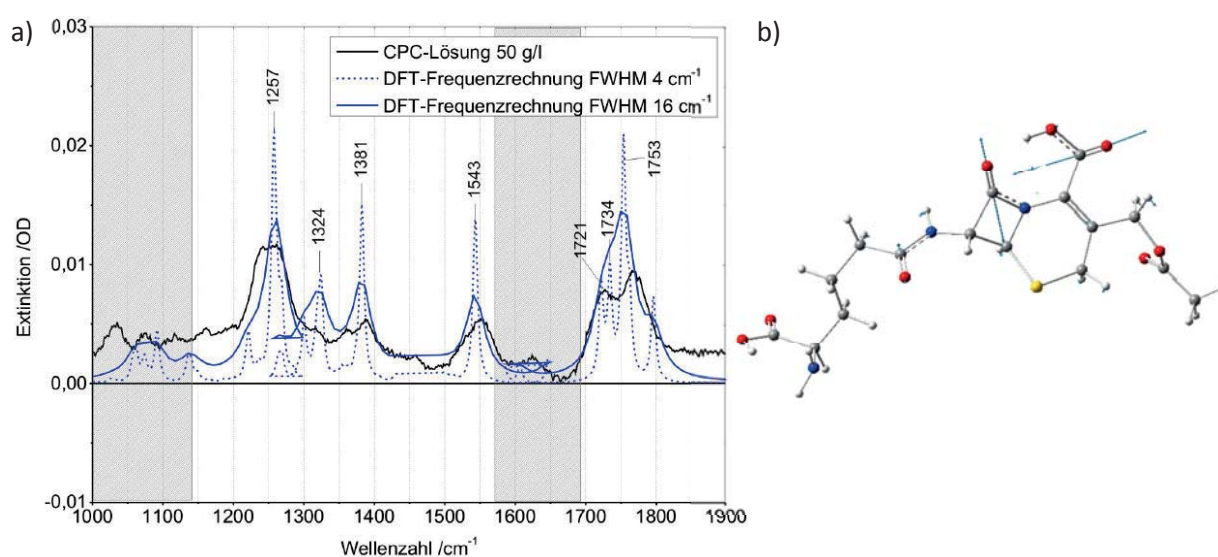


Abb. 100: a) Differenzspektrum einer CPC-Lösung (schwarze Linie) im Fingerprintbereich, sowie zwei theoretischer Spektren von CPC verschiedener Halbwertsbreiten aus einer DFT-Rechnung mittels GAUSSIAN. b) Zeigt das CPC inklusive Vektorpfeilen der Streckschwingung bei 1753 cm^{-1} .^[250]

Die IR-Spektren des PMO Adsorbers sind in Abb. 101 dargestellt und die dazugehörige Interpretation der Banden ist Tab. 10 zu entnehmen. Das in rot dargestellte Spektrum ist ein Differenzspektrum, bei dem Wasser als Untergrund subtrahiert wurde. Die Banden zwischen 2700 und 3100 cm^{-1} verschwinden in der breiten Bande des Wassers und durch die Subtraktion damit auch aus dem Spektrum des PMO. Somit können diese Banden für die Interpretation der Wechselwirkung nicht mehr herangezogen werden. Bleiben nur die Banden des Fingerprintbereiches, die in dem Ausschnitt in Abb. 101 dargestellt sind. Der Bereich von 950 bis 1200 cm^{-1} ist stark von den Banden des Silicat-Netzwerkes dominiert. Die beiden Banden bei etwa 1380 cm^{-1} und 1480 cm^{-1} sind schwer zuzuordnen. Bei 1380 cm^{-1} könnte es sich um die Streckschwingung des aromatischen Ringes handeln die durch die Einbindung ins Silicat-Netzwerk zu kleineren Frequenzen verschoben ist. Die Bande bei 1480 cm^{-1} liegt im

unteren Bereich der $\text{CH}_2\text{-NH}_3^+$ symmetrischen Deformationsschwingung, so dass diese beiden Banden für die Interpretation der Adsorption und Elution interessant sind.

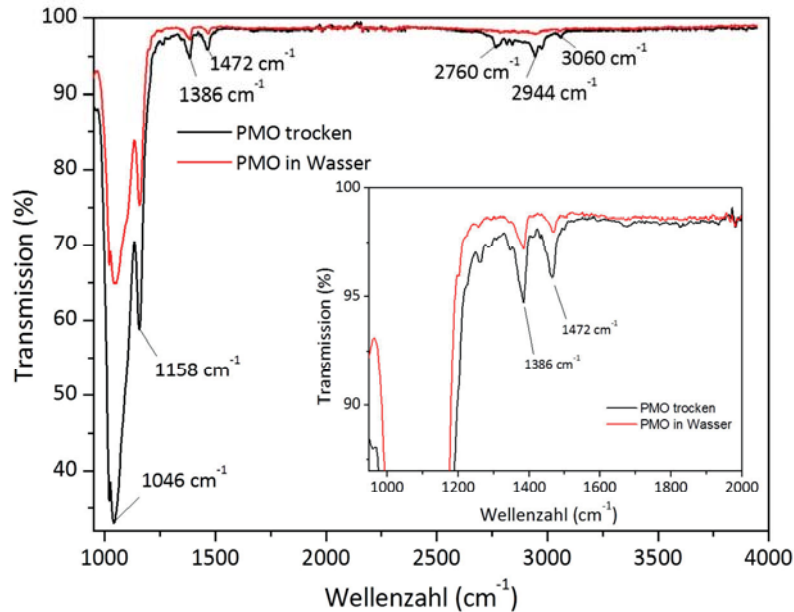


Abb. 101: FTIR-ATR-Spektrum der PMO als Pulver und gelöst in Wasser als Differenzspektrum mit Wasserkompensation. Dargestellt sind außerdem die Wellenzahlen der wichtigsten Banden im Spektrum und eine Vergrößerung des Fingerprintbereiches, welcher für Adsorptionsinterpretationen herangezogen wird.

Die Adsorption erfolgte mit den PMO 1:1 Partikeln im Eppendorfgefäß. Nach der Adsorption wurde der Adsorber vom Flüssigkeitsüberstand befreit und ein IR-Spektrum aufgenommen. Für die Spektren der Elution wurde genauso verfahren. Es wurde auf das Differenzspektrum mit Puffer als Untergrund verzichtet, wodurch eine zusätzliche Bande bei 1630 cm^{-1} entsteht, die der Wasserbande entspricht. Der Vergleich der Spektren im Bereich von $950\text{ bis }2000\text{ cm}^{-1}$ ist in Abb. 102 dargestellt.

Tab. 10: Zuordnung der Schwingungsbanden der PMO Adsorber:

Wellenzahl [cm^{-1}]	Schwingungen	Literatur
3075-3063, 1430	Streckschwingung des aromatischen Rings	[²⁵¹]
3010-2910	Symmetrische Streckschwingung Aminogruppen	[²⁵²]
1480	Deformationsschwingung der Aminogruppen	[²⁵²]
1029, 998	$\text{C}_6\text{H}_5\text{-Si}$	[²⁵³]
730, 695	Deformationsschwingung des $\text{C}_6\text{H}_5\text{-Si}$	[²⁵⁴]
965	O-C-C	[²⁵¹]
795	Si-O-C-C	[²⁵¹]
1300-950	Si-O-Si	[²⁵¹]

Nach der Adsorption erscheint im IR-Spektrum eine zusätzliche Bande bei 1761 cm^{-1} die wie bereits erwähnt der C=O Streckschwingung des Lactam-Ringes zugeordnet werden kann. Gleichzeitig wird die Bande bei 1476 cm^{-1} abgeschwächt. Durch die Adsorption des Antibiotikums an den Aminogruppen ist deren Deformationsschwingung deutlich gehindert, was auf die starke ionische Wechselwirkung des Antibiotikums mit der funktionellen Gruppe zurückzuführen ist. Die Streckschwingung des aromatischen Ringes wird durch die π - π -Wechselwirkung mit dem Zielmolekül nicht beeinflusst. Nach der Elution verschwindet die Bande des Lactam-Ringes nicht vollständig, wie es aus den Vorversuchen, bei denen die Elution nicht zu 100 % möglich war, erwartet wurde. An dieser Stelle stellt sich nun die Frage, ob diese leichte Flanke auf kovalent gebundenes Antibiotikum schließen lässt. Die Bande der Deformationsschwingung der Aminogruppen kehrt nach der Elution in die Ausgangsintensität zurück. Würden die Aminogruppen durch eine kovalente Bindung abgesättigt werden, wäre dies nicht der Fall, so dass die kovalente Bindung des Cephalosporins an den Aminogruppen als Grund für eine unvollständige Elution ausgeschlossen werden kann. In zukünftigen Versuchen sollte nach alternativen Elutionsmitteln gesucht werden.

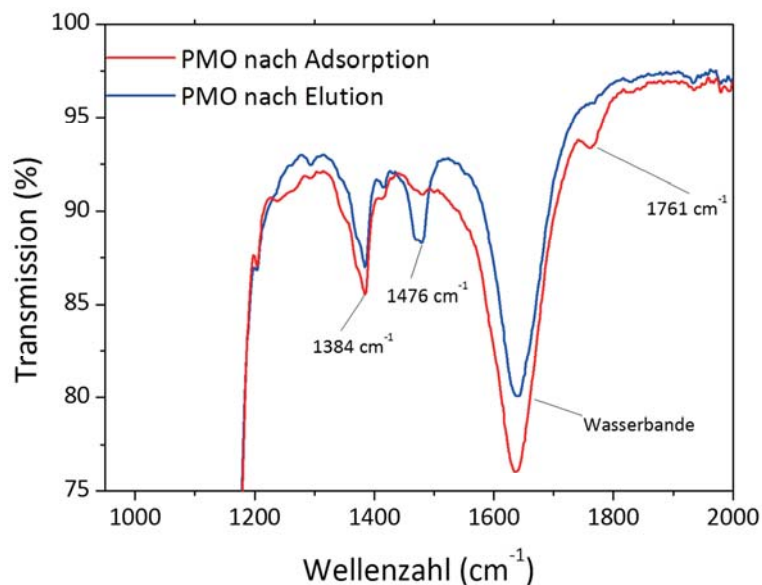


Abb. 102: FTIR-ATR-Spektrum von PMO nach der Adsorption (rot) und PMO nach der Elution (blau). Nach der Adsorption erscheint die für Cephalosporin C charakteristische Bande bei 1761 cm^{-1} . Nach der Elution verschwindet diese Bande aus dem Spektrum. Die Bande bei 1476 cm^{-1} für symmetrische Deformationsschwingung der Aminogruppe wird während der Adsorption abgeschwächt.^[248]

4.4.6 Wiederverwertbarkeit der Adsorbersysteme

Die Wiederfindung des Zielmoleküls und auch die Wiederverwertbarkeit des Adsorbers sind entscheidend für die Wirtschaftlichkeit der Adsorbersysteme. Im Fall von Imipenem nimmt die Kapazität des Adsorbers beim zweiten Einsatz auf 45 % der Ausgangskapazität ab und bleibt anschließend bei einem Wert zwischen 45 und 50 % konstant (siehe Abb. 103). Die zerstörungsfreie Elution des Imipenem von der Adsorberoberfläche stellt weiterhin ein Problem dar. Die starke Abnahme der Adsorption nach dem ersten Schritt könnte demnach mit einer kovalenten Bindung und damit Absättigung funktioneller Gruppen erklärt werden. Nach dem ersten Adsorptionsschritt ist lediglich eine Elution von 23 % des adsorbierten Imipenems möglich (siehe Abb. 103), ab der zweiten Elution bricht die Ausbeute deutlich ein und die Wiederfindung des Imipenems beträgt nur noch 10 %. Eine Variation des Elutionsmittels wurde durch den Kooperationspartner vorgeschlagen. Hier konnte durch die Verwendung von DMSO/1 M NaOAc pH 7,5/ H₂O im Verhältnis (5:5:4) eine Steigerung der Wiederfindung auf 55 % erzielt werden, aber gleichzeitig wurden auch etwa 10 % Abbauprodukte gefunden.^[243] Die Wiederverwertbarkeit des Adsorbers ist mit einer Kapazität von etwa 50 % des Ausgangswertes gegeben, die Elution des Antibiotikum bedarf allerdings weiterer Optimierung, die im Rahmen dieser Untersuchungen nicht mehr durchgeführt werden konnten.

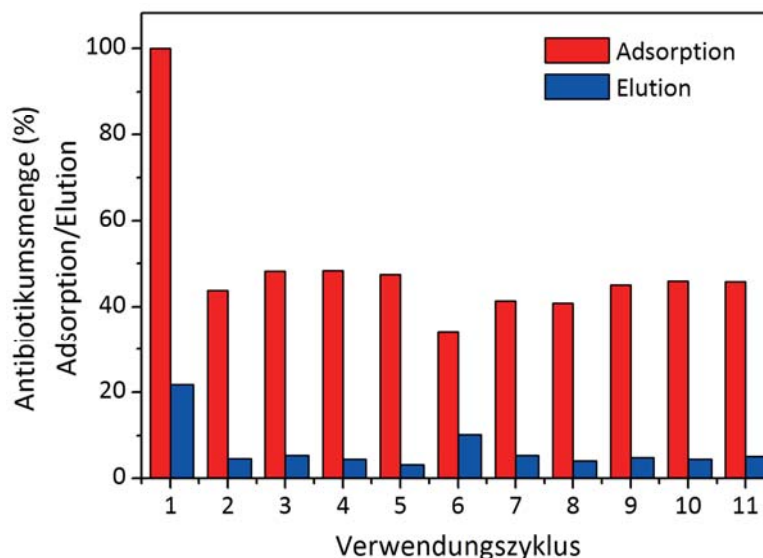


Abb. 103: Adsorption und Elution von Imipenem auf CV11005 in mehreren Zyklen, Imipenem in Pufferlösung.

Die Wiederverwertbarkeit der PMO stellt sich ähnlich dar wie im Falle der instrAction-Phase. Bereits beim zweiten Einsatz nimmt die Kapazität deutlich ab. Für hohe Antibiotikonzentrationen werden beim zweiten Einsatz sogar nur noch 20 % der Ausgangskapazität erreicht. Die Sättigung der Oberfläche erfolgt sehr viel schneller als bei kleinen Konzentrationen. Im kleinen Konzentrationsbereich ist die Abnahme deutlich geringer; bis 1 g/L beträgt die Abnahme weniger als 10 %. Grund hierfür ist die unvollständige Elution. In Abb. 98 wurde bereits gezeigt, dass die Elution im hohen Konzentrationsbereich deutlich schlechter ist als im niedrigen Konzentrationsbereich. Demnach ist auch hier eine Optimierung der Elution zwingend notwendig um die selektive Aufarbeitung weiter zu steigern. Kann die Elution gesteigert werden, ist auch mit diesem Adsorber eine stabile Adsorption in mehreren Zyklen zu erwarten.

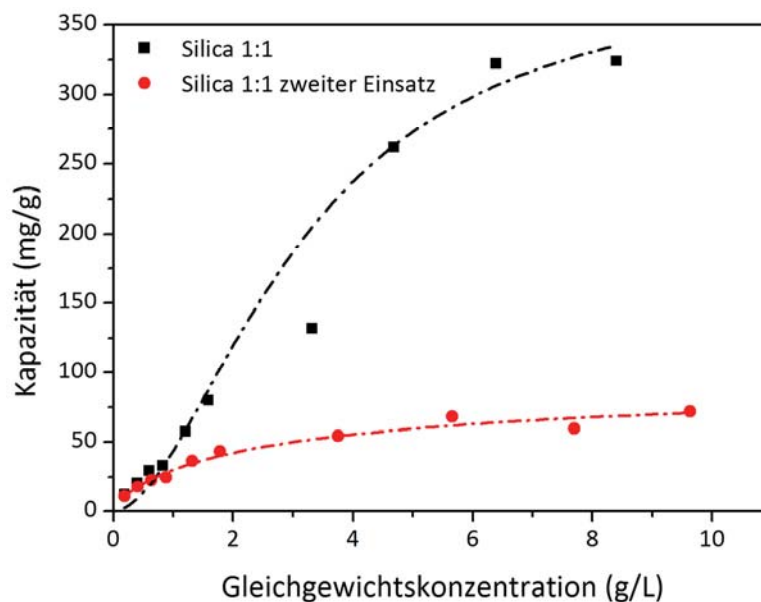


Abb. 104: Adsorptionsisothermen des PMO-Adsorbers Silicat 1:1 beim ersten und beim zweiten Einsatz der CPC-Adsorption. Die Kapazität im hohen Konzentrationsbereich bricht beim zweiten Einsatz des Adsorbers stark ein. Im kleinen Konzentrationsbereich ist die Abnahme deutlich geringer.



4.5 Optimierung des Hochgradienten Magnetseparators

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit dem Hochgradienten-Magnetseparator, der die im vorherigen Kapitel beschriebenen, optimierten magnetischen Adsorbersysteme nach der Adsorption aus dem Medium zurückgewinnen soll. Auch Spül- und Konditionierungsprozesse der Partikel können mit Hilfe der Hochgradienten-Magnetseparation einfach und schnell durchgeführt werden. Wie bereits in Kapitel 4.2.3 beschrieben gibt es das Prinzip der HGMS bereits seit den frühen 70er Jahren im Bereich der Abwasseraufreinigung. Der Einsatz dieser Technologie im biotechnologischen Bereich ist recht neu und Gegenstand aktueller Untersuchungen.^[209-213] Die hier vorgestellten Simulationen und Separationsexperimente liefern ein Konzept zur Optimierung der HGMS-Matrix für biotechnologische Prozesse mit integrierter Magnetseparation.

4.5.1 Eingesetzte Filterkammern

Die verschiedenen Separationsexperimente wurden mit dem HGF-10 Permanentmagnet-System der Firma Steinert GmbH durchgeführt. Die magnetisierbare Matrix dieses Systems wird von einer Reihe gestapelter Drahtgitter aufgebaut. Sie beinhaltet zwei verschiedene Gitter, wovon eine Sorte magnetisierbar ist (ferromagnetisches Material DIN 1.4106) und die andere als Spacer zwischen den magnetisierbaren Gittern aus einem nicht ferromagnetischen Material (DIN 1.4571) besteht (siehe Abb. 105).

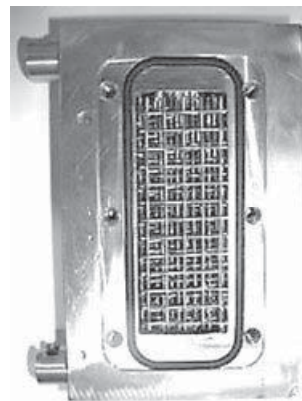


Abb. 105: Separationskammer vor der Optimierung der Gittermatrix

Diese nicht magnetisierbaren Gitter nehmen einen großen Raum in der Filterkammer ein, der für die Partikelseparation verloren geht und tragen somit nicht zur magnetischen Separation der Partikel bei. Durch diesen Raumverlust wechselt die Separation von einer reinen magnetischen Filtration zu einer Tiefenfiltration. Dies führt dazu, dass eine Separation der

Magnetpartikel von nicht magnetisierbaren Stoffen nur für eine kurze Zeit garantiert werden kann. Im Rahmen dieser Untersuchungen soll die originale Filtermatrix so reduziert werden, dass die Filtermatrix aus einem Minimum an Gitterstäben besteht, die als Stromstörer dienen und dennoch keine Verluste oder sogar eine Steigerung der Separationseffizienz aufweist.

Um herauszufinden, welche Gitterorientierung den größten Beitrag zur Partikelabscheidung liefert, wurde eine neue Trennkammer konstruiert, mit der die Gitterorientierung in alle drei Raumrichtungen variiert werden kann (siehe Abb. 106). Als magnetisierbares Gitter dienten Stäbe der Materialbezeichnung DIN 1.4310.

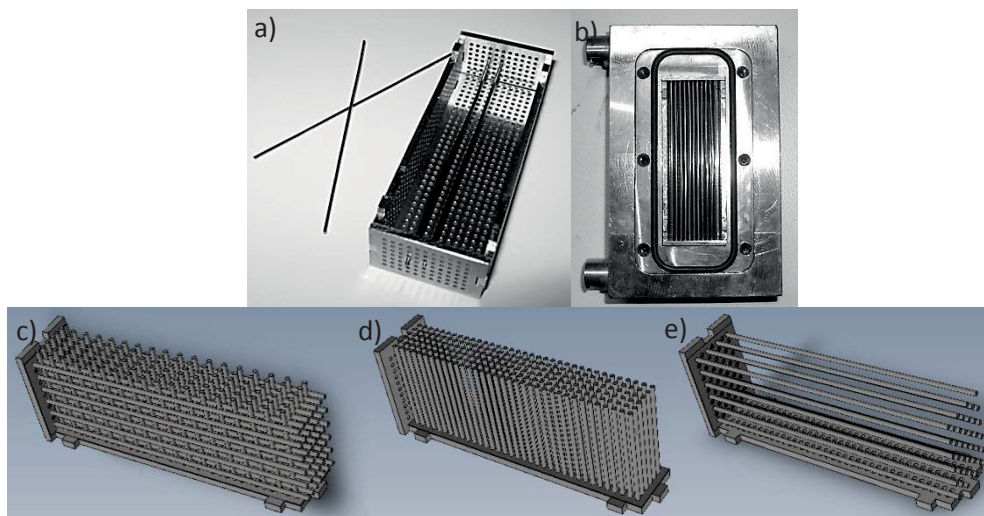


Abb. 106: Verwendete Matrixorientierungen für die Filterkammeroptimierung: a) Einsatz für die HGMS-Filtrationskammer für unterschiedliche Gitterorientierungen, b) Filterkammer mit axialer Anordnung, c) simulierte Gitterstruktur der Filterkammer, d) transversale Gitterorientierung und e) axial Gitterorientierung.^[242]

Anhand verschiedener Separationsexperimente wurde die Gittermatrix des Steinert HGF-10 (siehe Abb. 106 c) mit einer transversalen (Abb. 106 d) oder axialen Anordnung (Abb. 106 e) von Gitterstäben als Filtermatrix verglichen. Als Negativexperiment wurde eine sogenannte parallele Anordnung verwendet, bei der die Gitterstäbe parallel zum magnetischen Feld und senkrecht zum Flüssigkeitsstrom platziert werden. Diese Orientierung bildet keinen magnetischen Feldgradienten aus, so dass auch keine Partikel magnetisch abgetrennt werden sollten.

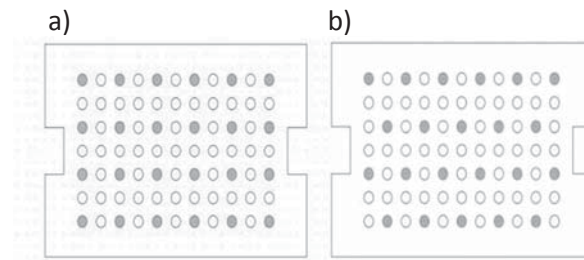


Abb. 107: Orientierung der magnetischen Stäbe in a) kubischer und b) rhomboedrischer Anordnung.^[195]

Als weitere Orientierungsmöglichkeit wurde eine kubische oder eine rhomboedrische Anordnung in Betracht gezogen (siehe Abb. 107). Die Effizienz der Separation wurde zunächst gravimetrisch bestimmt, indem nach einem bestimmten Zeitintervall die Menge an separierten Partikeln auf der Filtermatrix quantifiziert wurde. Ausgehend von diesem Wert wurde die Filterbeladung für jede Gitterorientierung berechnet. In Folgeexperimenten wurde die Separationseffizienz ausgehend vom Filterkoeffizient berechnet, welcher mit Hilfe von Durchbruchkurven bestimmt werden kann (siehe Kapitel 4.5.2). Für eine transversal rhomboedrische Anordnung der Stäbe wurden verschiedene Kammereinsätze mit Gitterabständen zwischen 0,2 mm und 1,4 mm angefertigt (siehe Abb. 108). Diese dienen der Identifizierung der optimalen Gitterabstände.

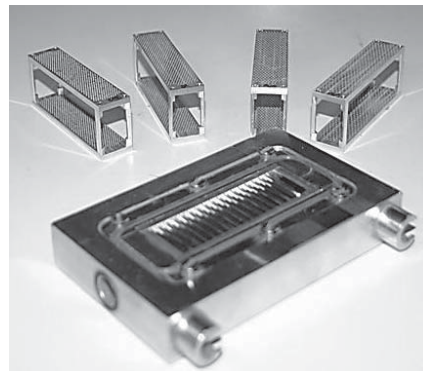


Abb. 108: Separationskammer mit verschiedenen Kammereinsätzen für Gitterabstände zwischen 0,2 mm und 1,4 mm.

4.5.2 Aufnahme von Durchbruchkurven und Berechnung der Filterkonstanten

Der Verlauf einer vollständigen Beladung der Gitterstäbe mit eigens hergestellten Silicat-Partikeln (Synthesevorschrift siehe Anhang A 4) bei einem Volumenstrom von 100 ml/min und deren Elution (500 ml/min) aus dem HGMS ist in Abb. 109 dargestellt. Der Durchbruch der Partikelsuspension beginnt nach einer Beladungsdauer von 4,5 min. Nach 9,5 min ist eine vollständige Erschöpfung der Filterkapazität zu erkennen. Die Maximalbeladung dieses Filters mit magnetischen Partikeln beträgt 4,2 g. Anhand der nachfolgenden Reinigungs-spülung der Kammer mit eingeschaltetem Magneten ab der 19,5ten Minute ist zu erkennen, dass die Partikel vollständig im Magnetfeld zurückgehalten werden. Erst nach der Entfernung des äußeren Magnetfeldes in der 27ten Minute ist die Elution der Partikel möglich.

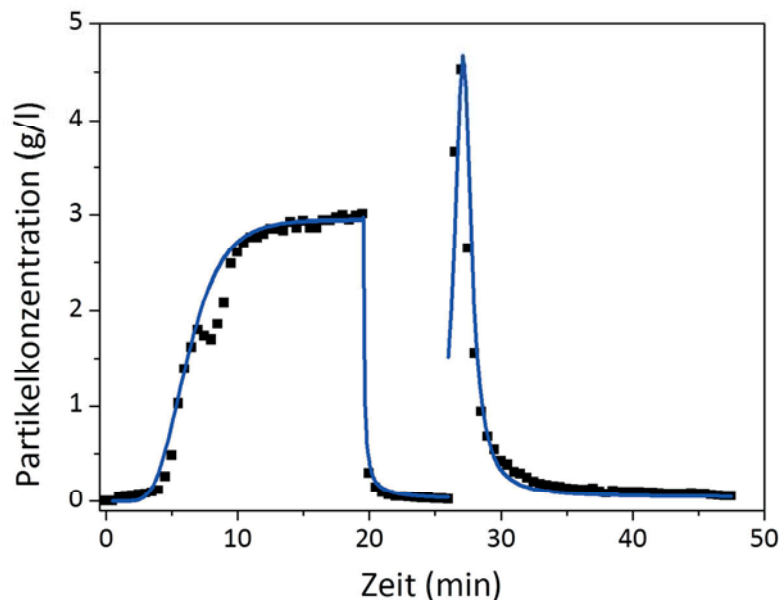


Abb. 109: Durchbruchkurve magnetischer Partikel im HGMS: Magnetpartikelkonzentration der eigens hergestellten Silicat-Partikel am Ausgang des HGMS-Filters. Bis zur 20. Minute ist die Beladung des Filters dargestellt. Im Anschluss die Spülung (ab 22 min) und das Auswaschen (ab 27 min kein Magnetfeld) der Filterkammer.

Anhand solcher Durchbruchkurven können Filterkonstanten wie die Sättigungbeladung und der initiale Filterkoeffizient berechnet werden, die Aufschluss über die Separationseffizienz geben. Bei der Aufnahme der Durchbruchkurven wird die Partikelkonzentration am Ausgang der Separationskammer mittels Messungen der optischen Dichte zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Mathematisch kann der Verlauf der Partikelkonzentration mit folgender Gleichung beschrieben werden:^[255]

$$\frac{c}{c_0} = \frac{\exp(\sigma_s^{-1} \cdot c_0 \cdot v_0 \cdot \lambda_0 \cdot \tau)}{\exp(\sigma_s^{-1} \cdot c_0 \cdot v_0 \cdot \lambda_0 \cdot \tau) + \exp(\lambda_0 \cdot L_F) - 1} \quad (9)$$

$$\tau = t - \frac{L_F}{v_F} \quad (10)$$

$$v_F = \frac{v_0}{\varepsilon} \quad (11)$$

c_0 ist hierbei die Partikelkonzentration am Kammereingang, c die Partikelkonzentration am Kammerausgang, σ_s die Sättigungskapazität der Filtermatrix, v_0 die Fluidgeschwindigkeit am Einlass, λ_0 der initiale Filterkoeffizient und τ die Verweilzeit, definiert durch die Filtrationszeit t minus dem Quotienten aus Filterlänge L_F und Fluidgeschwindigkeit v_F innerhalb des Filters, wobei v_F eine Funktion der Filterporosität ε ist.

Diese Gleichung basiert auf der Theorie der Tiefenfiltration. Mit diesem Modell kann die Kapazität der Filtermatrix bestimmt werden und für Vergleiche der verschiedenen Gitterausrichtungen herangezogen werden. Dieses Modell lässt sich gut auf die HGMS anwenden, was ebenfalls im Rahmen der Experimente bestätigt werden konnte (siehe Abb. 110).

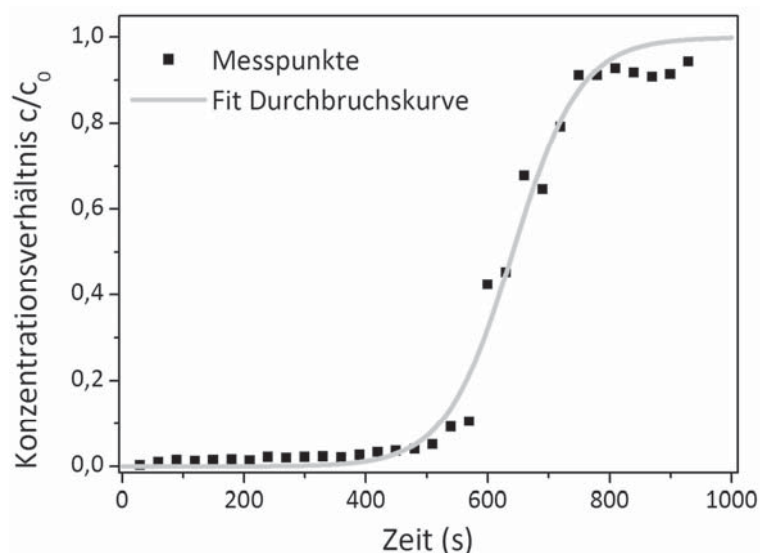


Abb. 110: Zeitlicher Verlauf des Filterdurchbruchs am Filterausgang. Die Darstellung wird als Durchbruchskurve bezeichnet. Der Fit der Messwerte anhand Gleichung (9) basiert auf der Theorie der Tiefenfiltration.



4.5.3 Simulation der Gittermatrix innerhalb der HGMS-Filterkammer

Die Software COMSOL Multiphysics 4.2 ist ein Programm, welches verschiedene physikalische Modelle verbindet und auf ein einziges zu simulierendes Problem anwendet. Die hier genutzte Simulation basiert auf Grundlagen der Magnetostatik und des inkompressiblen Navier-Stokes Modells.

Mit Hilfe des Moduls zur Magnetostatik kann auf Grundlage der Maxwell'schen Gleichungen das magnetische Feld simuliert werden. Anhand von Oberflächenplots ist in jedem Punkt der Simulation die magnetische Feldstärke \vec{H} bestimmt. Ausgehend von diesen Simulationen kann die magnetische Kraft \vec{F}_M berechnet werden, die auf die magnetischen Partikel wirkt:

$$\vec{F}_M = \mu_0 \cdot \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r_P \cdot \chi \cdot \vec{H} \cdot \text{grad } \vec{H} \quad (12)$$

Die Gleichung berücksichtigt die Permeabilitätskonstante des Vakuums μ_0 , den Partikelradius der magnetischen Komponente des Partikels r_P und die Suszeptibilität der magnetischen Partikel χ . Die Suszeptibilität der hier verwendeten Partikel wird definiert als $\chi = 0,61$, was einer Suszeptibilität von Magnetit bei 1 T entspricht.^[218] Die Suszeptibilität ist von der Form und Größe der Partikel abhängig. Diese Abhängigkeit spielt jedoch für das betrachtete Modell keine Rolle, da dieser Wert in allen Simulationen konstant gehalten und die Ergebnisse für den Vergleich der Matrixorientierungen untereinander herangezogen werden. Eine quantitative Beschreibung der Partikeltrajektorien soll hierbei nicht erreicht werden.

Die fluiddynamischen Abläufe für inkompressible viskose Flüssigkeiten wird mit Hilfe der Navier-Stokes Gleichung beschrieben. Die Kraft \vec{F}_D , die auf die Partikel durch den Flüssigkeitsstrom wirkt, kann mit Hilfe folgender Gleichung berechnet werden:

$$\vec{F}_D = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_{Pges} \cdot \vec{u} \quad (13)$$

Diese Reibungskraft beinhaltet die dynamische Viskosität η , den Partikelradius des gesamten Partikels r_{Pges} und die Fluidgeschwindigkeit \vec{u} . Die Simulationen wurden zunächst in 2D durchgeführt und alle Kräfte in x und y Richtung berechnet. Das Modell wurde an einem einzelnen PC (Quadcore CPU 2,67 GHz, 24 GB RAM) erstellt. Die Simulationszeiten sind abhängig von der Definition der Finiten Elemente, sowie zusätzlicher Simulationen der Partikelbahnen und auch der Kombination der magnetischen und fluiddynamischen Berechnungen und lag im Bereich von mehreren Stunden bis Tagen. Diese Betrachtungen können auch auf ein 3D Modell erweitert werden in dem in die geometrische Zeichnung und

die physikalischen Definitionen die dritte Ebene eingefügt wird. Allerdings erhöhen sich dadurch auch die Simulationszeiten deutlich, weshalb eine Anbindung an ein Rechenzentrum zu empfehlen ist.

Ein anderer wichtiger Faktor der Partikelseparation ist der Einfangradius R_c der Gitterstäbe. Da R_c eine Funktion des Quotienten $v_m/v_{0,s}$ ist, kann dieser für eine qualitative Aussage der Separationseffizienz heran gezogen werden.^[256] $v_{0,s}$ ist die maximale Fluidgeschwindigkeit zwischen zwei Gitterstäben und kann aus den fluiddynamischen Simulationen in der Mitte zwischen zwei Gitterstäben abgelesen werden; v_m ist die Geschwindigkeit des Partikels die aufgrund des magnetischen Gradienten erzeugt wird. Sie wird berechnet gemäß:^[257]

$$v_m = \frac{2}{9} \times \mu_0 \times \Delta\kappa \times M_s \times H_0 \times \frac{r_{p_{ges}}^2}{a \times \eta} \quad (14)$$

wobei $\Delta\kappa$ die Differenz der Volumenssuszeptibilität des magnetischen Partikels mit Radius $r_{p_{ges}}$ und der Volumenssuszeptibilität des Fluides darstellt, M_s ist die Sättigungsmagnetisierung der Gitterstäbe mit Radius a , abzulesen aus den magnetostatischen Simulationen und H_0 beschreibt das magnetische Feld genau zwischen zwei Gitterstäben, ebenfalls resultierend aus den magnetostatischen Simulationen. Der Quotient $v_m/v_{0,s}$ wird, wie bereits erwähnt, für die folgende qualitative Diskussion bezüglich der Gitterorientierung und der Drahtabstände herangezogen. Die Ergebnisse der Simulationen werden im folgenden Kapitel zusammengefasst und diskutiert.

4.5.4 Neukonstruktion der HGMS Filterkammer

Zur Verbesserung der Biomassedurchlässigkeit und Separationscharakteristik des HGMS wurden verschiedene Anordnungsrichtungen der Drahtstäbe simuliert und in Separationsversuchen getestet. Die Simulationen wurden durch den Einsatz der Finite Elemente Methode (FEM) durchgeführt. Hierbei sind dreidimensionale Simulationen der Trennkammer unter Beachtung der Differenzialgleichungen der Strömungs- und Magnetfelder entwickelt worden (siehe Kapitel 4.5.3). Eine Anordnung in z-Richtung entspricht einer Ausrichtung der Gitterstäbe parallel zum Mediumsstrom und senkrecht zum Magnetfeld (axiale Anordnung), in y-Richtung senkrecht zum Magnetfeld und senkrecht zum Fluss (transversal), in x-Richtung senkrecht zum Fluss und parallel zum Magnetfeld (parallel). Beispiele für die Ausrichtungen sind in Abb. 106 oder Abb. 112 c) zu finden. Zusätzlich wurden kubische und rhomboedrische Anordnung der Gitterstäbe untersucht. Die Ergebnisse der Separationsversuche und die daraus berechneten Filterbeladungen sind in Abb. 111 zusammengefasst.

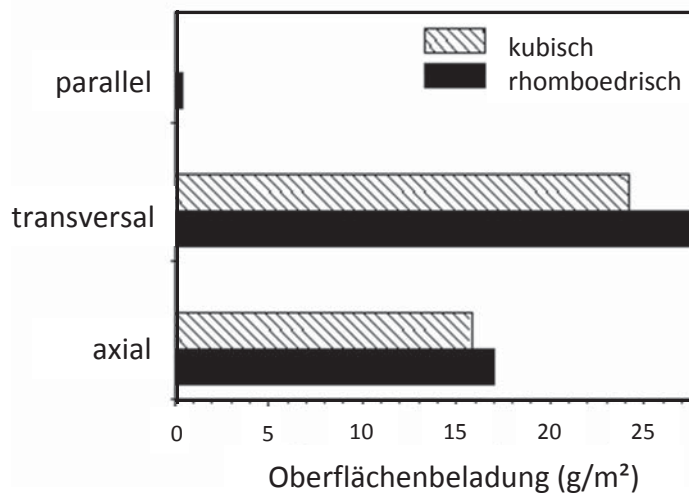


Abb. 111: Experimentelle Beladung des HGMS verschiedener Raumausrichtungen und Anordnungen der Drahtgitter. Die Beladung der Drähte mit Magnetpartikeln ist relativ zu deren Oberfläche dargestellt.^[195]

Die experimentellen Untersuchungen der Gitterorientierung zeigen klare Unterschiede zwischen den verschiedenen Anordnungen. Im Hinblick auf die gravimetrisch bestimmten Filteroberflächenbeladung (siehe Abb. 111) sowie die maximale Kapazität der Filter, welche aus den Durchbruchkurven berechnet wird (siehe Tab. 11), zeigt die transversale, rhomboedrische Anordnung die höchste Beladung bzw. Kapazität. Eine Anordnung der Stahlstäbe in x-Richtung (parallel zum Magnetfeld) liefert kaum bzw. keine Rückhaltung der magnetisierbaren Partikel. Dies wurde auch in den Simulationen bestätigt, da sich hier kein magnetischer Gradient innerhalb der Kammer aufbaut.



Tab. 11: Vergleich verschiedener Gitterorientierungen; die Filterkonstanten wurden anhand der Durchbruchkurven errechnet:^[242]

Orientierung	Maximale Kapazität [kg/m ³]	Filterkoeffizient [1/m]	Separationseffizienz []
Transversal	287,7	91,97	6,7
Axial	280,9	60,32	4,4
ax + trans (Gitter)	276,6	74,96	5,5

Neben der maximalen Kapazität der Filtermatrix wird auch der initiale Filterkoeffizient anhand der Durchbruchkurven errechnet. Das Produkt (sogenannte Filtereffizienz) $\lambda_0 \cdot L_F$ muss Werte größer als fünf annehmen, damit das Filtrationsverhalten des HGMS einer klassischen Tiefenfiltration angenähert werden kann.^[218] In diesem Fall bildet sich eine klare Beladungs- und Konzentrationsfront im Inneren der Kammer, die während der Filtrationszeit über die Länge des Filters in Richtung Kammerauslass wandert. Die Bildung einer solchen Front führt zu einem plötzlichen Durchbruch des Filters. Dies führt zu geringeren Verlusten an Partikeln im Vergleich zu einem langsamen und konstanten Anstieg von c/c_0 , wie es bei der axialen Anordnung der Fall ist. Die transversale Anordnung zeigt also neben der höchsten Kapazität auch die beste Separationseffizienz. Obwohl für die axiale Anordnung eine recht hohe maximale Kapazität erreicht wird, ist die Separationseffizienz ungenügend. Die Anordnung in einer Gitterstruktur (ax + trans) zeigt geringere maximale Beladungen, was in dem größeren Platzbedarf der Matrix innerhalb der Kammer begründet liegt. Anhand dieser Ergebnisse kann die Gitterstruktur zu Gunsten einer transversalen Anordnung von Gitterstäben ersetzt werden.

Um nun die Gitterabstände in der Kammer zu optimieren, wurde auf der Basis der Ergebnisse aus Tab. 11 und Abb. 111 eine neue Kammer entworfen. Die maximale Filterkapazität und die Separationseffizienz bei verschiedenen Flüssigkeitsströmen und Gitterabständen sind in Tab. 12 zusammengefasst.

Tab. 12: Vergleich der unterschiedlichen Gitterstababstände bei verschiedenen Flüssigkeitsströmen.^[258]

Abstand [mm]	maximale Kapazität 100 ml/min [kg/m ³]	maximale Kapazität 200 ml/min [kg/m ³]	Filterkoeffizient 100 ml/min [1/m]	Filterkoeffizient 200 ml/min [1/m]	Separationseffizienz 100 ml/min	Separationseffizienz 200 ml/min
1,4	113,7	103,7	92,2	38,9	9,9	2,8
1,0	168,0	83,9	200,4	27,2	14,6	1,9
0,8	167,1	87,5	125,2	32,0	9,1	2,3
0,6	88,3	115,4	248,6	64,7	18,2	4,7
0,4	120,3	20,9	186,4	34,3	13,6	2,5
0,2	29,4	23,7	57,5	21,1	4,2	1,5

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Fluidgeschwindigkeit von 200 ml/min zu hoch ist für eine adäquate Separation der magnetischen Partikel. Dies wird in erste Linie anhand der Ergebnisse der Separationseffizienz $\lambda_0 \cdot L_F$ klar, da keine Anordnung einen Wert von 5 erreicht, wie für eine optimale Partikelseparation vorausgesetzt wird. Eine deutlich bessere Separationseffizienz wird bei einem Volumenstrom von 100 ml/min erreicht, so dass für das hier präsentierte HGMS und den eingesetzten Partikeln diese Fluidgeschwindigkeit eingehalten werden muss. Zusätzlich ist Tab. 12 zu entnehmen, dass der Gitterabstand von einem Millimeter in transversaler Konfiguration die höchste Kapazität und eine sehr hohe Separationseffizienz erreicht.

Die FEM-Simulation dieser effizientesten Ausrichtung der Gitter in rhomboedrischer Anordnung mit einem Millimeter Gitterabstand ist in Abb. 112 a) und b) exemplarisch dargestellt. Durch die rhomboedrische Anordnung ist es möglich, im Vergleich zur kubischen Anordnung weniger Gitterstäbe bei gleicher Abtrennung einzusetzen. Dies bedeutet, dass sich weniger Stromstörer innerhalb des Systems befinden und Mikroorganismen beim Passieren der Kammer weniger behindert werden. Bei der Anordnung der Filtermatrix in y-Richtung (transversal) verteilen sich die magnetischen Beads links und rechts der Gitterstäbe. Dies könnte einen weiteren Vorteil für dieses System darstellen, da in dieser Ausrichtung die Partikel am effizientesten vom Medium umspült und damit die Biomasse ausgetragen werden kann.

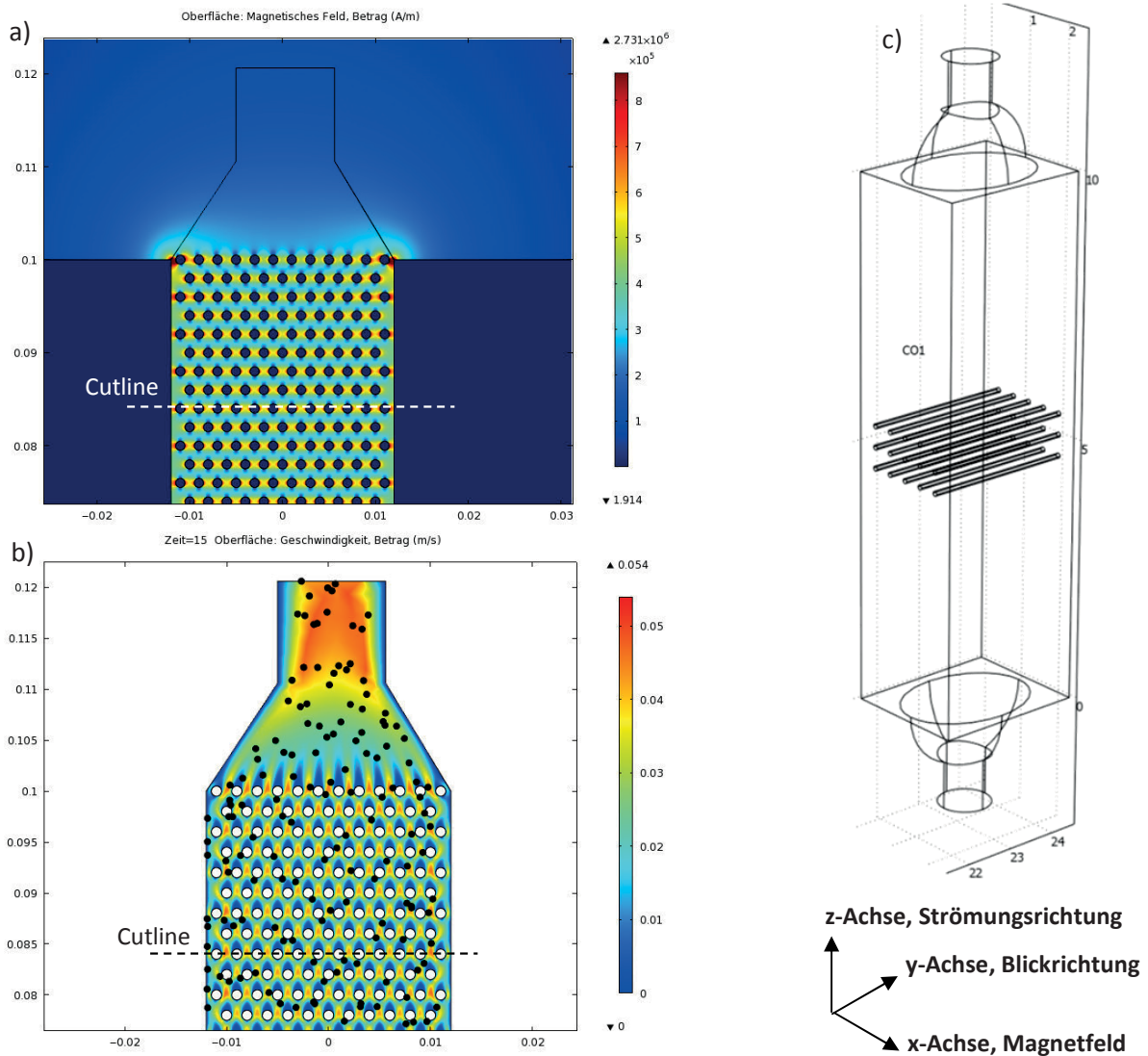


Abb. 112: Simulation des magnetischen Feldes und der fluiddynamischen Verteilung in der HGMS-Kammer, a) magnetisches Feld in transversaler rhomboedrischer Anordnung, b) Fluidgeschwindigkeit mit Partikeln in transversal rhomboedrische Anordnung c) kubische 3D Anordnung der magnetisierbaren Stahlstäbe in transversaler Anordnung innerhalb der Separationskammer.

Die Simulation der HGMS-Kammer kombiniert, wie bereits erwähnt, magnetostatische Berechnungen basierend auf Maxwell's Gleichungen mit fluiddynamischen Berechnungen der Navier-Stokes Gleichung. In Abb. 113 sind beispielhaft die berechneten magnetischen und fluiddynamischen Kräfte entlang der „Cutlinie“ aus Abb. 112 dargestellt. Die Fluidkraft geht aufgrund der Reibung auf der Gitteroberfläche gegen Null und erreicht genau zwischen den Stäben das Maximum. Für die magnetische Kraft stellt es sich genau anders herum dar. Auf der Gitteroberfläche ist die Kraft am höchsten, da das Magnetfeld mit dem Abstand exponentiell abnimmt. Genau zwischen zwei Gittern geht die Kraft gegen Null, da sich die anziehende Kraft der beiden benachbarten Gitterstäbe genau aufhebt.

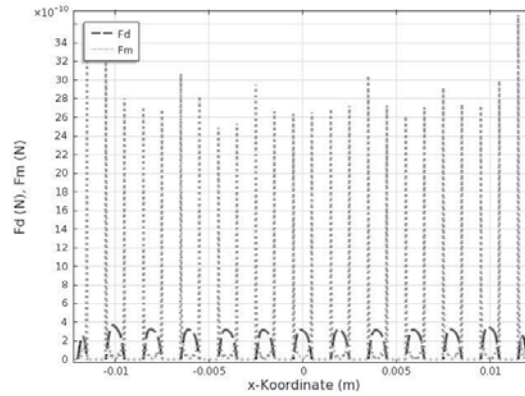


Abb. 113: Magnetische Kraft und fluiddynamische Widerstandskraft entlang der in Abb. 112 dargestellten Cutlinie.

Um die anhand der Durchbruchkurven definierte optimale Orientierung und die optimalen Gitterabstände durch das Simulationsmodell zu bestätigen, wird der Quotient aus magnetischer Geschwindigkeit und Fluidgeschwindigkeit $v_m/v_{0,s}$ herangezogen. Dieser Quotient wird anhand von 3D Simulationen für jede Gitteranordnung berechnet und die Ergebnisse miteinander verglichen (siehe Abb. 114). Abb. 114 a) ist zu entnehmen, dass auch bei den Simulationen die transversale Anordnung die höchsten Werte annimmt. Sowohl für axiale als auch für transversale Orientierung steigt die Separationseffizienz mit einer rhomboedrischen Anordnung, da in diesem Fall die Flüssigkeit optimal die Gitterstäbe umfließen kann. Wie bereits vermutet ist für die parallele Orientierung $v_m/v_{0,s} < 1$, was eine sehr geringe bis keine Separationseffizienz vorhersagt, da die Gitterstäbe parallel zum magnetischen Feld stehen und so kein magnetischer Gradient geformt wird.

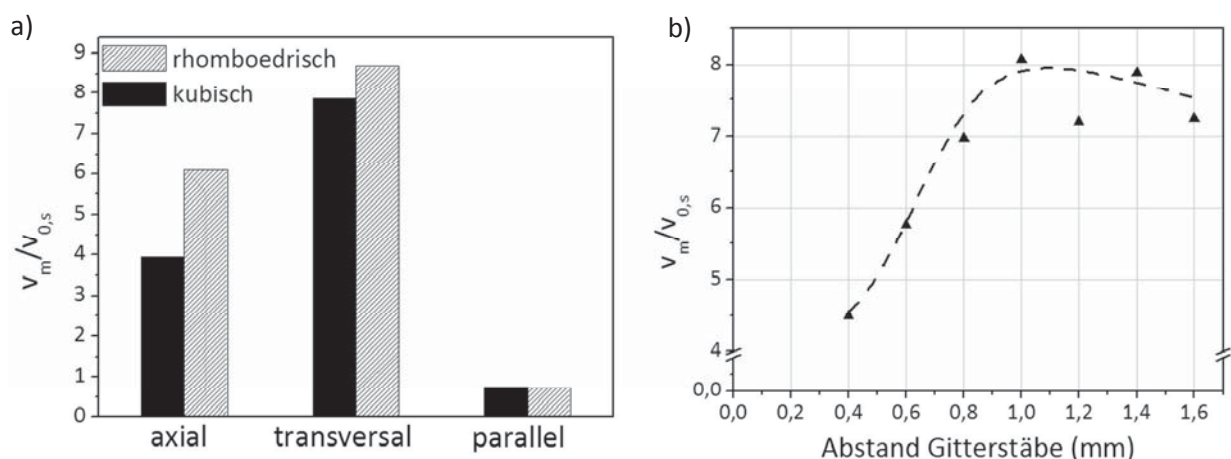


Abb. 114: Optimierung des HGMS-Gitter: a) zeigt einen Vergleich der Gitterorientierungen; für rhomboedrische Gitter in transversaler Ausrichtung wird der höchste Quotient des Einfangradius erreicht; b) zeigt für rhomboedrische transversale Anordnung die berechneten Quotienten des Einfangradius für verschiedene Gitterabstände und ein Maximum bei 1mm Gitterabstand.

Die Untersuchung der Gitterabstände zeigt ein Maximum von $v_m/v_{0,s}$ bei 1 mm Abstand zwischen zwei Stäben (siehe Abb. 114 b)). Für Gitterabstände < 1 mm steigt $v_{0,s}$ stärker als v_m , wodurch ein Teil der Partikel durch die erhöhte Widerstandskraft des Fluides ausgetragen wird. Mit einem Gitterabstand > 1 mm zwischen den Gitterstäben entsteht eine inhomogene Verteilung des Volumenstroms, was zu einer nicht gleichmäßigen Beladung der Separationskammer und somit zu einem frühen Filterdurchbruch führt. Die Simulation hat demnach gezeigt, dass bei einem Drahtdurchmesser von 1 mm die optimale Gittergeometrie eine Anordnung von Stäben in transversaler rhomboedrische Ausrichtung mit einem Abstand zwischen den Gitterstäben von 1 mm ist. Da diese Beobachtung auch anhand der Versuche mit Durchbruchkurven bestätigt werden konnte, beschreibt die Simulation die Vorgänge innerhalb der Kammer hinreichend gut, um eine qualitative Aussage bezüglich des optimalen Aufbaus der Kammer zu treffen.

Neben der optimalen Abtrennung der magnetischen Partikel aus einer Fermentationsbrühe ist es für die Anwendung des HGMS in einem biotechnologischen Prozess ebenfalls notwendig, die nicht magnetisierbaren Komponenten wie Mikroorganismen, Zelltrümmer oder sonstige Medienbestandteile zu betrachten.

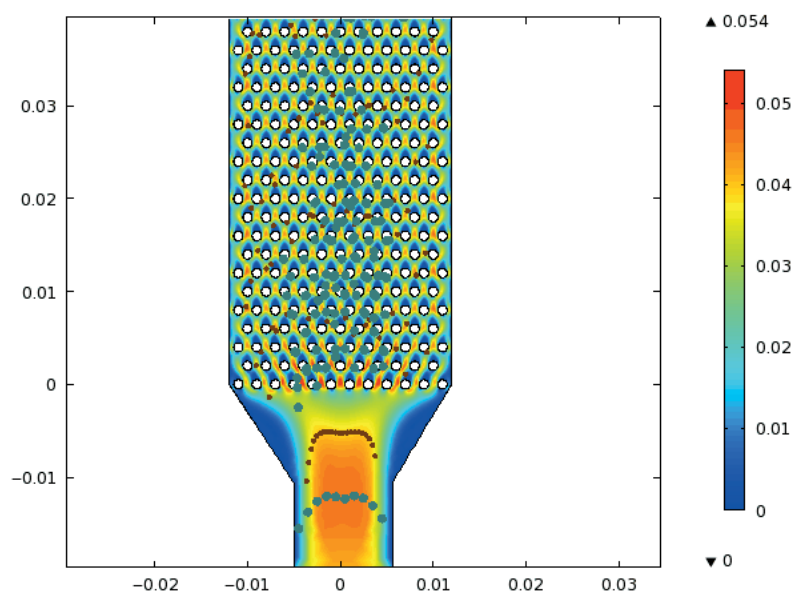


Abb. 115: Simulierte Partikeltrajektorie für pellet-bildende Mikroorganismen mit einem Durchmesser von $200 \mu\text{m}$ (grau) und einem Bakterium mit $1,5 \mu\text{m}$ Durchmesser (braun). Der Farbbalken zeigt die Verteilung der Fluidgeschwindigkeit innerhalb der Kammer. Bei dieser transversal, rhomboedrischen Anordnung kommt es zu einer Akkumulation des myzellaren Organismus innerhalb der Kammer, das Bakterium passiert die Kammer ungehindert.

Die Software COMSOL Multiphysics besitzt ein zusätzliches Tool, das die Partikeltrajektorien innerhalb der Separationskammer anhand der simulierten Kräfte errechnet und visualisiert. Mit dieser Anwendung ist es z.B. möglich zu diskutieren, ob ein nicht-magnetisierbarer Organismus die Kammer ungehindert passieren kann. In Abb. 115 wird ein pellet-bildender Mikroorganismus mit einem Durchmesser von 200 μm mit einem Bakterium (z.B. *E. coli*) mit einem Durchmesser von 1,5 μm verglichen. Die Kammer hat die definierte optimale Orientierung für die Magnetpartikelseparation, sprich transversal, rhomboedrisch mit einem Gitterabstand von 1 mm. Das Bakterium, hier in braun dargestellt, kann die Kammer ungehindert und schnell passieren; der myzellare Mikroorganismus hingegen, dargestellt in grau, akkumuliert innerhalb der Kammer. Eine problemlose Trennung der magnetischen Partikel von Fermentationsmedium und nichtmagnetisierbaren Feststoffen ist somit in dieser Anordnung nur für kleine Partikeldurchmesser möglich. Im Falle des pellet-bildenden Mikroorganismus ist somit eine Vorfiltration unumgänglich und muss bei der Integration des HGMS in den Fermentations- und Downstreamprozess berücksichtigt werden. Das hier vorgestellte Modell beinhaltet noch nicht alle vorherrschenden Kräfte, wie z.B. die Partikel-Partikel-Interaktion oder die Gravitationskraft. Als vergleichendes Tool zur Optimierung der Separationskammer für einen bestimmten Prozess kann das Modell jedoch gut eingesetzt werden, wie auch anhand der Ergebnisse der Separationsversuche bestätigt wurde. Studien zur Materialcharakteristik der Gitter, wie z.B. Stabdurchmesser und Auswahl des Materials, wurden bisher noch nicht durchgeführt. In der Literatur gibt es Studien, die bei Stabdurchmessern in der Größenordnung der Partikeldurchmesser eine verbesserte Separation vorhersagen. Diese Untersuchungen sollten im Folgenden mit dem hier vorgestellten Modell durchgeführt werden, um eine weitere Optimierung der Separationsperformance zu erreichen.

4.6 Integration der Magnetseparation in den Antibiotikumsfermentationsprozess

4.6.1 Aufbau des Prozesses

Für die Bilanzierung der Lactam-Aufarbeitung über mehrere Trennzyklen wurde der in Abb. 116 dargestellte Versuchsaufbau mit optimierter Gitteranordnung (siehe Kap. 4.5.4) verwendet. Der Trennzyklus aus Filtration, Waschen und Spülung wurde dabei zehnmal hintereinander mit einer Modell-Magnetpartikel-Suspension (Konzentration 3 g/L, Volumen 1 L) durchgeführt. Dazu wurde die aus der Fermentation von *Acremonium chrysogenum* (Cephalosporin C Herstellung) erhaltene Fermentationsbrühe mit Hilfe einer Filterzentrifuge (HERMLE SIEVA-2) von der Biomasse befreit.

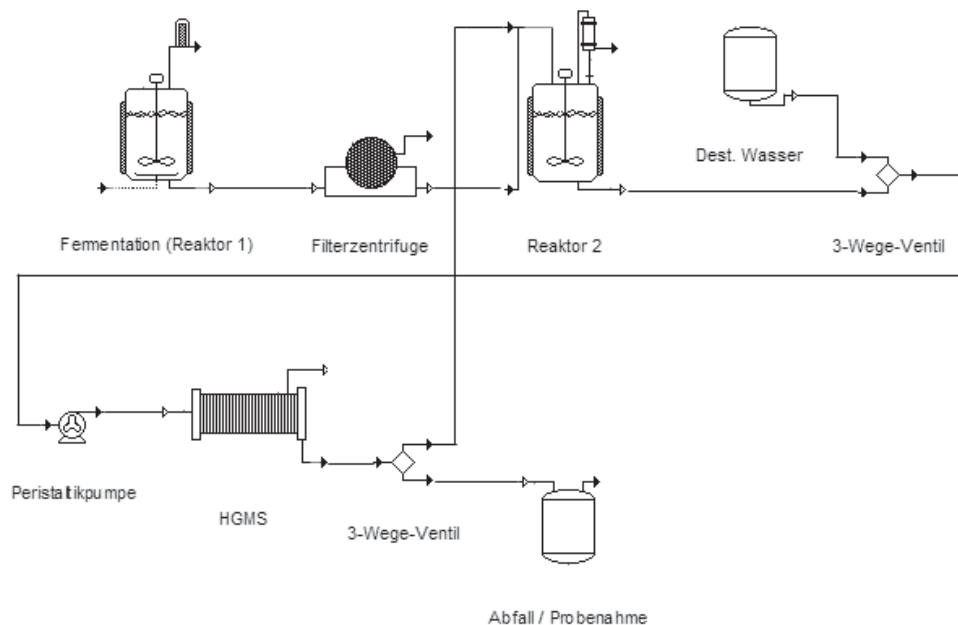


Abb. 116: Verfahrensschema der Reaktorkaskade zur Produktion und integrierter Aufarbeitung von Lactam-Antibiotika.

Mit dem auf diese Weise erhaltenen Permeat wurde ein Minifors-Reaktor, in dem sich eine Magnetpartikel-Suspension (Konzentration 3 g/L, Volumen 500 ml) befand, auf 1 L aufgefüllt. Dies simuliert nun den Adsorptionsschritt im Aufarbeitungsprozess in Reaktor 2. Diese Lösung wurde danach mittels des HGMS mit optimierter Filtermatrix bei einem Volumenstrom von 100 ml/min von den Magnetpartikeln befreit, die Flüssigkeit verworfen und die Partikel auf der Filtermatrix gewaschen. Danach erfolgte eine Spülung der Separationskammer bei 500 ml/min und ausgeschaltetem Magnetfeld, wobei der Flüssigkeitsstrom mit den ausgespülten Partikeln in Reaktor 2 gesammelt wurde. Deioni-

siertes Wasser wurde dabei zum Ausspülen verwendet, was im späteren Prozess durch das verwendete Elutionsmittel ersetzt werden kann und somit den Elutionsschritt des Prozesses simuliert. Diese Elutionssuspension wird wiederum im HGMS separiert (100 ml/min). Im realen Prozess würde der flüssige Überstand nun als Produkt zur weiteren Aufarbeitung aufgehoben. Anschließend werden die Partikel wieder gewaschen und können in diesem Schritt vor der nächsten Adsorption rekonditioniert werden. Mit destilliertem Wasser oder einer Pufferlösung werden die Partikeln dann von der Gittermatrix heruntergespült (500 ml/min) und die Lösung in Reaktor 2 zur nächsten Adsorption im Fermentationsmedium aufgefangen. Mit dem Permeat der Fermentationsbrühe aus Reaktor 1 wird für den nächsten Adsorptionszyklus Reaktor 2 auf ein Volumen von 1 L aufgefüllt, so dass der gesamte Vorgang aus Adsorption und Elution wiederholt werden kann. Auf diese Weise wurden 10 Zyklen durchgeführt. Durch eine minütliche Probenahme des Abflusstroms und der Ausgangskonzentrationen der Lösungen konnte so eine Stoffstrom-Bilanzierung erfolgen. Die Adsorption und Elution des Antibiotikums aus der Fermentationsbrühe des Reaktor 1 erfolgt sukzessive. Dies soll eine halbkontinuierliche Aufarbeitung des Antibiotikums ermöglichen. Nach zehn Zyklen beträgt die Endkonzentration der Partikel im Reaktor 1,88 g/L. Dies wird anhand gravimetrischer Messungen bestimmt. Damit beträgt der Gesamtverlust nach 10 Zyklen 1,12 g, im Durchschnitt also circa 0,11 g pro Zyklus, dies entspricht etwa 3,5 % der eingesetzten magnetischen Partikel. Ein negativer Einfluss des Mediums auf die Abtrennbarkeit der magnetischen Partikel kann nicht festgestellt werden.

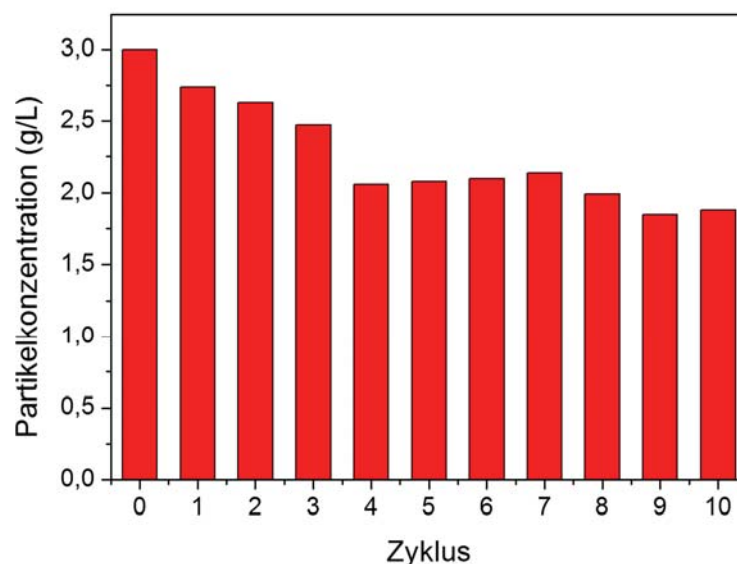


Abb. 117: Verlauf der Partikelkonzentration über mehrere Zyklen der HGMS-Filtration mit Modellmagnetpartikeln.^[258]

Ein Filterdurchbruch der Partikel konnte in keinem der Zyklen beobachtet werden. Demnach resultiert der Partikelverlust nur im geringen Maße an nicht abgetrennten Partikeln. Die Hauptverluste sind eher beim Waschen oder bei Ablagerungen in der Versuchsumgebung zu suchen. Während der aufeinanderfolgenden Zyklen kommt es zu einer Akkumulation von 0,24 g Partikeln auf der Gittermatrix, die nicht resuspendiert werden können. Dies resultiert hauptsächlich aus der ersten Separation, danach stellt sich ein Gleichgewicht auf der Matrixoberfläche ein. Die Bilanzierung der HGMS zeigt, dass auch nach mehreren Trennzyklen ein Verlust an Partikeln auftritt und sich für das komplette System nach 10 Zyklen noch kein Gleichgewicht eingestellt hat. Da die Herstellung magnetischer Adsorberpartikeln kostenintensiv ist, müssen die Verlustquellen weiter minimiert werden, um eine wirtschaftlich interessante Alternative zu den herkömmlichen Methoden darzustellen. Dies könnte insbesondere durch eine Verbesserung der Trenneigenschaften der Matrix sowie durch Verbesserung des Schlauchsystems erfolgen.

Zur Optimierung der Abtrenneigenschaften und somit der Minimierung an Partikelverlusten wäre der Einsatz eines anderen Werkstoffes als Gittermatrix ein möglicher Ansatz. Für die hier vorgestellten Untersuchungen wurde der Stahl 1.4310 eingesetzt. Als Alternative wurde für die Gitterstäbe der Stahl 1.4003 für eine Durchbruchkurve verwendet. Mit diesem Stahl konnte eine Steigerung der maximalen Beladung von 298 kg/m³ auf 396 kg/m³ erzielt werden. Außerdem kam es erst bei größeren Beladungen zum Partikeldurchbruch. Dieses Phänomen kann anhand der Schaefflerdiagramme für den entsprechenden Stahl erklärt werden (siehe Abb. 118). Im Schaefflerdiagramm werden die Nickel- (y-Achse) und Chromäquivalente (x-Achse) aufgetragen; es entstehen verschiedene Bereiche in dem Diagramm, die für die Gefüge der vorliegenden Stähle stehen. Die Bereiche der verwendeten Stähle sind in den Diagrammen als roter Kasten markiert. Die verschiedenen Gefüge besitzen unterschiedliche Eigenschaften. So besitzen austenitische Stähle eine geringere Permeabilitätskonstante als Martensit oder Ferrit, so dass Austenit deutlich geringere Magnetisierungen zeigt.^[259] Die Schaefflerdiagramme der verwendeten Gitterstäbe, sind in Abb. 118 a) und b) dargestellt. Der Stahl 1.4310, der vorwiegend für die Separationsversuche eingesetzt wurde, liegt im Austenit/Martensit/Ferrit-Bereich; der Vergleichsstahl in Abb. 118 b) allerdings ist ein Martensit/Ferrit Mischkristall. Der Anteil an Austenit führt somit zu einer geringeren Sättigungsmagnetisierung und damit auch zu geringeren Abtrenngeschwindigkeiten der Stähle. Für die Auswahl des magnetisierbaren Gitters sollte demnach ein Stahl mit möglichst geringem Austenit-Anteil ausgewählt werden.

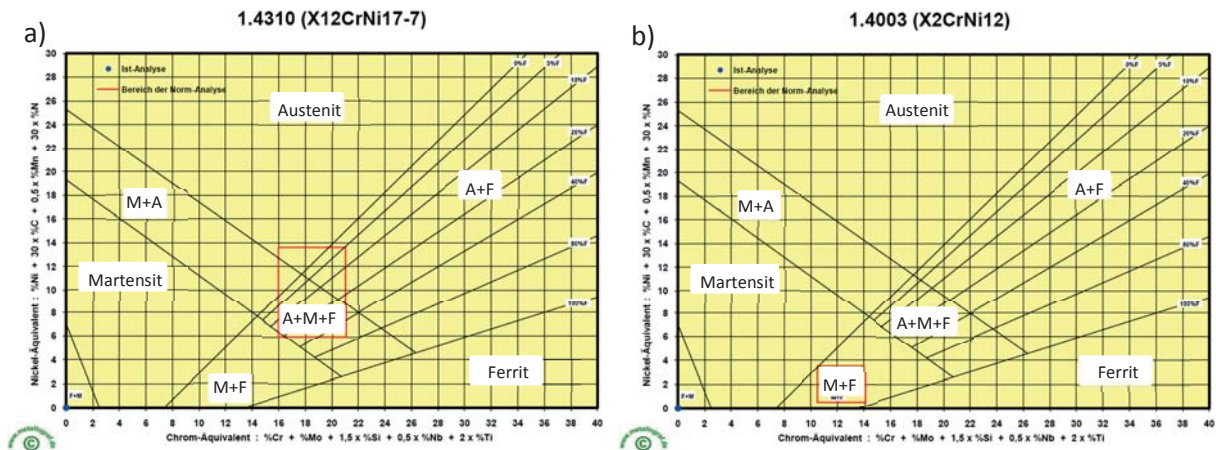


Abb. 118: Schaefflerdiagramme der verwendeten Stähle a) 1.4310 und b) 1.4003. Als roter Kasten ist der Bereich darstellt in dem sich die Zusammensetzung des verwendeten Stahls bewegt. Erzeugt wurden diese Diagramme mit einem Programm, welches als Freeware im Internet erhältlich ist.^[260]

Für die Verwendung des Stahles im HGMS ist aber nicht nur die Abtrennung der Partikel entscheidend sondern auch die Resuspendierung und Materialbeständigkeit in wässrigen Medien. Der Stahl 1.4003 zeigte bereits nach dem ersten Einsatz im HGMS deutliche Zeichen von Korrosion, die bei dem Stahl 1.4310 nicht auftraten. Grund hierfür ist der höhere Chromanteil, der für die Korrosionsbeständigkeit der Legierungen sorgt. Es sollte also ein möglichst hoher Chromgehalt des Stahles vorgesehen werden. Ein weiterer Nachteil des Stahles 1.4003 ist der hohe Martensit-Anteil. Martensit besitzt im Vergleich zu Ferrit eine deutlich höhere Remanenzmagnetisierung nach dem Ausschalten des Magnetfeldes.^[261] Dies führt dazu, dass die Partikel nur schwer aus der Kammer ausgespült werden können und erklärt die geringe Ausspülrate von lediglich 40 %. Durch verbesserte Methoden der Resuspendierung wie pneumatisches Klopfen oder Ultraschall könnte dieser Wert noch weiter gesteigert werden; dennoch sollte bei der Wahl der magnetisierbaren Stähle der Martensit-Anteil so gering wie möglich gehalten werden. Um also eine möglichst hohe Abtrennung, gute Resuspendierung und Korrosionsbeständigkeit der Gitterstäbe zu erhalten, sollte ein Stahl ausgewählt werden, der möglichst im Ferrit-Bereich liegt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Aufbau des Prozesses im Labormaßstab erfolgreich war. Der Prozess konnte über mehrere Trennzyklen betrieben und analysiert werden. Als letzter Schritt zur halbkontinuierlichen Aufarbeitung der Antibiotika muss nun die Filterzentrifuge in dem Prozess (siehe Abb. 116) durch ein System ersetzt werden, das es ermöglicht, die Fermentationsbrühe kontinuierlich von der Biomasse zu trennen. Auf diesen Prozessschritt wird im folgenden Kapitel näher eingegangen.

4.6.2 Vorfiltration der Biomasse

Wie bereits in den vorherigen Kapiteln diskutiert, ist eine Trennung der magnetischen Partikel von der Biomasse der Antibiotikumsfermentation aufgrund des filamentösen Wachstums nicht möglich. Die Filtermatrix des HGMS würde bereits bei sehr kleinen Pelletdurchmessern verblocken und die gesamte Biomasse in der Kammer zurückhalten, wie in der Simulation in Abb. 115 zu sehen. Um einen Fermentationsprozess mit integrierter Aufarbeitung zu ermöglichen, muss also die Biomasse zunächst im halbkontinuierlichen Betrieb vom Medium getrennt werden.

Realisiert werden sollte dies mittels einer In-line Permeationsfiltration einer Probenahme-sonde, die mit einer tubulären Polypropylen-Membran ausgestattet ist. Diese schlauchförmige Membran ist in Abb. 119 gelb dargestellt. Durch den Einsatz dieser direkten Filtration soll über die Membran die Biomasse zurückzuhalten und das Medium in Reaktor 2 mit den magnetischen Adsorbern überführt werden. Um ein Zusetzen der Membran mit Biomasse zu minimieren, soll nach der Separation des Mediums frisches Medium über diese Probenahme-sonde zugeführt werden.

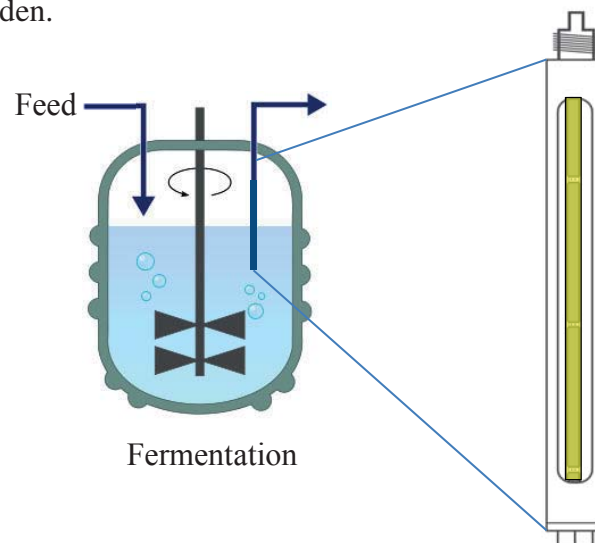


Abb. 119: Vorfiltration zur Abtrennung der Biomasse mit Hilfe einer Probenahme-sonde mit Mikrofiltrationsmembran.

Das Institut für Technische Chemie der Universität Hannover stellte eine entsprechende Probenahme-sonde für erste Versuche zur Machbarkeit zur Verfügung. Die Polypropylen-membran muss vor dem Einsatz hydrophilisiert werden. Diese Hydrophilisierung erfolgt mit 70 % Isopropanol welches für 2 h im Kreis durch die Membran gepumpt wird. Die bereit-gestellte Membran mit einem mittleren Porendurchmesser von $0,2\ \mu\text{m}$ erwies sich jedoch als

zu engmaschig und es kam zu deren sofortigen Verblockung. Die Flussgeschwindigkeiten, die über die Membran eingestellt werden können, sind mit 1,5 ml/min für den Produktionsmaßstab eindeutig zu gering. Eine Membran mit größeren Porenradien konnte bisher noch nicht untersucht werden, aber auch hier ist mit einer schnellen Verblockung der Membran zu rechnen. Die Verwendung der Sonde ist somit ausschließlich zur sterilen Probenahme geeignet und nicht als Prozess-Unit. Als Alternative wäre auch eine Cross-Flow-Filtration denkbar. Da allerdings die prinzipielle Verwendung von Membranen zur Biomasse-separation zu Membranfouling führt, müsste diese in kurzen Zeitabständen immer wieder getauscht werden, das Problem der Verblockung wird durch die Verwendung einer Cross-Flow-Filtration also nur zeitlich nach hinten verschoben.

Um dennoch die Integration des HGMS in den Fermentationsprozess zu ermöglichen, wurde eine magnetische Separation oder Rückhaltung der Biomasse in Erwägung gezogen. Es wurde festgestellt, dass die magnetischen Partikel und die Biomasse Agglomerate bilden, die nur schwer und unter Zugabe von Natriumpyrophosphat voneinander zu trennen sind. Werden die Partikel direkt zur Fermentation gegeben, werden diese sogar komplett von der Biomasse umschlossen. Was sich zunächst als Nachteil darstellt, könnte hier die Lösung für das Problem der Biomasseabtrennung sein. Es wurde im kleinen Ansatz in Batchversuchen untersucht, ob sich die Biomasse mit den Partikeln abtrennen lässt. Abb. 120 zeigt eine solche Abtrennung der magnetischen Partikel im Satzbetrieb. Bei dem hellbraunen Überstand in Abb. 120 b) handelt es sich um das Medium ohne Biomasse.

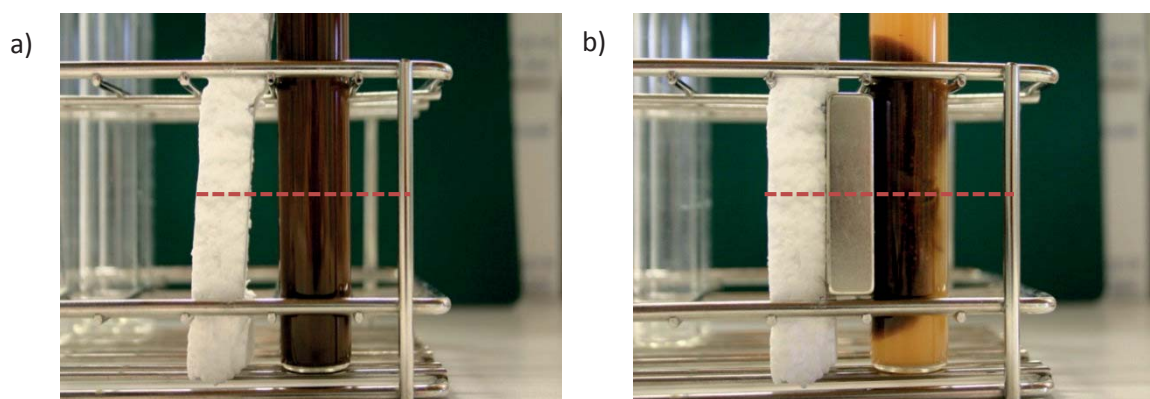


Abb. 120: Trennung der Partikel aus der Fermentationsbrühe im Satzbetrieb: a) Fermentationsbrühe mit magnetischen Partikeln, b) Abtrennung der in den *Streptomyces*-Pellets eingelagerten magnetischen Partikel mittels Permanentmagneten.^[195]

Die Biomasse wurde zusammen mit den magnetischen Beads abgetrennt. Dies wird auf die bereits erwähnte Einlagerung der Partikel in die Pellets der *Streptomyces* zurückgeführt, was sich bei der Beobachtung unter dem Mikroskop bestätigt (siehe Abb. 121). Um die Separation

der magnetischen Partikel mittels Permanentmagneten zu dokumentieren, wurden alle 10 Sekunden Bilder des Aufbaus aus Abb. 120 gemacht. Mit Hilfe einer Bildauswertesoftware (NI Vision Assistant) kann die farbliche Veränderung der Probe und damit die Wanderung der Partikelfront während der magnetischen Abtrennung beobachtet werden. Es wurde eine Linie etwa in halber Höhe des Magneten durch das Reagenzglas in die Abbildung gelegt und entlang dieser Linie die Farbintensität in Graustufen aufgezeichnet.

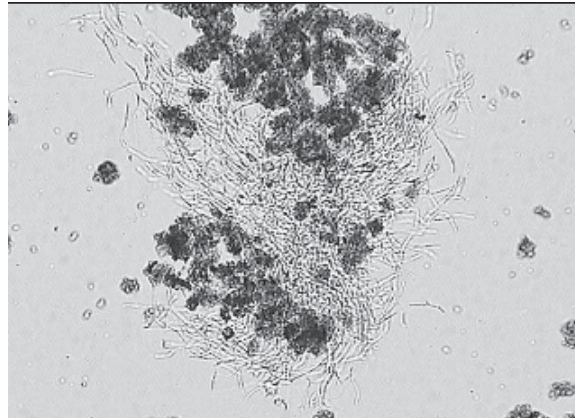


Abb. 121: Lichtmikroskopische Aufnahme bei 400-facher Vergrößerung der Einlagerung magnetischer Partikel in die filamentös wachsenden *Streptomyces fulvoviridis* 3N503.^[195]

Abb. 122 zeigt den Intensitätsverlauf zu verschiedenen Zeitpunkten. Ein geringer Wert in der Farbintensität deutete auf einen dunklen Bereich hin, ein hoher Wert steht für helle Bereiche. Bei $d = 1$ cm stellt sich ein Gleichgewicht mit hohen Farbintensitäten ein, sprich der Überstand auf der dem Magneten gegenüberliegenden Seite wird klar. Zwischen 0 und 0,2 cm stellen sich dunkle Bereiche ein. Bereits nach einer Minute hat sich eine Partikel/Biomasse-Front von etwa 0,2 cm Dicke gebildet, erkennbar an dem Sprung der Farbintensität.

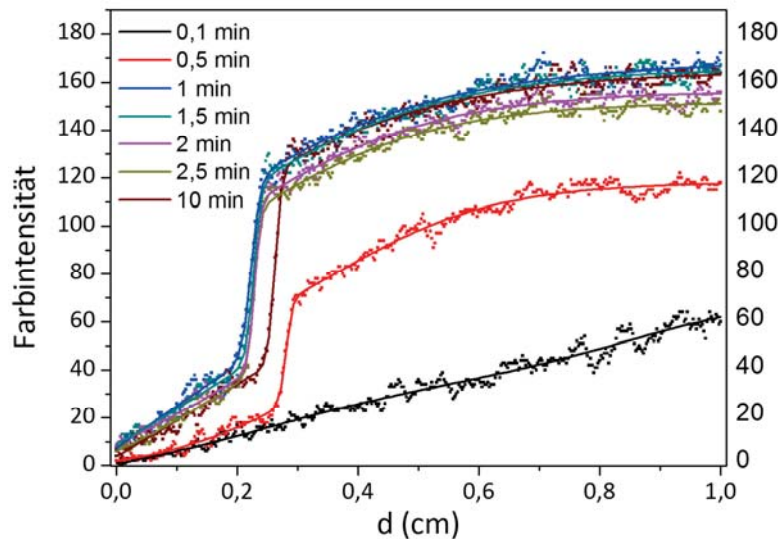


Abb. 122: Farbintensität ermittelt mit Hilfe von NI Vision Assistant. Nach etwa einer Minute bildet sich eine Partikel/Biomasse-Front von etwa 0,2 cm Dicke aus. Nach 10 Minuten ist diese Front auf 0,25 cm angewachsen.^[195]

Um eine irreversible Bindung zwischen Mikroorganismus und Magnetpartikel zu erreichen, können die Eisenoxidpartikel bereits zu Beginn der Fermentation zugegeben werden. So kann sich während der Fermentation das Mycel der *Streptomyces* um die Magnetpartikel legen. Fermentationsversuche im Schüttelkolben zeigen, dass in Gegenwart von magnetischen Silicat-Partikeln das Wachstum der Zellen leicht gehemmt ist (Rückgang der Biotrockenmasse). Mit dem Einsatz von M-PVA Partikel, kann keinerlei Einfluss der Eisenoxidpartikel auf das Biomassewachstum nachgewiesen werden. Demnach wäre eine Abtrennung der Biomasse mit magnetischen Partikeln möglich, allerdings erfordert dies eine Konstruktion mit der diese auch zuverlässig abgetrennt werden können.



4.7 Zusammenfassung

4.7.1 Adsorbersysteme

Im Rahmen des von der DBU geförderten Projektes konnte mit Hilfe der instrAction® Technologie ein Adsorber entwickelt werden, der den zwitterionischen Wirkstoff Imipenem unter Fermentationsbedingungen nahe dem IEP des Zielmoleküls bindet. Unter diesen Bedingungen kann mit einem kommerziell erhältlichen Adsorbersystem keine Bindung erreicht werden. Die durch die instrAction GmbH patentierte Beschichtungstechnologie konnte erstmals für die Beschichtung magnetischer Trägermaterialien eingesetzt werden. Die entwickelten Adsorber wurden anhand von Adsorptionsisothermen untersucht. Die Adsorptionsparameter wurden im Rahmen des Projektes optimiert, um eine Degradation des Antibiotikums während der Aufarbeitung zu minimieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Adsorber eine außergewöhnlich hohe Affinität zu dem Zielmolekül aufweisen und stabil in mehreren Zyklen einsetzbar sind. Nachteil dieser hohen Affinität ist eine unzureichende Elution, die dazu führt, dass nach dem ersten Adsorptionszyklus der Adsorber deutlich an Kapazität einbüßt. Zusammenfassend lässt sich aber sagen, dass die Eigenschaften und Beladungen der Adsorber, die durch polyvalente Wechselwirkung erzielt werden, durch kein kommerzielles System erreicht werden und auch für andere Zielmoleküle von Interesse sind. Die Idee der polyvalenten Wechselwirkung wurde im Folgenden auf ein weiteres Antibiotikum übertragen. Zum Vergleich der Adsorptionscharakteristik und zur Identifikation möglicher funktioneller Gruppen wurden kommerzielle Systeme zur CPC-Aufreinigung untersucht. Die aromatischen XAD 4 Adsorber zeigten die geringste Affinität zu dem Zielmolekül, aber dennoch die höchste Beladung, was auf die große Oberfläche des Adsorbers zurückzuführen ist. Die höchste Affinität der kommerziellen Systeme zeigte der starke Ionentauscher. Die geringeren Beladungen und auch die Abnahme der Kapazität im Fermentationsmedium zeichnen die schwachen Ionentauscher als beste funktionelle Gruppe aus. Die höchste Affinität aller untersuchter Adsorber zeigte die instrAction-Phase, welche eine Kombination aus aromatischen und ionischen Gruppen besitzt. Aus diesem Grund wurde nach einem Material gesucht, das zwei verschiedene Formen an funktionellen Gruppen und eine hohe Oberfläche aufweist. Polymorphe Organosilicate (PMO) können diese Vorgaben erfüllen, da in deren Silicatnetzwerk aromatische Gruppen und schwache Ionentauscher (Aminogruppen) eingebracht wurden. Das Verhältniss von aromatischen Gruppen zu Ionentauschern wurde variiert. Die PMO mit zwei funktionellen Gruppen zeigten größere Beladungen und Affinitäten als die



Adsorber mit ausschließlich aromatischen Gruppen. Die höchsten Affinitäten und Beladungen wurden mit dem PMO des Ligandenverhältnisses 1:1 erzielt. Die Elution ist wie bereits bei der instrAction-Phase nicht gelöst. Der wiederholte Einsatz der Adsorber wird durch die unvollständige Elution und damit verbundene Absättigung der Oberfläche erschwert. In Folgenden Untersuchungen sollte das Elutionsmittel variiert und optimiert werden. Auch die Variation der funktionellen Gruppen auf der Oberfläche könnte noch zu weiteren Steigerungen der Kapazitäten führen. Denkbar wäre z.B. als aromatische Gruppe eine Doppelringstruktur, die der des Cephalosporin ähnelt, um so die $\pi\pi$ -Wechselwirkungen zu verstärken. Diese Affinitätssteigerung führt nicht nur zu einer stabileren Bindung sondern auch zu einer höheren Selektivität, was die Aufarbeitungsschritte im Downstream-Prozess reduziert und so Zeit und Lösungsmittel einspart. Diese Technik hat somit großes Potential für ein weites Feld der Aufarbeitung aus komplexen Medien, sobald die Elution von diesen Adsorbent gesteuert werden kann.

4.7.2 HGMS-Optimierung

Nicht nur die Optimierung des Adsorbers spart Lösungsmittel und Prozessschritte ein, auch die Verwendung magnetischer Träger zeigt dieses Potential. Das Karlsruher Institut für Technologie hat sich bereits vor einigen Jahren mit dieser Thematik beschäftigt und den Hochgradienten-Magnetseparator (HGMS) entwickelt, der auch für die dargestellten Versuche zur Verfügung stand. Des Weiteren wurden für den Einsatz in einen Bioprozess Spezifikationen definiert, welche mit der im Rahmen dieser Arbeit optimierten Separationsmatrix (transversal, rhomboedrisch, Gitterabstand 1 mm) realisiert werden konnten. Der bei den Versuchen eingesetzte Mediumstrom ist vierfach höher als der geforderte mit einer maximalen Beladung der Matrix von 288 kg/m^3 , die der etwa dreifachen geforderten maximalen Beladung der Matrix entspricht und einer Separation von 99 % vor dem Partikeldurchbruch. Die Rückgewinnung der Partikel bedarf weiterer Optimierung, welche mit Hilfe einer Anpassung des Matrixmaterials und dem vorgestellten Simulationsmodell erreicht werden kann. Das Simulationsmodell, welches mit dem Programm COMSOL Multiphysics erstellt wurde, konnte die Ergebnisse der Separationsversuche bestätigen und veranschaulichen. Der Quotient aus magnetischer Geschwindigkeit und Fluidgeschwindigkeit $v_m/v_{0,s}$ gibt Aufschluss über die Effizienz der Separation bzw. über den Einfangradius und kann somit für die Bewertung der Separation herangezogen werden und nahm für eine Gitteranordnung transversal, rhomboedrisch und einem Gitterabstand von 1 mm maximale

Werte an. In das Modell fließen auch die Materialeigenschaften der Gitterstäbe mit ein, das optimale Gittermaterial könnte also anhand der Simulation identifiziert werden. Erste Überlegungen zum Material wurden anhand der Schaeffler-Diagramme gemacht und identifizieren einen Ferrit-Stahl mit den anscheinend besten Separationseigenschaften. Das Modell ermöglicht zusätzlich zur Simulation der Kräfte innerhalb der Kammer auch die Visualisierung der Partikeltrajektorien. Hier konnten auch unmagnetisierbare Partikel (z.B. zur Kugel vereinfacht Zellen) simuliert werden. Als Ergebnis lieferte das Modell eine Akkumulation der Biomasse mit Pelletdurchmessern von 200 µm innerhalb der optimierten Gittermatrix. Demnach ist eine direkte Trennung der magnetischen und unmagnetischen Bestandteile für pelletbildende Mikroorganismen in der optimierten Gittermatrix nicht möglich. Für den Prozess wird eine Vorfiltration benötigt. Die Vorfiltration ist jedoch nicht für alle biotechnologischen Prozesse notwendig, da in der Simulation Zellen mit kleineren Durchmessern wie z.B. *E.coli* (1,5 µm) die Gittermatrix ungehindert passieren können.

4.7.3 Prozessintegration

Nach Optimierung des Adsorbers und der HGMS Matrix mussten diese Komponenten noch in einen Gesamtprozess integriert werden. Zur Realisierung der Fermentation eines Antibiotikums mit integrierter Aufarbeitung mittels Hochgradient-Magnetseparation (HGMS) wurde eine Reaktorkaskade, bestehend aus zwei Reaktoren und dem HGMS, aufgebaut und charakterisiert. Mit jedem Verwendungszyklus gingen dabei etwa 3,5 % der magnetischen Partikel im System verloren. Eine weitere Optimierung des Schlauchsystems und des Gittermaterial sollte in der Lage sein, diese Verluste weiter zu reduzieren.

Zum Aufbau eines halbkontinuierlichen Prozesses wurde zur Abtrennung von Medium und Biomasse eine Vorfiltration des Mediums vorgesehen. Die Verwendung von Membranen stellte sich aufgrund von Biofouling und Filterverblockung als ungeeignet heraus. Als möglicher Lösungsansatz wurde eine magnetische Rückhaltung der Biomasse diskutiert. Es wurde gezeigt, dass nach der Zugabe von Magnetpartikeln zur Fermentation die Partikel von den Hyphen der Mikroorganismen umwachsen wurden und somit die Biomasse einfach magnetisch vom Medium getrennt werden konnte. Die magnetischen Partikel haben die Fermentation selbst nicht beeinflusst. Im Bioreaktor konnte die magnetische Rückhaltung bisher noch nicht technisch umgesetzt werden. Das Problem der Biomasserückhaltung ist also noch nicht abschließend gelöst, die Kaskade stellt jedoch einen vielversprechenden Ansatz zur Antibiotikaherstellung mit kontinuierlicher Produktabtrennung dar.





5 Abschließende Diskussion und Fazit

Die Einsatzmöglichkeiten magnetischer Partikel sind vielseitig, wie auch die vorgestellten Anwendungen zeigen. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden magnetische Nanopartikel als Träger für Enzyme zur enzymatischen Hydrolyse von Cellulose verwendet. Die Bindung des Enzyms auf einen Träger ermöglicht den Einsatz der Enzyme in mehreren Hydrolyse-Zyklen. Die Verwendung von Trägern zur Bindung der Enzyme ist bereits vielfach bekannt; die Verwendung von magnetischen Partikeln vereinfacht hierbei allerdings die Rückgewinnung aus der Reaktionslösung gegenüber Filtration erheblich. Darüber hinaus ermöglicht die magnetische Separation der Partikel auch Träger mit kleineren Partikeldurchmessern bis in den nm-Bereich zurück zu gewinnen und in mehreren Zyklen einzusetzen. Die vorgestellten Untersuchungen konnten zeigen, dass durch die Verwendung von Nanopartikeln die Aktivität des Enzyms bei dem schwer zugänglichen Substrat Cellulose gesteigert werden konnte. Um allerdings tatsächlich die Schnittstelle zwischen homogener und heterogener Katalyse bilden zu können, müssen weitere Aktivitätssteigerungen des immobilisierten Enzyms angestrebt werden. Eine Möglichkeit wäre der Einsatz von noch kleineren Nanopartikeln, die die Beweglichkeit des Partikel-Enzym-Komplexes weiter erhöht. Ein weiteres Problem stellt die hohe Affinität der Partikel zur Cellulosefaser dar. Für die Rückgewinnung wäre demnach ein fast 100 % Umsatz des Faserstoffes notwendig, was allerdings auch ein Ziel dieser Methode sein sollte. Für Carboxymethylcellulose konnte hier kein Einfluss beobachtet werden, da diese nicht mehr als Faserstoff vorliegt. Es käme also auch eine Vorbehandlung der Faserstoffe zu Carboxymethylcellulose in Frage. Allerdings würde dann auch ein magnetisches Partikel im μm -Maßstab ausreichen, da für nicht schwer zugängliche Substrate kein Unterschied in der Enzymaktivität zwischen μ - und Nano-Partikel beobachtet werden konnte. Die Untersuchungen im ersten Teil dieser Arbeit dienten der Ermittlung grundlegender Aspekte und haben den Einsatz in einer großtechnischen Anlage nicht betrachtet. Jedoch konnte mit der richtungsweisend Bestätigung der Einsatzmöglichkeit in mehreren Zyklen, bei lediglich geringem Aktivitätsverlust, der Grundstein für großtechnische Anwendung und Wirtschaftlichkeit dieser Technologie gelegt werden. Des Weiteren zeigte das Enzym in immobilisierter Form deutlich höhere Stabilität. In weiterführenden Untersuchungen sollte betrachtet werden, ob eventuell auch ein Einsatz bei höheren Reaktionstemperaturen möglich ist, um so die Raum-Zeit-Ausbeute der Hydrolyse weiter zu steigern. Wie bereits oben diskutiert wäre der Einsatz dieser Technologie in einem SSF-Prozess denkbar. Bei der verwendeten Biomasse sollte es sich allerdings um einen nicht filamentös wachsenden Mikroorganismus handeln, da



die Partikel dazu neigen, in das Mycel eingelagert zu werden. Die Trennung von filamentös wachsendem Mikroorganismus und magnetischem Partikel könnte dann nicht durch ein HGMS erfolgen, was eine vorherige Abtrennung der Biomasse notwendig machen würde. Der erhöhte Aufwand zur Trennung, z.B. mit Detergenzien wie Natriumpyrophosphat, wäre zu aufwendig, um noch wirtschaftlich arbeiten zu können. Dennoch sind die auf magnetischen Nanopartikeln immobilisierten Enzyme ein vielversprechender Ansatz, der nach dieser grundlegenden Betrachtung in einem Modellprozess Anwendung finden sollte.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein Prozess zur kontinuierlichen Gewinnung von Gluconsäure entwickelt. Das in der Lebensmittelindustrie weit verbreitete Produkt wird bisher fermentativ gewonnen. Ein Bottleneck der Produktion ist die aufwendige Aufarbeitung aus der Fermentationsbrühe. Es konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz von Goldkatalysatoren gleichgroße Umsätze, bei sehr hoher Selektivität erreicht werden können, sodass die Aufarbeitung des Produktes nur noch einen einzigen Prozessschritt benötigt. Durch die Übertragung der Synthese auf magnetische Partikel kann der Träger sehr viel kleiner gewählt und so für die Fällungsreaktion eine größere Oberfläche zur Verfügung gestellt werden, die wiederum kleinere Goldpartikel und so höhere Aktivitäten liefert. Die magnetischen Partikel können nach Ende der Reaktion einfach aus dem Batch abgetrennt und erneut eingesetzt werden. Die Aktivität der Partikel bleibt über zehn Ansätze unverändert; ein wiederholter Einsatz der Partikel stellt somit kein Problem dar und relativiert die gesteigerten Kosten für die Herstellung der Katalysatoren. Ein weiterer Vorteil der magnetischen Katalysatoren gegenüber der Fermentation ist die Möglichkeit eines kontinuierlichen Prozesses zur Gewinnung und gleichzeitigen Aufarbeitung der Gluconsäure. Hierzu wurde ein Prototyp eines magnetischen Wirbelschichtreaktors entwickelt, in dessen Reaktionsraum die Partikel durchmischt und gleichzeitig magnetisch zurückgehalten werden. Dieser Prototyp wurde bisher noch nicht in der Katalyse eingesetzt und sollte zunächst hinsichtlich der Einsetzbarkeit getestet werden, um auch die Schwachstellen des Systems aufzuzeigen. In einem zweiten an die magnetische Wirbelschicht angeschlossenen Kreislauf kann anschließend die Aufarbeitung aus der Reaktionslösung mittels einfacher Sorption erfolgen. Erste Versuche mit Ionentauschern zeigten, dass die Trennung von Produkt und nicht-umgesetzter Glucose kein Problem darstellt und so die Glucose in die Reaktionslösung zurückgeführt werden kann. Der Aufarbeitungskreislauf ist demnach auf jeden Fall realisierbar. Für den Reaktionskreislauf mit der magnetischen Wirbelschicht könnte es zu Problemen beim Upscaling des Prototyps kommen, da der Reaktionsraum nicht beliebig breit gewählt werden kann. Das magnetische Feld nimmt quadratisch mit dem Abstand ab und

somit auch die magnetische Kraft für die Partikelrückhaltung. Eine Möglichkeit wäre den Reaktionsraum zu verlängern, was allerdings durch pH-Kontrolle und Sauerstoff-Zufuhr limitiert ist. Gelöst werden könnte dieses Problem, indem mehrere Module der magnetischen Wirbelschicht hintereinander gesetzt werden, in denen eine getrennte Sauerstoffzufuhr und pH-Kontrolle stattfindet. So wäre ein halbkontinuierlicher Prozess mit integrierter Aufarbeitung möglich, der durch die reduzierten Aufarbeitungsschritte Zeit und Lösungsmittel einspart und so trotz erhöhter Kosten für die Herstellung der magnetischen Goldkatalysatoren eine konkurrenzfähige Alternative zur herkömmlichen Herstellung der Gluconsäure mittels Fermentation darstellt.

Als letzte Anwendungsmöglichkeit für magnetische Partikel wurde in Kapitel 4 der Einsatz im Downstream-Prozess einer Fermentation diskutiert. Wie auch bei dem vorherigen Kapitel soll die Aufarbeitung des Produktes in den Herstellungsprozess integriert bzw. angeschlossen werden. Als Modellsystem diente die Fermentation eines β -Lactamantibiotikums. Es wurden Adsorber mit sehr hoher Selektivität entwickelt, die auf Basis der multivalenten Wechselwirkung ausschließlich das Antibiotikum binden und auf der Adsorberoberfläche stabilisieren sollten. Es konnte gezeigt werden, dass durch die multivalente Wechselwirkung die Affinität der Oberfläche zu dem Zielmolekül deutlich gesteigert ist. Im Vergleich zu kommerziell erhältlichen Adsorbentien ist besonders für Imipenem kein anderes System in der Lage bei den vorherrschenden Fermentationsbedingungen die Adsorptionskapazitäten der entwickelten Partikel zu erreichen. Auch das Fermentationsmedium beeinflusst den Adsorptionsvorgang kaum, was eine direkte Aufarbeitung aus dem Fermentationsmedium heraus ermöglicht. Nach Charakterisierung der unmagnetischen Adsorber konnte die verwendete Synthese auch auf ein magnetisches Partikelsystem übertragen werden. Der Nachteil der hohen Affinität der Oberfläche ist, dass die Elution des Antibiotikums deutlich erschwert wird, was wiederum den wiederholten Einsatz in der Aufarbeitung beeinflusst. Hier ist also die Optimierung des Elutionsmittels notwendig, um die Ausbeute zu steigern, aber auch die Abnahme der Adsorberkapazität zu verhindern. Um nun die magnetischen Partikel und damit den Downstream-Prozess in die Fermentation zu integrieren, wurde ein für verfahrenstechnische Anwendungen konzipiertes HGMS verwendet und für diesen Prozess optimiert. Die Simulationen zeigten, dass die pelletbildenden Mikroorganismen aufgrund des großen Durchmessers auf dem optimierten HGMS Gitter zurückgehalten werden und somit eine Trennung von Biomasse und Fermentationsmedium vor der Adsorption erfolgen muss. Die für die Vorfiltration verwendete Sterilfiltersonde war ungeeignet, da die realisierbaren Flussraten zu gering und die Membran bereits nach kürzester Zeit komplett verblockte. Aus Versuchen im



Batch ist bekannt, dass die Partikel dazu neigen in das Pellet des Mikroorganismus aufgenommen zu werden. Das Wachstum der Biomasse wird von den Partikeln aber nicht beeinflusst. Durch die magnetische Komponente kann die Biomasse dann einfach magnetisch zurückgehalten und so das Fermentationsmedium für die Aufarbeitung entnommen werden. Ein Prototyp zur magnetischen Biomasserückhaltung muss noch entwickelt werden. Da der Permanentmagnet im HGMS nicht beliebig upscalebar ist, wird auch das Vergrößern des HGMS Volumens erschwert. Aus diesem Grund sollte ein Prozess entwickelt werden, der die Vergrößerung des HGMS umgeht. Hierzu wird das Fermentationsmedium schrittweise entnommen, das Medium im Reaktor wird wieder aufgefüllt und die Fermentation fortgesetzt, während parallel die Aufarbeitung des Antibiotikums mittels Adsorption stattfinden kann. So wird ein halbkontinuierlicher Prozess mit integrierter Aufarbeitung ermöglicht. Auch bei dieser Anwendung fehlt noch der Praxistest des kompletten Prozesses, das Einsparpotential an Lösungsmitteln für die Aufarbeitung macht diesen Prozess allerdings ebenfalls interessant und sollte weiter verfolgt werden.

Als Fazit lässt sich zusammenfassen, dass das Potential von magnetischen Partikeln in bioverfahrenstechnischen Prozessen groß ist. In vielen Bereichen stehen die Untersuchungen allerdings noch ganz am Anfang, wie in Kapitel 2 gezeigt. Im Bereich der großtechnischen Anwendung ist weiterhin das Problem des Upscalings nicht gelöst. Das Beispiel in Kapitel 3 zeigt, dass ein Einsatz in einem kontinuierlichen Prozess möglich ist, die Vergrößerung des Prototyps allerdings neue Probleme aufwerfen wird. Für den Einsatz magnetischer Partikel in der Aufarbeitung ist bereits ein HGMS-Separator entwickelt, der für Fermentationen bis 2 L eingesetzt werden kann und auch von einigen Arbeitsgruppen bereits zur Proteinaufarbeitung genutzt wird. Dies reicht allerdings für die Dimensionen in denen heutzutage fermentiert wird ($< 100 \text{ m}^3$), bei weitem noch nicht aus. Die Verwendung in einem in die Fermentation integrierten, halbkontinuierlichen Aufarbeitungsprozess könnte hier aber als Lösungsansatz für das Upscaling-Problem weiter verfolgt werden. Es bleiben also noch einige Dinge zu optimieren, bevor die Magnettechnologie auch in der Bioverfahrenstechnik großtechnisch eingesetzt werden kann. Dann aber kann die Magnettechnologie zu einem Werttreiber für viele Produktionen sowohl im wirtschaftlichen als auch im ökologischen Sinne werden.



6 Literaturverzeichnis

-
- [1] G. Reiss, A. Hütten, *Magnetic nanoparticles: Applications beyond data storage*, Nature Materials Vol. 4 (2005) 725 - 726.
- [2] M. Colombo, S. Carregal-Romero, M.F. Casula, L. Gutiérrez, M.P. Morales, I.B. Böhm, J.T. Heverhagen, D. Prosperi, W.J. Parak, *Biological Applications of Magnetic Nanoparticles*, Chemical Society Review Vol. 41 (2012) 4306-4334.
- [3] V.I. Shubayev, T.R. Pisanic, S. Jin, *Magnetic nanoparticles for theragnostics*, Advanced Drug Delivery Reviews Vol.61 (2009) 467-477.
- [4] P. Lokwani, *Magnetic Particles for Drug Delivery: An Overview*, International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences Vol. 2 (2011) 465-473.
- [5] I. Rabias, D. Tsitrouli, E. Karakosta, T. Kehagias, G. Diamantopoulos, M. Fardis, D. Stamopoulos, T.G. Maris, P. Falaras, N. Zouridakis, N. Diamantis, G. Panayotou, D.A. Verganelakis, G.I. Drossopoulou, E.C. Tsilibari, G. Papavassiliou, *Rapid magnetic heating treatment by highly charged maghemite nanoparticles on Wistar rats exocranial glioma tumors at microliter volume*, Biomicrofluidics Vol. 4 (2010) 1-8.
- [6] K.E. Scarberry, E.B. Dickerson, J.F. McDonald, Z.J. Zhang, *Magnetic Nanoparticle-Peptide Conjugates for in Vitro and in Vivo Targeting and Extraction of Cancer Cells*, Journal of the American Chemical Society Vol. 130 (2008) 10258–10262.
- [7] A. Silva, E. Silva-Freitas, J. Carvalho, T. Pontes, R. Araújo-Neto, K. Silva, A. Carriço, E. Egito, *Magnetic Particles in Biotechnology: From Drug Targeting to Tissue Engineering*, Biochemistry, Genetics and Molecular Biology, Advances in Applied Biotechnology Kapitel 13 (2012).
- [8] <http://www.nanopartikel.info/cms/presse>, http://www.deutschlandfunk.de/diskussion-um-gesundheitsgefahr-durch-nanotechnologie.697.de.html?dram:article_id=251864, geöffnet am 22.12.2013.
- [9] L. Harivardhan REdy, J.L. Arias, J. Nicolas, P. Couvreur, *Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications*, Chemical Review. Vol. 112 (2012) 5818-5878.
- [10] M. Albrecht, J.-U. Thiele, A. Moser, *Terabit-Speicher – bald Realität oder nur Fiktion?*, Physik Journal Vol. 2 (2003) 25-31.
- [11] S. Sun, D. Weller, C. Murray, *Self-assembled magnetic nanoparticle arrays*, The physics of high density magnetic recording, Springer-Verlag, Kapitel 9 (2001).
- [12] Z. Li, L. Wei, M.Y. Gao, H. Lei, *One-Pot Reaction to synthesize Biocompatible Magnetite Nanoparticles*, Advanced Materials Vol. 17 (2005) 1001-1005.
- [13] J.Schwender, *Kommerzielle Produkte und Anwendungen der Ferrofluidics GmbH*, in:Second German ferrofluid workshop Magdeburg (1999) 11-13.
- [14] <http://www.abc.net.au/science/articles/2013/11/25/3897174.htm>, geöffnet am 22.12.2013.
- [15] Homepage des Herstellers: <http://www.miexresin.com/>, geöffnet am 22.12.2013.



-
- [16] M. Franzreb, W. H. Höll, *Phosphate removal by high-gradient magnetic filtration using permanent magnets*, IEEE Trans. Appl. Superconductivity Vol. 10 (2000) 923-926.
- [17] M. Franzreb, N. Ebner, *Vorrichtung zur Affinitätsseparation mittels magnetischer Partikel*, Veröffentlichungsnummer WO 2007009519 A1 (2007).
- [18] Tobias Bayer, *Italien will Biosprit zum Durchbruch verhelfen*, Zeitungsartikel Die Welt (11.10.2013), online Artikel: <http://www.welt.de/wirtschaft/article120804147/Italien-will-Biosprit-zum-Durchbruch-verhelfen.html> (11.10.2013)
- [19] T. Sieker, A. Neuner, D. Dimitrova, N. Tippkötter, K. Muffler, H.-J. Bart, E. Heinzle, R. Ulber, *Ethanol production from grass silage by simultaneous pretreatment, saccharification and fermentation: First steps in the process development*, Engineering in Life Sciences Vol. 11 (2011) 436–442.
- [20] S. Poth, M. Monzon, N. Tippkötter, R. Ulber, *Lignocellulosic biorefinery: process integration of hydrolysis and fermentation (SSF process)*, Holzforschung, Vol. 65 (2011) 633–637.
- [21] E. A. Bayer, H. Chanzy, R. Lamed, Y. Shoham, *Cellulose, cellulases and cellulosomes*. Current Opinion in Structural Biology Vol. 8 (1998) 548-557.
- [22] P. Tomme, R. A. J. Warren, N. R. Gilkes, *Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi*, Advances in Microbial Physiology Vol. 37 (1995) 2-81.
- [23] <http://www.sigmaaldrich.com>; Angaben des Herstellers des verwendeten Cellulasepräparates, Seite geöffnet am 25.10.2012.
- [24] S. D. Mansfield, R. Meder, *Cellulose hydrolysis – the role of monocomponent cellulases in crystalline cellulose degradation*, Cellulose Vol. 10 (2003) 159–169.
- [25] A. Koivula., M. Linder, T. T. Teeri: *Structure-function relationships in Trichoderma cellulolytic enzymes*, Trichoderma & Gliocladium, Volume 2: Enzymes, biological control and commercial applications. Taylor & Francis Ltd., (1998)
- [26] M. Chauve, H. Mathis, D. Huc, D. Casanave, F. Monot, N. Lopes Ferreira, *Comparative kinetic analysis of two fungal β -glucosidases*, Biotechnology for Biofuels Vol. 3 (2010) 3-10.
- [27] J. D. McCarter, S. G. Withers, *Mechanisms of enzymatic Glykoside hydrolysis*, Current Opinion in Structural Biology Vol. 4 (1994) 885-892.
- [28] L. F. MacKenzie, G. Sulzenbacher, C. Divne, T. A. Jones, H. F. Woldike, M. Schulein, S. G. Withers, G. J. Davies, *Crystal structure of the family 7 endoglucanase I (Cel7B) from Humicola insolens at 2.2 Å resolution and identification of the catalytic nucleophile by trapping of the covalent glycosyl-enzyme intermediate*, Biochemical Journal (1998) 409-416.
- [29] A. Varrot, S. Hastrup, M. Schulein, G. J. Davies, *Crystal structure of the catalytic core domain of the family 6 cellobiohydrolase II, Cel6A, from Humicola insolens, at 1.92 Å resolution*, Biochemical Journal Vol. 337 (1999) 297-304.
- [30] P. S. Nigam, A. Singh, *Production of liquid biofuels from renewable resources*, Progress in Energy and Combustion Science Vol. 37 (2011) 52-68.



-
- [31] R. Hatti-Kaul, U. Törnvall, L. Gustafsson, P. Börjesson, *Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals – a cradle-to-grave perspective*, Trends in Biotechnology Vol.25 (2006) 119-124.
- [32] A. M. Galante, A. De Conti, R. Monteverdi, *Application of Trichoderma enzymes in the textile industry*, Trichoderma & Gliocladium, Vol. 1: Enzymes, biological control and commercial applications, Taylor & Francis Ltd. (1998).
- [33] A. M. Galante, A. De Conti, R. Monteverdi, *Application of Trichoderma enzymes in the food and feed industries*, Trichoderma & Gliocladium, Vol. 2: Enzymes, biological control and commercial applications, Taylor & Francis (1998).
- [34] M. Tombs, S. E. Harding; *An Introduction to Polysaccharide Biotechnology*, London: Taylor & Francis (1998).
- [35] Y. Li, D. C. Irwin, D. B. Wilson, *Increased Crystalline Cellulose Activity via Combinations of Amino Acid Changes in the Family 9 Catalytic Domain and Family 3c Cellulose Binding Module of Thermobifida fusca Cel9A*, Applied and Environmental Microbiology Vol. 76 (2010) 2582–2588.
- [36] S. L. McCarter, W. S. Adney, T. B. Vinzant, E. Jennings, F. P. Eddy, S. R. Decker, J. O. Baker, J. Sakon, M. E. Himmel, *Exploration of Cellulose Surface-Binding Properties of Acidothermus cellulolyticus Cel5A by Site-Specific Mutagenesis*, Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol. 98 (2002) 273-287.
- [37] D. Sell, J. Puls, R. Ulber, *Energielösungen für die Zukunft? Weiße Biotechnologie*, Vol. 41 (2007) 108–116.
- [38] R. A. Sheldon; *Enzyme Immobilization: The Quest of Optimum Performance*, Advanced Synthesis & Catalysis Vol. 349 (2007) 1289-1307.
- [39] W. Hartmeier; *Immobilisierte Biokatalysatoren – Eine Einführung*; Berlin Springer-Verlag (1986).
- [40] O. R. Zaborsky; *Immobilized Enzymes*, New Jersey, CRC Press (1974).
- [41] A. S. Bommarius, B. R. Riebel, Biocatalysis, WILEY-VCH Verlag Weinheim (2004).
- [42] L. Cao; *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design*, Weinheim WILEY-VCH Verlag (2005).
- [43] W. Tischer, F. Wedekind, *Immobilized Enzymes: Methods and Applications*, Topics in Current Chemistry Vol. 200 (1999) 95-126.
- [44] J. Kim, J. W. Grate, P. Wang, *Nanostructures for enzyme stabilization*, Chemical Engineering Science Vol. 61 (2006) 1017–1026.
- [45] S. Koutsopoulos, J. van der Oost, W. Norde, *Structural Features of a Hyperthermostable Endo- β -1,3-glucanase in Solution and Adsorbed on “invisible Particels*, Biophysical Journal Vol. 88 (2005) 467–474.



-
- [46] F. B. O. Daoud, S. Kaddour, T. Sadoun, *Adsorption of cellulose Aspergillus niger on a commercial activated carbon: Kinetics and equilibrium studies*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Vol. 75 (2010) 93-99.
- [47] J. L. Yan, G. X. Pan, L. Q. Li, G. X. Quan, C. Ding, A. L. Luo, *Adsorption, immobilization, and activity of b glucosidase on different soil colloids*, Journal of Colloid Interface Science Vol. 348 (2010) 565–570.
- [48] M. Kumakura, *Preparation of immobilized cellulase beads and their application to hydrolysis of cellulosic materials*, Process Biochemistry Vol. 32 (1997) 555-559.
- [49] K. Khoshnevisan, A. K. Bordbar, D. Zare, D. Davoodi, M. Noruzi, M. Barkhi, M. Tabatabaei, *Immobilization of cellulase enzyme on superparamagnetic nanoparticles and determination of its activity and stability*, Chemical Engineering Journal Vol. 171 (2011) 669–673.
- [50] J. M. Gomez, M. D. Romero, T. M. Fernandez, *Immobilization of β -Glucosidase on carbon nanotubes* Catalysis Letter Vol. 101 (2005) 275–278.
- [51] P. K. Roy, U. Roy, D.K. Duke, *Immobilized cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from Macrophornina phaseolina.* Journal of Chemical Technology and Biotechnology Vol. 34B, (1984) 165-170.
- [52] M. Kumakura, I. Kaetsu, *Immobilized enzyme particles prepared by radiation polymerization of polyurethane prepolymer*. Helvetica Chimica Acta Vol. 66 (1983) 2778-2784.
- [53] G. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Elsevier, zweite Auflage, London (2008).
- [54] L. F. Giraldo, *Mesoporous Silica Applications*; Macromolecular Symposia Vol. 259 (2007) 129-141.
- [55] A. Gole, S. Vyas, S. Phadtare, A. Lachke, M. Sastry, *Studies on the formation of bioconjugates of Endoglucanase with colloidal gold*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Vol 25 (2002) 129-138.
- [56] M. Kitaoka, *A Simple Method of Cellulase Immobilization on a Modified Silica Support*, Journal of Fermentation and Bioengineering Vol. 67 (1989) 182-185.
- [57] H. Liao, D. Chen, L. Yuan, M. Zheng, Y. Zhu, X. Liu, *Immobilized cellulase by polyvinyl alcohol/Fe₂O₃ magnetic nanoparticle to degrade microcrystalline cellulose*, Carbohydrate Polymers Vol. 82 (2010) 600–604.
- [58] Afsahi B, Kazemi A, Kheiriloomoom A, Nejati S, *Immobilization of Cellulase on Non-Porous Ultrafine Silica Particles*, Scientia Iranica Vol. 14 (2007) 379–383.
- [59] A. Garcia, C. R. Engler, *Cellulase immobilization on Fe₃O₄ and characterization*, Biotechnology and Bioengineering Vol. 33 (1989) 321–326.
- [60] L. Bergmann, C. Schaefer; *Lehrbuch der Experimentalphysik, Band II, Elektrizität und Magnetismus*; Walter de Gruyter Verlag (2006).
- [61] W. Demtröder, *Experimentalphysik 2: Elektrizität und Optik*, Springer, Berlin (2004).
- [62] P. A. Tipler, *Physik*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (1994).



-
- [63] A. Lu, E. Salabas, F. Schüth, *Magnetische Nanopartikel: Synthese, Stabilisierung, Funktionalisierung und Anwendung*, Angewandte Chemie Vol. 119 (2007) 1242-1266.
- [64] M. Mikhaylova, D. Kyung Kim, N. Bobrysheva, M. Osmolowsky, V. Semenov, T. Tsakalakos, M. Muhammed, *Superparamagnetism of Magnetite Nanoparticles: Dependence on Surface Modification*, Langmuir Vol. 20 (2004) 2472-2477.
- [65] M. Faraday, Philos. Trans. R. Soc. London 1857, 147, 145 – 181; deutsche Übersetzung: *Experimentelle Untersuchungen über das Verhalten von Gold (und anderen Metallen) zum Licht* (übersetzt und herausgegeben von F.-V. von Hahn), Ostwalds Klassiker der exakten Wissenschaften, Bd. 214, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig (1925).
- [66] G. Mie; *Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen*; Annalen der Physik Vierte Folge, Band 25, Nr. 3 (1908) 377-445.
- [67] R. Gans, T. Isnardi; *Experimentaluntersuchungen an trüben Medien*; Annalen der Physik Vierte Folge, Band 62, Nr. 15, (1920) 573-588.
- [68] K. L. Kelly, E. Coronado, L. Zhao, G. C. Schatz; *The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape and Dielectric Environment*; Journal of Physics Vol. 107 (2003) 668-677.
- [69] C. Sönnichsen, T. Franzl, T. Wilk, G. von Plessen, J. Feldmann; *Plasmon resonances in large noble-metal clusters*; New Journal of Physics Vol. 4 (2002) 93.1-93.8.
- [70] C. Sönnichsen; *Plasmons in metal nanostructures*, Universität München Dissertation (2001).
- [71] T. Kalkbrenner, *Charakterisierung und Manipulation der Plasmon-Resonanz eines einzelnen Gold-Nanopartikels*, Dissertation am Fachbereich Physik, Universität Konstanz (2002).
- [72] U. Kreibig, M. Vollmer; *Optical Properties of Metal Clusters*; Springer Series in Materials Science; Berlin; Vol. 25 (1995).
- [73] J. Vörös, *The Density and Refractive Index of Adsorbing Protein Layers*, Biophysical Journal Vol. 87 (2004) 552-561.
- [74] R. Massart, *Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media*, IEEE Transactions on Magnetics, Vol. 17 (1981) 1247-1248.
- [75] A. Pasteur, *Synthese, Charakterisierung und Funktionalisierung von Eisenoxid/Gold-Nanopartikeln*, Diplomarbeit am Lehrstuhl Biophysik und Medizinische Physik Prof. Schünemann, Technische Universität Kaiserslautern (2008).
- [76] J. L. Lyon, D. A. Fleming, M. B. Stone, P. Schiffer, M. E. Williams; *Synthesis of Fe Oxide Core/Au Shell Nanoparticles by Iterative Hydroxylamin Seeding*; Nano Letters Vol. 4 (2004) 719-723.
- [77] M.A. Morales, T. K. Jain, V. Labhasetwar, D.L. Leslie-Pelecky, *Magnetic studies of iron oxide nanoparticles coated with oleic acid and Pluronic block copolymer*, Journal of Applied Physics Vol. 97 (2005).
- [78] J. Turkevich, P. Cooper Stevenson, J. Hillier; *A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold*; Discussions of the Faraday Society (1951) 55-75.



-
- [79] C.J. Goss; *Saturation Magnetisation, Coercivity and Lattice Parameter Changes in the System Fe_3O_4 - γ - Fe_2O_3 , and their Relationship to Structure*; Phys Chem Minerals Vol. 16 (1988) 164-171.
- [80] A.K. Bandyopadhyay; *Nano Materials*; New Dehli: New Age International Publishers (2008).
- [81] H. Huang, R. Christmann, R. Ulber, V. Schünemann, *Mössbauer Spectroscopy of protein-passivated iron oxide nanoparticles*, Hyperfine Interactions Vol. 205 (2012) 121-124.
- [82] R. M. Cornell, U. Schwertmann, *The Iron Oxides – Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*, Wiley-VCH Verlag Weinheim, zweite Auflage (2003).
- [83] Greenwood N.N., Gibb T.C., *Mössbauer Spectroscopy*, Chapman and Hall Ltd, London (1971).
- [84] E. Murad, U.Schwertmann, *Temporal Stability of a Fine-Grained Magnetite*, Notes in Clays and Clay Minerals, Vol. 41 (1993) 111-113.
- [85] A. Ulman; *Thin Films – Self-Assembled Monolayers of Thiols*, Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, Vol.24 (1998).
- [86] G.E. Poirier, E.D. Pylnat; *The Self-Assembly Mechanism of Alkanethiols on Au (111)*, Science New Series Vol. 272 (1996) 1145-1148.
- [87] K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld; *Surface-enhanced Raman scattering and biophysics*; Journal of Physics Condensed Mater Vol. 14 (2002) 597-624.
- [88] K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, Dasari, M. S. Feld; *Ultrasensitive Chemical Analysis by Raman Spectroscopy*; Chemical Reviews Vol. 99 (1999) 2957-2975.
- [89] Homepage des Partikelherstellers Chemicell mit Bindungsprotokoll und Produktinformation: <http://www.chemicell.com/products/protocols/docs/SiMAG-Carboxyl.pdf>, Seite geöffnet am 08.10.2013.
- [90] Homepage: <http://www.piercenet.com/method/carbodiimide-crosslinker-chemistry>, Seite geöffnet am 08.10.2013.
- [91] G. Schwedt, *Fluorimetrische Analyse, Methoden und Anwendungen*, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida, Basel (1981).
- [92] Homepage des Herstellers Chemagen mit Bindungsprotokoll und Produktinformationen: http://www.chemagen.com/fileadmin/downloads/M-PVA_Cxy.pdf, Seite geöffnet am 15.09.2013.
- [93] DBU-Abschlußbericht zu AZ 13073, Einsatz von Magnettechnologie bei der Biokatalyse und Bioproduktaufarbeitung (2004);
Internet : <https://www.dbu.de/ab/DBU-Abschlussbericht-AZ-13073.pdf>, Seite geöffnet am 27.09.2013.
- [94] V. Ferreira, M. de Oliveira Faber, S. da Silva Mesquita, N. Pereira, *Simultaneous saccharification and fermentation process of different cellulosic substrates using a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harbouring the β -glucosidase gene*, Journal of Biotechnology Vol.13 (2010) 1-7.



-
- [95] E.P.S. Bon, M.A. Ferrara, *Bioethanol Production via Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Biomass*, FAO Symposium on The role of agricultural biotechnologies for production of bio-energy in developing countries (2007).
- [96] L. Canilha, A.K. Chandel, T.S. dos Santos Milessi, F.A. Fernandes Antunes, W.L. da Costa Freitas, M. das Gracas Almeida Felipe, S.S. da Silva, *Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation*, Journal of Biomedicine and Biotechnology (2012) 1-15.
- [97] M. Molliard; *Sur une nouvelle fermentation acide produite par le Sterigmatocystis nigra*; C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. Vol. 174 (1922) 881-883.
- [98] S. Ramachandran, P. Fontanille, A. Pandey, Ch. Larroche ; *Gluconic Acid: Properties, Applications and Microbial Production*; Food Technology and Biotechnology Vol. 44 (2006) 185-195.
- [99] K. Bernhauer, *Über die Charakterisierung der Stämme von A. niger auf Grund ihres biochemischen Verhaltens (Distinguishing A. niger genera based on their biochemical characterization)*, Biochemische Zeitschrift Vol. 197 (1928) 278–287.
- [100] R.H. Blom, V.F. Pfeifer, A.J. Moyer, D.H. Traufler, H.F. Conway, *Sodium Gluconate Production – Fermentation with Aspergillus niger*, Industrial & Engineering Chemistry Research Vol. 44 (1952) 435-440.
- [101] N. Porges , T. F. Clark , S. I. Aronovsky, *Gluconic Acid Production – Repeated Recovery and Re use of submerged Aspergillus niger by Filtration*, Industrial & Engineering Chemistry Research Vol. 33 (1941) 1065-1067.
- [102] G. Sumbali, R.S. Mehrotra, *Principles Of Microbiology: M&S*, Tata McGraw-Hill Companies, New Dehli, erste Auflage (2009).
- [103] R.D. Schmid, *Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2. Auflage (2006).
- [104] J. A. Kent, Kent and Riegel's Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology, Vol. 2, 11. EDITION, Springer Verlag, New York, (2007).
- [105] Patentschrift US6187570 B1, *Elektrodialyse zur Aufreinigung und Gewinnung von Gluconsäure-Derivaten* (2001).
- [106] T. Xu, Ch. Huang, *Electrodialysis-Based Separation Technologies: A Critical Review*, AIChE Journal Vol. 54 (2008) 3147-3159.
- [107] Ch. Huang, T. Xu, Y. Zhang, Y. Xue, G. Chen, *Application of electrodialysis to the production of organic acids: State-of-the-art and recent developments*, Journal of Membrane Science Vol. 288 (2007) 1–12.
- [108] D.S. Rao, T. Panda, *Comparative analysis of different whole cell immobilized Aspergillus niger catalysts for gluconic acid fermentation using pretreated Indian cane molasses*, Bioprocess and Biosystems Engineering Vol. 11 (1994) 209-212.



-
- [109] M. Heinrich, H. J. Rehm, *Formation of gluconic acid at low pH values by free and immobilized Aspergillus niger cells during citric acid fermentation*, European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Vol. 15 (1982) 88-92.
- [110] M. Petruccioli, P. Piccioni, M. Fenice, F. Federici, *Glucose oxidase, catalase and gluconic acid production by immobilized mycelium of Penicillium vaiabile P16*, Biotechnology Letter Vol. 16 (1994) 939-942.
- [111] P. Seiskari, Y.Y. Linko, P. Linko, *Continuous production of gluconic acid by immobilized Gluconobacter oxidans cell bioreactor*, Applied Microbiology and Biotechnology Vol. 21 (1985) 356-360.
- [112] Euro Patent EP 0 748 168 B1, *Fermentative Herstellung einer Bio-Limonade* (1995).
- [113] D.P. Grettie, Shortening Treatment, US Patent 2,236,569 (1941).
- [114] U. Kück, M. Nowrousian, B. Hoff, I. Engh, *Schimmelpilze: Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (2009).
- [115] R. O. Roblin, *Pencil and Crayon Rod*, U. S. Patent 2,220,992 (1942).
- [116] V. Dvorkovita, T. G. Hawley, *Washing Composition*, U. S. Patent 2,584,017 (1952).
- [117] M. E. Parker, P. W. Bonewitz, *Cleaning Composition*, U. S. Patent 2,338,688 (1941).
- [118] F. J. Prescott, J. K. Shaw, J. P. Bilello, G. Cragwall, *Gluconic Acid and Its Derivatives*, Industrial and Engineering Chemistry Vol. 45 (1953) 338-342.
- [119] H. Chmiel, *Bioprozesstechnik - Mikrobielle Prozesse*, Springer Verlag, Heidelberg (2011) 477-505.
- [120] Gluconic Acid and its Derivates, SIDS Initial Assessment Report (April 2004) letztes Update Januar 2006.
- [121] E. von Gorup-Besánez, *Ueber die Producte der Einwirkung des Platinmohrs auf Mannit*, Annalen der Chemie und Pharmacie Vol. 118 (1861) 257-280.
- [122] K. Heyns, H. Paulsen, *Selective catalytic oxidation of carbohydrates, employing platinum catalysts*, Advances in Carbohydrate Chemistry Vol. 17 (1962) 169-221.
- [123] A. Abbadi, H. van Bekkum, *Effect of pH in the Pt-catalyzed oxidation of D-glucose to D-gluconic acid*, Journal of Molecular Catalysis A: Chemical Vol. 97 (1995) 111-118.
- [124] J. M. H. Dirx, H.S. van der Baan, *The oxidation of gluconic acid with platinum on carbon as catalyst*, Journal of Catalysis Vol. 67 (1981) 14-20.
- [125] T. Kiyoura, T. Kimura, T. Sugiura, Patentschrift Japan Kokai 76:52,121; 85:160,467(1976).
- [126] M. Nakayama, A. Kimura, H. Eguchi, T. Matsui Euro Patent EP 48:974; 97:39, 31(1982).
- [127] I. V. Delidovich, O. P. Taran, L. G. Matvienko, A. N. Simonov, I. L. Simakova, A. N. Bobrovskaya, V. N. Parmon, *Selective Oxidation of Glucose Over Carbon-supported Pd and Pt Catalysts*, Catalysis Letters Vol. 140 (2010) 14-21.



-
- [128] M. Wenkin, P. Ruiz, B. Delmon, M. Devillers, *The role of Bismuth as promoter in Pd-Bi catalysts for the selective oxidation of glucose to gluconate*, Journal of Molecular Catalysis A-Chemical Vol. 180 (2002) 141-159.
- [129] P. C. C. Smith, B. F. M. Kuster, K. van der Wiele, H. S. van der Baan, *Lead modified platinum on carbon catalysts for the selective oxidation of 2-hydroxycarbonic acids, and especially polyhydroxycarbonic acid to their 2-keto derivatives*, Applied Catalysis Vol. 33 (1987) 83-96.
- [130] I. Dencic, J. Meuldijk, M. de Croon, V. Hessel, *From a Review of Noble Metal versus Enzyme Catalysts for Glucose Oxidation Under Conventional Conditions Towards a Process Design Analysis for Continuous-flow Operation*, Journal of Flow Chemistry Vol. 1 (2011) 13-23.
- [131] M. Haruta, T. Kobayashi, H. Sano, N. Yamada, *Novel Gold Catalysts for the Oxidation of Carbon Monoxide at a Temperature far Below 0 °C*, Chemistry Letter Vol. 16 (1987) 405-408.
- [132] G. J. Hutchings, *Vapor phase hydrochlorination of acetylene: Correlation of catalytic activity of supported metal chloride catalysts*, Journal of Catalysis Vol. 96 (1985) 292-295.
- [133] P. Claus, G. H. Vogel, *Die Rolle der Chemokatalyse bei der Etablierung der Technologieplattform „Nachwachsende Rohstoffe“*, Chemie Ingenieur Technik Vol. 78 (2006) 991-1112.
- [134] A. S. K. Hashmi, G. J. Hutchings, *Gold-Katalyse*, Angewandte Chemie Vol. 118 (2006) 8064-8105.
- [135] L. Prati, M. Rossi, *Gold on Carbon as a New Catalyst for Selective Liquid Phase Oxidation of Diols*, Journal of Catalysis Vol. 176 (1998) 552-560.
- [136] S. Biella, L. Prati, M. Rossi, *Selective oxidation of D-glucose on gold catalyst*, Journal of Catalysis Vol. 206 (2002) 242-247.
- [137] Y. Önal, S. Schimpf, P. Claus, *Structure sensitivity and kinetics of D-glucose oxidation to D-gluconic acid over carbon-supported gold catalysts*, Journal of Catalysis Vol. 223 (2004) 122-133.
- [138] M. Comotti, C. Della Pina, R. Matarrese, M. Rossi, *The Catalytic Activity of “Naked” Gold Particles*, Angewandte Chemie Vol. 43 (2004) 5812-5815.
- [139] A. Mirescu, U. Prüße, *A new environmental friendly method for the preparation of sugar acids via catalytic oxidation on gold catalysts*, Applied Catalysis B: Environmental Vol. 70 (2007) 644-652.
- [140] C. Baatz, U. Prüße, *Preparation of gold catalysts for glucose oxidation by incipient wetness*, Journal of Catalysis Vol. 249 (2007) 34-40.
- [141] K. Heidkamp, N. Decker, K. Martens, U. Prüße, K.-D. Vorlop, O. Franke, A. Stankowiak, *Oxidation of a tensidic alcohol to its corresponding carboxylic acid via Au catalysts*, European Journal of Lipid Science and Technology Vol. 112 (2010) 51-57.
- [142] N. Thielecke, M. Aytimir, U. Prüße, *Selective oxidation of carbohydrates with gold catalysts: Continuous-flow reactor system for glucose oxidation*, Catalysis Today Vol. 121 (2007) 115-120.



-
- [143] E. Grünewald, U. Prüße, K.-D. Vorlop, Goldene Zeiten für Zucker – Goldkatalysatoren veredeln Zucker zu Industrie-Produkten, ForschungsReport Nachwachsende Rohstoffe (2009) 22-25.
- [144] Ch. Baatz, Entwicklung von Goldkatalysatoren für den Einsatz in der Glucoseoxidation, Dissertation der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig (2007).
- [145] T. Mallat, A. Baiker, *Oxidation of alcohols with molecular oxygen on solid catalysts*, Chemical Reviews Vol. 104 (2004) 3037-3058.
- [146] H. Wieland, Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft 45, 46, 54, (1912-1921).
- [147] G. de Wit, J. J. de Flieger, A. C. Kock v. Dalen, A. P. G. Kieboom, H. van Bekkum, *Catalytic dehydrogenation of reducing sugars in alkaline solution at ambient conditions. Transfer hydrogenation of fructose*, Tetrahedron Letters Vol. 19 (1978) 1327-1330.
- [148] F. Hinze, S. Ripperger, M. Stintz, *Praxisrelevante Zetapotentialmessung mit unterschiedlichen Meßmethoden*, Chemie Ingenieur Technik Vol. 71 (1999) 338-347.
- [149] P. W. Atkins, *Physikalische Chemie*, Hrsg. A. Höpfner, Wiley-VCH Verlag, Weinheim dritte Auflage (2004).
- [150] K. Böckenhoff, W. Fischer, *Determination of electrokinetic charge with a particle-charge detector, and its relationship to the total charge*, Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, Vol. 371 (2001) 670-674.
- [151] R. H. Müller, *Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis*, Band 37, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, (1995).
- [152] W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, *Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range*, Journal of Colloid and Interface Science Vol. 26 (1968) 62-69.
- [153] N. Plumeré, A. Ruff, B. Speiser, V. Feldmann, H. Mayer, Stöber silica particles as basis for redox modifications: Particle shape, size, polydispersity, and porosity, Journal of Colloid and Interface Science Vol. 368 (2012) 208-219.
- [154] S. Sepeur, N. Laryea, S. Goedicke, F. Groß, *Nanotechnologie Grundlagen und Anwendungen*, Vincentz Network Farben und Lacke Edition, Auflage 1, Hannover (2008).
- [155] G.L. Ellman; *Tissue Sulfhydryl Groups*; Archives of Biochemistry and Biophysics Vol. 82 (1959) 70-77.
- [156] L. C. Varanda, M. Jafelicci, P. Tartaj, K. O'Grady, T. González-Carreno, M. P. Morales, T. Munoz, C. J. Serna, *Structural and magnetic transformation of monodispersed iron oxide particles in a reducing atmosphere*, Journal of Applied Physics Vol. 92 (2002) 2079-2085.
- [157] A. V. Mirescu, *Selektive Oxidation von niedermolekularen Kohlenhydraten und Diolen mit Edelmetallkatalysatoren*, Dissertation der Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig (2006).
- [158] W. Wu, Q. He, C. Jiang, *Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies*, Nanoscale Research Letters Vol. 3 (2008) 397-415.



-
- [159] S. Kittaka, T. Morimoto, *Isoelectric point of metal oxides and binary metal oxides having spinel structure*, Journal of Colloid and Interface Science Vol. 75 (1980) 398-403.
- [160] M. Kosmulski, *Chemische Eigenschaften der Materialoberflächen*, Marcel Dekker Verlag (2001).
- [161] R. C. Plaza, J. L. Arias, M. Espín, M. L. Jiménez, A. V. Delgado, *Aging Effects in the Electrokinetics of Colloidal Iron Oxides*, Journal of Colloid and Interface Science Vol. 245 (2002) 86–90.
- [162] S. Veeramasaneni, M. R. Yalamanchili, J. D. Miller, *Measurement of Interaction Forces between Silica and Alpha-Alumina by Atomic Force Microscopy*, Journal of Colloid and Interface Science Vol. 184 (1996) 594–600.
- [163] G. V. Franks, Y. Gan, *Charging Behavior at the Alumina–Water Interface and Implications for Ceramic Processing*, Journal of the American Ceramic Society Vol. 90 (2007) 3373–3388.
- [164] A. Penkova, J.M. Martinez Blanes, S.A. Cruz, M.A. Centeno, K. Hadjivanov, J.A. Odrizola, *Gold nanoparticles on silica monospheres modified by amino groups*, Microporous and Mesoporous Materials Vol. 117 (2009) 530-534.
- [165] H. Hommer, *Interaction of polycarboxylate ether with silica fume*, Journal of the European Ceramic Society Vol. 29 (2009) 1847-1853.
- [166] Ch. Baatz, N. Thielecke, U. Prüße, *Influence of the preparation conditions on the properties of gold catalysts for the oxidation of glucose*, Applied Catalysis B: Environmental Vol. 70 (2007) 653-660.
- [167] E. J. M. Hensen, D. G. Poduval, P.C. Magusin, A.E. Coumans, J.A.R. van Veen, *Formation of acid sites in amorphous silica-alumina*, Journal of Catalysis Vol. 269 (2010) 201–218.
- [168] A. J. Rubin, P. L. Hyden, *Studies on the Hydrolysis and Precipitation of Aluminum (III)*, Projektreport WATER RESOURCES CENTER the Ohio State University Columbus (1973).
- [169] A. Schrijnemakers, S. Andre, G. Lumay, N. Vandewalle, F. Boschini, R. Cloots, B. Vertruyen, *Mullite coatings on ceramic substrates: Stabilisation of Al₂O₃–SiO₂ suspensions for spray drying of composite granules suitable for reactive plasma spraying*, Journal of the European Ceramic Society Vol. 29 (2009) 2169–2175.
- [170] G. V. Franks, Y. Gan, *Charging Behavior at the Alumina–Water Interface and Implications for Ceramic Processing*, Journal of the American Ceramic Society Vol. 90 (2007) 3373-3388.
- [171] F. Moreau, G. C. Bond, *Preparation and reactivation of Au/TiO₂ catalysts*, Catalysis Today Vol. 122 (2007) 260–265.
- [172] Y. A. Nechayev, N. V. Nikolenko, *An adsorption mechanism for supergene gold accumulation*, Geochemistry International Vol. 25 (1988) 52-56.
- [173] S. Ivanova, V. Pitchon, Y. Zimmermann, C. Petit, *Preparation of alumina supported gold catalysts: Influence of washing procedures, mechanism of particles size growth*, Applied Catalysis A: General Vol. 298 (2006) 57-64.
- [174] S. J. Lee, A. Gavriilidis, *Supported Au Catalysts for Low-Temperature CO Oxidation Prepared by Impregnation*, Journal of Catalysis Vol. 206 (2002) 305-313.



- [175] H. Yazid, R. Adnan, M. Akhyar F. Shafida, A. Hamid, *Synthesis of Au/Al₂O₃-Nanocatalyst and its Application in the Reduction of p-Nitrophenol*, Journal of the Chinese Chemical Society Vol. 58 (2011) 593-601.
- [176] C.-H. Lin, S. D. Lin, J.-F. Lee, *Chlorine Residue in the Au/ γ -Al₂O₃ Prepared by AuCl₃ Impregnation - an EXAFS Analysis*, Catalysis Letters Vol. 89 (2003) 235-242.
- [177] M. Haruta, *Nanoparticulate Gold Catalysts for Low-Temperature CO Oxidation*, Journal of New Materials for Electrochemical Systems Vol. 7 (2004) 163-172.
- [178] H. H. Kung, M. C. Kung, C. K. Costello, *Supported Au Catalysts for low Temperature CO oxidation*, Journal of Catalysis Vol. 216 (2003) 425-432.
- [179] H. Fan, *Synthese und Anwendung magnetisierbarer Katalysatoren zur selektiven Zuckeroxidation*, Masterarbeit Technische Universität Kaiserslautern (2011).
- [180] S.J. Angyal, *The Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein transformation and related reactions*, Glycoscience Vol. 215 Springer-Verlag Berlin (2001) 1-14.
- [181] M. Ibrahim, M. Alaam, H. El-Haes, A. F. Jalbout, A. de Leon, *Analysis of the structure and vibrational spectra of glucose and fructose*, Eclética Química Vol. 31 (2006) 15-21.
- [182] H.-A. Tajmir-Riahi, *Sugar Complexes with Calcium Ion: Infrared Spectra of Crystalline D-Gluconic Acid and its Calcium Complexes*, Carbohydrate Research, 122 (1983) 241-248.
- [183] G. M. Escandar, J. M. Salas Peregrin, M. Gonzales Sierra, D. Martino, M. Santoro, A. A. Frutos, S. I. Garcia, G. Labardie, L. F. Sala, *Interaction of Divalent Metal Ions with D-Gluconic Acid in the Solid Phase and Aqueous Solution*, Polyhedron Vol. 15 (1996) 2251-2261.
- [184] I. G. Konkina, S. P. Ivanov, O. A. Knyazeva, V. A. Davydova, E. V. Vasil'eva, L. M. Karachurina, F. A. Zarudii, I. A. Ionova, R. K. Gaifutdinova, Yu. I. Murinov, *Physicochemical Properties and Pharmacological Activity of Mn(II), Fe(II), Co(II), Cu(II), AND Zn(II) Gluconates*, Pharmaceutical Chemistry Journal Vol. 36 (2002) 18-21.
- [185] H. Schmidt-Traub, *Preparative Chromatography*, WILEY-VCH Verlag, Weinheim (2005).
- [186] N. Tippkötter, R. Ulber; *Eine magnetische horizontale Wirbelschicht für die Durchmischung und Rückhaltung von magnetisierbaren Mikropartikeln im Durchfluss*; Tagungsbeitrag Jahrestagung der Biotechnologen & ProcessNet-Jahrestagung, Mannheim (2009).
- [187] Homepage für Programmdownload oder online Verwendung.: www.chemaxon.com/products/marvin/marvinsketch/; geöffnet am 20.12.2013.
- [188] Homepage Vertrieb DTT: http://www.iris-biotech.de/product_april; geöffnet am 21.12.2013.
- [189] M. T. Madigan, J. M. Martinko, J. Parker, *Brock Mikrobiologie*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin 9. Auflage (2002).
- [190] A. Fleming, *The Antibacterial Action in vitro of 2-(p-Aminobenzenesulphonamido) Pyridine on Pneumococci and Streptococci*, The Lancet Vol. 2 (1938) 74-78.
- [191] E. P. Abraham, *Nachfahren des Penicillins: vielseitig und hochwirksam*, Spektrum der Wissenschaft Vol. 8 (1981) 47-61.



-
- [192] G. G. Newton, E. P. Abraham, *Isolation of cephalosporin C, a penicillin-like antibiotic containing D-alpha-amino adipic acid*, Biochemical Journal Vol. 62 (1956) 651–658.
- [193] M. Kresken, S. Decker-Burgard, B. Drewelow, J. Majcher-Peszynska, M. W.R. Pletz, T. Welte, *Carbapeneme im Vergleich – Stellenwert von Doripenem*, Chemotherapie Journal Vol. 19 (2010) 131-149.
- [194] J. S. Kahan, F. M. Kahan, R. Goegelman, S. A. Currie, M. Jackson, E. O. Stapley, T. W. Miller, A. K. Miller, D. Hendlin, S. Mochales, S. Hernandez, H. B. Woodruff, J. Birnbaum, *Thienamycin, a new beta-lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties*, Journal of Antibiotics Vol. 32 (1979) 1-12.
- [195] S. Maurer, *Selektive Abtrennung von beta-Lactam-Antibiotika*, Diplomarbeit Technische Universität Kaiserslautern (2010).
- [196] R. King, *Mathematische Modelle der morphologischen Entwicklung von myzelförmig wachsenden Mikroorganismen*, Chemie Ingenieur Technik Vol. 67 (1995) 553-559.
- [197] Sarrà M, Casas C, Gòdia F, *Continuous production of a hybrid antibiotic by Streptomyces lividans TK 21 pellets in a three-phase fluidized-bed bioreactor*, Biotechnology and Bioengineering Vol. 53 (1997) 601-610.
- [198] H. G. Karge, J. Weitkamp, *Adsorption and Diffusion*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg (2008).
- [199] D. D. Do, *Adsorption Analysis: Equilibria and Kinetics*, Imperial College Press, London (1998).
- [200] W. Henry, *Experiments on the Quantity of Gases Absorbed by Water, at Different Temperatures, and under Different Pressures*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Vol. 93 (1803) 29-274.
- [201] I. Langmuir, *The adsorption of gases on plane surfaces of glass*, Journal of the American Chemical Society Vol. 40 (1918) 1361-1403.
- [202] H. Freundlich, *Über die Adsorption in Lösungen*, Zeitung für physikalische Chemie Vol. 57 (1906) 385-470.
- [203] D. Bathen, M. Breitbach, *Adsorptionstechnik*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York (2001).
- [204] R. Sips, *On the Structure of a Catalyst Surface*, Journal of Chemical Physics Vol. 16 (1948) 490-495.
- [205] S. Maurer, *Prediction of Single-Component Adsorption Equilibria*, Herbert Utz Verlag München (2000).
- [206] J. Toth, *Uniform Interpretation of Gas/Solid Adsorption*, Advances in Colloid and Interface Science Vol 55(1995) 1-239.
- [207] S. Tedds, A. Walton, D. P. Broom, D. Book, *Characterisation of Porous Hydrogen Storage Materials: Carbons, Zeolites, MOFs and PIMs*, Faraday Discussion Vol. 151 (2011) 75-94.
- [208] K. Jones, *Downstream processing of natural products*, Chromatographia, Volume 43, Issue 5-6, (1996) 334.



-
- [209] A. Meyer, D. B. Hansen, C.S.G. Gomes, T. J. Hobley, O. R. T. Thomas, M. Franzreb, *Demonstration of a strategy for product purification by high-gradient magnetic fishing: Recovery of superoxide dismutase from unconditioned whey*, Biotechnology Progress Vol. 21 (2005) 244–254.
- [210] J.J. Hubbuch, O.R.T. Thomas, *High-gradient magnetic affinity separation of trypsin from porcine pancreatin*, Biotechnology and Bioengineering Vol. 79 (2002) 301–313.
- [211] T. Banert, U. A. Peuker, *Synthesis of magnetic beads for bio-separation using the solution method*, Chemical Engineering Communication, Vol. 194 (2007) 707–719.
- [212] Cafer T. Yavuz, Arjun Prakash, J.T. Mayo, Vicki L. Colvin, *Magnetic separations: from steel plants to biotechnology*, Chemical Engineering Science Vol. 64 (2009) 2510-2521.
- [213] M. Franzreb, M. Siemann-Herzberg, T. J. Hobley and O. R. T. Thomas, *Protein purification using magnetic adsorbent particles*, Applied Microbiology and Biotechnology Vol. 70 (2006) 505-516.
- [214] C. Hoffmann, M. Franzreb, W. H. Höll, *A Novel High-Gradient Magnetic Separator (HGMS) Design for Biotech Applications*, IEEE Transactions on Applied Superconductivity Vol. 12 (2002) 963-966.
- [215] C. Hoffmann, *Einsatz magnetischer Separationsverfahren zur biotechnologischen Produktaufarbeitung*, Dissertation Forschungszentrum Karlsruhe (2003).
- [216] R. Gerber, R.R. Birss, *High gradient magnetic separation*. Research Studies, Chichester, UK (1983).
- [217] J. Svoboda, *Magnetic methods for the treatment of minerals*, Elsevier Verlag, Amsterdam (1987).
- [218] M. Franzreb, *Magnettechnologie in der Verfahrenstechnik wässriger Medien*, Habilitation, Universität Karlsruhe (2003).
- [219] R. R. Briss, R. Gerber, M. R. Parker, *Theory and design of axially ordered filters for high intensity magnetic separation*, IEEE Transactions on Magnetics Vol. 12 (1976) 892-894.
- [220] H. Greiner, H. Hoffmann, *Efficiencies of axially ordered HGMS-Filters calculated from a multiwire model*, Journal of magnetism and magnetic materials Vol.38 (1983) 194-204.
- [221] H. Greiner, G. Reger, H. Hoffmann, *The (competitive) performance of HGMS-Filters with a strictly ordered wire matrix in the axial and transverse configuration*, IEEE Transactions on Magnetics, Vol. 20 (1984) 1171-1173.
- [222] K. Gottschall instrAction GmbH Patentnummer 20110257028, *Method for selectively binding a substrate to sorbents by way of at least bivalent bonds* (20.10.2011).
- [223] Vortrag des Herstellers veröffentlicht unter: <http://www.instraction.de/sites/default/files/downloads/Design%20und%20Upscale%20eines%20innovativen%20Aufreinigungsprozesses.pdf>; Seite geöffnet am 13.10.2012.



- [224] M. Mammen, S. Choi, G. Whitesides, *Polyvalente Wechselwirkung in biologischen Systemen: Auswirkungen auf das Design und die Verwendung multivalenter Liganden und Inhibitoren*, *Angewandte Chemie*, Vol. 110 (1998) 2908-2953.
- [225] M. Chaubal, G. Payne, Ch. Reynolds, R. Albright, *Equilibria for the Adsorption of Antibiotics onto Neutral Polymeric Sorbents: Experimental and Modeling Studies*, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 47 (1995) 215-226.
- [226] J. Wook, H. Park, H. Moon, Adsorption and desorption of Cephalosporin C on nonionic polymeric sorbents, *Separation and Purification Technology*, Vol. 12 (1997) 1-11.
- [227] M. Dutta, M. M. Borah, N.N. Dutta, *Adsorptive Separation of β -Lactam Antibiotics: Technological Perspectives*, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* Vol. 86 (2004) 255-278.
- [228] J. S. Beck, J. C. Vartuli, W. J. Roth, M. E. Leonowicz, C. T. Kresge, K. D. Schmitt, C. T. W. Chu, D. H. Olson, E. W. Sheppard, S. B. McCullen, J. B. Higgins, J. L. Schlenker, *A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates*, *Journal of the American Chemical Society* Vol. 114 (1992) 10834-10843.
- [229] B. J. Melde, B. T. Holland, Ch. F. Blanford, A. Stein, *Mesoporous Sieves with Unified Hybrid Inorganic/Organic Frameworks*, *Chemistry of Materials* Vol. 11 (1999) 3302-3308.
- [230] S. Inagaki, S. Guan, Y. Fukushima, T. Ohsuna, O. Terasaki, *Novel Mesoporous Materials with a Uniform Distribution of Organic Groups and Inorganic Oxide in Their Frameworks*, *Journal of American Chemical Society* Vol. 121 (1999) 9611-9614.
- [231] T. Asefa, M. J. MacLachlan, N. Coombs, G. A. Ozin, *Periodic mesoporous organosilicas with organic groups inside the channel walls*, *letters to nature* Vol. 402 (1999) 867-871.
- [232] D. Schaffner, *Periodisch mesoporös strukturierte Organosilikate mit ionisch gebundenem Quecksilber für die Katalyse*, *Diplomarbeit Technische Universität Kaiserslautern* (2010).
- [233] A. Monnier, F. Schüth, Q. Huo, D. Kumar, D. Margolese, R. S. Maxwell, G. Stucky, M. Krishnamurty, P. Petroff, A. Firouzi, M. Janicke, B. Chmelka, *Cooperative Formation of Inorganic-Organic Interfaces in the Synthesis of Silicate Mesostructures*, *Science* Vol. 261 (1993) 1299-1303.
- [234] M. Cornelius, *Studien zur Synthese mesoporöser Organosilica- Hybridmaterialien mit konjugierten π -Systemen*, *Dissertation Justus-Liebig-Universität Gießen* (2007).
- [235] J. C. Vartuli, W. J. Roth, J. S. Beck, S. B. McCullen, C. T. Kresge, *The Synthesis and Properties of M41S and Related Mesoporous Materials, Molecular Sieves*; Springer-Verlag, Berlin, 1. Auflage (1998).
- [236] S. H. Tolbert, *Mesoporous silica: Holey quasicrystals*, *Nature Materials* Vol. 11 (2012) 749-751.
- [237] S. Shylesh, A. Wagener, A. Seifert, S. Ernst, W. R. Thiel, *Mesoporous Organosilicas with Acidic Frameworks and Basic Sites in the Pores: An Approach to Cooperative Catalytic Reactions*, *Angewandte Chemie* Vol. 49 (2010) 184–187.



- [238] S. Shylesh, L. Wang, Werner R. Thiel, *Palladium(II) Phosphine Complexes Supported on Magnetic Nanoparticles: Filtration Free, Recyclable Catalysts for Suzuki–Miyaura Cross Coupling Reactions*, *Advanced Synthesis & Catalysis* Vol. 352 (2010) 425-432.
- [239] J. Tanga, L. Wang, G. Liu, Y. Liu, Y. Hou, W. Zhang, M. Jia, W. R. Thiel; *Mesoporous SBA 15 materials modified with oxodiperoxo tungsten complexes as efficient catalysts for the epoxidation of olefins with hydrogen peroxide*, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* Vol. 313 (2009) 31-37.
- [240] http://www.chemie.uni-kl.de/fileadmin/akthiel/pdf/research_thiel.pdf; Seite geöffnet am 11.08.2013.
- [241] G. B. Smith, G. C. Dezeny, A. W. Douglas, *Stability and Kinetics of Degradation of Imipenem in Aqueous Solutions*, *Journal of Pharmaceutical Sciences* Vol. 79 (1990) 732-740.
- [242] E. Hackemann, *Adsorption von beta-Lactam Antibiotika und Optimierung der magnetischen Filtration*, Studienarbeit Technische Universität Kaiserslautern (2011).
- [243] Persönliche Mitteilung Christian Meyer instrAction GmbH (30.11.2011).
- [244] M.V. Chaubal, G.F. Payne, C.H. Reynolds, R.L. Albright, *Equilibria for the Adsorption of Antibiotics onto Neutral Polymeric Sorbents: Experimental and Modeling Studies*, *Biotechnology and Bioengineering* Vol. 47 (1995) 215-226.
- [245] H.C. Stables, K. Briggs, *Processing of Cephalosporin C*, United States Patent Nr. 4,205,165 (1978).
- [246] M. Zhang, *Selektive Abtrennung von β -Laktam-Antibiotika (Cephalosporin C)*, Diplomarbeit Technische Universität Kaiserslautern (2011).
- [247] G. Limousin, J. P. Gaudet, L. Charlet, S. Szenknect, V. Barthes, M. Krimissa, Sorption isotherms; A review on physical bases, modeling and measurement, *Applied Geochemistry* Vol. 22 (2007) 249-275.
- [248] A. López Soriano, *Integration of High-Gradient Magnetic Separation in Lactam Fermentation Process*, Masterarbeit Technische Universität Kaiserslautern (2012).
- [249] M. Bora, N. Dutta, B. Tosh, K. Bhattacharya, *Reactive Extraction of beta-lactam antibiotics: IR spectroscopic studies*, *Chemical Engineering Communications*, Vol. 108 (2000) 107- 126.
- [250] J. Ernst, *UV- und IR-Spektroskopie zur reversiblen Substratbindung von b-Lactam Antibiotika an synthetische Adsorberphasen*, Diplomarbeit Technische Universität Kaiserslautern (2011).
- [251] G. Blanco-Brieva, *Effect of precursor nature on the behavior of titanium-polysiloxane homogeneous catalysts in primary alkene epoxidation*, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* Vol. 269 (2007) 133-140.
- [252] G. Socrates, *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies – Tables and Charts*, John Wiley & Sons Verlag, Chichester, New York, Weinheim, Toronto, Brisbane, Singapore (2001).
- [253] John F. Brown, Jr., *The Polycondensation of Phenylsilanetriol*, *Journal of the American Chemical Society* Vol 87 (1965) 4317-4324.
- [254] M. Hesse, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 7. Auflage (2005).



-
- [255] N. Tippkötter, *Reaktiosnssysteme zur Aufarbeitung und Umsetzung nachwachsender Rohstoffe*, Dissertation Technische Universität Kaiserslautern (2010).
- [256] J.H.P. Watson, *Magnetic filtration*, Journal of Applied Physics, Vol. 44 (1973) 4208-4213.
- [257] J.H.P. Watson, D.C. Ellwood, *Biomagnetic Separation and extraction process*, IEEE Transactions on Magnetics, Vol. 23 (1987) 3751-3752.
- [258] M. Kolano, *Magnetische Abtrennung von β -Lactam-Antibiotika sowie Aufbau und Bilanzierung einer Anlage im Labormaßstab*, Studienarbeit Technischer Univeristät Kaiserslautern (2012).
- [259] H.-J. Bargel, G. Schulze, *Werkstoffkunde*, Springer Verlag 9. Auflage, Berlin Heidelberg (2005).
- [260] Informationshomepage über Stähle: <http://www.metallograf.de/>, im Downloadberiech kann das Programm heruntergeladen werden; Seite geöffnet am 29.09.2011.
- [261] S. Hasse, *Duktiles Gusseisen – Handbuch für Gusserzeuger und Gussverwender*, Fachverlag Schiele & Schoen (1996).
- [262] K. R. Brown, M. J. Natan, *Hydroxylamin Seeding of Colloidal Au Nanoparticles in Solution and on Surfaces*; Langmuir Vol. 14 (1998) 726-728.
- [263] P.Singer, *Spektroskopische Untersuchung zur Bindung eines β -Lactam Antibiotikums an synthetische Rezeptorphasen*, Diplomarbeit Univeristät Kaiserslautern (2011).
- [264] G. Emig, E. Klemm, *Technische Chemie: Einführung in die chemische Reaktionstechnik*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 5.Auflage (1995).
- [265] Winfried Storhas, *Bioreaktoren und periphere Einrichtungen*, Friedrich Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig/Wiesbaden (1994).
- [266] W. Storhas, *Bioverfahrensentwicklung*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim (2013).
- [267] J. Weitkamp, R. Gläser, Winnacker, Küchler, *Chemische Technik: Prozesse und Produkte*, Band 1 - Methodische Grundlagen Wiley-VCH Verlag (2004).
- [268] Kogler, *Carbapenem OA-6129 – Versuche zur fermentativen Gewinnung im Schüttelkolben*, aus der Forschung und Entwicklung der biochemischen Gesellschaft m.b.H. Kundl (1984).
- [269] C. Tollnick, G. Seidel, M. Beyer, K. Schügerl, *Inverstigations oft he Production oft he Cephalosporin C by Acremonium chrysogenum*, Advances in Biocehmistry and Biotechnology Vol. 86 (2004) 1-45.
- [270] US Patent 4,205,165: Stables et al.: Processing of Cephalosporin C (1978).
- [271] H.Paus, *Physik in Experimenten und Beispielen*, zweite Auflage, Carl Hansen Verlag, München, Wien (2002).
- [272] COMSOL Multiphysics 4.2 User's Guide (2011).



-
- [273] J.M. Coulson, J. F. Richardson, *Particle Technology and Separation Processes*, Chemical Engineering Vol. 2 (2002).
- [274] Rohm & Haas, Produktbeschreibung der Amberlite XAD 4, erstellt im Oktober 2003.
- [275] J. Konecny, E. Felber, J. Gruner, *Kinetics of the hydrolysis of cephalosporin C*, The Journal of antibiotics, Vol. 26 (1972) 135-141.
- [276] S. Dillenberger, *Porphyrin-funktionalisierte Au-Fe-Oxid-Partikel für Hydroxylierungsreaktionen*, Diplomarbeit Universität Kaiserslautern (2009).
- [277] P. Y. Bruice, *Organische Chemie Studieren Kompakt*, 5. Aktualisierte Auflage, Pearson Education Verlag München (2011).
- [278] Vorlesungsskript Mechanische Verfahrenstechnik: http://www.mvt.ovgu.de/mvt_media/Vorlesungen/VO_MVT/MVT_e_4-p-1566.pdf (geöffnet am 20.06.2014), die Herleitung der Gleichung basiert auf den Grundlagen aus: H. Niedrig, M. Sternberg, Physik, Hütte - Das Ingenieurwissen, Springer Berlin (1991).



Anhang A Synthesevorschriften

Anhang A 1 Superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel

Die Herstellung der Eisenoxid-Nanopartikel erfolgt durch Co-Präzipitation von Eisensalzen in Natronlauge.^[74] Magnetit, die Zielkomponente der Synthese, kristallisiert im inversen Spinell. Die kubische Einheitszelle weist eine Kantenlänge von $a = 0.839$ nm auf. Die 32 Sauerstoffatome der Einheitszelle bilden ein kubisch flächenzentriertes Untergitter. In dessen Zwischengitterplätzen befinden sich Eisenkationen in zwei unterschiedlichen Koordinationen. Der mit Sauerstoff tetraedrisch koordinierte Kationenplatz ist ausschließlich mit Fe^{3+} Kationen besetzt, der zweite, oktaedrisch koordinierte Platz, ist je zur Hälfte mit Fe^{2+} - und Fe^{3+} -Kationen besetzt. Diese Kristallstruktur bedeutet für die Einwaage ein Verhältnis $\text{Fe(III)Cl}_3:\text{Fe(II)Cl}_2$ von 2:1. Für die Synthese wird benötigt:

- 0,2 M HCl in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$
- 5,4 g $\text{Fe(III)Cl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
- 2 g $\text{Fe(II)Cl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
- 250 ml NaOH 1,5 M

Die Eisenchloride werden in 25 ml einer 0,2 M Salzsäurelösung (HCl) gelöst. Die erhaltene Lösung wird unter starkem Rühren tropfenweise in 250 ml einer 1,5 M Natronlauge gegeben. So entstehen die magnetisierbaren Nanopartikel (ca. 10 nm) als schwarzer Niederschlag in der Lauge:



Diese werden magnetisch von der überstehenden Flüssigphase abgetrennt und dreimal mit jeweils ca. 500 ml deion. Wasser gewaschen bis der pH-Wert neutral ist. Anschließend werden die Partikel in 100 ml deion. Wasser suspendiert. Um die Konzentration der Magnetitpartikel im Wasser zu bestimmen, wird 1 ml der Suspension als Probe entnommen und nach Zentrifugation für 24 h bei 60 °C getrocknet. Die Menge an Partikeln in 1 ml Suspension wird anschließend gravimetrisch bestimmt. Die ermittelten Konzentrationen liegen im Bereich von 10 bis 19,5 g/L. Anhand laufender Messergebnisse konnte gezeigt werden, dass kein reines Magnetit vorliegt sondern eine Mischphase aus Eisenoxiden und Eisenhydroxiden. Es wird im Folgenden jedoch weiterhin von Magnetitpartikeln gesprochen, die für alle Magnetpartikelsynthesen als Grundpartikel dienen.



Anhang A 2 Goldummantelung der Eisenoxidgrundpartikel

Die Goldummantelung gelingt am besten mit teilweise oxidierten Magnetitkernen. Deshalb sollte die Stammlösung der Kerne 2 Wochen ruhen und dann auch bei der Dekoration gut durchmischt werden (erhöhter Sauerstoffeintrag in die Lösung). Die Goldschale wird durch eine Reduktion von Au^{3+} auf der Oberfläche des Eisenoxides geformt. Hierbei wird ein etwas modifiziertes Verfahren von Brown und Natan ^[262], das „Iterativer Hydroxylamin Seeding“, genutzt. Für die Golddekoration benötigt man:

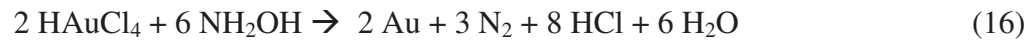
- 140 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$
- 7,5 ml Eisenoxid-Lösung
- 7,5 ml Natriumcitrat 0,1 M
- Hydroxylamin 0,2 M
- Goldsäure 1 % (wt)

Zunächst werden Wasser, Magnetit- und Natriumcitrat-Lösung für zwei Stunden auf dem Magnetrührer vermischt und dann über Nacht stehen gelassen (0. Dekorationsschritt). Am nächsten Morgen wird als Referenz für UV/Vis-Spektren eine Probe des 0. Schrittes genommen. Die nächsten Dekorationsschritte werden nach folgendem Pipettierschema durchgeführt:

Tab. 13: Auflistung der Zugabemengen zur iterativen Ummantelung der magnetischen Partikel mit einer Goldschicht.^[76]

Iterations-schritt	Hydroxylamin [ml]	Goldsäure [ml]	Total mol % Au	Total mol % Eisenoxid
1	0,750	0,625	69	31
2	0,281	0,500	80	20
3	0,188	0,500	85	15
4	0,188	0,500	88	12
5	0,281	0,500	90	10

Jeder Iterationsschritt wird an einem Tag durchgeführt. Zunächst wird das Hydroxylamin hinzugegeben, die Lösung für 10 Minuten gemischt und dann die Goldsäure addiert. Der komplette Ansatz wird wieder für zwei Stunden gemischt und dann über Nacht im Abzug stehen gelassen:



Die Proben, die an jedem morgen genommen wurden, werden bis das UV/Vis-Spektrum aufgenommen wird, im Kühlschrank gelagert. Die Dekoration erfolgt in einzelnen Schritten, um die Neubildung von reinen Goldpartikeln zu verhindern. Ebenfalls müssen alle Glasgefäße immer gründlich gereinigt sein, damit nicht Schmutzpartikel als Reduktionsoberfläche dienen. Das Natriumcitrat in der Lösung dient als Stabilisator.



Anhang A 3 Funktionalisierungsprozess mit EDC und NHS

Für die Bindung der Cellulase auf magnetischen Goldpartikeln stand eine Ausgangslösung mit einer Konzentration von 10 g/L zur Verfügung. Die Partikel sind zunächst in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ suspendiert. Im ersten Schritte werden Spacer auf die Magnetpartikel aufgebracht. Hierzu werden 50 μl der 5 mM 16-Mercaptohexadecanoic acid Lösung („Nanothinks“) zu 1 ml der Magnetbeads zugegeben und anschließend für 2 h im Rotator gemischt. Die Abtrennung der Partikel vom Überstand erfolgt dann über Nacht mit dem Magneten.

Nach der Abtrennung werden die Partikel in 1 ml MES-Puffer mit 40 mg EDC und 40 mg NHS resuspendieren und für 15 Minuten im Rotator gemischt. Nach Ende der Zeit werden diese erneut magnetisch abtrennen und in 1 ml MES-Puffer resuspendieren. Für die Immobilisierung werden nun 50 μl einer 10 g/L Enzymlösung zu den Beads geben und mit 450 μl PBS-Puffer aufgefüllt. Die Beads werden erneut für zwei Stunden im Rotator gemischt. Danach erfolgt ein dreimaliges Waschen der Partikel mit PBS-Puffer. Der Überstand wird für spätere Fluoreszenz-Messungen und Berechnungen der Beladung aufbewahrt und gründlich von den Partikel befreit (Überstand eventuell nochmals zentrifugieren).

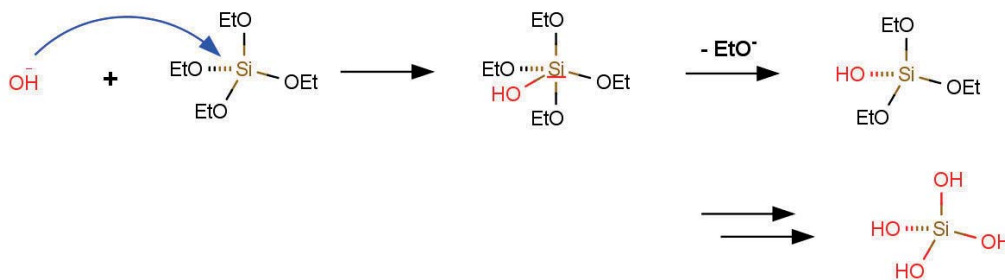
Die Partikel werden abschließend noch in einem Blocking-Puffer (Tris-Puffer) resuspendiert und erneut für zwei Stunden im Rotator gemischt, um alle funktionellen Gruppen auf der Partikeloberfläche abzusättigen. Die Partikel werden dann noch einmal mit PBS-Puffer gewaschen und in einem McIlvain-Puffer pH 5 resuspendiert. In diesem Puffer wurde ebenfalls der Methylcellulose-Abbau durchgeführt.

Anhang A 4 Magnetische Goldkatalysatoren auf Silicat-Trägern

Ummantelung von Magnetit mit Silicat basierend auf der Stöber-Synthese:

200 ml der Eisenoxidpartikellösung und 200 ml Ethanol werden 10 Minuten unter Ultraschall suspendiert und anschließend mit 50 ml Ammoniak (25 Gew.-% in Wasser) versetzt. Zu dem erhaltenen Reaktionsgemisch werden im Abstand von 10 Minuten viermal jeweils 10 ml Tetraethylorthosilicat (TEOS) zugegeben. Anschließend wird die Reaktionslösung für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Der dabei entstandene Feststoff wird von der Flüssigphase durch Zentrifugation oder magnetisch getrennt und zweimal mit Wasser gewaschen. Anschließend wird das Produkt zur Stabilisierung in Wasser suspendiert und die Konzentration gravimetrisch bestimmt. Die beiden beim Stöber-Prozess parallel ablaufenden Reaktionen sind in Abb. 123 dargestellt.

Hydrolysereaktion:



Kondensationsreaktion:

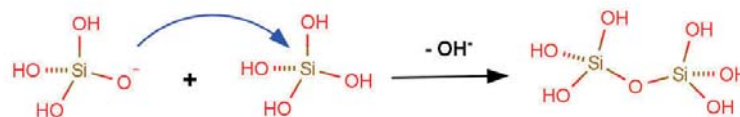


Abb. 123 Schematische Darstellung der parallel ablaufenden Hydrolyse- und Kondensationsreaktion.^[153]

Wenn die Hydrolyse schneller ist als die Kondensation, bilden sich viele Keime, die nur langsam wachsen; im umgekehrten Fall bilden sich wenige Keime und es werden größere Partikel gebildet. In alkalischer Umgebung ist die Hydrolyse der geschwindigkeitsbestimmende Schritt und es werden eher größere Partikel synthetisiert.



Einbringen von Thiolgruppen in die Silicatmatrix

Syntheseansatz a):

50 ml Magnetitpartikellösung ($c = 12 \text{ g/L}$) und 50 ml Ethanol werden für 10 Minuten unter Ultraschall suspendiert und im Anschluss mit 12,5 ml Ammoniak (25 Gew.-% in Wasser) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird für fünf Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 3 ml 3-Mercapto-propyl-trimethoxysilan (MPTMS) zugegeben. Nach 10 Minuten Rühren bei Raumtemperatur werden weitere 3 ml MPTMS zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird für 18 h gerührt. Allerdings beginnen nach ca. 2 h die Magnetitpartikel zu agglomerieren.

Syntheseansatz b):

20 ml Magnetitpartikellösung ($c = 12 \text{ g/L}$) und 20 ml Ethanol werden für 10 Minuten unter Ultraschall suspendiert und im Anschluss mit 12,5 ml Ammoniak (25 Gew.-% in Wasser) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird mit 1 ml Tetraethylorthosilicat versetzt und danach bei Raumtemperatur gerührt. Nach 10 Minuten wird 1 ml 3-Mercapto-propyl-trimethoxysilan zugegeben und für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird 1 ml 3-Mercapto-propyl-trimethoxysilan zugegeben und das Reaktionsgemisch für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Der dabei entstandene Feststoff wird magnetisch von dem flüssigen Überstand abgetrennt und fünfmal mit Wasser gewaschen. Das Produkt wird zur Stabilisierung in Wasser suspendiert und die Konzentration gravimetrisch bestimmt.

Syntheseansatz c):

16 ml Magnetitpartikellösung ($c = 12 \text{ g/L}$), 39 ml Wasser und 45 ml Ethanol werden 10 Minuten unter Ultraschall-Eintrag suspendiert. Anschließend werden nacheinander 0,5 ml Ammoniak (25 Gew.-% in Wasser) und 0,3 ml 3-Mercapto-propyl-trimethoxysilan zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird für 18 h gerührt. Der dabei entstandene Feststoff wird magnetisch von dem flüssigen Überstand abgetrennt und fünfmal mit Wasser gewaschen. Das Produkt wird zur Stabilisierung in Wasser suspendiert und die Konzentration gravimetrisch bestimmt.

Binden von Gold-Nanopartikeln auf Magnetit-Silicat-Partikel

Die Bindung erfolgt über eine Inkubation der Silicat-Partikel in einer verdünnten kolloidalen Lösung Goldpartikel (5 nm kommerziell erhältlich). Die Inkubation erfolgt für 2 h bei Raumtemperatur im Rotator.



Anhang A 5 Magnetische Goldkatalysatoren auf Aluminiumoxid-Trägern

Aluminiumummantelung von Magnetitpartikeln:

100 ml Eisenoxidlösung (10 g/L) werden mit 1 M Natronlauge auf einen pH-Wert von 12,5 eingestellt. Anschließend werden 100 ml 0,01 M Aluminiumnitrat-Nonahydrat-Lösung ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$) zugegeben. Das Gemisch wird mit verdünnter Salzsäure auf pH 7,5 eingestellt und für 1 h bei konstantem pH-Wert gerührt. Mittels Titrator ist hier eine konstante Regelung des pH-Wertes möglich. Danach wird der gebildete Feststoff magnetisch abgetrennt und dreimal mit Wasser gewaschen. Der erhaltene schwarze Feststoff wird über Nacht bei 60 °C getrocknet. Nach dem Trocknen werden die Partikel leicht gemörsert. Anschließend wird das Produkt für 3 h bei 400 °C im Muffelofen calciniert und nach dem Abkühlen zerstoßen. Die optimale Anfangskonzentration von Aluminiumnitrat ist einzuhalten, da die Homogenität der Aluminiumoxid-Schicht sonst beeinflusst wird. Bei hohen Konzentrationen fällt das Aluminiumhydroxid als Niederschlag aus. Bei geringeren Konzentrationen entsteht eine nicht geschlossene Aluminiumoxid-Schicht. Außerdem erfolgt bei der Fällungsreaktion eine strenge Kontrolle des pH-Wertes, da der IEP von Al_2O_3 und Eisenoxiden bei diesem Schritt eine wichtige Rolle spielt.

Goldfällung auf ummantelte Magnetitpartikel mittels Deposition-Precipitation-Methode:

1 g ummantelte Magnetpartikel ($\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Partikel) werden in 50 ml deion. Wasser gelöst und auf 70 °C erwärmt. Der pH-Wert dieser Suspension wird auf 7,5 eingestellt. Anschließend werden 2 ml einer 10 g/L HAuCl_4 -Lösung unter intensivem Rühren zugetropft. Der pH-Wert der Suspension wird mit 0,1 M Natronlauge im Titrator auf 7,5 gehalten, und es wird 1 h bei 70 °C weiter gerührt. Nach der Abkühlung auf Raumtemperatur werden 20 ml einer 10 g/L Natriumcitrat Lösung ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) zugegeben und 1 h gerührt. Durch Zugabe von Natriumcitrat werden die $[\text{AuCl}_4]^-$ -Ionen zu Gold reduziert. Das Natriumcitrat dient aber nicht nur als Reduktionsmittel sondern wirkt ebenfalls als Stabilisator und verhindert ein zu starkes Sintern der Goldpartikel während der Calcinierung. Danach wird der Feststoff magnetisch vom Überstand abgetrennt und mit ca. 500 ml Wasser chloridfrei gewaschen. Das Nachweisen von Chloridionen erfolgt mit Silbernitrat-Lösung. Wenn kein weißer Niederschlag im Überstand entsteht, ist es chloridfrei. Nach dem Waschen werden die beschichteten Partikel bei 60 °C über Nacht im Trockenschrank getrocknet und später gemörsert. Schließlich werden die getrockneten Partikel 4 h bei 200 °C im Muffelofen calciniert.

Anhang A 6 Goldkatalysatoren mit unmagnetischen Al_2O_3 -Trägern

Die unmagnetischen Goldkatalysator ($\text{Au}/\text{Al}_2\text{O}_3$) werden genau wie die magnetischen mittels Deposition-Precipitation-Methode mit Natronlauge als Fällungsmittel hergestellt. Die Fällung auf Aluminiumoxid dient dem Screening der besten Goldverhältnisse zur Fällung auf dem Träger. Hierzu wird 1 g Al_2O_3 (Süd-Chemie Träger EXM 2181) in 50 ml deion. Wasser gelöst und auf 70 °C erhitzt. Die Suspension wird mit 0,1 M Natronlauge auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt und danach werden unterschiedliche Menge der Goldsäure-Lsg. (siehe Tab. 14) unter starkem Rühren zugetropft. Dabei wird der pH-Wert des Reaktionsgemisches durch die kontinuierliche Zugabe von 0,1 M Natronlauge auf 7,5 gehalten. Dann wird das Gemisch 1 h bei 70 °C weiter gerührt. Nach der Abkühlung auf Raumtemperatur werden erneut 20 ml Natriumcitrat-Lsg. zugesetzt und eine weitere Stunde gerührt. Anschließend wird der Feststoff über einen Papierfilter mit Hilfe einer Nutsche abgetrennt und mit deion. Wasser chloridfrei gewaschen und bei 60 °C über Nacht getrocknet. Zuletzt wird der Feststoff für 4 h bei 200 °C im Trockenschrank calciniert.

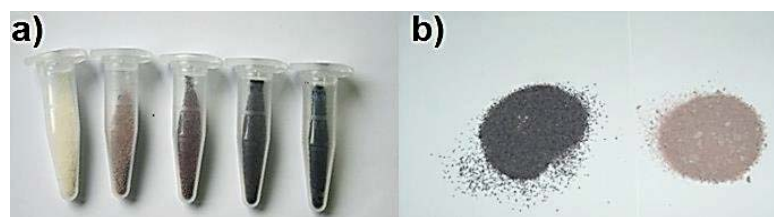


Abb. 124: a) $\text{Au}/\text{Al}_2\text{O}_3$ -Katalysator von Typen 1; 2; 3; 5 und 6 (granuliert) von links nach rechts; b) Typ 6 mit granuliertem Aluminiumoxid (violett) und mit pulverförmigem Aluminiumoxide (pinkfarben).

Anhand der Färbung der Trägermaterialien kann bereits auf die Beladungsmenge geschlossen werden (siehe Abb. 124). Im rechten Bild ist zweimal der gleiche Träger mit der gleichen zugegebenen Menge an Goldsäure zu sehen. Der Unterschied liegt hier in der Körnung. Durch das Mörsern der Träger kann eine größere Oberfläche geschaffen werden die für die Fällung ausgenutzt werden kann. Ein Nachteil ist, dass durch feinere Träger die Rückgewinnung des Katalysators schwieriger wird, magnetische Katalysatoren umgehen dieses Problem.



Tab. 14: Unterschiedliche Typen der Goldkatalysatoren auf Al₂O₃-Träger:

Au/Al₂O₃-Partikel	Menge von H₂AuCl₄ [ml_{H₂AuCl₄}/g_{Al₂O₃}]	Menge von Au [mg_{Au}/g_{Al₂O₃}]	synthetisierte Menge [g]
Typ 1	0,1	0,58	0,5
Typ 2	0,5	2,9	0,5
Typ 3	1,0	5,8	0,5
Typ 4	1,5	8,7	0,5
Typ 5	2,0	11,6	0,5
Typ 6	3,0	17,4	25
Typ 7	5,0	29	0,5
Typ 8	10,0	58	0,5



Anhang B Analytische Methoden

Anhang B 1 Ellman's Assay

Eine mögliche Methode zur Quantifizierung von Thiolgruppen bietet die Umsetzung mit 5,5-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) (=DTNB). Die farblosen Thiole reagieren mit DTNB zu stark gelb gefärbten Thiophenolat-Anionen (siehe Abb. 125), die quantitativ durch Photometrie erfasst werden können. Diese Methode wurde erstmals durch Ellman beschrieben und ist auch unter seinem Namen als Ellman's Assay bekannt.^[155]

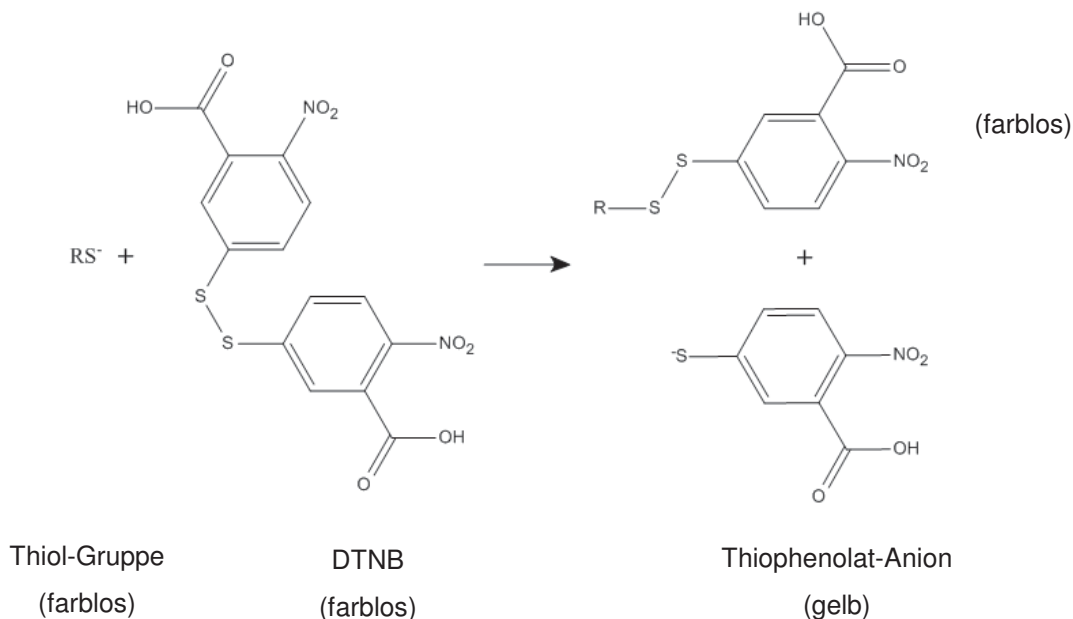


Abb. 125: Reaktion Ellman's Assay: Das farblose Reagenz spaltet sich in Gegenwart von Thiolgruppen auf und erzeugt so einen gelben Farbumschlag, der direkt proportional zur Thiolkonzentration ist.

Zur Quantifizierung der Thiolgruppen auf der Partikeloberfläche wird zunächst eine Kalibration mit Cystein durchgeführt. Der Testansatz wird in Halbmikroküvetten pipettiert und nach fünf Minuten Inkubation bei Raumtemperatur und bei 412 nm am UV/Vis-Spektrometer gegen einen Blindwert (Wasser) gemessen. Die in Abb. 126 dargestellten Messwerte der Kalibrationsgeraden zeigen sehr deutlich den linearen Zusammenhang zwischen Gelbfärbung und Thiolkonzentration. Der dreifache Messansatz zeigte so geringe Fehler, dass darauf verzichtet wurde die Fehlerbalken im Diagramm darzustellen. Für die Messung der Partikel ist ebenfalls eine Inkubationszeit von fünf Minuten vorzusehen. Danach wird der Überstand entfernt und in einer Halbmikroküvette vermessen. Bei bekannter Partikelmenge kann die Thioldichte der Partikel in $\mu\text{mol/g}$ berechnet werden.

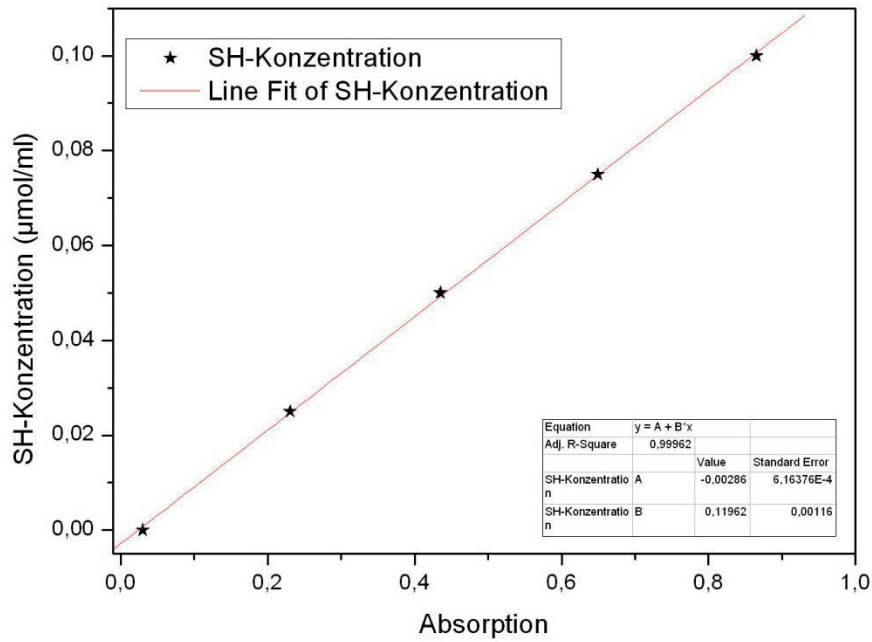


Abb. 126: Kalibrationsgerade des Ellman's Assay mit Cystein. Jede Probe wurde im 3-fachen Ansatz gemessen. Der Fehler zwischen den Messwerten ist zu gering, um hier dargestellt zu werden.

Gemäß der DIN 32645 wurden für das verwendete Ellman's Assay folgende analytischen Grenzwerte bestimmt:

Verfahrensstandardabweichung: 0,001 µmol/ml

Nachweisgrenze: 0,005 µmol/ml

Erfassungsgrenze: 0,009 µmol/ml

Bestimmungsgrenze: 0,016 µmol/ml

Anhang B 2 HPLC-Methoden

Anhang B 2.1 HPLC Analytik von Zuckern

Die Analytik der verschiedenen Zucker erfolgte über chromatographische Auftrennung der Proben (Injektionsvolumen 20 µl) mit einer ReproGel Ca²⁺ Säule (9 µm, 300 x 8 mm, Dr. Maisch). Als Laufmittel dient deionisiertes Wasser mit einer Flussrate von 0,5 ml/min. Die Auftrennung erfolgte an der HPLC Techlab mit einem RI-Detektor und der Auswertesoftware Clarity. Abb. 127 zeigt ein Beispielchromatogramm der Auftrennung eines Standard-Zuckergemisches.

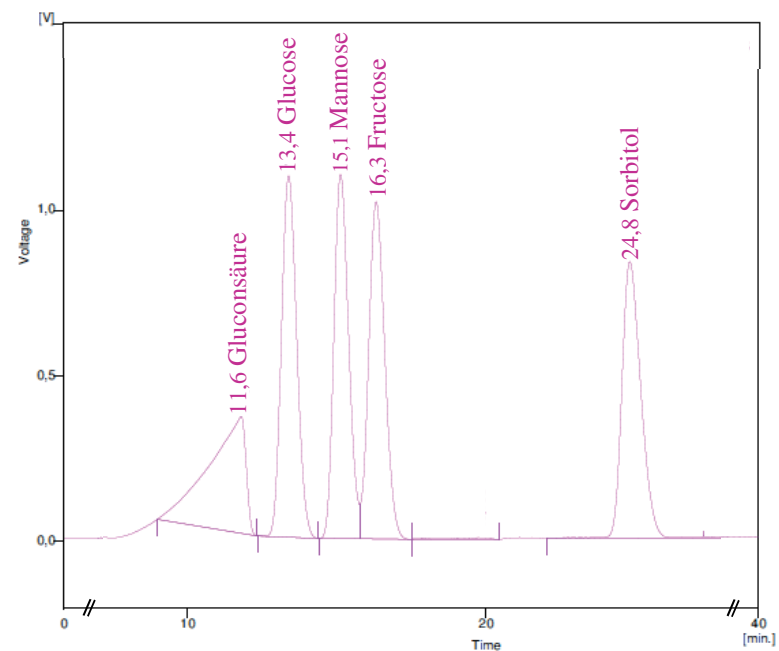


Abb. 127: Beispielchromatogramm eines Standard-Gemisches. Zu sehen sind die Peaks von Gluconsäure, Glucose, Mannose, Fructose und Sorbitol. Der Gluconsäure-Peak zeigt ein starkes Fronting und vermischt sich in einer Probe aus der Reaktionslösung mit dem Peak des KPP-Puffers.

Die Maximal messbare Zuckerkonzentration beträgt 2 g/L und wurde auch in Abb. 127 aufgetrennt. Zusätzlich zu dem Standardgemisch wurde noch Mannose, Fructose und Sorbitol eingewogen, da diese als Nebenprodukte der Zuckerumlagerung entstehen können. Die dargestellte Gluconsäure zeigt im Chromatogramm ein starkes Fronting und kann in einer Probe aus der Reaktionslösung nicht vom Peak des eingesetzten KPP-Puffers unterschieden werden. Aus diesem Grund wurde für die Analytik der Zuckersäure eine andere Trennsäule verwendet. Gemäß der DIN 32645 wurden für die verwendete HPLC Methode zur Glucoseanalytik folgende analytischen Grenzwerte bestimmt:

Verfahrensstandardabweichung: 0,01 g/L

Nachweisgrenze: 0,023 g/L

Erfassungsgrenze: 0,047 g/L

Bestimmungsgrenze: 0,055 g/L

Anhang B 2.2 HPLC Analytik von Organischen Säuren

Die Analytik der Zuckersäuren erfolgte über chromatographische Auftrennung der Proben (Injektionsvolumen 20 µl) mit einer ReproGel H⁺, Säule (8 µm, 300 x 4,6 mm, Dr. Maisch). Als Laufmittel dient eine 9 mM Schwefelsäure in deionisiertem Wasser mit einer Flussrate von 0,3 ml/min. Die Auftrennung erfolgte an der HPLC-Waters mit einem UV-Detektor bei 210 nm und der Auswertesoftware Empower. Abb. 128 a) zeigt ein Beispielchromatogramm der Auftrennung einer Standard-Zuckersäure (1 g/L).

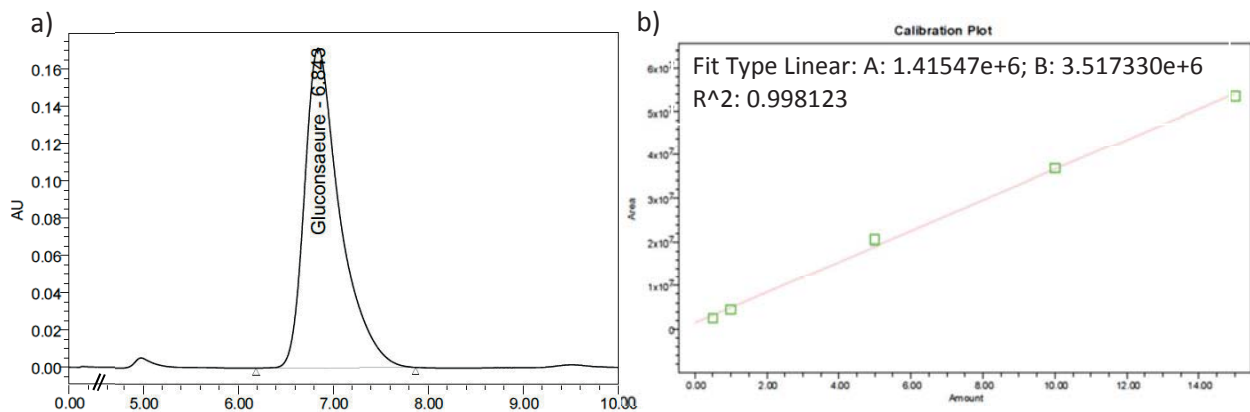


Abb. 128: a) Chromatogramm einer 1 g/L Gluconsäure-Stammlösung, bei 5 min ist ein Pufferpeak, bei 6,8 min der Peak für die Gluconsäure zu sehen; b) Kalibrationsgerade für Gluconsäure im Bereich von 0,5 bis 15 g/L.

Der Gluconsäure-Peak kann klar vom Puffer-Peak getrennt werden. In b) ist die Kalibrationsgerade für Gluconsäure dargestellt. Die Abhängigkeit von Konzentration zu Peakfläche ist im Konzentrationsbereich von 0 - 15 g/L linear. Gemäß der DIN 32645 wurden für die verwendete HPLC Methode folgende analytischen Grenzwerte bestimmt:

Verfahrensstandardabweichung: 0,26 g/L

Nachweisgrenze: 0,247 g/L

Erfassungsgrenze: 0,494 g/L

Bestimmungsgrenze: 0,65 g/L

Anhand dieser Chromatographie-Methode kann nun auch eine HPLC-MS Analytik durchgeführt werden. Für die massenspektroskopische Untersuchung werden mit Hilfe der 234

Elektronenspray-Ionisation (ESI) positive Ionen erzeugt. Dafür wird die flüssige Phase am Ende einer Kapillare durch eine Hochspannung von 3,5 kV in die Gasphase überführt. Die Messungen erfolgen mit dem Gerät Waters Micromass Quattro LC und dem Photodiode Array Detector Waters 2998 der Firma Waters GmbH (Eschborn). In Tab. 15 sind die eingestellten MS-Parameter aufgelistet.

Tab. 15: Verwendete MS-Einstellungen für die Detektion der Massenspektren der untersuchten Substanzen:

Parameter	Einstellung
Ionisierung	ESI pos.
Trägergas	Stickstoff (99%)
Kapillarspannung	3,5 kV
Konusspannung	20 V
Quellentemperatur	100 °C
Desolvatisierungstemperatur	450 °C
Scan-Bereich	50-1000 m/z

Anhang B 2.3 HPLC Analytik von Antibiotika

Die Analytik der Antibiotika erfolgte über eine chromatographische Auftrennung der Proben mit einer ReproSil 100 C18 Säule (5 µm, 250 x 4 mm, Dr, Maisch). Als Laufmittel diente 0,25 M Ameisensäure pH 8,0 (A; mit Ammoniak eingestellt) und Methanol (B). Zur Auftrennung wurden die Laufmittel als Gradient gefahren (siehe Tab. 16):

Tab. 16: Gradient für die HPLC-Antibiotika-Analytik:

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	90	10
10	65	35
20	65	35
25	90	10
30	90	10

Die Flussrate betrug 0,5 ml/min und das Injektionsvolumen 20 µl. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines UV-Detektors für Imipenem bei 300 nm und für Cephalosporin C bei 260 nm. Vor Beginn der Messung befinden sich die Proben in einem auf 4 °C temperierten Probenraum. Die Trennung und Detektion erfolgt bei einer Säulentemperatur von 25 °C. Gemäß der DIN 32645 wurden für die verwendete HPLC Methode folgende analytischen Grenzwerte bestimmt:



Imipenem:

Verfahrensstandardabweichung: 0,007 g/L

Nachweisgrenze: 0,006 g/L

Erfassungsgrenze: 0,011 g/L

Bestimmungsgrenze: 0,013 g/L

Cephalosporin C:

Verfahrensstandardabweichung: 0,11 g/L

Nachweisgrenze: 0,169 g/L

Erfassungsgrenze: 0,338 g/L

Bestimmungsgrenze: 0,401 g/L



Anhang B 3 Glucoseoxidase (GOD) Assay

Der GOD-Assay dient der Quantifizierung der enthaltenen Zuckerkonzentration. Die eingesetzte Glucoseoxidase katalysiert die Oxidation von D-Glucose zum Gluconolacton, welches mit Wasser zu Gluconsäure und Wasserstoffperoxid hydrolysiert. Das entstandene H_2O_2 wiederum wird mit Peroxidase (POD) zur Oxidation des ABTS (2,2'-Aza-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)) verwendet. Zunächst liegt ABTS als stabiles Radikal in reduzierter Form vor. Durch die Überführung in die oxidierte Form erhält das ABTS eine intensive grüne Färbung, die bei 405 nm detektiert wird. Der zeitliche Verlauf der Intensitätszunahme wird aufgezeichnet und nach Erreichen der Sättigung die Anfangssteigung bestimmt. Diese dient als Maß für die enthaltene Glucosekonzentration. Für dieses Assay werden folgende Chemikalien benötigt:

- ❖ 250 μ l ABTS-Puffer
- ❖ 10 μ l Glucoseoxidase (GOD) Lösung 0,1 mg/ml
- ❖ 10 μ l Peroxidase (POD) Lösung 1 mg/ml
- ❖ 30 μ l Probelösung

Als erster Schritt wird eine Multititerplatte mit flachem Boden auf Kratzer auf der Unterseite untersucht. Beschädigte Probenkammern werden markiert, diese sollten nicht für Messungen genutzt werden. Zunächst wird die POD und GOD Lösung auf der Platte vorgelegt und dann ABTS-Puffer dazugegeben. In einer zweiten Multititerplatte werden die Proben vorbereitet. In der obersten Reihe werden die Standardlösungen vorgelegt, darunter dann die Proben. Es sollten zwischen 50 und 100 μ l Probelösung vorgelegt werden, um eine Aufnahme von 30 μ l in die Pipette zu gewährleisten. Vor der Zugabe der Probe zu den GOD Reagenzien sollte die Messapparatur vorbereitet werden. Ist alles vorbereitet, können möglichst zügig mit Hilfe der Multipipette die Probelösungen auf die GOD Reagenzien gegeben werden. Die Multititerplatte wird dann möglichst schnell in das Gerät eingespannt, wo sie auf einer Schüttelplatte durchmischt und gemessen wird. Gemäß der DIN 32645 wurden für das GOD Assay folgende analytischen Grenzwerte bestimmt:

Verfahrensstandardabweichung: 0,079 g/L

Nachweisgrenze: 0,132 g/L

Erfassungsgrenze: 0,263 g/L

Bestimmungsgrenze: 0,276 g/L

Anhang B 4 Fluoreszenzspektroskopie zur Proteinquantifizierung

Zur Proteinquantifizierung wurde die Fluoreszenz von Proteinen ausgenutzt. Für die Messungen der Enzymkonzentration ist es nicht notwendig, das komplette 3D-Spektrum aufzunehmen. Es reicht aus, direkt am Fluoreszenzmaximum die Fluoreszenzintensität zu messen. Als Messpunkt wird die Intensität bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und einer Emissionswellenlänge von 350 nm gemessen. Der maximale Konzentrationsbereich liegt zwischen 0 und 0,1 g/L Enzym. Da es sich bei dieser Messmethode um eine einfache und schnelle Methode handelt (die zu messende Lösung muss lediglich in eine Küvette eingefüllt werden), wurde vor jeder Messung eine Kalibrationsgerade für Cellulase aufgenommen (siehe Abb. 129). Für alle Fluoreszenzmessungen wurde die Software FLWinLab von Perkin Elmer zur Auswertung verwendet.

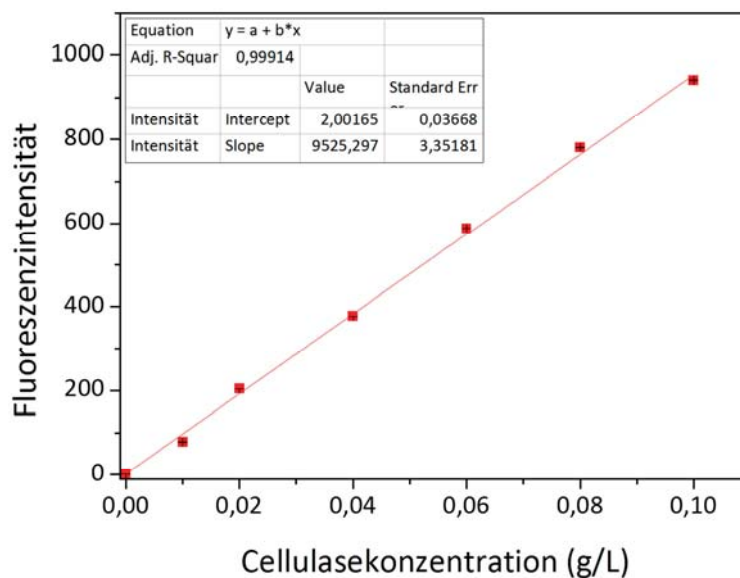


Abb. 129: Kalibrationsgerade zur Proteinquantifizierung. Die Messung erfolgte bei 280 nm Anregungswellenlänge und 350 nm Emission im Konzentrationsbereich bis 0,1 g/L. Der Zusammenhang zwischen Fluoreszenz und Cellulasekonzentration ist im gesamten Bereich linear.

Der Zusammenhang zwischen Fluoreszenz und Proteinkonzentration ist im gesamten Konzentrationsbereich linear. Die Messwerte sind Mittelwerte aus einer dreifachen Messung. Die bestimmten Fehler sind sehr klein und kaum in Abb. 129 zu erkennen (schwarze Balken). Gemäß der DIN 32645 wurden für die Fluoreszenzspektroskopische Bestimmung der Proteinkonzentration folgende analytischen Grenzwerte bestimmt:

Verfahrensstandardabweichung: 0,002 g/L

Nachweisgrenze: 0,004 g/L

Erfassungsgrenze: 0,008 g/L

Bestimmungsgrenze: 0,009 g/L



Diese Methode ist sehr zuverlässig zur Bestimmung des Gesamtproteingehaltes, allerdings nur im kleinen Konzentrationsbereich einsetzbar. Sobald zur Messung Verdünnungen notwendig werden, wird der Fehler deutlich größer. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Bilanzierung der Immobilisierung alle Überstände sowie der erste und zweite Waschschrift herangezogen.

Anhang B 5 IR-Spektroskopie der Gluconsäure aus der Zuckeroxidation

Neben HPLC Analytik wurden die Proben nach Komplettumsetzung der Glucose zu Gluconsäure auch mittels IR-Spektroskopie untersucht. Hierzu wurde der Überstand bzw. ein Teil des Überstandes nach Ende der Reaktion entnommen und gefriergetrocknet. Als Vorbereitung für die Gefrierd Trocknung wird die Probe in einem Rundkolben eingefroren und die gefrorene Probe unter Vakuum zu einem weißen Pulver getrocknet. Bei diesem Pulver handelt es sich um das Natrium oder Kaliumsalz der Gluconsäure. Das Gluconsäurepulver wird mit 10 mM KPP-Puffer zu einer 1 M Probelösung angesetzt unter der Annahme, dass die Gluconsäure rein vorliegt. Die Standardlösungen wurden ebenfalls in KPP-Puffer gelöst (Glucose, Natriumgluconat und Glucuronsäure) und KPP-Puffer als Untergrund vor der Aufnahme der Spektren abgezogen. Die Zusammenfassung der Standards ist in Abb. 130 dargestellt.

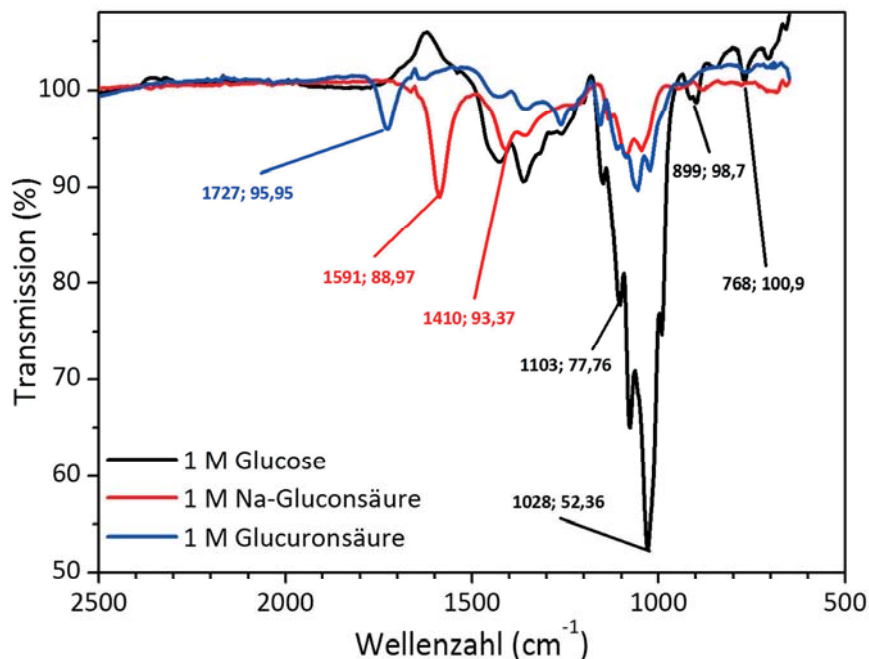


Abb. 130: Zusammenfassung der IR Spektren der Standardsubstanzen. In schwarz ist das Spektrum für Glucose dem Substrat dargestellt mit der Hauptbande zwischen 950 und 1100 cm⁻¹. Das Produkt Gluconsäure, in rot, besitzt drei Hauptbanden, wobei die Bande mit einem Maximum bei 1591 cm⁻¹ eine hochspezifische Bande ist, die von keinem anderen hier untersuchten Stoff überlagert wird. Diese Band kann somit für die Konzentrationsbestimmung verwendet werden. In grün ist außerdem ein mögliches Nebenprodukt dargestellt, die Glucuronsäure, welche ebenfalls eine hochspezifische Bande hier bei 1727 cm⁻¹ besitzt.



Im Gegensatz zu Glucose und Glucuronsäure besitzt Natriumgluconat eine starke spezifische Transmissionsbande bei 1591 cm^{-1} . Diese entspricht der asymmetrischen Streckschwingung der (COO^-) -Gruppe. Anhand dieser Bande lässt sich die Menge an gebildeter Gluconsäure quantifizieren. Durch Bestimmung der Banden-Fläche dieser spezifischen Banden kann die Konzentration des dazugehörigen Stoffes bestimmt werden. Glucuronsäure kann durch die Bande bei 1727 cm^{-1} im Spektrum des Produktes identifiziert und quantitativ bestimmt werden. Zur Identifizierung von Glucose können die Banden bei 899 cm^{-1} und 769 cm^{-1} genutzt werden. Etwa im Bereich zwischen 1000 und 1100 cm^{-1} besteht eine Überlappung der Banden von Glucose, Glucuronsäure und Gluconsäure. Eine Quantifizierung der Glucose anhand dieser Bande ist demnach nicht ohne weiteres möglich. Da jedoch die Glucose deutlich höhere Intensität aufweist, ist zumindest eine qualitative Aussage zur Glucose-Konzentration möglich.

Anhang B 6 IR-Spektroskopie zur Adsorption von Cephalosporin C

Die Untersuchungen zur Adsorption und Elution des Cephalosporin C von den PMO Adsorbentien wurden mittels FTIR-ATR-Spektroskopie durchgeführt. Mit der ATR-Zelle können Feststoffe untersucht werden (siehe Abb. 131a), die dann mittels eines Stempels auf den ATR-Kristall aufgedrückt werden. In diesem Fall erhält man direkt das IR-Spektrum des Feststoffes. Es können auch Flüssigkeiten untersucht werden, die direkt auf den ATR-Kristall aufgetropft werden (siehe Abb. 131b). Da die Eindringtiefe in die Flüssigkeit nur gering ist, wird auch bei einem gewissen Feststoffanteil in der Lösung nur die flüssige Phase gemessen. Wässrige Systeme benötigen in diesem Fall eine Subtraktion des Lösungsmittels, um eine Überlagerung des Spektrums mit OH Schwingungen des Wassers zu vermeiden. Die dritte Möglichkeit für die Analytik ist die Messung eines feuchten Feststoffes (siehe Abb. 131c). Hier besteht ebenfalls die Möglichkeit, das Lösungsmittel vor der Messung zu subtrahieren, dies ist allerdings nicht zwingend notwendig solange der Bereich außerhalb der OH-Schwingungen betrachtet wird.

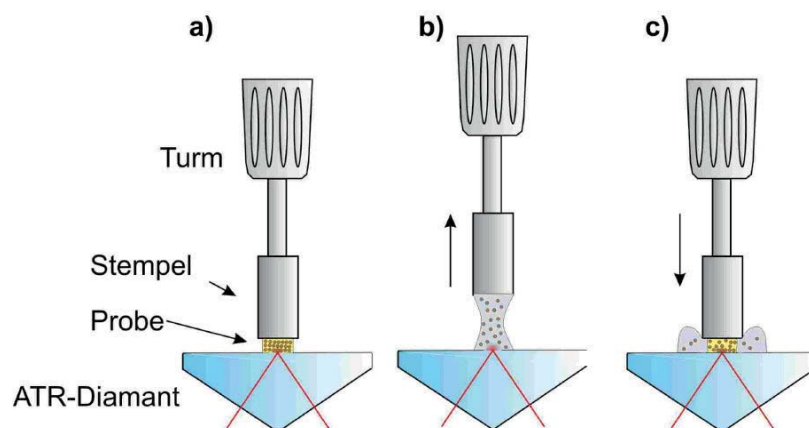


Abb. 131: FTIR-ATR-Zelle zur Messung der Bindung von Antibiotika auf der Adsorbentoberfläche.^[264]

Die Untersuchungen zu Adsorption bzw. Elution erfolgte mit der Variante c) aus Abb. 131. Es wird eine definierte Menge Adsorbentien zur Adsorption in einer Antibiotikums-Lösung (10 g/L) eingesetzt. Nach 1 h Inkubationszeit wird der Überstand entfernt und die Adsorbentien mehrmals mit Wasser gewaschen, um unspezifisch gebundenes Antibiotikum zu entfernen. Die feuchten Adsorbentien werden auf den ATR-Kristall gegeben und mittels Stempel auf dem ATR-Kristall fixiert. Die Transmission wird im Spektrenbereich von 650 cm^{-1} bis 4000 cm^{-1} mit einem Inkrement von 1 cm^{-1} aufgenommen. Das Spektrum wird aus Messungen von 10 Iterationen generiert. Die Messung der Elutionsprobe erfolgte mit gleichen Einstellungen.

Anhang B 7 PCD-Potential-Messung

Zur Proben-Vorbereitung werden 0,02 g Feststoff in 20 ml Millipore Wasser gelöst. Von jeder Partikelcharge wurden jeweils drei Proben hergestellt, um den IEP eines Feststoffes genau zu bestimmen. Vor der Messung wird der Feststoffe noch einmal mit Millipore Wasser gespült. Außerdem müssen die Messzelle und der Verdrängerkolben nach jeder Messung gründlich mit Wasser gereinigt werden. Vor jeder Messung sollte das Gerät mit Leitungswasser überprüft werden. Das Strömungspotential von Leitungswasser liegt ungefähr bei -700 mV. In der PCD-LabX Software werden die Parameter (siehe Tab. 17) in der Titrationsmethode „Isoelektrischer Punkt Methode 7“ verändert, damit der Titrator gezielt gesteuert wird.

Tab. 17: Liste der eingestellten Parameter für IEP-Titration:

Titriermittel	dE [mV]	dt [s]	Titriermittel- Zugabe	dV(min.) [ml]	dV(max.) [ml]	Abbruch bis zu
HCl/NaOH	1,0	2	Kontinuierlich	0,001	0,01	benötigter pH- Wert

Es werden 20 ml Probe in die Messzelle eingefüllt, so dass beide Goldelektroden mit Flüssigkeit bedeckt sind. Anschließend wird die Messzelle auf der Führung bis zum Anschlag nach hinten geschoben. Danach wird der Verdrängerkolben nach oben gezogen und durch eine Rechtsdrehung in den Bajonettverschluss eingehängt. Dann wird die pH-Elektrode in die Messzelle eingetaucht. Der Motor des Verdrängerkolbens wird eingeschaltet und nach einer Wartezeit von etwa 30 s stabilisiert sich das Potential auf einen Wert. Die Bürettenspitze wird durch eine Schraube fixiert und in die Flüssigkeit eingetaucht. Dabei darf die Bürettenspitze nicht den Kolben berühren. Anschließend kann die Titration gestartet werden. Ein Titrationsvorgang dauert ca. 25 min. Nach der Titration bekommt man einen IEP und das verbrauchte Volumen des Titriermittels.

Anhang B 8 Bestimmung der Reaktionsordnung

Anhang B 8.1 Differentialmethode

Aus den Konzentrations-Zeit-Diagrammen einer Reaktion kann man erkennen, wie die beteiligten Teilreaktionen ablaufen. Aus diesem Grund ist eine wesentliche Aufgabe der Reaktionskinetik die Bestimmung des Zeitgesetzes und damit der Reaktionsordnung n sowie der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k . Die Reaktionsgeschwindigkeit ist eine Funktion der Konzentration der Reaktanden, der Temperatur, des Druckes und der Anwesenheit von Fremdstoffen wie Inhibitoren. Für die Reaktionsgeschwindigkeit v gilt folgender Zusammenhang (Produktansatz):^[265]

$$v = \frac{dc_A}{dt} = -k \cdot c_A^n \quad (17)$$

Die Geschwindigkeitskonstante k ist eine temperaturabhängige Konstante. Die Substratanfangskonzentration c_A ist bei der Differenzialmethode die Variable. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird aus der Anfangssteigung des Substrat-Zeit-Diagrammes bestimmt. In Abb. 132 sind die Verläufe bei verschiedenen Anfangskonzentrationen dargestellt. Anhand der Steigung des roten Fits kann die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt werden.

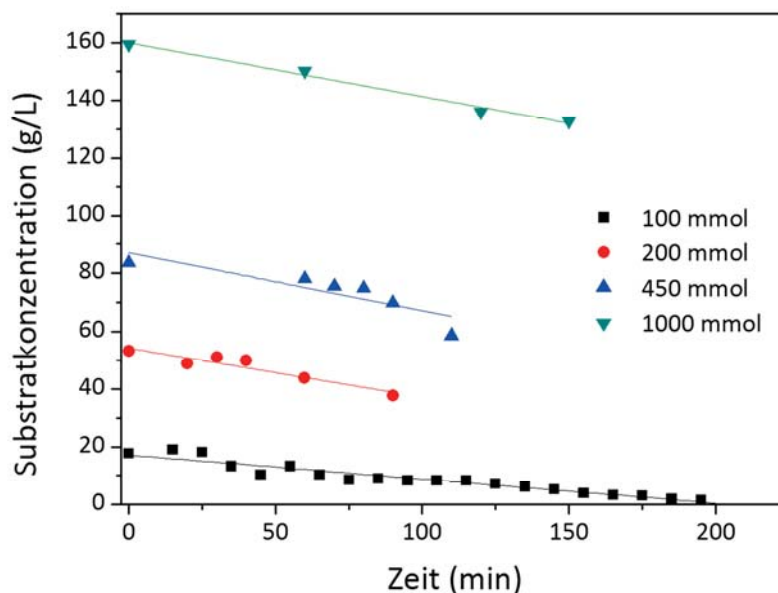


Abb. 132: Substrat-Zeit-Diagramm der Glucoseumsetzung mit verschiedenen Substratanfangsgeschwindigkeiten.

Durch Logarithmieren der Gleichung (17) erhält man folgende Gleichung die es ermöglicht aus der Geradengleichung die Reaktionsordnung n zu bestimmen:^[264]

$$\ln v = \ln \frac{dc_A}{dt} = n \ln c_A + \ln k \quad (18)$$

In Abb. 133 ist das Vorgehen an dem untersuchten Konzentrationsbereich von 100 mM bis 1000 mM Glucose dargestellt.

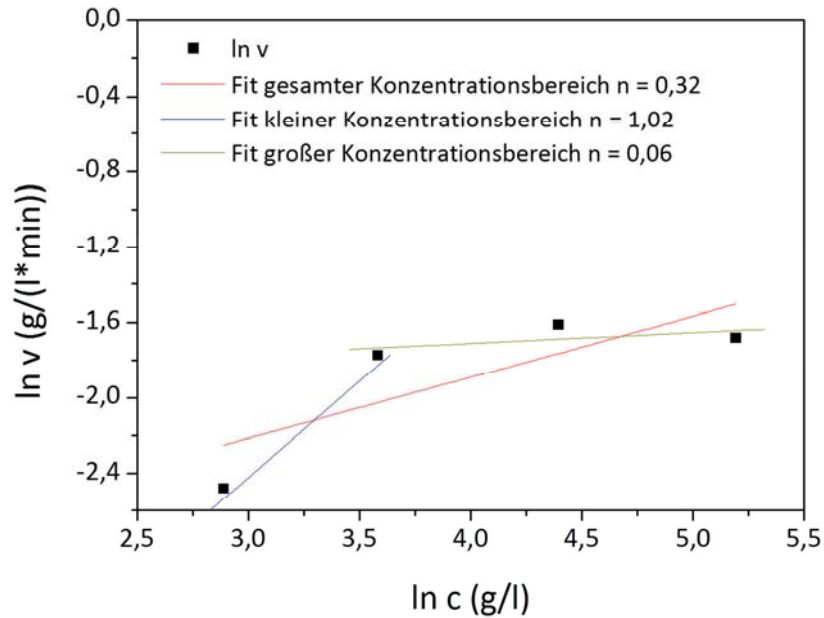


Abb. 133: Zusammenfassung der Reaktionsgeschwindigkeiten über den gesamten Konzentrationsbereich. Da kein linearer Zusammenhang besteht, wurden kleiner und großer Konzentrationsbereich zusätzlich getrennt betrachtet.

Anhang B 8.2 Integralmethode

Eine andere Möglichkeit um aus den Messergebnissen die Reaktionsordnung zu bestimmen ist die Integralmethode. Bei dieser Methode wird zunächst eine Reaktionsordnung der Reaktion angenommen. Für jede Ordnung liegt ein anderer Zusammenhang von Reaktionsgeschwindigkeit, Konzentration der Reaktanden und Geschwindigkeitskonstante vor. Die Gleichungen für 0., 1, und 2. Ordnung sind in Tab. 18 zusammengefasst:

Tab. 18: Zeitgesetze verschiedener Reaktionsordnungen, dargestellt als Differential- und Integralgleichung:

Ordnung	Differentialgleichung	Integration
0.	$-dc_G/dt = k_0$	$c_{G,t} = -k_0 \cdot t$
1.	$-dc_G/dt = k_1 \cdot c_G$	$c_{G,t} = c_{G,0} \cdot e^{-k_1 \cdot t}$
2.	$-dc_G/dt = k_2 \cdot c_G \cdot c_{O_2}$	$c_{G,t} = c_{G,0} \cdot A \cdot e^{-A \cdot k_2 \cdot t} / (c_{G,0} \cdot e^{A \cdot k_2 \cdot t} - c_{O_2,t})$

$A = c_{G,0} - c_{O_2,0}, \quad v = -dc_G/dt = dc_{GS}/dt$

Die experimentell bestimmten Messwerte werden in einem Substrat-Zeit- oder einem Produkt-Zeit-Diagramm dargestellt und mit den integrierten Gleichungen aus Tab. 18 gefittet. Beispielhaft sind die Messwerte der Versuche mit dem Titrator und den dazugehörigen Fits in Abb. 134 dargestellt.

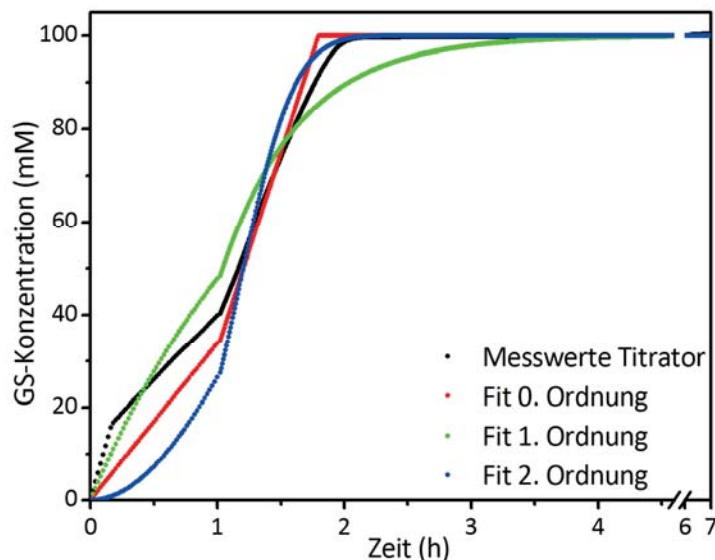


Abb. 134: Experimentelle Kurve (schwarz) der Versuche mit Titrator und die dazugehörigen Fit-Kurven der Integralgleichungen der Zeitgesetze 0., 1. und 2. Ordnung.^[179]



Zur Bewertung der Fits werden die Fehlerquadrate der Fits betrachtet. Der Fit mit dem geringsten Fehlerquadrat liefert die beste Übereinstimmung mit dem Zeitgesetz. In Tab. 19 sind die Fehlerquadrate aus den Fits für den Versuch im Titrator und im 1 L-Bioreaktor zusammengefasst. Die Werte zeigen für beide Versuche die beste Übereinstimmung bei dem Zeitgesetz 0. Ordnung.

Tab. 19: Bestimmte Fehlerquadrat der 0., 1. und 2. Ordnung der beiden Versuche im Titrator und dem 1 L Bioreaktor:

Fehlerquadrat (mmol^2/L^2)	0. Ordnung	1. Ordnung	2. Ordnung
Titrator	5587	10035	18166
1 L Bioreaktor	423	10659	3557

Anhang B 9 Bestimmung der Verweilzeitverteilung und Raum-Zeit-Ausbeute

Zur Charakterisierung von Reaktoren im kontinuierlichen Betrieb wird oft die Verweilzeit des Substrates im Reaktionsraum bestimmt. Die Verweilzeit beschreibt die mittlere Zeit, in der sich ein Substratteilchen im Reaktionsraum aufhält. Aufgrund unterschiedlicher Strömungspfade innerhalb des Reaktors ist die Verweilzeit für jedes Substratmolekül eines Kollektivs leicht unterschiedlich. So ergibt sich eine Verteilungsfunktion, die die stochastische Verteilung der Teilchen am Ausgang des Reaktors beschreibt. Zur Bestimmung des Verlaufs dieser Ausgangsfunktion wird eine definierte Tracermenge (200 μl , 5 M Natriumchlorid, Volumenstrom 1,5 ml/min) zugegeben. Die Zugabe des Tracers erfolgt als Impulsfunktion (Dirac-Funktion) und zeigt die Totzeit des Systems. Als Messgröße am Reaktorausgang wird die Leitfähigkeit herangezogen.

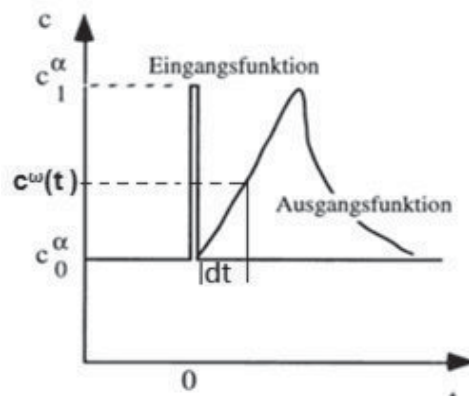


Abb. 135: Beispiel für ein Eingangssignal als Impulsfunktion und dem Verlauf des Ausgangssignals mit einer asymmetrischen Peakform am Reaktorausgang.^[266]

Wie in dem Beispiel in Abb. 135 zu sehen, handelt es sich bei den Verläufen der Ausgangsfunktion meist nicht um symmetrische Peaks, sodass die Berechnung der mittleren Verweilzeit über das erste absolute Moment erfolgt:^[185]

$$\mu_t = \frac{\int_0^{\infty} t \cdot c(t) dt}{\int_0^{\infty} c(t) dt} = \frac{\sum_{i=0}^n [t_i \cdot c(t_i) \cdot \Delta t_i]}{\sum_{i=0}^n [c(t_i) \cdot \Delta t_i]} \quad (19)$$

Die mittlere Verweilzeit und die dazugehörige Varianz ermöglichen die Bestimmung der Bodensteinzahl, einer Kenngröße, die das Verhältnis zwischen konvektivem Transport und der axialen Rückvermischung angibt:^[185,266]

$$B_0 = 2 \cdot \frac{\mu^2}{\sigma^2} = \frac{u \cdot L}{D_{ax}} \quad (20)$$

Nach Umstellen der Gleichung (20) kann mit der Leerrohrgeschwindigkeit u und der Länge des Reaktionsvolumens L die axiale Rückvermischung D_{ax} berechnet werden.



Eine weitere Größe zur Charakterisierung von Reaktionen ist die Raum-Zeit-Ausbeute, welche anhand der Substratmengen n , der Zeit t und dem Reaktorvolumen V_R berechnet werden kann.^[267]

Kontinuierlicher Prozess:

$$RZA = \frac{\dot{n}_{aus} - \dot{n}_{ein}}{V_R}$$

Batch Prozess:

$$RZA = \frac{n_t - n_0}{t \cdot V_R} \quad (21)$$

Anhang B 10 Bestimmung der Brown'schen Molekularbewegung

Partikel mit Durchmessern im Nanometer-Bereich zeigen Brown'sche Molekularbewegung. Diese kann als mittlerer Effektivwert der Schwankungsgeschwindigkeit $\sqrt{\bar{v}^2}$ aus der mittleren kinetischen Energie ultrafeiner Partikel berechnet werden. Diese ist definiert als:^[278]

$$\sqrt{\bar{v}^2} = \sqrt{\frac{3 \cdot k_B \cdot T}{\rho_P \cdot V_P}} \quad (22)$$

Die Dichte der Partikel ρ_P wurde für die verwendeten Kompositpartikel zu 12160 kg/m³ berechnet (50 % Goldgehalt). Bei dem Volumen der Partikel V_P wird für die Berechnung von einer Kugel ausgegangen und die entsprechenden Durchmesser eingesetzt. Als Temperatur T wird die Raumtemperatur 25 °C eingesetzt und die Boltzmann-Konstante k_B ist definiert als 1,38065 10⁻²³ J/K. Die berechneten Werte für die verschiedenen Partikeldurchmesser d sind in Tab. 20 zusammengefasst.

Tab. 20: Zusammenfassung der berechneten mittleren Effektivwerte der Schwankungsgeschwindigkeit von Au/Fe-Partikeln verschiedener Partikeldurchmesser. Zum Vergleich sind die Werte für Quarzpartikel mit einer Dichte von $\rho_P=2650$ kg/m³ dargestellt:

d [nm]	Quarzpartikel	Au/Fe Partikel
1	94 m/s	44 m/s
10	3 m/s	1,4 m/s
100	9,4 cm/s	4,4 cm/s
1000	0,3 cm/s	0,14 cm/s

Der Tabelle ist zu entnehmen, dass mit steigendem Partikeldurchmesser die Beweglichkeit der Partikel stark abnimmt. Die in der Arbeit verwendeten Au/Fe-Trägerpartikel ($d=135$ nm) zeigen allerdings noch Brown'sch Molekularbewegung, wohingegen bei den verwendeten μ -Partikeln ($d=3$ μ m), die Beweglichkeit bereits kaum mehr gegeben ist.



Anhang C Reaktionsvorschriften

Anhang C 1 Hydrolyse von Cellulose im 2 ml-Eppendorf-Gefäß

Um die Aktivität der Immobilisate qualitativ bewerten zu können, wird diese in der Cellulose-Hydrolysen eingesetzt. Für jeden Ansatz wird im 2 ml-Eppendorf-Gefäß 40 mg Cellulose (Carboxymethylcellulose oder fibröse Cellulose) vorgelegt. Für den Standard nativer Cellulase wird diese in einem McIlvaine Puffer pH 5 gelöst und 1 ml der Standardlösung der Cellulose zugegeben. Die Partikelsysteme sind bereits nach der Immobilisierung in entsprechenden McIlvaine Puffern gelöst. Von der Partikellösung wird ebenfalls 1 ml (sprich 10 mg Partikel) der Cellulose zugegeben. Abschließend wird jedem Ansatz 1 μ l β -Glucosidase zugegeben, um die entstandene Cellobiose in Glucose zu spalten. Außerdem wird für jeden Versuchsansatz eine Blindprobe mit Cellulose, gelöst in Puffer, mit 1 μ l β -Glucosidase angesetzt. Die Blindprobe zeigte bei den Ansätzen mit fibröser Cellulose gar keine Glucose und bei Carboxymethylcellulose vernachlässigbare Konzentrationen. Die Hydrolysen wurden bei 50 °C im Trockenschrank im Rotator (75 rpm) für 24 h durchgeführt. Am Ende der Hydrolyse wurden die Proben zentrifugiert bzw. magnetisch vom Feststoffgehalt befreit und anschließend mittels GOD-Assay (siehe Anhang B 3) die entstandene Glucose bestimmt.



Anhang C 2 Glucoseoxidation im Rührkessel

Die verschiedenen Oxidationsreaktionen der einzelnen Partikelsysteme wurden zunächst im kleinen Maßstab durchgeführt, um während des Partikelscreenings möglichst wenig Partikel einsetzen zu müssen und so auch den Versuchsdurchsatz hoch zu halten. Nach der Identifikation des geeigneten Katalysatorsystems kann sowohl die Synthese als auch das Reaktionsvolumen vergrößert und dann auch die optimalen Reaktionsbedingungen eingestellt werden. In diesem Abschnitt werden die einzelnen Reaktionsbedingungen zusammengefasst.

Anhang C 2.1 Oxidationsreaktion im 50 ml Falcon

Reaktionsvolumen: 25 ml

Katalysatormenge: 0,025 u. 2,5 g Au/Al₂O₃; 0,025 g Au/Al₂O₃/Fe₃O₄;
1,087 ml Au-BSA; 0,5 ml Au-Colloid

Glu-Konzentration: 100 mmol/L in 10 mM KPP-Puffer

Temperatur: 40 °C

pH-Wert: 9

keine Titration und ohne Begasung

Die Durchmischung des Reaktionsansatzes erfolgt mittels Rotator bei 75 rpm. Unter obiger Reaktionsbedingung wird die Oxidation mit den Partikeln Au/Al₂O₃/Fe₃O₄, Au/Al₂O₃ Typ 1 bis 8, Au-BSA und reinem Goldkolloid durchgeführt.

Anhang C 2.2 Oxidationsreaktion im „Dosimat“ bzw. Titrator

Reaktionsvolumen: 50 ml

Katalysatormenge: 1 g/L Au/Al₂O₃

Glu-Konzentration: 100 mM in 10 mM KPP-Puffer

Temperatur: 40 °C

pH-Wert: 9

Titrationmittel NaOH: 2,5 M

Begasungsrate und Rührerdrehzahl sind auf maximale Werte eingestellt. Die Begasung erfolgt über einen Schlauch durch einfaches Einperlen der Luftblasen.

Anhang C 2.3 Oxidationsreaktion im 500 ml Rührkessel

Reaktionsvolumen: 300 ml

Katalysatormenge: 3 u. 1,2 g Au/Al₂O₃

Glu-Konzentration: 100; 280; 450 u. 1000 mM in 10 mM KPP-Puffer

Temperatur: 40 °C

pH-Wert: 9

Titrationmittel NaOH: 2,5 M

Begasungsrate und Rührerdrehzahl sind auf maximale Werte eingestellt. Der allgemeine Aufbau für den Dosimat und der Reaktion im Rührkessel ist in etwa gleich, nur das Reaktionsgefäß ist in diesem Fall größer und mit einem besseren Doppelmantel für die Temperierung ausgestattet. Außerdem erfolgt die Begasung über eine Fritte, die die eingetragene Druckluft fein dispergiert und somit den Sauerstoffübertrag verbessert. Der Aufbau ist für den 500 ml Rührkessel in Abb. 136 dargestellt.

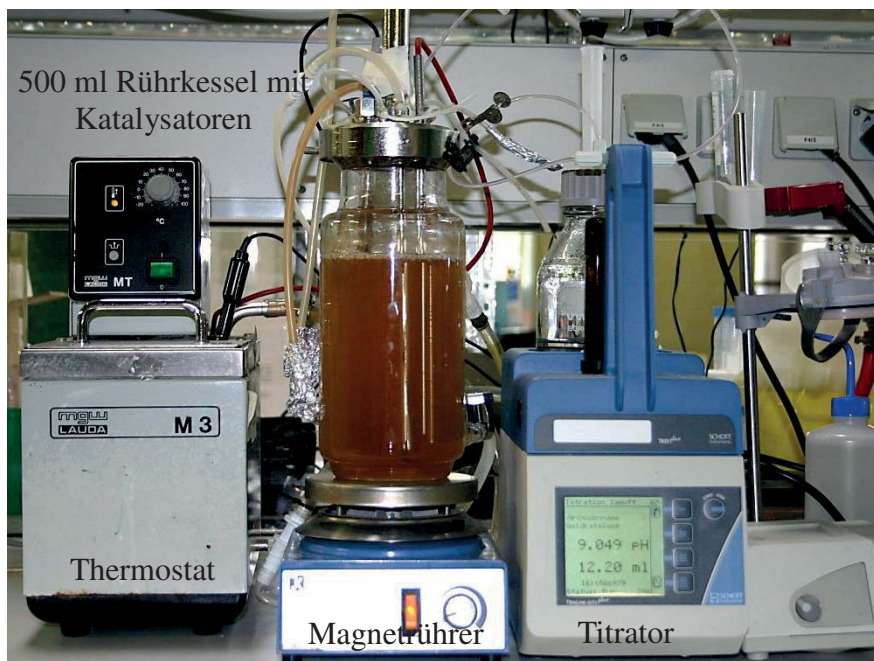


Abb. 136: Versuchsaufbau, bestehend aus einem Thermostat, Titrator, Magnetrührer und einem 500 ml Rührkessel mit Sauerstoffzufuhr, pH-Elektrode und Titriermittelezuführung zur pH-Kontrolle. Im Inneren des Reaktors ist der rotbraune Ansatz einer Katalyse zu sehen.



Anhang C 2.4 Oxidationsreaktion im 1 L-Miniforce-Reaktor

Reaktionsvolumen: 1 L

Katalysatormenge: 10 g Au/Al₂O₃

Glu-Konzentration: 100 mM in 10 mM KPP-Puffer

Temperatur: 40 °C

pH-Wert: 9

Titration NaOH: 2 M

Luft-Flussrate: 144 L · min⁻¹

Rührerdrehzahl: 700 rpm

Das Reaktionssystem ist aufgebaut aus Basen-Pumpe, pH-Elektrode, Thermostatmantel, pO₂-Elektrode, Rührsystem, Belüftung, Rückflusskühler und Abgassensor. Vor Beginn der Katalyseversuche erfolgt eine Einstellung der Reaktionsparameter (Temperatur, pH-Wert, Kalibrierung von pH- und pO₂-Elektrode, Rührerdrehzahl und Begasungsrate). Im Rahmen der Langzeitversuche des feinen Katalysators Au/Al₂O₃ Typ 6 wurde die Glucosekonzentration immer nach Vollumsatz erneut auf 100 mM im Minifors eingestellt. Bei diesem Experiment wurde der Katalysator insgesamt zehn mal in der Glucoseoxidation eingesetzt.



Anhang C 3 Adsorptionsisothermen

Anhang C 3.1 Adsorption von Imipenem

Im Fall von Imipenem wurden zur Erstellung der Adsorptionsisothermen die Ausgangskonzentrationen 0,05 g/L; 0,1 g/L; 0,2 g/L; 0,4 g/L; 0,6 g/L; 0,8 g/L; 1 g/L; 2 g/L; 4 g/L; 6 g/L; 8 g/L; 10 g/L eingesetzt. Als Lösemittel für das Imipenem diente zunächst eine 15 mM NaCl, 35 mM Natriumacetat Lösung (pH 7,5). Aliquots von 1 ml der verschiedenen Imipenem-Konzentrationen wurden jeweils zu 20 mg des entsprechenden Adsorbermaterials zugegeben. Die Adsorptionszeit betrug anfänglich 1 h bei 25 °C und wurde später auf 10 Minuten reduziert. Die Gleichgewichtskonzentrationen der Überstände nach der Adsorption wurden mit Hilfe der HPLC-Analytik ermittelt. Die späteren Adsorptionsuntersuchungen erfolgten im realen Fermentationsmedium folgender Zusammensetzung:

Tab. 21: Zusammensetzung des Fermentationsmediums für *Streptomyces sp.* zur Adsorption des Imipenems:^[268]

Bestandteil	Konzentration [g/L]
Glycerin	80
K ₂ HPO ₄	2
MgSO ₄	2
Sojaamine	25,8
Hefeextrakt	7,6

Anhang C 3.2 Adsorption von Cephalosporin C

Zur Erstellung einer Adsorptionsisotherme wurden die CPC Ausgangskonzentrationen 1 g/L, 2 g/L, 3 g/L, 4 g/L, 5 g/L, 7 g/L, g/L, 11 g/L, 13 g/L, 15 g/L eingesetzt. Der pH-Wert wurde mit 0,1 M Essigsäure/NaOH auf 3 und 4 eingestellt. In 1 ml der Lösungen verschiedener CPC-Konzentrationen wurden jeweils 20 mg des entsprechenden Adsorbermaterials zugegeben. Die Adsorptionszeit betrug 1 Stunde bei 25 °C. Die Gleichgewichtskonzentrationen der Überstände nach der Adsorption wurden mit Hilfe der HPLC-Analytik ermittelt. Die spätere Adsorption wurde im realen Fermentationsmedium folgender Zusammensetzung durchgeführt:



Tab. 22: Zusammensetzung des Fermentationsmediums für *Acremonium chrysogenum* zur Adsorption des Cephalosporin C:^[269]

Bestandteil	Konzentration [g/L]
Glucose	35
MgSO ₄	6,67
H ₂ KPO ₄	3,1
FeSO ₄	0,09
MnSO ₄	0,03
ZnSO ₄	0,02
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,2
CuSO ₄	0,02
Na ₂ SO ₄	5
Urea	2,1
Serin	1
DL-Methionin	14,67
Sojaöl	40

Anhang C 3.3 Elutionen

Die beladenen Adsorber werden zunächst mit 1 ml des Adsorptionspuffers gewaschen, um unspezifisch gebundenes Antibiotikum zu entfernen. Als Elutionsmittel für XAD 4 und Cephalosporin C werden 2 ml einer 50 % (v/v) Methanol-Lösung eingesetzt. Für IRA 67 und Orica Partikel werden 2 ml einer 0,1 M Kaliumacetat-Lösung bei pH 6,5 eingesetzt.^[270] Die Elutionszeit beträgt 1 Stunde bei 25 °C. Auch hier wird die Konzentrationen mittels HPLC bestimmt. Im Falle von Imipenem auf der instrAction-Phase und CPC auf den PMO-Partikeln wird ein Eluent mit 1 M Natriumacetat/Ethanol/H₂O (1:1:1) eingesetzt. Die Elutionszeit wird auf 10 Minuten reduziert.

Anhang D Simulationen

Zur Optimierung der Kammergeometrie bzw. des Separationsgitters, wurden FEM-Simulationen mit der Software COMSOL Multiphysics 4.2 durchgeführt. Im Folgenden sind die verschiedenen Einstellungen und zugrundeliegenden Gleichungen zusammengefasst.

Anhang D.1 Magnetostatische Simulationen

Die grundlegende Gleichung zur Berechnung magnetostatischer Felder unter Berücksichtigung von Materie im magnetischen Feld ist die Definition der magnetischen Flussdichte \vec{B} .^[61,62,271]

$$\vec{B} = \mu_0 \cdot \mu_r \cdot \vec{H}; \mu_r = 4000 \quad (23)$$

Die magnetische Flussdichte \vec{B} und die magnetische Feldstärke \vec{H} sind vektorielle Größen und zueinander parallel. Die magnetische Feldkonstante μ_0 ist eine physikalische Konstante und gibt die magnetische Permeabilität des Vakuums an. Die Permeabilitätszahl μ_r , oder auch relative Permeabilität, ist eine Materialkonstante, die für verschiedene Materialien der Datenbank des Simulationsprogramms zu entnehmen ist. Diese Gleichung sowie die angegebene Permeabilitätszahl wird für alle in der Simulation magnetisierbaren Gitterstäbe und für den Eisenjoch des HGMS genutzt. Dem Raum innerhalb der Kammer, welcher mit Wasser gefüllt wird, wird eine Permeabilitätszahl $\mu_r = 1$ zugeordnet. Dies ist notwendig, um die Kombination zwischen Fluidodynamischer und magnetostatischer Simulation zu ermöglichen. Im Falle des Permanentmagneten wird Gleichung (23) durch die magnetische Flussdichte der Remanenzmagnetisierung \vec{B}_r ergänzt:

$$\vec{B} = \mu_0 \cdot \mu_r \cdot \vec{H} + \vec{B}_r; \mu_r = 1,07; B_r(x) = 1,2 T; B_r(y) > 0; B_r(z) > 0 \quad (24)$$

Da sich die Magnetfelder des HGMS während der Separation zeitlich nicht ändern, werden für die FEM-Simulationen magnetostatische Gleichungen zugrunde gelegt. Ausgehend von den Maxwell'schen Gleichungen, der Definition des magnetischen Vektor-Potentials \vec{A}

$$\vec{B} = \nabla \times \vec{A} \quad (25)$$

sowie der konstitutiven Beziehung zwischen magnetischer Flussdichte, magnetischer Feldstärke und der Magnetisierung des Materials,



$$\vec{B} = \mu_0 \cdot (\vec{H} + \vec{M}) \quad (26)$$

kann Ampere's Gesetz für den statischen Fall in folgender Form geschrieben werden:

$$\nabla \times (\mu_0^{-1} \nabla \times \vec{A} - \vec{M}) - \sigma \vec{v} \times (\nabla \times \vec{A}) = \vec{j}^e \quad (27)$$

Diese Gleichung wird im Rahmen der FEM-Simulation gelöst. Für die genaue Herleitung der Gleichung sei auf das Simulationshandbuch von COMSOL Multiphysics verwiesen.^[272]

Anhang D.2 Fluiddynamische Simulation

Die numerische Berechnung der Geschwindigkeitsverteilung in der Separationskammer wird unter der Annahme einer inkompressiblen Flüssigkeit gemacht. Dies ist für den vorliegenden Fall möglich, da sich während der Magnetseparation die Temperatur des Fluides kaum ändert und somit die Viskosität konstant bleibt. Damit vereinfacht sich die Kontinuitätsgleichung (basierend auf der Erhaltung der Massen) zu:^[272]

$$\rho \nabla \vec{u} = 0 \quad (28)$$

Zur Beschreibung der Strömungsverhältnisse im Inneren der Separationskammer wird die Navier-Stokes-Gleichung verwendet. Sie ist eine nichtlineare partielle Differentialgleichung, welche aus der Bewegungsgleichung und den vorherrschenden Kräften hergeleitet wird. Ihre Lösung gibt die Geschwindigkeitsverteilung u in einer Flüssigkeit als Funktion von Ort und Zeit an:^[272]

$$\rho \frac{\partial \vec{u}}{\partial t} + \rho (\vec{u} \cdot \nabla) \vec{u} = \nabla \cdot [-p \vec{I} + \eta (\nabla \vec{u} + (\nabla \vec{u})^T)] + \vec{F} \quad (29)$$

Die nachfolgenden Parameter müssen vor Beginn der Simulation definiert werden:

Die konstanten Eigenschaften des Fluides, hier Wasser:

- Temperatur $T = 293,15$ K;
- Fluidichte $\rho = 1.000$ kg/m³;
- Viskosität $\eta = 0,001$ Pa · s

Die Anfangsbedingungen am Kammereinlass:

- Einströmgeschwindigkeit: $v_0(x) = 0$; $v_0(y) = 0$; $v_0(z) = 0,04$ m/s
- Druck: $p = 10.000$ Pa



Die Bedingung am Kammerauslass:

- Druck: $p = 10.000 \text{ Pa}$

Anhang D.3 Kräfte auf Magnetpartikel

Um eine qualitative Aussage und Wertung über die Gitterorientierung und Gitterabstände innerhalb der Separationskammer treffen zu können, wurden die vorherrschenden magnetischen und hydrodynamischen Kräfte auf die Partikel berechnet (siehe Gleichungen (12) und (13)). Die Magnetische Feldstärke und die Fluidgeschwindigkeiten sind den Simulationen zur Magnetostatik und Fluidodynamik zu entnehmen. Alle weiteren eingesetzten Konstanten sind nachfolgender Aufzählung zu entnehmen:

- Suszeptibilität $\chi = 0,61$;
- Radius der magnetischen Komponente $r_p = 0,42 \cdot 10^{-6} \text{ m}$ (nur 60 % des Partikels bestehen aus Eisenoxid);
- Radius des gesamten Partikels $r_{p_{ges}} = 0,5 \cdot 10^{-6} \text{ m}$

Anhang D.4 Partikelbewegung

Es ist möglich Partikeltrajektorien zu berechnen. Hierzu muss zunächst die Fluidodynamische Simulation durchgeführt werden, die das Geschwindigkeitsfeld innerhalb der Kammer darstellt. Anhand dieser Simulation kann im nächsten Schritt die Bewegung der Partikel berechnet werden. Die Berechnung der Partikelbewegung beruht auf dem zweiten Newton'schen Gesetz der Bewegungsgleichung:

$$\vec{F} \left(t, \vec{r}, \frac{d\vec{r}}{dt} \right) = m \cdot \frac{d^2\vec{r}}{dt^2} \quad (30)$$

Die Kraft \vec{F} ist die Summe aller Kräfte, die auf die Partikel wirken während sie die Kammer passieren. Der Vektor \vec{r} gibt den Ort an, an dem sich das Teilchen zum Zeitpunkt t befindet. Für die Simulation der Bewegung der unmagnetischen Mikroorganismen ist lediglich die Kraft der Fluidbewegung beim Passieren durch die Kammer entscheidend. Die von der Software verwendete Gleichung ist in diesem Fall:^[273]

$$\vec{F} = \pi \cdot r_{p_{ges}}^2 \cdot \rho \cdot |\vec{u} - \vec{u}_p| \cdot (\vec{u} - \vec{u}_p) \cdot [1,84 \cdot Re^{-0,31} + 0,293 \cdot Re^{0,06}]^{3,45} \quad (31)$$

Wobei die Reynoldszahl Re definiert ist als:^[273]

$$Re = \frac{|\vec{u} - \vec{u}_p| \cdot 2 \cdot r_{Pges} \cdot \rho}{\eta} \quad (32)$$

Diese Gleichung gilt für den Fluidodynamischen Einfluss und beschreibt demnach nur die Bewegungen der nicht magnetisierbaren Partikeln. Um auch die Bahnen der magnetischen Partikel beschreiben zu können, muss in dem Simulationsmodell der Einfluss der magnetischen Kraft berücksichtigt werden. Die Kraft des Magnetfeldes (berechnet mit der Gleichung (12)) wird hierbei auf die in Gleichung (32) beschriebene Kraft addiert. In Abb. 137 ist das fluiddynamische Feld innerhalb der Kammer dargestellt (farbige Markierung der Flussgeschwindigkeiten) sowie die dazugehörigen Partikelbahnen, die an verschiedenen Stellen innerhalb der Kammer enden.

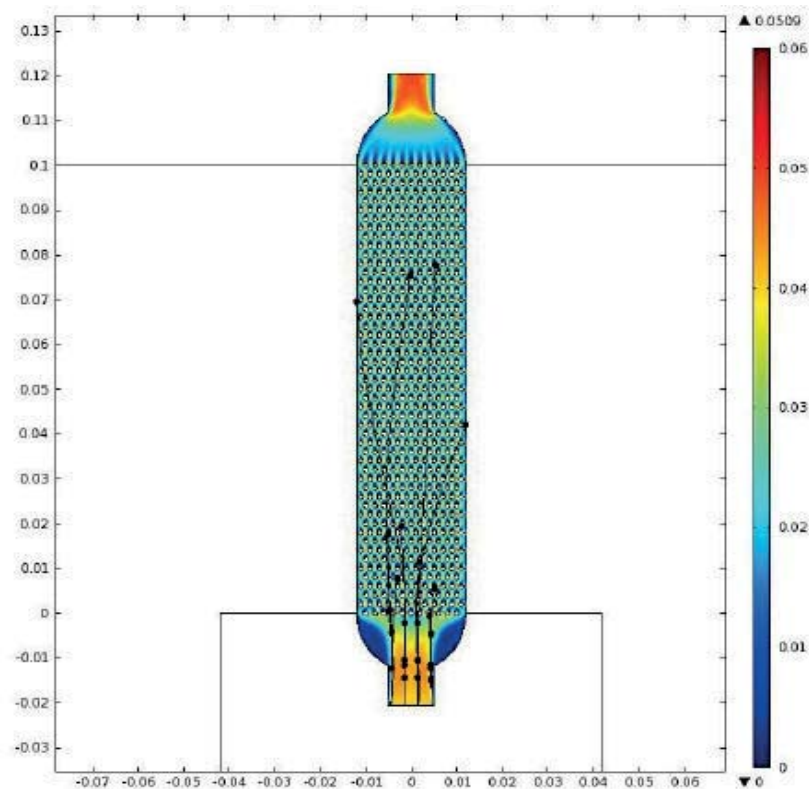


Abb. 137: Fluiddynamische Simulation des Geschwindigkeitsfeldes. Mit Hilfe der Farbskala auf der rechten Seite sind die verschiedenen Geschwindigkeiten innerhalb der Kammer dargestellt. Links und rechts der Kammer ist der magnetische Eisenjoch angedeutet. Zusätzlich zum Geschwindigkeitsfeld ist noch die Partikelbewegung dargestellt. Die schwarzen Linien zeigen den Weg der unten hereinfließenden Partikel bis hin zum Gitterstab, auf dem die Partikelbahn endet.



Anhang E Verwendete Adsorber- und Partikelsysteme

Kommerzielle Adsorber:

XAD 4: Polystyrolbasierte nicht ionische Beads mit Partikeldurchmesser zwischen 0,49 bis 0,69 mm, einer spezifischen Oberfläche von 850 m²/g und einer Porosität von 0,5 ml/ml.

Vorbehandlung: Waschen der Partikel mit Methanol, um die Salze für die Lagerung herauszuwaschen. Danach werden die Adsorber in deion. Wasser zur weiteren Verwendung gelagert und eingesetzt.^[274]

IRA 67: Schwach basischer unporöser Ionentauscher auf Acrylbasis mit einer spezifischen Oberfläche von 0,7 m²/g und tertiärem Amin als funktionelle Gruppe. Der Beaddurchmesser beträgt 0,3 bis 1,2 mm.

Vorbehandlung: Zunächst Waschen der Adsorber mit deion. Wasser, um auch hier Salze der Lagerung zu beseitigen. Danach werden die Adsorber mit 1 M NaOH vorbehandelt, um dann mit 1 M Essigsäure in die Acetat-Form überführt zu werden.^[275]

Orica: Stark basischer unporöser magnetisierbarer Ionentauscher mit einer spezifischen Oberfläche von 5,1 m²/g und tertiärem Amin als funktioneller Gruppe. Der mittlere Partikeldurchmesser beträgt 0,18 mm.

Vorbehandlung: Diese magnetisierbaren Beads liegen in Lösung vor und werden zunächst mit Wasser gewaschen und im Trockenschrank getrocknet. Anschließend erfolgt die gleiche Vorbehandlung wie bei IRA 67.

IRA 400: Stark basischer poröser Ionentauscher auf Polystyrolbasis und quartären Aminen als funktionelle Gruppe. Das Adsorberharz liegt in der Cl- Form vor. Der Beaddurchmesser beträgt 0,6 bis 0,75 mm.

Vorbehandlung: siehe IRA 67



InstrAction-Phasen:

ND11490: Silicagel mit optimierter Derivatisierung (Palmoylsäure + Sulfobenzoesäure);

CV11005: magnetisches Silicapartikel mit gleicher Derivatisierung wie ND 11490 ;

ND11835: gleiches Partikel wie CV11005 mit gleicher Derivatisierung und anschließender Acetylierung der restlichen Aminogruppen;

ND12195: gleiches Partikel wie CV11005 mit veränderter Derivatisierung (ohne Sulfonsäure-Gruppen)

Eine **Vorbehandlung** der instrAction-Phasen ist nicht notwendig. Die Partikelsysteme können direkt eingesetzt werden.

Periodisch Mesoporöse Organosilikate (PMO):

Die Adsorber wurden für ein Screening mit verschiedenen Verhältnissen von Phenolring zu Aminogruppe versehen. Die erste Zahl bei der Bezeichnung entspricht dabei dem Anteil an Aromaten und die zweite Zahl an Ionentauscher.

Silica 1-0: Ausschließlich aromatische Gruppen im Silica Netzwerk

Silica 1-1: 50 % Aromaten und 50 % Ionentauscher

Silica 1-2: 33 % Aromaten und 67 % Ionentauscher

Silica 1-5: 20 % Aromaten und 80 % Ionentauscher

Silica 1-10: 10 % Aromaten und 90 % Ionentauscher

Vorbehandlung: Zunächst Waschen der Partikel mit Wasser, danach Inkubation der Adsorber für 1 h in 1 M NaOH. Anschließend wird die Partikellösung mit Essigsäure neutralisiert und mehrmals mit Wasser gewaschen. Nach der Trocknung der Partikel im Trockenschrank können diese für die Adsorption von CPC eingesetzt werden.



Anhang F Verwendete Geräte

Gerät	Typ, Hersteller
Alternating-Gradient-Magnetometer	Fa. Princeton Measurements, New York, USA
ATR-MIR-Spektrometer	Spectrum 100 Universal Perkin-Elmer
Aufnahmesoftware	WISSOFT 2003; Wissenschaftliche Elektronik
Mössbauerspektroskopie	
Autosampler	AS 2000A, Merck-Hitachi
Bioreaktor 1 L	Miniforce
Brechungsindexdetektor	RID-6A, Shimadzu
Durchflusskattrusche	
Fermenter	BioStat®Q, B. Braun Biotech International
Fluoreszenzspektrometer	Perkin-Elmer LS-55
FPLC	Bio-Rad, Duoflow. Inkl. Fraktionssammler
Funktionsgenerator	Mössbauer Driving Unit MRG-500;
Mössbauerspektroskopie	Wissenschaftliche Elektronik
Hochgradienten-Magnetseparator	HGF-10
HPLC Säule Organische Säuren	Reprogel-H ⁺ , 300 x 4,6 mm; Dr. Maisch
HPLC Säule Zuckanalytik	Reprogel-Ca ²⁺ , 300 x 8 mm; Dr. Maisch
HPLC-Komplettsystem	Separations Module 2695, Waters, Auswertesoftware Empower
HPLC-Pumpe	L 7100, Merck-Hitachi
Inkubatoren	BD 53; Binder
Kryostat Mössbauerspektroskopie	Optistat DN; Oxford Instruments
Lichtmikroskop	
Mikrotiterplattenphotometer	Bio Tek
MS-Stufe	Waters Micromass Quattro LC
Particle Charge-Detektor	Mütek BTG PCD-PH03
Partikelgrößenverteilung	
Streulichtanalyse	Horiba LA-950, Retsch Technology
Permanentmagnete	Neodym Supermagnete
Probenahmesonde	
Raman-Spektrometer	
Rasterelektronenmikroskop	Firma JOEL
Rotor für 50 ml Reaktionsgefäße	Hermle Labortechnik
Säule Katalyse im Durchfluss	UNO-Q1-Säule



Schrittmotoren	
Simulationssoftware	Comsol Multiphysics Berkley Madonna Chemaxon Marvin Sketch Version 5.3.1 GAUSSIAN
Software PCD	Lab X
Spritzenpumpe	KDS 100, KD Scientific
Thermomixer	TS-100, Biosan
Thermoschrank	
Titration	Schott Instruments TL Alpha 20
Überkopfschüttler	Multi Bio RS-24, Biosan
UV/DAD-Detektor	Photodiode Array Detector 2996, Waters
UV/Vis-Spektrophotometer	Cary 50 Bio, Varian Inc. Perkin-Elmer Lambda Bio+UV
Vielkanalanalysator	
Mössbauerspektroskopie	CMCA-550; Wissenschaftliche Elektronik
Zentrifuge	Hermle Labortechnik



Anhang G Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Angaben	Hersteller
16-Mercaptohexadecanoic acid	Nanothinks	Sigma-Aldrich
3-Mercapto-propyl-trimethoxysilan		Sigma-Aldrich
5,5-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)	Ellman's Reagenz	Sigma-Aldrich
ABTS (2,2`-Aza-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure))		Sigma-Aldrich
Aceton	99,8 % zur Analyse	Chemikalienausgabe Uni-KL
Aluminiumnitrat-Nonahydrat	98,5 %	Sigma-Aldrich
Aluminiumoxid Granulat	Träger EXM 2181	Süd-Chemie
Ameisensäure	p.A. 98 %	Chemikalienausgabe Uni-KL
Ammoniak	Lösung Reinst 25 %	Chemikalienausgabe Uni-KL
Ammoniumsulfat	99,5 %	Chemikalienausgabe Uni-KL
BSA	Lyophilized powder; ≥ 96 %	Sigma-Aldrich
Calciumcarbonat	p.A. 99 %	Chemikalienausgabe Uni-KL
Calciumchlorid	Dihydrat; 147,12 g/mol	Chemikalienausgabe Uni-KL
Carboxymethylcellulose	Natriumsalz hohe Viskosität	Sigma-Aldrich
Cellulasekomplex	Lyophilized powder from <i>Apergillus niger</i> 0,3 units/mg solid	Sigma-Aldrich
Cellulose	Faser lang	Sigma-Aldrich
Cellulosefilter	Regenerierte Cellulose; 45 µm	Albet Labscience
Cephalosporin C	Zinksalz	Sigma-Aldrich
L-Cystein	97 %	Sigma-Aldrich
di-Natriumhydrogenphosphat	p.A. 99 % wasserfrei	Chemikalienausgabe Uni-KL
EDC	Kristallin 99 %	Sigma-Aldrich
Eisenchlorid (II)-Tetrahydrat	p.A. 99,9 %	Chemikalienausgabe Uni-KL
Eisenchlorid (III)-Hexahydrat	p.A. 98-102 %	Chemikalienausgabe Uni-KL
Ethanol	99,9 % f. Spektroskopie	Chemikalienausgabe Uni-KL
D-Fructose	99 % wasserfrei	Sigma-Aldrich
D-Glucose	99 % Wasserfrei	Chemikalienausgabe Uni-KL
Glucoseoxidase	Lyophilized powder from <i>Aspergillus niger</i>	Sigma-Aldrich
D-Gluconsäure	Natriumsalz 99 %	Sigma-Aldrich
D-Glucuronsäure	98 %	Sigma-Aldrich



Goldkolloid (kommerziell)	0,01 % H _{Au} Cl ₄ Durchmesser 5 nm	Sigma-Aldrich
Goldsäure (Gold(III) chlorid hydrate)	~52 % Au Basis	Sigma-Aldrich
Hydroxylamin	99,9 %	Sigma-Aldrich
Imipenem		Sandoz
Kaliumchlorid	p.A. 99,5 %	Chemikalienausgabe Uni-KL
Kalium-di-hydrogenphosphat	p.A. 99,5 %	Chemikalienausgabe Uni-KL
D-Mannose	99,5 %	Sigma-Aldrich
MES	Monohydrat, Pufferqualität	Applichem
Methanol	99,9 % zur Analyse	Chemikalienausgabe Uni-KL
Natriumchlorid	p.A. 99,8 %	Chemikalienausgabe Uni-KL
Natriumcitrat	p.A. 99 % wasserfrei	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid	Plättchen zur Analyse	Chemikalienausgabe Uni-KL
N-Hydroxysuccinimide (NHS)	98 %	Sigma-Aldrich
Nylonfilter	Nylon (PA); 0,2 µm	MedChrom GMBH
Peroxidase	Lyophilized powder; ≥ 96 %	Sigma-Aldrich
Salzsäure		Chemikalienausgabe Uni-KL
Schwefelsäure	p.A. 95-97 %	Merck
Silbernitrat	p.A. 99,8 %	Chemikalienausgabe Uni-KL
D-Sorbitol	98 %	Sigma-Aldrich
Tetraethylorthosilicat	99,99 %	Sigma-Aldrich
Tris	Herstellung von Puffer p.A. 99,9 %	Chemikalienausgabe Uni-KL
Tween 20		Sigma-Aldrich
β-Glucosidase	NS 22118	Novozymes



Anhang H Verwendete Puffer und Lösungen

Immobilisierung Au/Fe-Partikel:

Waschpuffer (Immobilisierung):

MES-Puffer 0,1 M pH 5

Aktivierungspuffer (Immobilisierung):

MES-Puffer 0,1 M pH 5 + 40 g/L EDC + 40 g/L NHS

Kopplungspuffer PBS (Immobilisierung) pH 7,4:

5 g/L Natriumchlorid

0,2 g/L Kaliumchlorid

1,44 g/L di-Natriumhydrogenphosphat Na_2HPO_4

0,24 g/L Kalium-di-hydrogenphosphat KH_2PO_4

Wasch-Kopplungspuffer:

Kopplungspuffer + 0,05 % Tween 20

Blockierpuffer:

0,1 M Tris-Puffer

ABTS Assay:

Benötigt werden ein 0,1 M KPP-Puffer und eine ABTS-Stammlösung

Für 50 ml **KPP-Puffer** wird benötigt:

421 mg KH_2PO_4 Kaliumdihydrogenphosphat

332 mg K_2HPO_4 Dikaliumhydrogenphosphat

Für **ABTS-Stammlösung** (10 g/L) wird benötigt:

5 mg ABTS (Feststoff)

0,5 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

Für den **ABTS-Puffer** werden 0,125 ml ABTS-Stammlösung mit KPP-Puffer auf 12,5 ml Gesamtlösung aufgefüllt. Der ABTS-Puffer reicht für 50 Messungen.





Anhang I Angaben zur Person

Anhang I 1 Betreute Studien-, Diplom- und Masterarbeiten

Gaoping Wang, Synthese von magnetisierbaren Polyvinylalkoholpartikeln unter Enzymeinschluss, Studienarbeit (2009).

Slobodanka Maurer, Selektive Abtrennung von beta-Lactam-Antibiotika, Diplomarbeit (2010).

Erik Enderle, Synthese magnetisierbarer Polymer- und Silicatpartikel im μm -Bereich, Studienarbeit (2010).

Benjamin Barth Umsatz von Glucose durch magnetisch abtrennbare Gold-Nanopartikel-Katalysatoren, Studienarbeit (2011)

Jens Trampert, Synthese magnetisierbarer Partikel zur Glucoseoxidation, Studienarbeit (2011).

Ming Zhang, Selektive Abtrennung von β -Lactam-Antibiotika (Cephalosporin C), Diplomarbeit (2011).

Hui Fan, Synthese und Anwendung magnetisierbarer Katalysatoren zur selektiven Zuckeroxidation, Masterarbeit (2011).

Eva Hackemann, Adsorption von beta-Lactam Antibiotika und Optimierung der magnetischen Filtration, Studienarbeit (2011).

Markus Kolano, Magnetische Abtrennung von β -Lactam-Antibiotika sowie Aufbau und Bilanzierung einer Anlage im Labormaßstab, Studienarbeit (2012).

Alejandro López Soriano, Integration of High-Gradient Magnetic Separation in Lactam Fermentation Process, Masterarbeit (2012).

Anhang I 2 Veröffentlichungsliste

Vorträge:

A. Pasteur, S. Dillenberger, V. Schünemann, R. Ulber, Funktionalisierte magnetische Nanopartikel. Jahrestagung der Biotechnologen (2009-09-09) Mannheim

A. Pasteur, N. Tippkötter, Darstellung und Einsatzbeispiele magnetischer Partikelsysteme. Tandemvortrag Nanokat Workshop (2009-10-08) Potzberg

A. Pasteur, B. Ludwig, S. Maurer, N. Tippkötter, P. Singer, C. Meyer, S. König, K. Gottschall, P. Kampeis, R. Diller, R. Ulber, Entwicklung selektiver Adsorbermaterialien zur Aufarbeitung von β -Lactamantibiotika. Bioprozessorientiertes Anlagendesign (2010-05-12) Nürnberg



A. Pasteur, Magnetpartikel: Anwendungspotential in der Bioverfahrenstechnik. Eingeladener Vortrag (31-08-2012) Leibniz-Institut für neue Materialien (INM) Saarbrücken

A. Pasteur, Magnetic particles: Application possibilities in bioprocess engineering. Eingeladener Vortrag BASF SE Ludwigshafen (10.2012)

Posterbeiträge:

A. Pasteur, R. Christmann, S. Dillenberger, J. A. Wolny, V. Schünemann, R. Ulber, Functional Au-Fe₃O₄-Nanoparticles: Synthesis and Characterisation. Workshop Nanokat (2009-01-23) Kaiserslautern

A. Pasteur, B. Ludwig, S. Maurer, N. Tippkötter, P. Singer, Ch. Meyer, K. Gottschall, P. Kampeis, R. Diller, R. Ulber, Entwicklung selektiver Adsorbermaterialien zur Aufarbeitung von beta-Lactamantibiotika. Bioprozessorientiertes Anlagendesign (2010-05-10) Nürnberg

A. Pasteur, B. Ludwig, S. Maurer, N. Tippkötter, P. Singer, Ch. Meyer, K. Gottschall, P. Kampeis, R. Diller, B. König, R. Ulber, Aufarbeitung von beta-Lactamantibiotika mittels selektiver, magnetischer Adsorbermaterialien. DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen (2010-09-21) Aachen

A. Pasteur, B. Barth, N. Tippkötter, R. Ulber, Immobilisierte Gold-Nanopartikel für die Umsetzung von Glucose zu Gluconsäure. NanoKat Frühjahrstagung (2011-04-14) Kaiserslautern

A. Pasteur, B. Ludwig, P. Singer, N. Tippkötter, C. Meyer, P. Kampeis, R. Diller, R. Ulber, Synthese magnetisierbarer Nanopartikel-Silicabeads zur Abtrennung von β -Lactam-Antibiotika aus Fermentationsmedien. NanoKat Frühjahrstagung (2011-04-14) Kaiserslautern

A. Pasteur, B. Barth, N. Tippkötter, R. Ulber, Entwicklung magnetisierbarer Goldkatalysatoren für die selektive Oxidation von Zuckern und Zuckersäuren in der magnetischen Wirbelschicht. Vortrags- und Diskussionstagung: Bioverfahrenstechnik an Grenzflächen (2011-05-29) Potsdam

A. Pasteur, B. Barth, H. Fan, N. Tippkötter, R. Ulber, Investigation of magnetisable gold catalysts for the selective, continuous oxidation of sugar to its sugar acid in a magnetically fluidised bed. European Congress of Chemical Engineering (2011-09-25) Berlin

A. Pasteur, B. Ludwig, M. Zhang, N. Tippkötter, P. Singer, R. Diller, B. König, P. Kampeis, R. Ulber, Purification of beta-Lactam antibiotics with magnetisable particle systems. European Congress of Applied Biotechnology (2011-09-25) Berlin

N. Tippkötter, J. Hartmüller, A. Pasteur, P. Kampeis, P. Welters, L. à Brassard, U. Habich, R. Ulber, Bioaffinity Layering magnetisierbarer Mikro- und Nanopartikel, 14. Heiligenstadter Kolloquium (2008)

N. Tippkötter, V. Schünemann, R. Christmann, A. Pasteur, J. Schweizer, R. Ulber; Different magnetizable particles for bioaffinity layering; European BioPerspectives (2008) Hannover; Book of Abstracts 253



N. Tippkötter, S. Maurer, A. Pasteur, P. Kampeis, R. Ulber; Hochgradient-Magnetseparation von Fermentationsprodukten - Finite Elemente Simulation der Filtermatrix; DECHEMA-Jahrestagungen (2010-09-21) Aachen

N. Tippkötter, A. Pasteur, P. Kampeis, R. Ulber; Fluid dynamic simulations for improved high gradient magnetic separation of beta-lactam producing fungi; European Congress of Chemical Engineering and Applied Biotechnology (2011-09-25) Berlin

N. Tippkötter, S. Wollny, A. Pasteur, R. Ulber; Biofunktionalisierte Nano- und Mikropartikel für ernährungsrelevante und medizinische Anwendungen; Tag der Forschung und Technologie (2011-11-29) Mainz

C. Schlegel, A. Pasteur, C. Müller, I. Reichenbach, C. Ziegler, J. Aurich, K. Muffler, R. Ulber, Biofilme auf mikrostrukturierten Metalloberflächen als immobilisierte Produktionssysteme; GVC/DECHEMA Vortrags- und Diskussionstagung - Biopharmazeutische Produktion (2012-05-14) Freiburg

C. Schlegel, N. Wesuls, A. Pasteur, C. Müller, I. Reichenbach, C. Ziegler, J. Aurich, K. Muffler, R. Ulber, Mikrostrukturabhängige Bildung extrazellulärer Substanzen von Biofilmen auf Metalloberflächen; DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen (2012-09-10) Karlsruhe

N. Tippkötter, A. Pasteur, R. Ulber; Magnetisch abtrennbare Gold-Nanopartikel zur katalytischen Zuckeroxidation; DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen (2012-09-10) Karlsruhe

N. Tippkötter, A. Pasteur, C. Meyer, P. Kampeis, R. Diller, R. Ulber; Aufreinigung von Cephalosporin C durch poröse, selektiv-beschichtete Magnetpartikel; DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen (2012-09-10) Karlsruhe

Publikationen in Journals:

A. Pasteur, K. Muffler, N. Tippkötter, R. Ulber, C. Meyer, R. Diller, P. Kampeis, B. König, Entwicklung selektiver Adsorbentmaterialien zur Aufarbeitung von beta-Lactamantibiotika. ChemBioTec Review (2011-07-01)

A. Pasteur, N. Tippkötter, R. Ulber; Optimization of HGMS-Chamber for Purification of biotechnological products (2014) (eingereicht).



Anhang I 3 Lebenslauf

Zur Person

Aline Melanie Pasteur
geboren am 30.08.1982 in Paris
als Tochter von Gabriele Pasteur geb. Schäfer und Gilles Pasteur

Schulische Ausbildung

09/1994-03/2002 St.-Franziskus-Gymnasium Kaiserslautern

04/2002-09/2002 Studium Diplom Physik an der Technischen Universität Kaiserslautern

10/2002-12/2008 Studium Diplom Biophysik im Fachbereich Physik an der Technischen Universität Kaiserslautern; 12/2008 Abschluss als Diplom Biophysiker am Lehrstuhl für Biophysik und Medizinische Physik (Prof. Schönemann)

Beruflicher Werdegang

07/2006-03/2008 Studentische Aushilfe im physikalischen und chemischen Materialprüfungslabor der Corning GmbH Einsiedlerhof

01/2009-12/2009 Promotionsstipendium der Technischen Universität Kaiserslautern am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik (Prof. Ulber)

01/2010-03/2012 Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Technischen Universität Kaiserslautern am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik (Prof. Ulber)

Seit 12/2012 Senior Automation Engineer in der Prozessanalysetechnik der BASF SE Ludwigshafen



