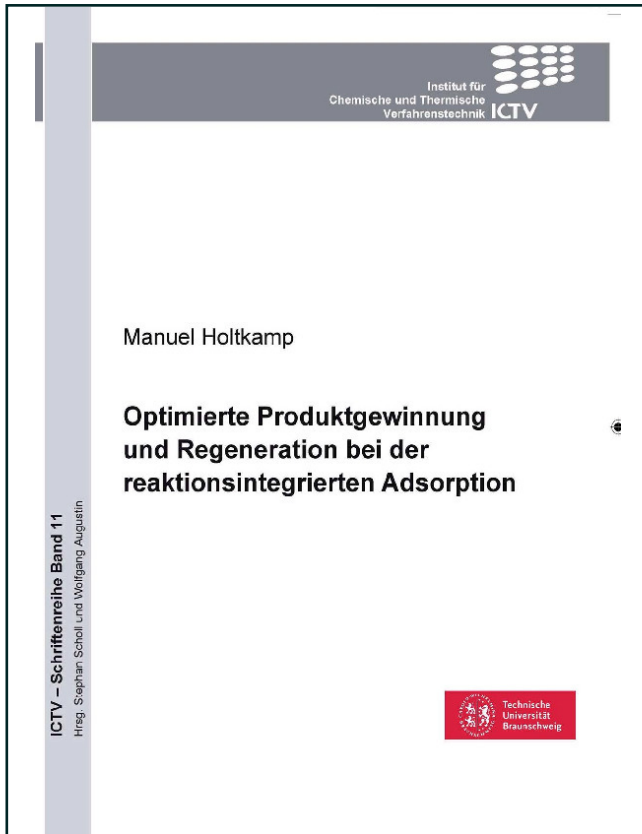




Manuel Holtkamp (Autor)
**Optimierte Produktgewinnung und Regeneration bei der
reaktionsintegrierten Adsorption**



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/225>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

1 Einleitung und Problemstellung

Die Nutzung von Mikroorganismen oder Enzymen ist in den letzten Jahren durch erhebliche Fortschritte in der Biotechnologie, Bioprozesstechnik und Bioverfahrenstechnik gestiegen. Das Potential ist aber noch deutlich größer [42]. Diese Technologien gelten als Schlüssel für weitere Innovationen [70]. Die Aufarbeitung biotechnologischer Produkte hat dabei eine besondere Bedeutung. Das so genannte Downstream Processing (DSP), also die Aufarbeitung des Zielprodukts, verursacht häufig den größten Teil der Gesamtproduktkosten [37]. Dies ist zum einen durch die Prozessbedingungen biotechnologischer Produkte bedingt. Häufig liegt das Produkt in geringen Konzentrationen und als Gemisch mit einer Vielzahl von weiteren Komponenten, mit teilweise sehr ähnlichen Eigenschaften vor. Zum anderen konnten in den letzten Jahren auf diesem Gebiet weit weniger Fortschritte erzielt werden als beim Upstream Processing, der Kultivierung oder der enzymatischen Umsetzung. Dies führte dazu, dass die Aufarbeitung anteilmäßig immer kostenintensiver wurde [126].

In der hier vorgestellten Arbeit wird ein Prozesssystem zur enzymatischen Produktion von Kohlenhydraten untersucht. Seltene Kohlenhydrate oder neuartige Saccharide haben vielfältige Eigenschaften und sind im Life Science Bereich von großem Interesse. Im vorliegenden Modellsystem wird das schwer zu reinigende Disaccharid Isomaltose, aus Saccharose (Haushaltszucker) und Glukose (Traubenzucker) produziert. Um Folgereaktionen zu verhindern und eine Produktabtrennung während der Reaktion zu ermöglichen wird ein hochdealuminierter BEA-Zeolith als Adsorbens verwendet. Im Reaktorsystem befinden sich somit zwei feste Phasen, der Biokatalysator und das Adsorbens, sowie als flüssige Phase das Reaktionsmedium. Apparativ wird dieser Prozess in einem Wirbelbettreaktor (Slurryanwendung), dem Mehrphasenbioreaktionsadsorber (MBRA), realisiert. Dieses Konzept wurde bereits etabliert und in mehreren Arbeiten untersucht [14, 49, 50].

Isomaltose kommt in der Natur z.B. in Honig vor. Es kann durch Spaltung von Polymeren wie Dextran oder Amylopectin entstehen. In beiden Fällen liegt Isomaltose dann in einem Gemisch mit anderen Sacchariden vor. Da die Konzentration von Isomaltose dabei teilweise sehr gering ist, lohnt eine Aufarbeitung aus diesen Quellen nicht. Die in diesem Projekt angestrebte gezielte enzymatische Synthese von Isomaltose soll zu einer Produktlösung führen, aus der Isomaltose leicht aufgereinigt werden kann. Dies wird durch verschiedene Prozessbedingungen angestrebt. Zum einen sollen nur die Edukte Saccharose und Glukose eingesetzt werden. Dadurch reduziert sich die Vielfalt der entstehenden Verbindungen. Zum

anderen wird durch die Adsorption während der Produktion mit der Aufarbeitung der Isomaltose begonnen. So kann das entstehende Produkt Isomaltose kontinuierlich aus dem Synthesereaktor ausgeschleust werden und steht für Folgereaktionen nicht mehr zur Verfügung.

Die Problemstellung dieser Arbeit liegt im Design und der Optimierung der Aufarbeitung. Abbildung 1.1 zeigt das Prozessschema der Verfahrensstufen, die für diese Aufarbeitung von Interesse sind und genau charakterisiert werden müssen. Die grau unterlegten Prozessschritte sind die Schwerpunkte dieser Arbeit. Das Adsorbens wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten [14, 49] ausgewählt und charakterisiert. Eine Betrachtung der Kinetik und der Adsorptionenthalpie erfolgte jedoch nicht und wird deshalb in dieser Arbeit untersucht.

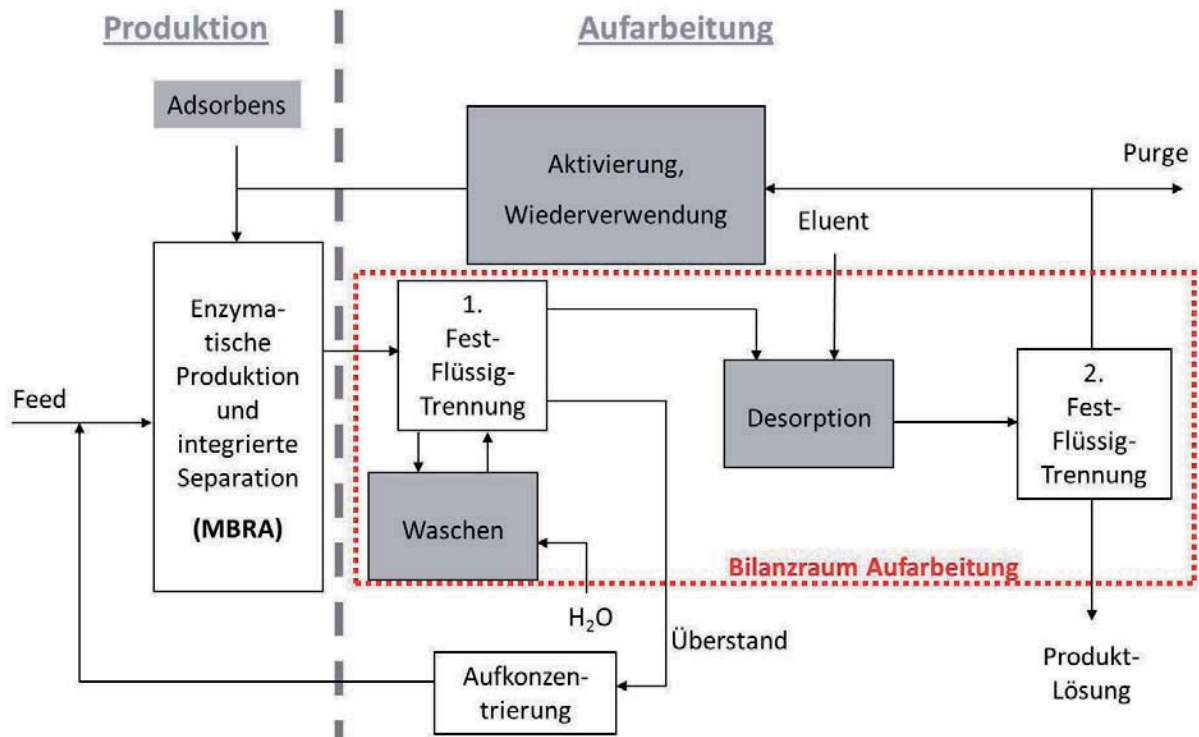


Abbildung 1.1: Prozessschema der Produktion und Aufarbeitung

In dieser Arbeit wird als Ausbeute nur die Effizienz der Aufarbeitung betrachtet. Dazu wird der in Abbildung 1.1 markierte Bilanzraum Aufarbeitung verwendet. Um die Gesamtausbeute des Prozesses zu untersuchen, müsste die Produktion ebenfalls mit bilanziert werden und die Ausbeute auf die eingesetzte Substratmenge bezogen werden. Hierauf wird jedoch verzichtet. Die Effizienz der enzymatischen Systeme wurde von Erhardt [50] untersucht.

Die Aufarbeitung beginnt mit der Ausschleusung der beladenen Zeolithe aus dem MBRA. In einer ersten Fest-Flüssig-Trennung (FFT) werden die Zeolithe aus der Reaktionslösung abgetrennt. Je mehr Reaktionslösung abgetrennt werden kann, desto mehr kann davon für eine erneute Reaktion verwendet werden und desto weniger Waschaufwand ist nötig. Je nach verwendetem Enzymsystem liegt die Glukosekonzentration in der Reaktionslösung bei bis zu $500 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Bei so hohen Saccharidkonzentrationen ist die Abtrennung eines feindispersen Adsorbens eine Herausforderung für die Auslegung einer geeigneten Fest-Flüssig-Trennung. Die Restfeuchte im Filterkuchen der Zeolithe enthält noch unreaktierte Edukte und Nebenprodukte, die vor der Desorption entfernt werden müssen. Als Konsequenz muss nach der ersten FFT eine geeignete Waschprozedur durchgeführt werden, um die im Zwickel verbliebene Flüssigkeit durch unbeladenes Wasser zu ersetzen. Dabei sollten die Bedingungen so gewählt werden, dass es nicht zu einer vorzeitigen unerwünschten Desorption der adsorbierten Isomaltose kommt. Zur Verbesserung der Wirtschaftlichkeit werden abgetrennte Reaktionslösung und Waschlösungen in geeigneten Verfahren (z.B. Vakuumdestillation, Fallfilmverdampfer) behandelt und aufkonzentriert, so dass sie dem Feed zugeführt werden können.

Zum Abschluss der Waschprozedur wird der beladene Zeolith zunächst der ersten FFT und dann einer Desorptionsstufe zugeführt. Hier müssen geeignete Parameter für eine möglichst effektive, aber auch schonende Desorption gefunden werden. Diese Untersuchung der Desorption ist das primäre Ziel dieser Arbeit. Für die Auslegung der Desorption werden kinetische Aspekte untersucht. Verschiedene Desorptionsverfahren werden analysiert und gegenübergestellt. Eine vollständige Desorption minimiert Ausbeuteverluste und erleichtert die spätere Wiederverwendung des Adsorbens.

Um den entladenen Zeolithen dann von der Produktlösung abzutrennen ist eine zweite FFT erforderlich. Eine möglichst komplette Entfernung der Produktlösung reduziert auch hier Ausbeuteverluste und vereinfacht die weitere Nachbehandlung für eine Wiederverwendung der entladenen Zeolithe. Gleichzeitig soll die erhaltene Produktlösung frei von Zeolithpartikeln sein, um die finale Formulierung durch z.B. Gefriertrocknung nicht zu beeinflussen. In der Aktivierung und Wiederverwendung der Zeolithe müssen geeignete Verfahren untersucht werden, die eine häufige Wiederverwendung der Zeolithe ermöglicht.

Als Verfahrensalternative zur Slurryanwendung im MBRA werden in dieser Arbeit Untersuchungen an vergrößerten Zeolithformkörpern (Extrudaten) durchgeführt. Auch hier ist eine genaue Charakterisierung der adsorptiven Eigenschaften wie der Selektivität, der Kapazität und der Kinetik erforderlich.

2 Stand des Wissens

2.1 Kohlenhydrate

Kohlenhydrate, Saccharide oder einfach nur Zucker genannt, sind die mengenmäßig am häufigsten vorkommenden organischen Moleküle auf der Welt [13]. Sie gehören zu der Klasse der Polyhydroxyaldehyde oder -ketone und können im Allgemeinen durch die Summenformel $(\text{CH}_2\text{O})_n$ beschrieben werden [136].

Für biologische Systeme haben Kohlenhydrate bedeutende Funktionen [128, 152]. So besteht das Rückgrat der DNA aus 2-Desoxyribose [3]. Proteine erhalten häufig erst nach ihrer Synthese spezielle Saccharidbausteine, die den als Glycoproteinen bezeichneten Molekülen ihre Struktur geben und ihre Funktion ermöglichen [160]. Auch Fette können mit Sacchariden gekoppelt sein. Diese Glycolipide können synthetisch hergestellt werden und zeigen in modifizierter Form eine erhöhte immunstimulierende Wirkung [99]. Des Weiteren erkennen sich Zellen über bestimmte Zuckerstrukturen an deren Oberfläche. Kohlenhydrate spielen deshalb eine wichtige Rolle bei der Zellkommunikation [141]. All diese Eigenschaften rücken Kohlenhydrate ins Interesse der Forschung, um neue Impfstoffe [1] und Medikamente [140], aber auch Nahrungsmittelzusätze [102] oder Kosmetika [79] zu entwickeln.

Auch für die chemische Industrie sind Kohlenhydrate, die aus Speicherstoffen wie Stärke, Glykogen oder Cellulose stammen, interessant. Grund ist der steigende Ölpreis und die damit verbundene Substituierung fossiler Ölquellen durch regenerative [43, 70, 112].

Kohlenhydrate bieten durch eine Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten ein nahezu unerschöpfliches Potential. So sind vor allem neuartige Saccharide, die in der Natur nicht oder nur sehr selten vorkommen, interessant, um neue Anwendungsmöglichkeiten zu erschließen. Dabei sind die Herstellungsmethoden für synthetische Kohlenhydrate sehr teuer und zeitaufwändig [53]. Auch wenn es inzwischen möglich ist, diese Moleküle durch chemische Synthesen herzustellen [123], sind diese Methoden noch nicht für große Maßstäbe geeignet. Einen Überblick über die enzymatische Synthese von Oligosacchariden bieten Buchholz und Seibel [24]. Zur gezielten Herstellung dieser Oligomeren (ein bis zehn Monomerbausteine) sind Mono- und Disaccharide als sogenannte „Building Blocks“ von erhöhtem Interesse. Diese müssen sowohl in größeren Mengen, als auch in hoher Reinheit zur Verfügung gestellt werden können [140].

An diesem Punkt setzt diese Arbeit an. Mit dem Disaccharid Isomaltose soll ein Modellsystem untersucht werden, um einen Beispielprozess für eine günstige enzymatische Synthese eines Building Blocks zu etablieren. Der Aufarbeitung kommt dabei eine besondere

Bedeutung zu, denn verschiedene Kohlenhydrate lassen sich häufig aufgrund ihrer sehr ähnlichen Eigenschaften nur schwer voneinander trennen.

2.2 Isomaltose, Dextran und Enzyme

Isomaltose kommt relativ häufig in der Natur vor, z.B. in Honig, jedoch immer im Gemisch mit anderen Sacchariden [118]. Eine Verknüpfung der Isomaltose mit weiteren Glukose- oder Isomaltosemolekülen führt zu den sogenannten Isomaltoseoligomeren (IMOs). Dabei handelt es sich um Mehrfachzucker, die aus den Glukose-Grundbausteinen bestehen und alle α -1-6-glycosidisch verknüpft sind. Einen Überblick über die Nutzung von Oligosacchariden geben Buchholz und Seibel [61]. Diesen IMOs werden präbiotische Eigenschaften zugeschrieben [96, 101, 110]. Präbiotika sind Substanzen, die vom Menschen nicht verdaut werden können, aber nützliche Mikroorganismen im Darm unterstützen. Untersuchungen an Masthähnchen zeigten einen positiven Einfluss auf die Darmflora der Tiere, wenn IMOs dem Futter zugemischt werden [148, 163]. In Japan werden IMOs aus Stärke schon seit längerem als Süßungsmittel verwendet. Studienergebnisse aus Humanstudien (Interventionsstudien) sind selten, da die Kosten für aufgereinigte IMOs sehr hoch sind. Eine Untersuchung an Senioren, die an träger Darmtätigkeit litten, zeigte, dass durch Zugabe von IMOs während einer Diät eine Besserung erreicht werden kann [33].

Isomaltose in Reinform könnte, sobald sie günstig produziert werden kann, eine gezielte Herstellung der gewünschten IMOs erleichtern [71] und so eine genauere Untersuchung in klinischen Studien ermöglichen. Gegenwärtig liegen die Preise für Isomaltose zwischen $154 \text{ €}\cdot\text{g}^{-1}$ (Cosmo Bio Co., LTD, Japan, 2010) und $620 \text{ €}\cdot\text{g}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, 2010).

Isomaltose wurde in jüngster Zeit mit Isomalt in Verbindung gebracht oder mit Isomaltulose verwechselt. Isomalt (ein Zuckeraustauschstoff) ist ein Zuckeralkohol aus 1-O- α -D-Glucopyranosyl-D-mannit und 6-O- α -D-Glucopyranosyl-D-sorbit. Isomaltulose (Palatinose[®]) ist eine Verknüpfung von Glukose und Fruktose (6-O- α -D-Glucopyranosyl-D-fructose), die nicht kariogen wirkt und von der Europäischen Union im Jahr 2005 als neuartiges Lebensmittel oder –zusatz zugelassen wurde [78].

Isomaltose ist laut Herstellerangaben leicht reizend (Sigma-Aldrich), geht bei hohen Konzentrationen in einen amorphen Zustand über [121] und besitzt eine geringere Süßkraft als Isomaltulose [134]. Isomaltose werden nichtkariogene und antimikrobielle Eigenschaften zugeschrieben [85]. In der Medizin kommt der Begriff Isomaltose in einer seltenen Form einer Kohlenhydratmalabsorption vor [113, 127]. Dabei handelt es sich um eine Stoffwechselstörung durch einen Mangel des Enzyms Saccharase.

Das Disaccharid Isomaltose ($C_{12}H_{22}O_{11}$), (CAS Nummer: 499-40-1), Chemical Structure (CID 439 193) besteht aus zwei Glukoseeinheiten, welche α -1-6-glycosidisch miteinander verbunden sind [40, 62].

Neben der korrekten IUPAC Bezeichnung beschreibt O^6 - α -D-Glucopyranosyl-D-glucose die Struktur der Isomaltose eindeutig [103]. Die Verknüpfung von zwei Glukosemolekülen über eine Alkoholgruppe und eine Hemiacetal-Hydroxylgruppe lässt elf mögliche Variationen zu [131]. Aufgrund dieser äußerst ähnlichen Strukturen ist eine Trennung sehr schwierig. Die Struktur der Isomaltose ist in Abbildung 2.1 zusammen mit Gentiobiose, ebenfalls 1-6 verknüpft, aber in β -Stellung dargestellt.

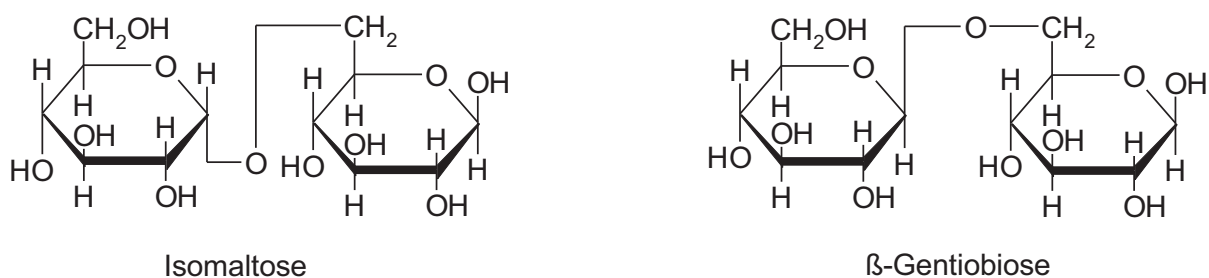


Abbildung 2.1: Struktur von Isomaltose und Gentiobiose [159]

Gentiobiose wird gelegentlich auch als β -Isomaltose bezeichnet. Die Struktur und die Eigenschaften dieser glycosidischen Bindung sind durch quantenmechanische Methoden berechnet worden [82].

Die erste wissenschaftliche Erwähnung der Isomaltose durch Emil Fischer geht auf das Jahr 1890 zurück [55]. Fischer versetzte D-Glukose mit konzentrierter Salzsäure. Aus dem entstandenen Sirup isolierte er durch Behandlung mit Phenylhydrazin ein neues Osazon. Aus dessen Eigenschaften leitete er ab, dass der neue Zucker ebenso wie Maltose konstruiert ist. Maltose ist aber α -1-4 verknüpft und im Gegensatz zu Isomaltose durch Hefen vergärbar und kristallisierbar [121].

Neben Fischer publizierten auch weitere Autoren wie C.J. Lintner die Entdeckung von „Isomaltose“ [22], deren Beschreibung sogar in den Lexika Meyers [108] und Brockhaus [20] zu finden waren. Lintner erzeugte „Isomaltose“ durch eine Hydrolyse von Stärke durch Diastase [48]. Deren Eigenschaften, Vorkommen und Entstehen wurden kontrovers diskutiert [116, 125]. Es stellte sich dabei jedoch heraus, dass Lintner keine Isomaltose, sondern ein Gemisch aus Maltose und Dextrin hergestellt hatte, das er aufgrund der damaligen Analysemöglichkeiten fälschlicherweise für Isomaltose hielt.

Aus dieser Zeit stammen andere Bezeichnungen wie z.B. Dextrinose. Auch Melibiose (CAS Nummer: 585-99-9) wird gelegentlich als Synonyme für Isomaltose verwendet, hierbei

handelt es sich jedoch um eine Verknüpfung von Glukose und Galaktose, die ebenfalls wie Isomaltose α -1-6 glycosidisch verbunden ist [40].

In der α -1-6-glycosidischen Bindung liegt eine Besonderheit der Isomaltose, die sie von vielen anderen Disacchariden wie z.B. Maltose (α -1-4) oder Saccharose (α -1-2) unterscheidet. Diese Bindung ist sehr flexibel und ermöglicht praktisch eine freie Drehbarkeit der beiden Glukosebausteine [82]. Begründet wird dies durch ein Fehlen von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen [120]. Diese Bindung ist auch für die Anwendung als Süßungsmittel entscheidend, denn sie widersteht der endogenen Verdauung. Für die Adsorption in BEA-Zeolithen hat sie eine besondere Bedeutung. Aufgrund der Flexibilität der Isomaltose wird angenommen, dass sich das Molekül in die Poren des Adsorbens hineindrehen kann.

Die genaue Funktion dieser Bindung wurde auch mit NMR-Methoden und durch molekulare Simulation [17, 153] untersucht, um ein besseres Verständnis für das Biopolymer Dextran zu bekommen. Isomaltose ist die Wiederholungseinheit im Polymer Dextran. Neben Dextran ist Isomaltose in anderen häufig vorkommenden Biopolymeren wie Amylopectin und Glykogen zu finden [121].

Die lange, lineare Hauptkette des Dextrans ist α -1-6 verknüpft [68]. Durch eine Hydrolyse aus Dextran kann ebenfalls Isomaltose gewonnen werden. Die Hydrolyse ist dabei jedoch zu unspezifisch, so dass immer ein sehr komplexes Gemisch aus vielen verschiedenen langen IMOs entsteht. Die Seitenketten des Dextrans sind mit ein bis drei Monomeren sehr kurz und α -1-3 verknüpft. Dextran wird hauptsächlich als Ersatzmittel für Blutplasma verwendet [127]. Mitunter wird Dextran sogar zu Dopingzwecken missbraucht und kann über eine Freisetzung von Isomaltose detektiert werden [65].

Dextran dient in der Natur als extrazellulärer Speicherstoff und ist in einer Vielzahl von Mikroorganismen zu finden. Bakterien des Stamms *Leuconostoc mesenteroides* produzieren das Enzym Dextranucrase, welches den Aufbau von Dextran synthetisiert. Dieses Enzym wird seit vielen Jahrzehnten für die industrielle Herstellung von Dextran aus Saccharose genutzt. Aus dem Stamm *L. mesenteroides* NRRL B-512-F wurde eine kommerziell erhältliche Enzymvariante (Fa. CRITT, Toulouse), die sogenannte Dextranucrase (DSRS), (EC 2.4.1.5) isoliert. In dem hier beschriebenen Prozess wird sie unter bestimmten Bedingungen zur Produktion von Isomaltose eingesetzt.

Neben Dextranucrasen können weitere Enzyme wie Amylasen [96, 155] oder Glucosidasen [153] zur Produktion von Isomaltose und IMOs genutzt werden. Für die kontinuierliche

Herstellung von IMO's aus Maltosesirup wurden sogar ganze immobilisierte Zellen eingesetzt [84].

Für die Aufreinigung von Isomaltose wurden bisher hauptsächlich säulenchromatographische Anwendungen, wie das von Miyake et al. [109] patentierte Verfahren, verwendet. Dabei wurde ein Pulver hergestellt, das 65,3% Isomaltose enthält. Die weiteren Bestandteile sind Isomaltodextrin und höhere IMO's. Zu einer Reindarstellung der Isomaltose kann dieses Verfahren demnach nicht genutzt werden.

2.3 Adsorption

Als Adsorption bezeichnet man den Vorgang der Anlagerung von Adsorptiven wie Atomen, Molekülen oder Teilchen aus einer fluiden Phase an der Oberfläche eines Feststoffes, dem Adsorbens. Die fluide Phase kann dabei ein Gas oder eine Flüssigkeit sein.

Die Adsorption zählt zu den chemischen und thermischen Trennverfahren und findet somit in einer Vielzahl von Gebieten Anwendung. Dabei zählt die Abtrennung von Schadstoffen aus Abgasen oder Abwässern [132] genauso zu diesen Trennoperationen wie die Aufreinigung von Pharmaprodukten durch ein chromatographisches Verfahren [12]. Dies zeigt, wie vielseitig die Anwendungsmöglichkeiten der Adsorption sind. Im Vergleich zu anderen Trennverfahren wie Extraktion oder Rektifikation kommt die Adsorption ohne eventuell schädigende Lösungsmittel oder hohe Temperaturen aus. Dafür muss jedoch das Adsorbens als zusätzliche feste Phase in ein System eingebracht werden, was zu neuen Komplikationen führen kann. Das Verständnis für die Vorgänge der Adsorption ist bei weitem noch nicht so ausgereift wie für die Rektifikation, so dass in Zukunft noch große Potenziale für weitere Entwicklungen vorhanden sind [12].

Zur Klassifizierung von Adsorptionsisothermen wird in dieser Arbeit die in Abbildung 2.2 dargestellte Einteilung nach IUPAC verwendet. Für Flüssigphasenadsorptionen sind die Isothermen I, II und III von Interesse. Die Formen IV und V weisen Hysteresen auf, die hauptsächlich in Gasphasenanwendungen auftreten.