



## 1. Motivation

Die weiße Biotechnologie stellt einen rasant wachsenden Bereich in der akademischen Forschung sowie der chemischen und pharmazeutischen Industrie dar. Ihr hohes Potential ist begründet durch die Erschließung neuer Rohstoffquellen, dem Hervorbringen neuartiger Produkte ebenso wie neuen, ökonomischeren und ökologischeren Produktionswegen [1–4]. Hierbei reicht das Anwendungsspektrum der weißen Biotechnologie von Massenprodukten, welche in Bioreaktoren mit mehreren hundert Kubikmetern produziert werden, über Chemikalien mit Jahresproduktionen im Kilogrammmaßstab, hin bis zu Spezialchemikalien und Pharmazeutika, von denen batchweise nur wenige Milligramm produziert werden [5–8]. Aufgrund der hohen Individualität der einzelnen Prozesse ist deren Entwicklung jedoch mit einem hohen Zeit- und Kostenaufwand verbunden [9–11]. Aus diesem Grund werden auf Basis von Modellreaktionen und -prozessen allgemeingültige Regeln konzipiert, welche auf analoge Reaktionen und/oder Prozesse übertragbar sind. Diese sogenannten Plattformtechnologien werden auch in der Biotechnologie für die Entwicklung neuer Produkte und Prozesse genutzt und verkürzen deren Entwicklungszeit sowie damit verbundene Kosten und Risiken [9, 12].

Um die Umsetzung eines Edukts in das gewünschte Produkt biochemisch zu katalysieren, werden sowohl ganze Zellen als auch isolierte Enzyme oder Enzyme in Zellextrakten eingesetzt. In beiden Fällen können die Katalysatoren frei oder immobilisiert vorliegen [13]. Durch die Immobilisierung werden jedoch häufig die (kinetischen) Katalysatoreigenschaften und damit die Prozessperformance beeinflusst. Dieser Einfluss kann positiv, z.B. eine Erhöhung der thermischen Stabilität, wie auch negativ sein: Beispielsweise werden durch die Immobilisierung Diffusionsbarrieren aufgebaut, die überwunden werden müssen. Dadurch wird die integrale Leistung der Katalysatoren negativ beeinflusst. Für die Immobilisierung werden u.a. Polymere verwendet, in welche die Enzyme oder Zellen eingeschlossen werden [14, 15]. Hier gilt es durch genaue Kenntnisse der Stofftransporteigenschaften in diesen Polymeren den Prozess optimal zu gestalten und die Formulierung der Immobilisate so zu wählen, dass der Stofftransport und die Effektivität des Immobilisates möglichst minimal beeinflusst werden.



## 1. Motivation

---

Katalysatoren sind lediglich in der Lage, das Gleichgewicht einer Reaktion schneller einzustellen. Die Stabilität des Produktes bezogen auf Folgereaktionen oder Gleichgewichtslagen werden durch diese nicht beeinflusst. Hier stellt die reaktionsintegrierte Produktgewinnung (ISPR, *In-Situ* Product Removal) eine effektive Methode dar, um Produkte aus thermodynamisch ungünstigen Reaktionen zu gewinnen, Inhibierungen durch das Produkt oder dessen Weiterreaktionen zu vermeiden sowie eine Vorkonzentrierung des Zielproduktes zu erreichen, wodurch kostenintensives Downstream-Processing vereinfacht und reduziert werden kann [16–19].

Im Rahmen dieser Arbeit werden am Beispiel der reaktionsintegrierten Adsorption trienzymatisch synthetisierter Laminaribiose allgemeingültige Gestaltungsregeln für die Prozessauslegung von ISPR-Biokatalysen abgeleitet. Das Reaktionsschema zur Darstellung von Laminaribiose ist in Abbildung 1.1 dargestellt, wobei die Enzyme jeweils in immobilisierter Form vorliegen sollen. In einem ersten Schritt wird Saccharose unter Verbrauch von Phosphat in Glukose-1-Phosphat und Fruktose umgesetzt. Die Fruktose wird anschließend zu Glukose isomerisiert. Im dritten Reaktionsschritt werden Glukose-1-Phosphat und Glukose zur Laminaribiose verknüpft, wobei Phosphat frei wird. Dieses wird im ersten Reaktionsschritt erneut eingesetzt. Anstelle der Glukose kann jedoch auch Laminaribiose im letztgenannten Reaktionsschritt als Akzeptormolekül dienen, so dass höhere Laminarioligosaccharide gebildet werden. Um diese Folgereaktion zu vermeiden, muss die Laminaribiose reaktionsintegriert entfernt werden. Dies geschieht in diesem Prozess mittels Adsorption an Zeolithen, welche eine hohe Affinität zu Sacchariden aufweisen [20, 21].

Die in diesem Modellprozess gewonnenen Erkenntnisse werden so formuliert, dass die Übertragbarkeit auf vergleichbare Prozesse gegeben ist und eine Plattformtechnologie entwickelt werden kann. Dabei werden spezifische Gestaltungsregeln für den jeweils betrachteten Einzelbeitrag erstellt, die unabhängig voneinander sind und auch für die jeweilige Teildisziplin des betrachteten Gesamtprozesses gelten. Dadurch ist es möglich bei neuen, analogen Prozessen auf vorhandenes Wissen aufzubauen und somit deren Entwicklungszeit und –kosten zu verkürzen.

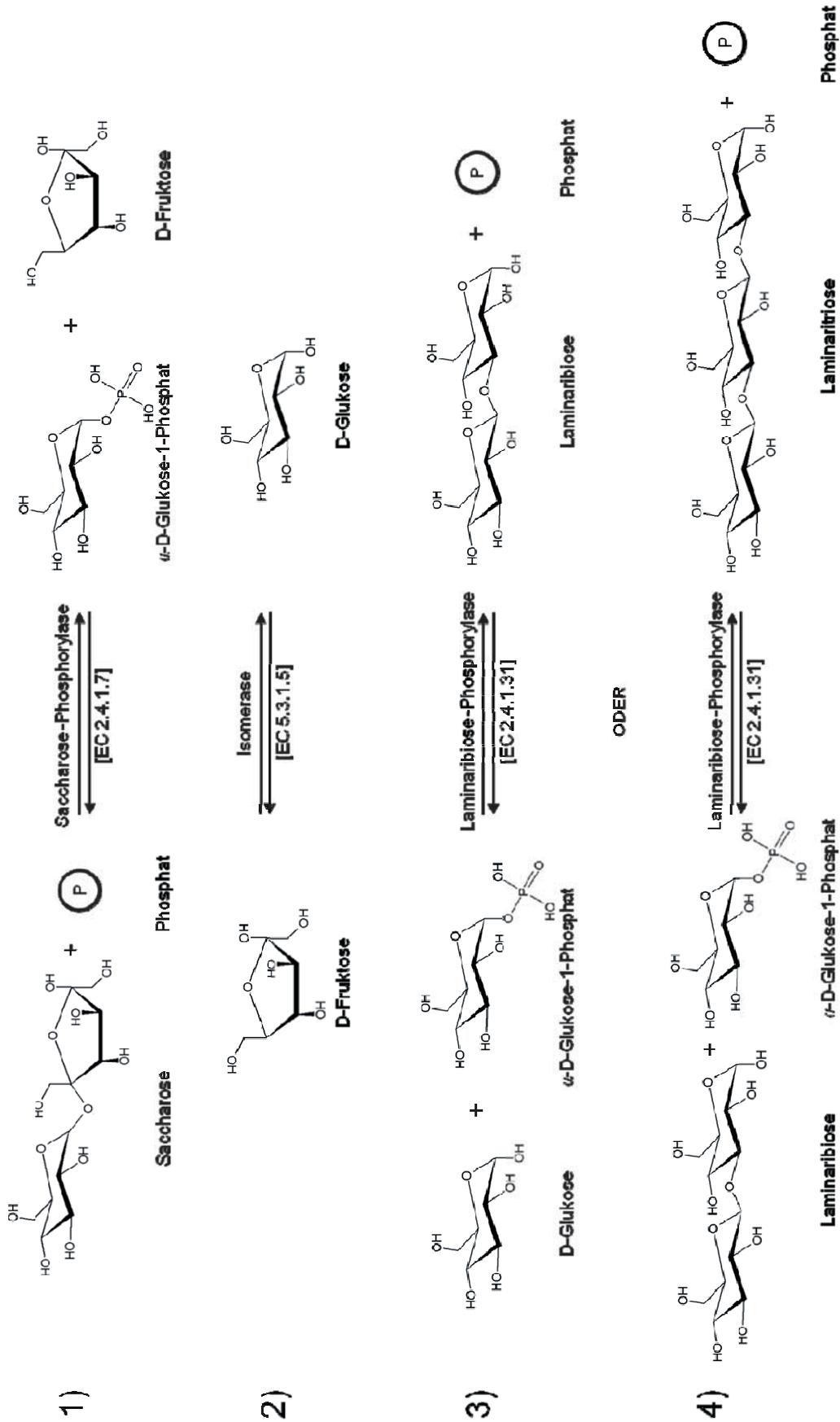


Abbildung 1.1: Reaktionsschema der trienzymatischen Synthese von Laminaribiose und dessen Weiterreaktion zur Laminaritriose



## 2. Stand des Wissens

### 2.1 Modellreaktionen, Plattformtechnologien und Gestaltungsregeln

Mit Hilfe von einfachen Modellreaktionen werden grundlegende Zusammenhänge in einem Reaktionssystem analysiert und erfasst. Die hierbei gewonnenen Erkenntnisse dienen als Grundlage für die Untersuchung und Auslegung phänomenologisch analoger Reaktionssysteme.

Im Bereich der Biotechnologie sind viele monoenzymatische Synthesen sehr gut untersucht und verstanden. Hier gibt es eine große Anzahl an technischen Applikationen [8, 22, 23], jedoch sind diese Anwendungen jeweils nur auf einzelne Syntheseschritte limitiert. Multienzymatische Reaktionssysteme bieten die Möglichkeit, mehrere Reaktionsschritte in einem Reaktor durchzuführen, wodurch Zeit und Kosten eingespart werden können. Die multienzymatischen Systeme werden in zwei Arten unterschieden: *in-vivo* Systeme haben eine Vielzahl technischer Anwendungen, wenn auch die intrazellulären Syntheserouten nicht immer gänzlich verstanden sind [24, 25]. Als vorteilhaft in solchen Systemen ist die Cofaktor-Regenerierung und deren Recycling hervorzuheben. Nachteilig ist vor allem die Bildung einer hohen Anzahl von Nebenprodukten, welche das Downstream Processing erschweren [4, 24]. Für multienzymatische *in-vitro* Systeme existieren nur wenige Reaktionsbeispiele, obwohl solche Systeme im Vergleich zu *in-vivo* Systemen den Vorteil einer deutlich geringeren Komplexität bieten und weniger Nebenprodukte gebildet werden [26, 27]. Hier wird ein großer Forschungsbedarf für die Verfahrensentwicklung solcher Systeme gesehen [28, 29]. Das betrachtete Modellsystem der Laminaribiosebildung adressiert diesen Bedarf zur Entwicklung von multienzymatischen *in-vitro* Systemen.

Die Entwicklung neuer Verfahren ist stets mit dem Risiko verbunden, nicht zum gewünschten Erfolg zu führen, so dass sich somit entstandene Kosten nicht amortisieren. Dies gilt im Besonderen für das vergleichsweise junge Feld der weißen Biotechnologie, da hier gemessen an den Technologien der mechanischen, chemischen und thermischen Verfahrenstechnik nur eine begrenzte Erfahrung vorliegt und die hohe Variabilität der Natur zu unterschiedlichen Produktionssystemen führt. Dies bedingt vergleichsweise lange Entwicklungszeiten für biotechnologische Prozesse. Hier soll der Aufbau eines „Methodenpools“ Abhilfe schaffen

[9]. Es gilt also Plattformtechnologien zu entwickeln, um „phänomenologisch verwandte Systeme mit ähnlicher Prozesstechnik zu nutzen“ [7]. Im Vergleich zu den etablierten Methoden der chemischen Synthese wird aktuell jedoch nur ein geringes Potential der weißen Biotechnologie ausgenutzt, so dass auch hier ein großer Forschungsbedarf gesehen wird. Die Erfassung von Daten biotechnologischer Prozesse und deren Implementierung in mathematische Modelle ist aktuell noch Stand der Forschung [30, 31]. So erfolgt auch die Prozessauslegung in biotechnologischen Verfahren meist empirisch, zumal solche komplexen Prozesse nur schwer abzubilden sind [24, 32].

Im Gegensatz zur Biotechnologie sind Plattformtechnologie und Gestaltungsregeln in der klassischen Verfahrenstechnik intensiv untersucht und verstanden. Die einzelnen „unit operations“ der Verfahrenstechnik lassen sich mittels „Computer Aided Process Engineering“ sehr gut beschreiben und eine prädiktive, modellgestützte Prozessauslegung z.B. für eine Rektifikationskolonne am Computer ist Stand der Technik [33]. Im Bereich der hybriden Trennverfahren, also der Integration von Reaktion und Stofftrennung, ist dies jedoch nicht der Fall. Obwohl ein hohes Einsparpotential in diesem Bereich besteht, gibt es bisher nur vereinzelt systematische Zusammenfassungen über das Anwendungspotential dieser Prozesse bei gegebenen Rahmenbedingungen [19, 33, 34]. Die reaktionsintegrierten Prozesse werden in Kapitel 2.5 detailliert beschrieben. Im Folgenden werden zunächst bekannte Gestaltungsregeln solcher Prozesse betrachtet.

Ein wesentliches Merkmal für ein Reaktionssystem ist die Anzahl der Freiheitsgrade  $\mathcal{F}$  entsprechend der Gibb'schen Phasenregel in Abhängigkeit der Anzahl an Komponenten  $K$  und Phasen  $P$  gemäß Gleichung (2.1):

$$\mathcal{F} = K - P + 2 \quad (2.1)$$

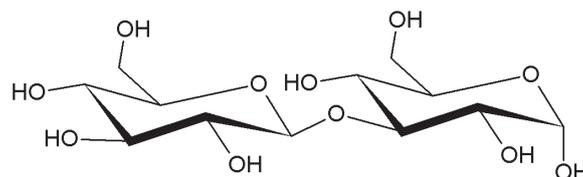
Ist die Integration der Separationstechnologie in die Reaktion mit dem Einbringen einer neuen Phase verbunden, kann sich dies aufgrund der Reduzierung der Freiheitsgrade nachteilig auf das gesamte System auswirken. In dem betrachteten Modellsystem der reaktionsintegrierten Adsorption ist dies jedoch nicht der Fall, da zwar ein Feststoff in Form des Adsorbens eingebracht wird, sich jedoch ebenfalls die Anzahl der Komponenten erhöht. Durch die Adsorption der Zucker am Zeolithen wird ebenfalls keine neue Zuckerphase generiert.

Ein weiteres Kriterium sind sogenannte „Prozessfenster“ der einzelnen Teilbeiträge des Gesamtsystems. Dies soll am Beispiel der Temperatur betrachtet werden: enzymatische Reaktionen durchlaufen typischerweise ein Temperaturoptimum. Bei zu hohen Temperaturen findet aufgrund der Denaturierung der Enzyme keine Katalyse mehr statt, bei zu niedrigen Temperaturen ist die Aktivität der Enzyme stark reduziert [13]. Für das betrachtete Modellsystem wird eine optimale Reaktionstemperatur von ca. 40 °C vorgegeben [35]. Für die Adsorption von Sacchariden an Zeolithen ist dies eine annehmbare Temperatur [20, 21], jedoch nimmt die Adsorptionsfähigkeit eines Adsorbens grundsätzlich mit steigender Temperatur ab [36]. Hier bieten Kenntnisse zur Temperaturabhängigkeit der Adsorption die Möglichkeit der Verfahrensoptimierung.

Weiterführende allgemeingültige Gestaltungsregeln für die reaktionsintegrierte Produktabtrennung betreffen z.B. Reaktordesign sowie Investitionen und Betriebskosten. In der Literatur sind Entscheidungsbaumverfahren zu finden, anhand derer ein mögliches Prozesskonzept entwickelt werden kann [32, 34, 37]. Entscheidend ist jedoch, dass eine ausreichende Datenbasis für den Aufbau solcher Entscheidungsbäume zur Verfügung steht um im Idealfall eine Simulationssoftware aufzubauen [30]. Die vorgestellte Arbeit ist ein Beitrag zum Aufbau solcher Daten, erarbeitet am Beispiel der trienzymatischen Laminaribiosebildung.

### 2.2 Darstellung von Laminaribiose

Laminaribiose, dargestellt in Abbildung 2.1, ist ein Disaccharid, bei welchem zwei Glukosemoleküle über eine  $\beta(1\rightarrow3)$ -glykosidische Bindung miteinander verknüpft sind. Aufgrund dieses strukturellen Aufbaus ist Laminaribiose ein interessanter Vertreter für die Pharmazie und Lebensmittelindustrie [38, 39].



**Abbildung 2.1:** Strukturformel von Laminaribiose (3- $\beta$ -D-Glucosyl-D-glucose)



In der Natur finden sich  $\beta(1\rightarrow3)$ -verknüpfte Glykoside unter anderem in Antitumor-Polysacchariden und an Proteinen, welche der Zellkommunikation dienen [38, 40]. Entsprechend kann Laminaribiose als „building block“ für neue Pharmazeutika genutzt werden. So erhöht sich beim Triterpenoid Saponin die Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen um den Faktor 15, wenn am  $C_3$ -Atom das vorhanden Proton durch Laminaribiose substituiert wird [41]. Weiterhin besitzt Laminaribiose präbiotische Eigenschaften [42] und wäre bei entsprechend niedrigen Produktionskosten als Lebensmittelzusatz sinnvoll einsetzbar. Gegenwärtig liegt der Preis für Laminaribiose bei etwa 3000,- € pro Gramm (Fa. Megazyme, Irland), was ihren Einsatz in größeren Mengen verhindert. Laminaribiose und die höheren Laminarioligosaccharide sind trotz des hohen Preises Gegenstand aktueller Krebs- und Gesundheitsforschung [41, 43–45].

Die Darstellung von Laminaribiose kann mittels einer chemischen Synthese ausgehend von Glukose erfolgen [46], einem chemischen oder enzymatischen Abbau von  $\beta(1\rightarrow3)$ -Glucan [38] oder über eine trienzymatische Synthese ausgehend von Saccharose [39], wie es in Abbildung 1.1 dargestellt ist. Von den genannten Darstellungsrouten besitzt die trienzymatische Synthese das größte ökologische und ökonomische Potential [39].

Die einzelnen enzymatischen Reaktionsschritte sind gut verstanden und weitreichend untersucht. Im ersten Reaktionsschritt wird Saccharose unter Verbrauch von Phosphat durch das Enzym Saccharose-Phosphorylase [EC 2.4.1.7] in Glukose-1-Phosphat und Fruktose umgesetzt. Die Fruktose wird anschließend von einer Isomerase [EC 5.3.1.5] zu Glukose isomerisiert. Im letzten Syntheseschritt werden Glukose-1-Phosphat und Glukose durch Laminaribiose-Phosphorylase [EC 2.4.1.31] zur Laminaribiose verknüpft, wobei Phosphat frei wird. Einen Überblick zu diesen Reaktionen sowie eine ausführliche Literatursammlung findet sich in der „Braunschweig Enzyme Database“ BRENDA [47]. Im letztgenannten Reaktionsschritt kann Laminaribiose anstelle der Glukose ebenfalls als Akzeptormolekül dienen, so dass Laminaritriose gebildet wird. Diese kann wiederum als Akzeptor dienen usw., so dass verschieden lange Laminarioligosaccharide gebildet werden. Diese Folgereaktionen zu höheren Oligomeren sind begünstigt, je mehr Glukose-1-Phosphat im Verhältnis zu Glukose bzw. den Oligomeren vorliegt [48]. Aufgrund der Gleichgewichtsbedingung zwischen Fruktose und Glukose im zweiten Reaktionsschritt, welches bei etwa der Hälfte liegt [49], kann jedoch maximal halb so viel Glukose wie Glukose-1-Phosphat vorliegen, so



dass die Folgereaktionen thermodynamisch begünstigt sind. Entsprechend muss die Laminaribiose reaktionsintegriert ausgeschleust werden, um eine hohe Ausbeute zu erhalten.

Die trienzymatische Synthese von Laminaribiose ist bisher nur als Batchprozess mit frei vorliegenden Enzymen untersucht und beschrieben. Die Darstellung der Laminaribiose in einem kontinuierlichen Prozess würde die Ökonomie und Ökologie des Prozesses verbessern. Hierfür ist eine Immobilisierung der Enzyme notwendig.

### 2.3 Immobilisierung von Biokatalysatoren

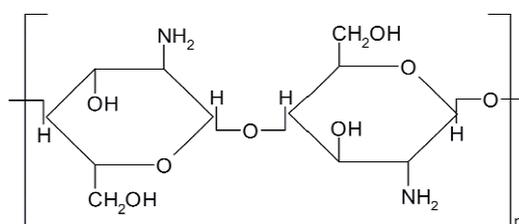
Durch eine Immobilisierung werden (Bio)katalysatoren im Reaktionsraum zurückgehalten oder stromabwärts des Reaktors wiedergewonnen und rezykliert, so dass ein kontinuierlicher Betrieb ermöglicht wird. Insbesondere bei wertvollen Katalysatoren, wie beispielsweise Enzymen, ist dies ein ökonomisch notwendiger Schritt, da so die Standzeit der Enzyme im Reaktor erhöht wird. Dies stellt die wesentliche Motivation der Enzymimmobilisation dar [8, 50]. Gleichzeitig wird auf diese Weise das Produkt vom Katalysator getrennt, was je nach Anforderungen an die Produktreinheit ohnehin notwendig ist [25].

In der Literatur sind hunderte verschiedene Immobilisierungsmethoden beschrieben, welche auf vielfache Art unterschieden werden können [8, 50–52]. An dieser Stelle soll zunächst eine einfache Unterscheidung in „Fixierung“ und „Einschluss“ genügen. Bei der Fixierung werden Biokatalysatoren z.B. adsorptiv, ionisch oder kovalent auf einen festen Träger gebunden oder auch durch eine chemische Reaktion an den funktionellen Gruppen der Aminosäurereste kovalent untereinander quervernetzt, so dass sich größere Partikel bilden. Beim Einschluss werden die Biokatalysatoren innerhalb einer Polymermatrix oder in Kapseln eingeschlossen [13, 25]. Hierbei besteht nahezu kein direkter Kontakt zwischen Biokatalysatoren und Einschlussmatrix [15]. Der Einschluss in Polysaccharide wird gerne verwendet, da die Immobilisierungsprozedur einfach ist und es kaum Interaktion zwischen Polysaccharid und Enzym gibt, so dass deren intrinsische Aktivität wenig beeinflusst wird [8].

Ein populäres Polysaccharid, welches zur Immobilisierung verwendet wird, ist Alginsäure [25, 53]. Aus wässriger Lösung kann dieses ionotroph mittels zweiwertiger Kationen schonend und einfach in ein Gel (Alginat) überführt werden. Für die verwendete

Modellreaktion ergeben sich jedoch zwei wesentliche Nachteile: Zum einen bildet Alginate vergleichsweise grobe Netzwerke, so dass die Enzyme posttranskriptional vergrößert werden müssten, um ein Ausbluten des Enzymträgers zu verhindern [13]. Zum anderen ist dieser Komplex in Gegenwart einwertiger Kationen nicht stabil [13]. Da in der Modellreaktion Dihydrogenphosphat im Puffer Verwendung finden soll, müsste die Salzkonzentration an zweiwertigen Ionen drastisch erhöht werden, um den Gelkomplex zu stabilisieren. Hohe Salzkonzentrationen erschweren jedoch die Reindarstellung des Produktes und reduzieren im Allgemeinen die Enzymaktivität [25].

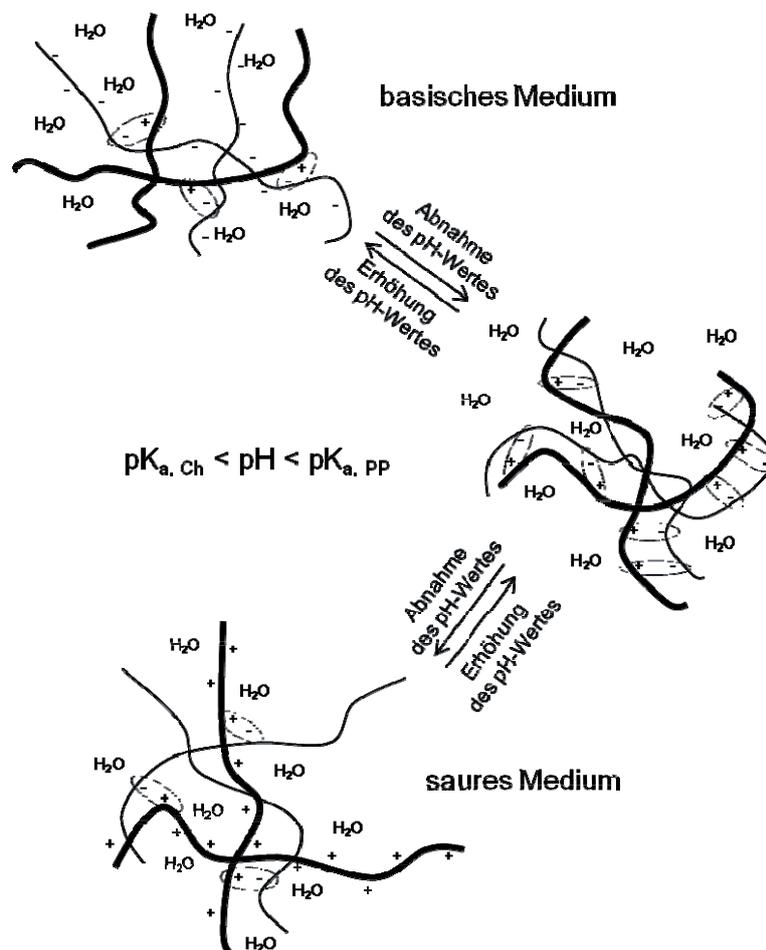
Chitosan ist ein Polysaccharid, welches ebenfalls einfach und schonend ionotroph geliert, in Gegenwart von Phosphatpuffern stabile Komplexe bildet und zur Immobilisierung von Enzymen eingesetzt werden kann [52, 54–56]. Da es biokompatibel und nicht toxisch ist, hat es ein breites Anwendungsspektrum in der Biotechnologie, Lebensmitteltechnologie, Landwirtschaft und Pharmazie [55, 57, 58]. Chitosan ist ein Derivat des Chitins und kann entweder direkt aus Pilzmycelien gewonnen werden oder aus einer mechanisch/chemischen Umsetzung von Krabbenschalen, da diese hohe Mengen an Chitin enthalten [55, 58]. Chitosan ist ein Heteropolymer, welches aus den Monomeren Acetylglucosamin (2-Acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glycopyranose) und dessen deacetylierter Form Glucosamin (2-Amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glycopyranose) besteht, die jeweils  $\beta(1\rightarrow4)$ -glykosidisch miteinander verknüpft sind. Die Struktur ist dargestellt in Abbildung 2.2. Im strukturellen Aufbau unterscheidet sich Chitosan zunächst nicht von Chitin. Chitosan besitzt einen höheren Anteil an Glucosamin, allerdings ist bisher kein exakter Grenzwert definiert [58]. Im Allgemeinen liegt der Deacetylierungsgrad zwischen 50-95 % [55, 57]. Ebenso gibt es zum Molekulargewicht unterschiedliche Aussagen, welches mit  $250 - 2.000.000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  angegeben wird, wobei Chitosan aus Pilzmycelien grundsätzlich ein geringeres Molekulargewicht aufweist [55, 57].



**Abbildung 2.2:** Allgemeine Struktur von Chitosan [55].

Der  $pK_a$ -Wert der Aminogruppen im Chitosangerüst liegt bei 6,2 [59], somit ergibt sich eine Löslichkeit von Chitosan in sauren Lösungen bei einem pH-Wert kleiner 6 [60]. In diesem leicht sauren Milieu sind die Aminogruppen positiv geladen, so dass Chitosan ein Polykation bildet und mit negativ geladenen Polyanionen, z.B. Polyphosphat, ein Gel bilden kann. Der Komplexbildungsmechanismus ist ausführlich in der Literatur beschrieben [61, 62]. Dabei hat der pH-Wert einen entscheidenden Einfluss auf den Anteil an ionischen Wechselwirkungen im Gel und dessen Quellverhalten.

Ein starkes Quellverhalten geht einher mit einem hohen Maß an nicht-komplexierten Regionen. Deren Anteil wird zum einen durch den Deacetylierungsgrad bestimmt und zum anderen durch den pH-Wert des umgebenden Mediums. Dieser Mechanismus ist dargestellt in Abbildung 2.3.



**Abbildung 2.3:** Struktur und pH-sensitives Quellverhalten eines Chitosan-Polyphosphatkomplexes, modifiziert nach [62]. — Chitosan (Ch), — Polyphosphat (PP), + positive Ladung, - negative Ladung, ∷ ionische Wechselwirkung