Fraunhofer
IGB

FRAUNHOFER-INSTITUT FÜR GRENZFLÄCHEN- UND BIOVERFAHRENSTECHNIK IGB

BERICHTE AUS FORSCHUNG UND ENTWICKLUNG NR. 073

Matthias Stier

Prozessentwicklung zur Herstellung von Methanol und Ameisensäure aus Biogas mittels einer Formaldehyd-Dismutase

FRAUNHOFER VERLAG

Fraunhofer-Institut für
Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB

Berichte aus Forschung und Entwicklung Nr. 073

Prozessentwicklung zur Herstellung von Methanol und Ameisensäure aus Biogas mittels einer Formaldehyd-Dismutase

Matthias Stier

FRAUNHOFER VERLAG

Kontaktadresse:
Fraunhofer-Institut für
Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB
Nobelstraße 12
70569 Stuttgart
Telefon 07 11 9 70-40 00
Telefax 07 11 9 70-42 00
E-Mail info@igb.fraunhofer.de
URL www.igb.fraunhofer.de

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.
ISBN (Print): 978-3-8396-1407-5

D 93

Zugl.: Stuttgart, Univ., Diss., 2017

Druck: Mediendienstleistungen des
Fraunhofer-Informationszentrum Raum und Bau IRB, Stuttgart

Für den Druck des Buches wurde chlor- und säurefreies Papier verwendet.

© by FRAUNHOFER VERLAG, 2018
Fraunhofer-Informationszentrum Raum und Bau IRB
Postfach 80 04 69, 70504 Stuttgart
Nobelstraße 12, 70569 Stuttgart
Telefon 07 11 9 70-25 00
Telefax 07 11 9 70-25 08
E-Mail verlag@fraunhofer.de
URL http://verlag.fraunhofer.de

Alle Rechte vorbehalten

Dieses Werk ist einschließlich aller seiner Teile urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die über die engen Grenzen des Urheberrechtsgesetzes hinausgeht, ist ohne schriftliche Zustimmung des Verlages unzulässig und strafbar. Dies gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen sowie die Speicherung in elektronischen Systemen.
Die Wiedergabe von Warenbezeichnungen und Handelsnamen in diesem Buch berechtigt nicht zu der Annahme, dass solche Bezeichnungen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und deshalb von jedermann benutzt werden dürften. Soweit in diesem Werk direkt oder indirekt auf Gesetze, Vorschriften oder Richtlinien (z.B. DIN, VDI) Bezug genommen oder aus ihnen zitiert worden ist, kann der Verlag keine Gewähr für Richtigkeit, Vollständigkeit oder Aktualität übernehmen.

Prozessentwicklung zur Herstellung von Methanol und Ameisensäure aus Biogas mittels einer Formaldehyd-Dismutase

Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines Doktors der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)

genehmigte Abhandlung

vorgelegt von

Matthias Stier

aus Frankfurt am Main

Hauptberichter: Prof. Dr. Thomas Hirth

Mitberichter: Prof. Dr. Markus Pietzsch

Prof. Dr. Karl-Heinrich Engesser

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Dezember 2017

Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie der Universität Stuttgart

2017

Meiner Frau Andrea, meinen Kindern und meinen Eltern

Danksagung

Ich möchte Herrn Professor Dr. Thomas Hirth ganz herzlich dafür danken, dass er es mir ermöglichte eine Doktorarbeit zu beginnen und für die Betreuung und Unterstützung während meiner Zeit als Doktorand.

Zudem gilt mein Dank der Gruppe „Technische Mikrobiologie“ des Fraunhofer IGB, allen voran Professor Dr. Dieter Bryniok für die Betreuung der Arbeit und die fachlichen Diskussionen. Auch der Abteilung „Molekulare Biotechnologie“ danke ich für die Zusammenarbeit und die Bereitstellung der benötigten Materialien.

Dem Mitberichter dieser Arbeit Professor Dr. Markus Pietzsch und seinen Mitarbeitern Frau Dr. Franziska Seifert und Andreas Griethe möchte ich ganz herzlich für die sehr gute Zusammenarbeit danken. Die gemeinsamen Versuche haben mir sehr viel Freude bereitet.

Für die Hilfe und Unterstützung im beruflichen Alltag bedanke ich mich herzlich bei den Kollegen des Instituts für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie IGVP der Universität Stuttgart und Herrn Professor Dr. Günter Tovar für die Unterstützung meiner Forschungstätigkeit.

Meine Arbeit wurde im Rahmen eines Promotionsstipendiums der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) gefördert. Ich danke der DBU für die Förderung sowie für die großartigen Doktorandenseminare und insbesondere den Mitarbeitern der DBU Herrn Dr. Hans-Christian Schäfer und Frau Dr. Hedda Schlegel-Starmann für die gute Zusammenarbeit. Meinem Mitstipendiaten Dr. Lars Berger möchte ich herzlich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen unsers gemeinsamen Kolloquiums „Die nachhaltige Stadt“ und für das große Engagement bei der Erstellung des dazugehörigen Tagungsbands danken.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst, lediglich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel, verfasst habe.

_____

Matthias Stier

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis i

Tabellenverzeichnis xiii

Abkürzungen xvii

Kurzfassung xxi

Abstract xxiii

1 Einleitung und Zielsetzung der Arbeit 1

2 Stand von Wissenschaft und Technik 5

2.1 Einführung in den Stand der Technik und Hypothesen der Doktorarbeit 5

2.2 Formaldehyd-Dismutase (FDM) 7

2.3 Der Organismus *Pseudomonas putida* 10

2.4 Fermentation zur Herstellung der Formaldehyd-Dismutase 11

2.4.1 Auswirkung der Fermentationsparameter auf die FDM-Konzentration 11

2.4.2 Struktur und Klonierung der Formaldehyd-Dismutase 13

2.5 Downstream Processing zur Gewinnung der Formaldehyd-Dismutase 14

2.6 Enzymatische Umsetzung von Formaldehyd 16

2.6.1 Analysemethoden zur Charakterisierung der FDM 16

2.6.2 On-line-Messverfahren 17

2.6.3 Bestimmung der Michaelis-Menten-Parameter und Modellierung der FDM Reaktion 19

2.6.4 Enzymimmobilisierung 20

2.7 Herstellung von Formaldehyd 21

2.8 Herstellung von Ameisensäure und die Verwendung von Extraktionsverfahren 21

2.8.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion von Ameisensäure aus einer wässrigen Lösung 22

2.8.2 Verwendung von Ionenaustauschern 26

2.9 Herstellung von Methanol und die Verwendung von Pervaporationsverfahren 28

2.9.1 Triebkraft in einer Pervaporationsmembran 31

2.9.2 Selektivität und Flux von Pervaporationsmembranen 32

2.10 Kombination der Enzymimmobilisierung und Produktabtrennung 33

2.11 Technische Prozesse zur Nutzung der Formaldehyd-Dismutase 34

3 Materialien und Methoden 37

3.1 Analytik zur Bestimmung der Formaldehyd-Dismutase-Aktivität 37

3.1.1 Bradford-Test zur Bestimmung der Proteinkonzentration 37

3.1.2 Acetylaceton-Methode zur Bestimmung der Formaldehydkonzentration 39

3.1.3 Sulfit-Pararosanilin-Verfahren zur Bestimmung der Formaldehydkonzentration 40

3.1.4 MBTH-Methode zur Bestimmung der Formaldehydkonzentration 42

3.1.5 Verwendung von Mikrotiterplatten 43

3.2 On-line-Massenspektrometer zur Konzentrationsmessung 47

3.2.1 Aufbau des Massenspektrometers mit Flüssigeinlass 47

3.2.2 Kalibrierung des Massenspektrometers 48

3.2.3 Messung eines Testsystems 52

3.3 Bestimmung der Pufferkapazität 55

3.3.1 KH_2PO_4-Na_2HPO_4-Pufferkapazität 56

3.3.2 NaH_2PO_4-K_2HPO_4-Pufferkapazität 56

3.4 Aktivitätstest 58

3.5 Fermentation 61

3.5.1 Formaldehydlösung 61

3.5.2 Bestimmung der Biomassekonzentration 61

3.5.3 Emerskultivierung auf Nährböden 62

3.5.4 Submerskultivierung von *P. putida sp.* 63

3.6 Herstellung des FDM-Rohextrakts 65

3.7 Immobilisierung der Formaldehyd-Dismutase 67

3.7.1 Matrixeinschluss im Hydrogel (pVP-co-PEG) 67

3.7.2 Trägerfixierte Bindung 68

3.7.3 Immobilisierung der FDM an Pervaporationsmembranen 70

3.8 In-situ-Produktgewinnung von Methanol und Ameisensäure 74

3.8.1 Rektifikation zur Gewinnung flüchtiger Produkte 74

3.8.2 Pervaporation zur Produktgewinnung 75

3.8.3 Verwendung eines Ionenaustauschers 78

3.8.4 Flüssig-Flüssig-Extraktion 79

3.9 Versuchsanlagen zur Durchführung der FDM-Reaktion 81

3.9.1 Anlagenaufbau für Versuche mit gelöster oder immobilisierter FDM 81

3.9.2 Festbettreaktor für Trägerpackungen 82

3.9.3 Aufbau eines Druckreaktors für gelöstes Enzym oder Trägersuspensionen..... 83

3.9.4 Versuchsanlage zur Entwicklung eines Enzymprozesses mit kontinuierlicher Produktabtrennung 84

3.9.5 Charakterisierung des gerührten 1 Liter-Druckreaktors 86

3.9.6 Pilotanlage zur Herstellung von Methanol und Ameisensäure aus Biogas 91

3.10 Geräte- und Materialliste 93

4 Ergebnisse 95

4.1 Fermentation zur Herstellung der Formaldehyd-Dismutase 95

4.2 Herstellung eines FDM-Rohextrakts 101

4.2.1 Zellaufschluss 102

4.2.2 Trocknung des Rohextrakts 104

4.3 Rührreaktorcharakteristik 107

4.3.1 Leistungscharakteristik 108

4.3.2 Mischzeit 108

4.4 Enzymatische Umsetzung von Formaldehyd 111

4.4.1 Reaktion mit gelöstem Enzym aus dem Rohextrakt 112

4.4.2 Mathematische Herleitung der Michaelis-Menten-Kinetik und Modellierung 115

4.4.3 Übertragbarkeit des Modells 125

4.4.4 Produktinhibierung der Formaldehyd-Dismutase 129

4.4.5 Reaktion mit immobilisierter FDM aus dem Rohextrakt 131

4.5 Produktabtrennung 142

4.5.1 Methanolreinigung mittels Rektifikation 143

4.5.2 Methanolabtrennung mittels Pervaporation 146

4.5.3 Ameisensäureadsorption mittels Ionenaustausch 152

4.5.4 Flüssig-Flüssig-Extraktion von Methanol und Ameisensäure 156

4.6 Kombination von Enzymreaktion mit der Produktabtrennung 163

4.6.1 Kombination der Flüssig-Flüssig-Extraktion mit der FDM-Reaktion 163

4.6.2 Kombination der Pervaporation mit der FDM-Reaktion 164

4.7 Herstellung von Methanol und Ameisensäure aus Biogas 167

4.7.1 Diskontinuierliche Herstellung durch Verwendung freier FDM 168

4.7.2 Kontinuierliche Herstellung durch Verwendung immobilisierter FDM 169

5 Diskussion 171

5.1 Zusammenfassung der zu diskutierenden Ergebnisse 171

5.2 Analytik und Messtechnik 174

5.2.1 Nasschemische Analytik zur Bestimmung der Formaldehydkonzentration 174

5.2.2 Analytik aller Komponenten mittels Massenspektrometrie 175

5.3 Fermentative Herstellung der Formaldehyd-Dismutase 177

5.4 Herstellung der Enzympräparate 179

5.5 Enzymatische Umsetzung von Formaldehyd 181

5.5.1 Aktivitätsmessung der Formaldehyd-Dismutase 182

5.5.2 Modellierung der FDM-Reaktion 184

5.5.3 Verwendung immobilisierter Enzyme 187

5.6 Produktabtrennung von Methanol und Ameisensäure 191

5.6.1 Rektifikation zur Reinigung von Methanol 191

5.6.2 Pervaporation zur Abtrennung von Methanol 191

5.6.3 In-situ Methanolabtrennung durch Kombination von Pervaporation mit der FDM-Reaktion 194

5.6.4 Adsorption von Ameisensäure durch Verwendung eines Ionenaustauschers 195

5.6.5 Abtrennung von Ameisensäure durch Flüssig-Flüssig-Extraktion 199

5.7 Kopplung der Chemo- und Biokatalyse zur Herstellung von Methanol und Ameisensäure aus Biogas 204

5.8 Massen- und Energiebilanz des Gesamtprozesses 205

5.8.1 Betrachtung der Biogas-Herstellung 206

5.8.2 Chemokatalytische Umsetzung von Methan zu Formaldehyd 208

5.8.3 Enzymatische Reaktion mit in-situ Produktabtrennung 210

5.8.4 Pervaporation von Methanol 212

5.8.5 Wirtschaftlichkeitsbetrachtung des Gesamtprozesses 213

6 Zusammenfassung und Ausblick 215

Anhang 219

Literaturverzeichnis 225

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Zweistufiger Prozess zur Herstellung von Methanol aus Biogas. *Umrandung: Darstellung des Forschungsfelds der Doktorarbeit.* 3

Abbildung 2-1 Reaktionsschema der Formaldehyd-Dismutase. 8

Abbildung 2-2 Mikroskopische Aufnahmen der DSMZ vom Stamm *Pseudomonas putida J3 (DSM ID 12-974II, 16. Januar 2013).* 11

Abbildung 2-3 Wachstumskurve von *P. putida* F61-a und Formaldehyd-Dismutase Aktivität im Medium II (mit Glycerin als Kohlenstoffquelle, *obere Abbildung*)) und Medium III (mit zusätzlich Glukose als Kohlenstoffquelle, *untere Abbildung*) zu unterschiedlichen Fermentationszeitpunkten (Werte nach [16]). 12

Abbildung 2-4 Darstellung verschiedener Diffusionsmodelle eines Ionenaustauscher Partikels. 27

Abbildung 2-5 Konzentrationsverlauf von Methanol durch eine Pervaporationsmembran. Stoffübergangskoeffizienten: β^L feedseitige Grenzschicht zur Membran; β_M Membran (aktive Schicht); β^G permeatseitige Grenzschicht zur Membran 31

Abbildung 3-1 Kalibrierung der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford. 38

Abbildung 3-2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford in Abhängigkeit von der Methanolkonzentration in der Probe. 38

Abbildung 3-3 Kalibriergeraden für die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford für verschiedene Pufferkonzentrationen. 39

Abbildung 3-4 Bestimmung der Absorption bei 416 nm als Maß für die Formaldehydkonzentration mittels Hach Lange Acetylaceton-Methode in Abhängigkeit der Pufferkonzentration. 40

Abbildung 3-5 Kalibrierung der Formaldehydkonzentrationsbestimmung mittels Pararosanilin-Lösung. 41

Abbildung 3-6 Standardabweichung aus der Bestimmung der Formaldehyd-konzentration mittels Pararosanilin in Abhängigkeit der Pufferkonzentration. 42

Abbildung 3-7 Kalibrierung der Formaldehydkonzentrationsbestimmung mittels MBTH-Test in 1 ml Küvetten. 43

Abbildung 3-8 Ablaufdiagramm zur Messung der Formaldehydkonzentration zur Bestimmung der Enzymaktivität in 96-Well-Mikrotiterplatten mittels Acetylaceton-Methode nach Hach Lange. 44

Abbildung 3-9 Kinetik der Absorption des Pararosanilin-Tests für verschiedene Formaldehydkonzentrationen in einer Mikrotiterplatte. 45

Abbildung 3-10 Kalibrierungsgerade der Pararosanilin-Methode in einer Mikrotiterplatte. 46

Abbildung 3-11 RI-Schema Massenspektrometer mit Flüssigkeitseinlass. Dargestellt sind alle Komponenten des Messaufbaus. Zudem sind die Anbindungen an die Steuerungstechnik farblich gekennzeichnet. 49

Abbildung 3-12 Kalibrierungsgeraden der Massen 29 und 30 für Formaldehyd in Wasser (ungepuffert). 50

Abbildung 3-13 Kalibrierungsgeraden unterschiedlicher Massen für Methanol in Wasser (ungepuffert). 50

Abbildung 3-14 Kalibrierungsgeraden unterschiedlicher Massen für Ameisensäure in Wasser (ungepuffert). 51

Abbildung 3-15 Kalibrierungsgeraden unterschiedlicher Massen für Methylformiat in Wasser (ungepuffert). 51

Abbildung 3-16 Verlauf der Messung von Gemischen aus Formaldehyd, Methanol und Ameisensäure mit dem Testsystem. Begonnen wurde mit einer 0,5 M

Formaldehydlösung. Sukzessiv wurde die Formaldehydkonzentration verringert und die äquimolaren Anteile Methanol und Ameisensäure bis zu einer Gesamtkonzentration von 0,5 M ergänzt. 53

Abbildung 3-17 Vergleich der vorgelegten (Soll-) und gemessenen (Ist-) Konzentration von Methanol und Formiat in Wasser. 54

Abbildung 3-18 Versuchsaufbau zur Bestimmung einer Pufferkapazität mit Datenerfassung. 55

Abbildung 3-19 Titrationskurven eines 0,25 M KH_2PO_4-Na_2HPO_4-Puffers und einer 0,25 M Ameisensäurelösung in Abhängigkeit des Molverhältnisses beider Stoffe. Dargestellt ist zudem der pKs-Wert von 6,73. 56

Abbildung 3-20 Titrationskurven eines 0,25 M NaH_2PO_4-K_2HPO_4-Puffers und einer 0,25 M Ameisensäurelösung in Abhängigkeit des Molverhältnisses beider Stoffe. Dargestellt ist zudem der pKs-Wert von 6,77. 57

Abbildung 3-21 Titration des NaH_2PO_4-K_2HPO_4-Puffers in eine Ameisensäurelösung und gemessene pH-Werte. Die Änderung des pH-Werts in Abhängigkeit vom Molverhältnis zwischen Phosphatpuffer und Ameisensäure wurde durch ein Polynom 6. Grades beschrieben. 58

Abbildung 3-22 Variation des Substrat-Protein-Verhältnisses zur Bestimmung der maximalen spezifischen Aktivität. 60

Abbildung 3-23 T-x-Diagramm für das Gemisch aus Methanol und Wasser (erstellt mit der Software Aspen [101]) 75

Abbildung 3-24 Schematische Darstellung einer Versuchsanlage mit einem Pervaporationsmodul für Flachmembranen. 76

Abbildung 3-25 Schematische Darstellung einer Versuchsanlage mit einem Pervaporations-Röhrenmodul. 78

Abbildung 3-26 Schematische Darstellung des Membraneinlasses. Ein Flüssigkeitsstrom wird kontinuierlich an einer Membran (blau) vorbeigeführt. Auf der Permeatseite liegt ein Vakuum an und sorgt für die Triebkraft der flüchtigen Komponenten durch die Membran. 78

Abbildung 3-27 Schematische Darstellung eines Versuchsaufbaus für die Aktivitätsbestimmung von gelöster und immobilisierter FDM. Der Verbrauch von Formaldehyd und Base wurden über Waagen erfasst. Durch ein Regelsystem wurden Temperatur und pH-Wert im Reaktor konstant gehalten. 82

Abbildung 3-28 Schematische Darstellung eines mit Enzymträger gefüllten Festbettreaktors. Die Zugabe von Formaldehyd erfolgt über eine Kolbenpumpe. Die Temperatur im Reaktor wird konstant gehalten. Die Produkte können mittels on-line Analytik direkt am Ausgang des Reaktors detektiert werden. 83

Abbildung 3-29 Schematische Darstellung eines Versuchsaufbaus für den Einsatz von gelösten Enzymen und Enzymträgersuspensionen unter Druck. Die Zugabe von Formaldehyd erfolgt über eine Membrandosierpumpe. Eine on-line-Analyse erfolgt über das Massenspektrometer. Alle Ventile und die Druckregelung sind über eine Prozesssteuerung automatisiert. 84

Abbildung 3-30 Gesamter Versuchsaufbau zur Prozessentwicklung einschließlich der Produktgewinnung..... 85

Abbildung 3-31 CAD-Zeichnung des verwendeten Autoklaven der Firma Büchi. 89

Abbildung 3-32 Pilotanlage zur Herstellung von Methanol und Ameisensäure aus Biogas. *links*: Massenspektrometer zur Bestimmung von Stoffkonzentrationen; *Mitte*: Prozessanlage einschließlich eines Druckreaktors für die enzymatische Umsetzung von Formaldehyd; *rechts*: Gasreaktor zur Umsetzung von Biogas zu Formaldehyd. 92

Abbildung 4-1 Vergleich von vier Fermentationsverfahren. Reaktor 1 mit Glukose (10 g/l) als Vorlage und Umstellung auf Fed Batch Betrieb mit Formaldehyd-

Feed (15 g/l) nach 48 Stunden. Reaktor 2 mit Glukose als Vorlage (1 g/l) und Umstellung auf Fed Batch mit Formaldehyd/Glukose-Feed zur gleichen Zeit. Reaktor 3 mit Methanol (1 g/l) als Vorlage und Formaldehyd-Feed und Reaktor 4 mit ausschließlicher Kultivierung auf Formaldehyd. Der semikontinuierliche Betrieb wurde zu den eingezeichneten Zeitpunkten wie folgt angepasst: 97

Abbildung 4-2 Biotrockenmasse, FDM-Aktivität und spezifische FDM-Aktivität in Abhängigkeit von der Fermentationszeit..... 98

Abbildung 4-3 Fermentation von *Pseudomonas putida J3* im Fed-Batch Betrieb mittels Feed-Regelung der Formaldehyd-Dosierung über die Gelöstsauerstoffkonzentration. 99

Abbildung 4-4 Optimierung des Zellaufschlusses von *P. putida sp*. mittels Ultraschall bei einer Amplitude von 60 % und einem Intervall von 50 %. *Links oben:* Abnahme der Formaldehydkonzentration in Enzym-Rohextrakten nach unterschiedlicher Ultraschall-Beschallungszeit. *Rechts oben:* FDM-Aktivität und Proteinkonzentration im Überstand in Abhängigkeit von der Beschallungszeit. *Unten:* spezifische FDM-Aktivität in Abhängigkeit von der Beschallungszeit. 103

Abbildung 4-5 Zellaufschluss von *P. putida* und *E. coli* mittels Hochdruckhomogenisation bei 1500 bar über mehrere Passagen. Dargestellt sind die Proteinkonzentration und die spezifische Aktivität der FDM zur Quantifizierung des Aufschlusserfolgs. 104

Abbildung 4-6 Lyophilisierung von *E. coli* Lysat mit (*E. coli J3* 07.05.2014) und ohne Tag (*E. coli J3* 12.02.2014). 105

Abbildung 4-7 Spezifische Aktivität nach Trocknung eines *E. coli Lysats* mittels Sprühtrockner und Variation der Temperaturdifferenz zwischen Sprühkopf und Luftstromausgang. Die ursprüngliche FDM-Aktivität des Lysats betrug 49,46 U/mg. 106

Abbildung 4-8 Leistungscharakteristik des Druckreaktors im Vergleich zu standardisierten Rührkesseln [110]. 108

Abbildung 4-9 Mischzeit in Abhängigkeit der Rührerdrehzahl für 1 Liter-Füllvolumen im Druckreaktor. 109

Abbildung 4-10 Mischzeit-Charakteristik im Druckreaktor mittels 4-Blatt-Scheibenrührer für Wasser und Puffer im Vergleich zu standardisierten Rührertypen [110]. 1 Ankerrührer, 2 Scheibenrührer mit vier Stromstörern, 3 Kreuzbalkenrührer vierstufig mit vier Stromstörern, 4 Wendelrührer d/D=8,95, 5 Schneckenrührer d/D=8,52 mit Leitrohr. 110

Abbildung 4-11 Enzymreaktion im 100 ml Reaktor. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Formaldehyd (1,4 g/l) gestartet. *Oben:* Ionenströme für verschiedene Massen. *Unten:* Umrechnung der Ionenströme in die jeweiligen Konzentrationen von Methanol und Methylformiat. 112

Abbildung 4-12 Enzymreaktion im 100 ml Reaktor. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Formaldehyd (11 g/l) gestartet. *Oben:* Ionenströme für verschiedene Massen. *Unten:* Umrechnung der Ionenströme in die jeweiligen Konzentrationen von Methanol und Methylformiat. 113

Abbildung 4-13 Reaktionsverlauf der FDM in einem 1 l Druckreaktor bei atmosphärischem Druck. 114

Abbildung 4-14 Berechnung der Konstanten der Michaelis-Menten-Kinetik über eine Gleichung ohne Produktinhibierung auf Basis der Daten einer on-line-Messung mittels Massenspektrometer. Die Formaldehydkonzentration zu Beginn der Reaktion war 50 mM. 116

Abbildung 4-15 Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung mit nicht-kompetitiver Hemmung zur Berechnung der Konstanten. Die Formaldehydkonzentration zu Beginn der Reaktion war 50 mM. 117

Abbildung 4-16 Berechnung der Michaelis-Menten-Kinetik-Konstanten anhand einer on-line-Messung mittels Massenspektrometer. Die Formaldehydkonzentration zu Beginn der Reaktion war 50 mM. Die Anpassung erfolgte über eine Gleichung mit kompetitiver Hemmung. 122

Abbildung 4-17 FDM-Reaktion im 1 l Maßstab mit einer Anfangskonzentration von 0,5 M Formaldehyd. Die Anpassung erfolgte über eine Gleichung mit kompetitiver Hemmung. 123

Abbildung 4-18 Darstellung aller Inhibierungstypen in einem Schema (α=a und β=b) [116]. 124

Abbildung 4-19 Beschreibung der FDM-Reaktion mit einer hyperbolischen Geschwindigkeitsgleichung. 125

Abbildung 4-20 Verwendung der einfachen Michaelis-Menten-Gleichung ohne Produktinhibierung zur Modellierung der im Labormaßstab erhaltenen Ergebnisse. Es wurde lediglich $vmax$ variiert und der km Wert aus der Simulation mit kompetitiver Hemmung verwendet. 126

Abbildung 4-21 Berechnung von $vmax$ mittels nichtlinearer Regression anhand von Reaktionskinetiken in Abhängigkeit von der Proteingesamtkonzentration des Rohextrakts 127

Abbildung 4-22 Methanolbildung durch die Dismutase-Reaktion mit der J3 FDM aus *E. coli* (12.2.2014) unter Variation des Drucks bei 37 °C. 128

Abbildung 4-23 Produktinhibierung der FDM durch Methanol (MeOH) in initialen Konzentrationen bis 2,5 M, dargestellt durch den verminderten Formaldehydabbau der FDM. 129

Abbildung 4-24 Produktinhibierung der FDM durch initial vorgelegte Ameisensäure (AM) in Konzentration bis 1,1 M, dargestellt durch den verminderten Formaldehydabbau der FDM. 130

Abbildung 4-25 Produktinhibierung der FDM durch Methylformiat (MF) durch initiale Konzentrationen bis 1 M. 131

Abbildung 4-26 Vergleich der Aktivität der freien Enzyme (Proteinkonzentration 1,13 g/l, initiale FA-Konzentration 13,8 %) mit in 25% und 50 % Polyethylenglykol immobilisierten Enzymen. 132

Abbildung 4-27 Formaldehydlösungen mit Konzentrationen von 42 mM, 393 mM und 500 mM wurden im 200 ml Festbettreaktor bei 25 °C und einem Volumenstrom von 10 ml/min zu Methanol, Ameisensäure und Methylformiat umgesetzt. Ameisensäure liegt vollständig dissoziiert vor und kann nicht gemessen werden. 136

Abbildung 4-28 Vergleich der Reaktionsverläufe von 176 mg immobilisiertem Rohextrakt auf 2 g Trägerpartikel und der Reaktion des freien Enzyms mit der gleichen Proteinmenge im 500 ml Maßstab bei 37 °C. Dargestellt sind zudem die berechneten Konstanten der Michaelis-Menten-Kinetik mit kompetitiver Hemmung. 138

Abbildung 4-29 Berechnung des Wirkungsgrads für immobilisierte Enzyme anhand der Anpassung des Modells. Die Werte für $vmax$, Km, und Ki sind in beiden Modellen identisch. Die Anpassung für das immobilisierte Enzym erfolgt lediglich über den Wirkungsgrad $\boldsymbol{\eta}$. 140

Abbildung 4-30 Berechnung der Wirkungsgrade der Michaelis-Menten-Parameter für immobilisierte Enzyme. Die Werte für $vmax$, Km, und Ki wurden anhand der Reaktion des freien Enzyms berechnet. 141

Abbildung 4-31 Berechnung der Wirkungsgrade der Michaelis-Menten-Parameter für immobilisierte Enzyme mit optimierten Startwerten. Die Werte für $vmax$, Km, und Ki wurden anhand der Reaktion des freien Enzyms berechnet. ηKI wurde auf den Wert 1 festgesetzt und nicht neu berechnet. 142

Abbildung 4-32 Fließschema zur Rektifikation von wässriger Methanollösung zur Simulation mittels Aspen HYSYS [98]. 145

Abbildung 4-33 y-x-Diagramm für das Gemisch aus Methanol und Wasser (erstellt mit Aspen Plus [101]).....146

Abbildung 4-34 Selektivität der PDMS-M1_2-Membran für Methanol in Wasser und Transmembran-Flux für Methanol in Abhängigkeit von der Methanolkonzentration. 147

Abbildung 4-35 Abnahme der Methanolkonzentration im Retentat an der Pervaporationsmembran M1_2 bei einer Temperatur von 25 °C, einem Druck von 20 mbar bis 25 mbar und der Membranfläche von 0,005 m². 147

Abbildung 4-36 Verwendung eines Pervaporation-Röhrenmoduls für verschiedene Methanol-Ausgangskonzentrationen. 148

Abbildung 4-37 *Oben*: Vergleich der Selektivitäten der beiden Pervaporationsverfahren im Vergleich zur Anreicherung mittels Rotationsverdampfung und der Verwendung einer porösen PTFE-Membran als Grenzfläche. *Unten*: Darstellung des Fehlers der Selektivität.....149

Abbildung 4-38 Vergleich des Transmembranfluxes der beiden Pervaporationsverfahren und der PTFE-Membran im Flachmembranmodul. 150

Abbildung 4-39 Selektivität von verschiedenen PDMS-Membranen (M1_1, M1_2, M2_1, M2_2) und einer PTMSP-Membran gemessen im Membranmodul des Massenspektrometers bei einem Vakuum von 0,16 mbar. Der Fehler liegt bei $<10^{-6}$.....152

Abbildung 4-40 Messung der Flüchtigkeit von Ameisensäure bei unterschiedlichen Konzentrationen in Wasser und in einem 1 M Puffer pH 6,8 im Massenspektrometer. Dargestellt ist der Ionenstrom der Masse 46 für Ameisensäure im Verhältnis zur Masse 18 für Wasser.....153

Abbildung 4-41 Darstellung der Adsorptionskinetik von Ameisensäure an einen Anionenaustauscher.....153

Abbildung 4-42 Abhängigkeit der berechneten Adsorptionsgeschwindigkeit von der Beladung des Ionenaustauschers zur Bestimmung einer Beladungsgrenze bei dem Einsatz zur In-situ Produktabtrennung.. 154

Abbildung 4-43 Beladungskinetik des Anionenaustauschers. Die maximale Beladung ist herstellerseitig mit 0,31 mmol/g angegeben. 155

Abbildung 4-44 Spezifische Aktivität freier FDM nach einminütiger Säurebehandlung bei verschiedenen pH-Werten..... 156

Abbildung 4-45 Einfluss von 1-Octanol auf die FDM-Reaktion. 157

Abbildung 4-46 Einfluss von 1-Hexanol auf die FDM-Reaktion. 158

Abbildung 4-47 Einfluss von 1-Decanol auf die FDM-Reaktion. 158

Abbildung 4-48 Einfluss von TBP unterschiedlicher Konzentrationen auf die FDM-Reaktion. 159

Abbildung 4-49 K_D-Werte in Abhängigkeit der Extraktionsmittel-zusammensetzung für TBP und TOA. 162

Abbildung 4-50 Abnahme des Wassergehalts in der Karl-Fischer-Titration nach der Silanol Behandlung von plasmaaktivierten Membranen. 165

Abbildung 4-51 *Links*: flächenspezifische Aktivität der unterschiedlich behandelten Membranen. *Rechts*: spezifische Aktivität der Enzyme auf den Membranen.... 167

Abbildung 4-52 Bildung von Methanol aus Biogas durch die chemische Katalyse von Biogas zu Formaldehyd und gleichzeitiger Umsetzung von Formaldehyd mittels freier FDM zu Methanol im 500 ml Maßstab..... 168

Abbildung 4-53 Bildung von Methanol aus Biogas durch die chemische Katalyse von Biogas zu Formaldehyd und gleichzeitige Umsetzung von Formaldehyd mittels immobilisierter FDM zu Methanol im 500 ml Maßstab. 169

Abbildung 5-1 3D-Struktur der FDM aus *P. putida F61* mit allen Untereinheiten. Gelb hervorgehoben sind die Aminosäuren Histidin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin und Cystein, die als Bindungsstellen für das Cross-Linking mit Formaldehyd fungieren können. 184

Abbildung 5-2 3D-Struktur der Formaldehyd-Dismutase aus *P. putida F61* und ihre homologen Untereinheiten aus unterschiedlichen Perspektiven: *links:* Darstellung des Abstands vom C-terminalen Ende zum aktiven Zentrum; *rechts:* Darstellung des Abstands des C-terminalen Endes zwischen den Untereinheiten. 190

Abbildung 5-3 Schematische Darstellung einer kontinuierlichen Gegenstromextraktion zur in-situ-Produktabtrennung von Ameisensäure (links) und gleichzeitiger enzymatischer Reaktion an porösen Trägerpartikeln (rechts) [98]..... 203

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1 Vergleich der Eigenschaften der Formaldehyd-Dismutasen aus unterschiedlichen Mikroorganismen [10] 9

Tabelle 2-2 Substratspezifität der Formaldehyd-Dismutase aus *P. putida* F61 [13] 10

Tabelle 2-3 Aktivität der Formaldehyd-Dismutase nach Kultivierung von *P. putida* F61 auf unterschiedlichen Medien [16]. Medium I besteht aus einer Mineralsalzlösung [12]. Medium II besteht aus Pepton, Fleischextrakt, NaCl und K2HPO4. Medium III besteht aus Medium II mit zusätzlicher Glukose. 12

Tabelle 2-4 Die ersten 20 N-terminalen Aminosäuren der FDM aus unterschiedlichen Stämmen. 13

Tabelle 2-5 Reinigung der FDM aus dem Wildtyp F61 nach Kato [11]. 14

Tabelle 2-6 Reinigung der FDM aus dem Wildtyp F61 nach Kato [21]. 15

Tabelle 2-7 Reinigung der FDM aus dem Wildtyp F61 nach Yanase [19]. 15

Tabelle 2-8 Reinigung der FDM aus einem rekombinanten Stamm nach Yanase [20] 16

Tabelle 2-9 Nachweismethoden für die Bestimmung der Dismutase-Aktivität und zur Charakterisierung der Formaldehyd-Dismutase aus unterschiedlichen Publikationen. 17

Tabelle 2-10 Formaldehyd-Umsetzung durch unterschiedlich immobilisierte Formaldehyd-Dismutase und deren Stabilität. Das Reaktionsvolumen (20 ml) enthielt 1 mg der gereinigten freien Formaldehyd-Dismutase oder das immobilisierte Enzympräparat mit 1 mg des gereinigten Enzyms. Die Reaktion wurde bei 30 °C unter N_2-Atmosphäre durchgeführt. Die Reaktion wurde in

einem frischen Reaktionsgemisch wiederholt, bis eine signifikante Aktivitätsänderung eintrat [18]. 21

Tabelle 2-11 Verteilungskoeffizienten und Effizienz der Extraktion (D_E) mehrerer organischer Lösemittel (Ester, Ketone, Alkohole) bei bestimmten Ameisensäurekonzentrationen (c_{AS}) [41], [42]. 24

Tabelle 2-12 Zusammenfassung der Parameter unterschiedlicher PDMS-Membranen für die Pervaporation von Methanol [61]. 29

Tabelle 2-13 Zusammenfassung der Parameter unterschiedlicher Zeolit- und Silicalit-Membranen für die Pervaporation von Methanol 30

Tabelle 3-1 Vergleich verschiedener Methoden zur Aktivitätsbestimmung. 47

Tabelle 3-2 Dosierungstabelle des Phosphatpuffers in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (FA). Bei vollständigem Umsatz des Formaldehyds durch die FDM hat die Reaktionslösung einen pH-Wert von 6. 57

Tabelle 3-3 Bestimmung der Biomassekonzentration nach Rodewyk [10] und Spieth [88]. 61

Tabelle 3-4 Emerskultivierung auf Agarplatten 62

Tabelle 3-5 Phosphatpuffer 1 zur Fermentation (250 mM) nach Rodewyk [7] 63

Tabelle 3-6 Spurenelementlösung SL11b = SL4 63

Tabelle 3-7 Mineralsalzlösung A1 1:5 63

Tabelle 3-8 Minimalmedium 63

Tabelle 3-9 Kultivierung von *P. putida J3* im Schüttelkolben. 64

Tabelle 3-10 Fermentation von *P. putida* J3 im Bioreaktor 64

Tabelle 3-11 Herstellung des Rohextrakts aus *P. putida* J3 66

Tabelle 3-12 Eigenschaften des OH-Anionenaustauschers Purolite A111 79

Tabelle 3-13 Umsetzung von synthetischem Biogas (30 Vol.-% Methan N25, Rest synthetische Luft N50) an 25 mg eines Vanadiumkatalysators in Abhängigkeit vom Volumenstrom und der Temperatur [105]. 91

Tabelle 3-14 Zusammenfassung aller verwendeten Geräte und Materialien 93

Tabelle 4-1 Vergleich der FDM-Aktivität nach Aufschluss mittels Hochdruckhomogenisation und Lyophilisierung der Biomasse aus verschiedenen Fermentationen von *Pseudomonas putida J3* mit Feed-Regelung der Formaldehyd-Dosierung über die Gelöstsauerstoffkonzentration. 100

Tabelle 4-2 Vergleich verschiedener Stämme und Fermentationsbedingungen auf FDM-Aktivität [106][107]. 100

Tabelle 4-3 Bewertung des Aufschlusserfolgs durch Variation des Leistungseintrags und der Beschallungszeit mittels mikroskopischer Aufnahmen. 102

Tabelle 4-4 Bestimmung des Hemmungstyps mittels hyperbolischer Geschwindigkeitsgleichung anhand der Konstanten a und b [34][117]. 125

Tabelle 4-5 Berechnete Werte für $vmax$ mittels Michaelis-Menten-Gleichung mit kompetitiver Hemmung für verschiedene Reaktionsdrücke. 129

Tabelle 4-6 Aktivität der FDM auf unterschiedlichen Trägermaterialien mit unterschiedlichen Bindungstypen (Herstellerangaben). 134

Tabelle 4-7 Spezifikationen des Polyacryl-Trägers IB-150A. 135

Tabelle 4-8 Betriebsparameter einer Rektifikationskolonne in Abhängigkeit der Methanol-Feedkonzentration. Die Leistung ist ohne und mit Wärmerückgewinnung durch einen Wärmetauscher dargestellt. 145

Tabelle 4-9 Verteilungskoeffizienten und Extraktionseffizienzen für verschiedene Extraktionsmittelzusammensetzungen in ungepufferten und sauren Systemen.

Es wurden TBP, TOPO und TOA als Extraktionsmittel und Diethylcarbonat als Lösungsmittel verwendet. 161

Tabelle 4-10 Methanolkonzentrationen in der ungepufferten wässrigen Phase vor und nach der Extraktion für verschiedene Extraktionsmittelzusammensetzungen bei neutralem pH-Wert. Es wurden TBP, TOPO und TOA als Extraktionsmittel und Diethylcarbonat als Lösungsmittel verwendet. 162

Tabelle 4-11 Verteilungskoeffizienten und Extraktionseffizienzen für verschiedene Extraktionsmittelzusammensetzungen durch enzymatische Umsetzung einer 1 g/l Formaldehydlösung zu Methanol und Ameisensäure bei einem pH-Wert von 6,8. Es wurden TBP und TOA als Extraktionsmittel und Diethylcarbonat als Lösungsmittel verwendet. 164

Tabelle 4-12 Immobilisierte Proteinmenge an plasmabehandelte PDMS und PTMSP Membranen. 166

Tabelle 5-1 Prozessparameter der Chemokatalyse zur Herstellung von Formaldehyd aus synthetischem Biogas. 208

Tabelle 5-2 Energiebilanz der Chemo- Katalyse bezogen auf die Daten der Gesamtbilanz. 209

Tabelle 5-3 Parameter der Enzymreaktion im Mischbettfilter 211

Tabelle 5-4 Parameter der Adsorption der Ameisensäure mittels Anionenaustauscher im Mischbettfilter 211

Tabelle 5-5 Parameter des Mischbettfilters und Kosten. 212

Tabelle 5-6 Parameter und Kosten der Pervaporation von Methanol 213

Tabelle 5-7 Simulation der dreistufigen Pervaporation einer wässrigen Methanollösung. 213

Tabelle 5-8 Kostenaufstellung für die Herstellung von Ameisensäure und Methanol 214

Abkürzungen

µ	Dynamische Viskosität
µM	Mikromol
A	Ampere
A	Fläche
BHKW	Blockheizkraftwerk
Bp	Basenpaare
c	Konzentration
C	Celsius
C	Kohlenstoff
CH_2O	Formaldehyd
CH_3OH	Methanol
CH_4	Methan
CIP	Cleaning-In-Place
d	Durchmesser
dest.	destilliert
DMPA	2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
E_0	Gesamtkonzentration der aktiven Zentren
EEG	Erneuerbare-Energien-Gesetz
EU	Europäische Union
FA	Formaldehyd
FDM	Formaldehyd-Dismutase (EC 1.2.99.4)
G	Gramm
H_2	Wasserstoff
H_2O	Wasser
HCOOH	Ameisensäure
HDH	Hochdruckhomogenisator
HPLC	High-performance liquid chromatography
I	Ionenstrom
ICT	Institut für Chemische Technologie

IGB	Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
k	Geschwindigkeitskonstante
kDa	Kilodalton
K_i	Inhibitionskonstante
kJ	Kilojoule
k_M	Michaelis-Konstante
k_{kat}	Wechselzahl
kW	Kilowatt
KWK	Kraft-Wärme-Kopplung
L	Liter
M	Molar
m	Masse
M	Drehmoment
MBT	(Abteilung) Molekulare Biotechnologie
MeOH	Methanol
MF	Methylformiat
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Mikromolar
MS	Massenspektrometer
MW	Megawatt
n	Drehzahl
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NB	Nutrient-Broth
Ne-Zahl	Newton-Zahl
NH3	Ammoniak
NVP	N-Vinyl-2-pyrrolidon
OD	optische Dichte
ode	ordinary differential equation
P	Leistung
PEG	Polyethylenglykol
pK_S	Logarithmus der Säurekonstante

PP	Phosphatpuffer
ppb	parts per billion
PDMS	Polydimethylsiloxan
PSI	Pervaporation Separation Index
PTMSP	Polytrimethylsiloxanpropien
PU	Polyurethan
Q	Ladung
$\dot{Q}$	Wärmestrom
R	Rücklaufverhältnis
Re-Zahl	Reynolds-Zahl
rpm	Umdrehungen pro Minute
S	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIB	Swiss Institute of Bioinformatics
TM	Trockenmasse
U	Units
u	Umdrehungsgeschwindigkeit
UE	Untereinheit
V	Volumen
$\dot{V}$	Volumenstrom
v_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
ρ	Dichte

Kurzfassung

Zur Herstellung von Methanol und Ameisensäure aus Biogas wurde ein Prozess entwickelt, der Chemo- und Biokatalyse miteinander kombiniert. An einem Vanadium-Katalysator wurde Biogas zu Formaldehyd oxidiert und in einem nächsten Schritt biokatalytisch durch die Formaldehyd Dismutase (FDM) in einem gerührten Druckreaktor mit einem Reaktionsvolumen von 100 ml bis 1 Liter der Formaldehyd zu Methanol und Ameisensäure umgesetzt. Mittels Echtzeit-Massenspektrometrie mit Membraneinlass wurden direkt aus der Flüssigkeit die Produktkonzentrationen gemessen und anhand nichtlinearer Regression die Michaelis-Menten-Parameter für die FDM aus dem Rohextrakt von *Pseudomonas putida sp.* exakt bestimmt. Sowohl mittels Modellierung als auch experimentell konnte eine Produktinhibierung durch Ameisensäure und Methanol beschrieben werden, die zur Beendigung der Enzymreaktion bei einer Gleichgewichtskonzentration von 1,5 M Methanol bzw. 0,7 M Ameisensäure führt. Für K_M wurde ein Wert von 43,5 mM, für K_I ein Wert von 12 mM und für v_{max} ein Werte zwischen 0,2 mmol/min und 1,7 mmol/min erhalten. Für Formaldehydkonzentrationen von 50 mM konnte eine kompetitive Hemmung nachgewiesen werden. Bei Reaktionen mit 500 mM als Startkonzentration überwog die unkompetitive Hemmung, wie anhand eines hyperbolischen Modells gezeigt werden konnte. Zur Immobilisierung der FDM wurden dreizehn verschiedene Enzymträger im 1 ml Maßstab getestet. Auf diese Weise wurde eine oberflächenspezifische Aktivität von 160 U/mm² erzielt und nach 440 Tagen eine Restaktivität von bis zu 40 % erreicht. Somit war es erstmals möglich, eine 0,5 M Formaldehydlösung kontinuierlich (10 ml/min) mit einem Umsatz von 91 % in einem 200 ml Festbettreaktor umzusetzen und die Reaktion mit der Chemokatalyse zu koppeln.

Zur Produktgewinnung wurden die Extraktion, Adsorption an Ionenaustauschern, Pervaporation und Rektifikation angewendet und untersucht. Die Pervaporation von Methanol an Polydimethylsiloxan (PDMS) und Poly[1-(trimethylsilyl)-1-propyne] (PTMSP) Membranen lieferten für Methanolkonzentrationen von 33 mM bei 25 °C und einem Vakuum von 0,16 mbar eine Selektivität von 7 [-] und einen Flux von 0,6 kg/h m². Es konnten in-situ Verfahren für die Verwendung von Ionenaustauschern und der Extraktion entwickelt werden. Für die Extraktion konnte aber kein Extraktionsmittel gefunden werden, das keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität hat. Anhand einer Prozessbilanz konnte das gesamte Verfahren skizziert und eine Wirtschaftlichkeitsbetrachtung durchgeführt werden. Der berechnete Preis für Methanol und Ameisensäure beträgt in Summe je Tonne etwa 1800 €.

Abstract

For producing methanol and formic acid out of biogas, a process has been developed by combining chemo- and biocatalysis. On a vanadium catalyst, biogas was oxidized to form formaldehyde and, in a next step, the formaldehyde was converted biocatalytically with formaldehyde dismutase (FDM) in a stirred pressure reactor with a reaction volume of 100 ml up to 1 liter to methanol and formic acid. By using real-time mass spectrometry with membrane inlet, the product concentrations were recorded directly from the liquid and the Michaelis-Menten parameters for the FDM from the raw extract of *Pseudomonas putida sp*. were determined exactly by non-linear regression. Both by modeling and experimentally, product inhibition by formic acid and methanol could be described, leading to the completion of the enzyme reaction at an equilibrium concentration of 1.5 M methanol and 0.7 M formic acid. For K_M a value of 43.5 mM, for K_I a value of 12 mM and for v_{max} a value between 0.2 mmol/min and 1.7 mmol/min were obtained. For formaldehyde concentrations of 50 mM, a competitive inhibition could be demonstrated. During reactions with 500 mM as start concentration the uncompetitive inhibition prevailed, as shown by a hyperbolic model. To immobilize the FDM, thirteen different enzyme carriers were tested in a 1 ml scale. By this means, a surface-specific activity of 160 U/mm² and a residual activity of up to 40 % after 440 days were achieved. Thus, it was possible to convert a 0.5 M formaldehyde solution continuously (10 ml/min) with a conversion of 91 % in a 200 ml fixed-bed reactor and to couple the reaction with the chemocatalysis for the first time.

Extraction, adsorption with ion exchangers, pervaporation and rectification were investigated for product recovery. Pervaporation of methanol by polydimethylsiloxane (PDMS) and poly [1- (trimethylsilyl) -1-propyne] (PTMSP) membranes revealed a selectivity of 7 [-] and a flux of 0.6 kg/h m² for methanol concentrations of 33 mM at 25 °C under a vacuum of 0.16 mbar. In-situ recovery processes for the use of ion exchangers and extraction have been developed. However, no extraction agent, having no influence on the enzymatic activity, could be found for the extraction. Based on a process balance, the entire process could be assessed and an economic analysis was realized. The calculated total price for methanol and formic acid from biogas ranges at about 1800 € per ton.

1 Einleitung und Zielsetzung der Arbeit

Ende 2015 waren in Deutschland 8861 Biogasanlagen mit einer installierten elektrischen Leistung der damit verbundenen Blockheizkraftwerke (BHKW) von insgesamt 4018 MW in Betrieb. Die Prognosen zum Jahresende 2016 liegen bei 9009 Biogasanlagen mit einer installierten elektrischen Leistung von 4166 MW [1]. Bei einer Vielzahl von landwirtschaftlichen Biogasanlagen ist eine sinnvolle und effiziente Nutzung der Wärmeenergie des zugehörigen BHKW nicht gegeben. Selbst in modernsten BHKW mit einer elektrischen Leistung von 400 kW bis 2,5 MW liegt der elektrische Wirkungsgrad bei 38-43 %. Der thermische Wirkungsgrad liegt bei 43-52 %. Das EEG 2012 erweiterte die Bedingungen für den KWK-Bonus von Biogasanlagen mit BHKW um eine grundsätzlich erforderliche Wärmequote von mindestens 60% [2]. Diese Wärmequote kann mit herkömmlichen landwirtschaftlichen Biogasanlagen ohne zusätzliche Wärmeverbraucher nicht erreicht werden. Um sich von der wirtschaftlich existenziellen Abhängigkeit von der Stromeinspeisung nach EEG 2012 zu lösen, sind die Betreiber neuer Biogasanlagen gezwungen, sich eine ertragreiche Wärmenutzung zu erschließen oder zumindest Teilströme des produzierten Biogases anderweitig gewinnbringend zu nutzen.

Eine Möglichkeit wäre die Herstellung von Methanol und Ameisensäure aus Biogas als speicherfähige und transportierbare Energieträger sowie Rohstoffe für die chemische Industrie. Methanol wird derzeit im großen Maßstab aus Erdgas mittels Reforming hergestellt. Dabei wird zunächst Synthesegas hergestellt und dieses anschließend zu Methanol umgesetzt. Das Verfahren ist sehr energieaufwendig. Der thermische Wirkungsgrad für die Lurgi-Druckvergasung mit anschließender Niederdruck-Methanol-Synthese liegt bei 68 % [3]. Bei der sogenannten „Autothermen Reformierung“ von Erdgas werden die Dampfreformierung und die partielle Oxidation kombiniert und damit der Erdgasverbrauch reduziert [4]. Diese Verfahren werden im großen Maßstab durchgeführt, wie beispielsweise beim MegaMethanol-Verfahren von Lurgi mit einer Tageskapazität von 5000 Tonnen Methanol pro Tag [5].

Biomasse ist weltweit flächendeckend verfügbar und kann entweder in Form von Abfall oder Energiepflanzen zur dezentralen Herstellung von Biogas eingesetzt werden. Allerdings sind

die Durchsätze der Biogasanlagen so gering, dass sich die genannten gängigen Verfahren zur dezentralen Herstellung von Methanol nicht rentieren [6]. Zudem ist Biogas ein Gasgemisch, das zu etwa gleichen Teilen aus den Hauptkomponenten Methan und Kohlenstoffdioxid besteht. Größere Durchsätze könnte man theoretisch durch das Zusammenführen des Biogases aus mehreren Biogasanlagen und den Transport zu einer gemeinsamen Raffinerie erzielen, was aber wegen der geringer Energiedichte von Biogas, der schlechten Komprimierbarkeit von Methan und relativ hohen Transportkosten schwierig umzusetzen ist. Die Speicherung des Methans im Biogas nach Aufbereitung und Einspeisung in ein Gasnetz ist mit 193 Anlagen in Deutschland (Prognose 2016) eine Seltenheit [1], was die Problematik unterstreicht. Das Kohlenstoffdioxid bleibt gänzlich ungenutzt.

Die partielle Oxidation von Methan zu Methanol ist theoretisch die effizienteste Methode zur Herstellung von Methanol, da keine energieaufwendige Synthesegasherstellung erforderlich ist. Daher ist die Partialoxidation zu Methanol Ziel vieler wissenschaftlicher Untersuchungen, die aber bisher nicht zu befriedigenden Ergebnissen geführt haben [6], da eine weitere Oxidation zu Formaldehyd oder zu höheren C_1-Oxygenaten nur schwer verhindert werden kann.

Das Oxidationsverhalten des Methans soll sich nun für einen neuartigen Prozess zu Nutze gemacht werden. Bei der partiellen Oxidation von Methan mit Sauerstoff werden Umsätze von etwa 10 % erreicht. Das umgesetzte Methan kann maximal zu 20 % zu Methanol, aber zu 90 % zu Formaldehyd oxidiert werden [7], [8]. Die Besonderheit des in dieser Arbeit vorgeschlagenen Prozesses liegt in einer Kombination der chemo-katalytischen partiellen Oxidation von Methan mit Kohlenstoffdioxid zu Formaldehyd mit einer anschließenden Disproportionierung von Formaldehyd durch die Formaldehyd-Dismutase (FDM) aus *Pseudomonas putida sp.* zu Methanol und Ameisensäure in einem Enzymreaktor.

Die Doktorarbeit befasst sich mit dem biotechnologischem Teil und der Stofftrennung, wie in Abbildung 1-1 durch die Umrandung dargestellt. Da in diesem Prozessverlauf die entstehende Ameisensäure in den katalytischen Prozess zurückgeführt wird, werden in der Bilanz des Gesamtprozesses drei Mol Methan und ein Mol Kohlenstoffdioxid zu vier Mol Methanol umgewandelt. Damit entsteht kein bilanzieller Energieverlust, was die Verbrennungsenthalpie von Biogas (Methan: -890,4 kJ mol^{-1}) und Methanol (726,4 kJ mol^{-1}) angeht. Da es sich um einen

endothermen Prozess handelt, liegt der theoretische Energiegehalt des Produktes sogar höher als der des eingesetzten Biogases.

Ziel der Doktorarbeit war es daher, das Zwischenprodukt Formaldehyd aus dem Blickwinkel einer technischen Nutzung enzymatisch mittels der FDM zu Methanol und Ameisensäure umzusetzen und die reinen Produkte Methanol und Ameisensäure zu erhalten. Dies beinhaltete die Herstellung des Enzyms, die Verwendung des Enzyms zur Umsetzung des Formaldehyds und die Produktgewinnung. Zudem sollten zuletzt die Chemo- und Biokatalyse in einer Pilotanlage miteinander kombiniert und Biogas zu den Produkten umgewandelt werden.

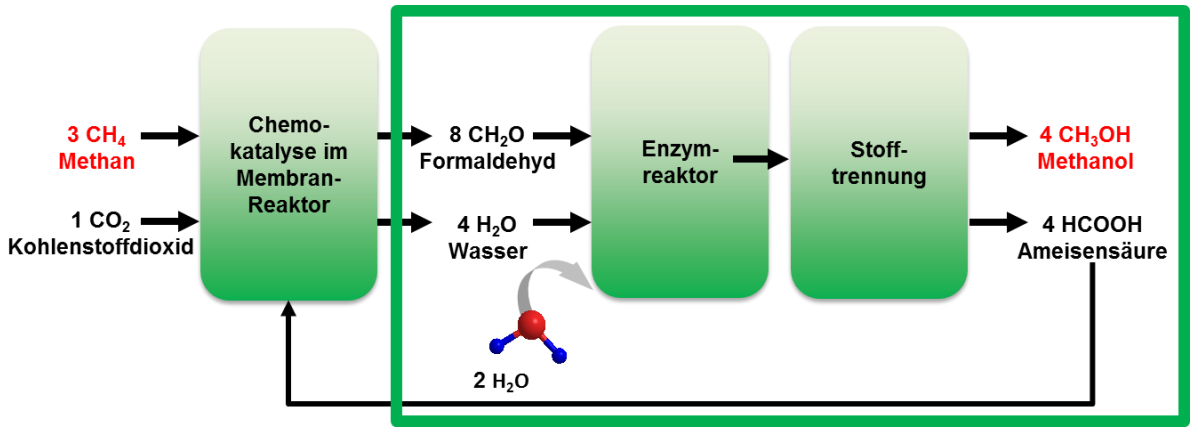


Abbildung 1-1 Zweistufiger Prozess zur Herstellung von Methanol aus Biogas. *Umrandung: Darstellung des Forschungsfelds der Doktorarbeit.*

Für die systematische Entwicklung eines Prozesses zur Herstellung von Methanol und Ameisensäure aus Formaldehyd mussten die folgenden Punkte bearbeitet werden:

1. Die Entwicklung von **Analysemethoden**, da sowohl das Edukt Formaldehyd als auch die Produkte in der Pufferlösung durch ihre chemo-physikalischen Eigenschaften als Stoffgemisch schwer zu erfassen waren. Dies beinhaltete die Entwicklung eines geeigneten Enzym-Assays und die Etablierung einer on-line-Messtechnik zur Aufzeichnung von Messwerten mit einer bestimmten Datendichte.
2. Die Batch-Fermentation des Wildtypstamms *Pseudomonas putida J3* mit Formaldehyd ist zur Ausbildung der FDM notwendig. Formaldehyd ist als alleinige Kohlenstoffquelle wegen seiner toxischen Wirkung auf den Stamm zur Enzymherstellung nicht geeignet. Deshalb wurden verschiedene Ansätze zur **Fermentation** verfolgt.

3. Für den Einsatz als technisches Enzym musste die **Formaldehyd-Dismutase (FDM)** gewonnen werden.
4. Die **Enzymreaktion** lässt sich im Hinblick auf eine technische Umsetzung unter unterschiedlichen Bedingungen durchführen. Die Enzymimmobilisierung und die Prozessparameter stehen dabei im Vordergrund. Dieses in einem mathematischen Modell zu beschreiben, war zur Simulation des Gesamtprozesses wichtig.
5. Die **Produktgewinnung** stellt einen maßgeblichen Schritt des Gesamtprozesses dar, da die Produkte Methanol und Ameisensäure trotz ihrer guten Löslichkeit in Wasser am Ende des Prozesses voneinander getrennt in möglichst reiner Form vorliegen müssen.
6. Die Kombination aus Chemokatalyse, Enzymreaktion und Produktaufbereitung bilden den Kern der **Verfahrensentwicklung**. Hierbei wurden verschiedene Verfahrenselemente miteinander kombiniert.

2 Stand von Wissenschaft und Technik

2.1 Einführung in den Stand der Technik und Hypothesen der Doktorarbeit

Formaldehyd wird in zahlreichen Produktionsprozessen eingesetzt und ist in vielen Produkten, beispielsweise in Form von Kunstharzen in Holzwerkstoffen enthalten. Gleichzeitig ist die Gefahr der gesundheitlichen Gefährdung von Menschen durch Formaldehyd allgemein bekannt [9]. Daher wurde verstärkt auf dem Gebiet des Formaldehydnachweises und der Beseitigung von Formaldehyd aus Produkten und Produktionsprozessen geforscht. In den 80er und 90er Jahren wurden in diesem Zuge auch der mikrobielle Abbau von Formaldehyd erforscht und dabei Enzyme isoliert. Auf diese Weise rückten sowohl das Enzym Formaldehyd-Dismutase (vergl. Kapitel 2.2) als auch die Fermentation zur Herstellung des Enzyms (vergl Kapitel 2.3 und 2.4) in den Blickpunkt der Aufmerksamkeit.

Die *P. putida sp.* Fermentationen, aber auch die Fermentationen von rekombinanten Stämmen zur Gewinnung der Formaldehyd-Dismutase (FDM), sind in der Literatur umfänglich beschrieben (vergl. Kapitel 2.4). Im Falle von *P. putida sp.* wird die Bildung der FDM durch die Zugabe von Formaldehyd induziert. Allerdings wirken zu hohe Formaldehydkonzentrationen toxisch auf die Bakterien. Deshalb schien es in der Doktorarbeit sinnvoll, eine Methode zur geregelten Zugabe von Formaldehyd während der Fermentation zu entwickeln, um eine möglichst konstante Qualität der Enzymlösung zu erhalten. Da Formaldehyd als alleinige Kohlenstoffquelle durch den Organismus verwendet werden kann, muss nach Zugabe von Formaldehyd auch ein Sauerstoffverbrauch beobachtet werden können. So bestand die Hypothese darin, dass anhand der Gelöstsauerstoffkonzentration in der Fermentationsbrühe ein Regelsystem für die Zugabe von Formaldehyd entwickelt werden kann.

Es sind unterschiedliche Methoden zur Bestimmung der Aktivität der FDM publiziert (vergl. Kapitel 2.6). Im Rahmen der Doktorarbeit konnte auf diese Methoden zurückgegriffen werden, wobei einige Randbedingungen, wie die Auswirkungen von Art und Konzentration des Puffers oder der Produktkonzentration auf die Analysemethode, nicht bekannt waren. Auch das Herstellen verschiedener Enzym-Präparate (vergl. Kapitel 2.5) ist aus der Literatur bekannt. Trotz umfangreicher Untersuchungen wurde das Enzym bisher nicht auf die technische

Eignung untersucht. Deshalb galt es für diese Arbeit herauszufinden, bis zur welcher Produktkonzentration die FDM eingesetzt (vergl. Kapitel 2.6.3), ob die FDM immobilisiert und wie lange oder wie oft das Enzym für die Reaktion verwendet werden kann (vergl. Kapitel 2.6.4). Die Reaktion der FDM konnte bisher nicht mit Hilfe eines mathematischen Modells beschrieben werden, weshalb die Modellierung in der Doktorarbeit aufgegriffen wurde. Dabei ist in der Literatur nicht bekannt, weshalb die erstellten Modelle die FDM-Reaktion nicht abbilden können [10]. Ursache dafür könnte die Hemmung der Aktivität durch die Produkte Methanol und Ameisensäure sein. Es bestand die Hypothese, dass durch die Herstellung möglichst homogener und langzeitstabiler Enzympräparate und durch das Erzielen möglichst sehr exakter Reaktionsbedingungen in einem vollautomatisierten Anlagenaufbau mit geeigneter Messtechnik sehr hochaufgelöste Messdaten erzeugt werden können. Mittels on-line Massenspektrometrie (vergl. Kapitel 2.6.2) sollten die Edukt- und Produktkonzentrationen direkt aus der Flüssigphase bestimmt und aufgezeichnet werden, die die qualitativen Voraussetzungen zur datengetriebenen Modellierung erfüllen. Zudem reagieren Methanol und Ameisensäure in wässriger Lösung zu Methylformiat, was bisher bei der Verwendung der FDM als Katalysator in der Literatur nicht beachtet wurde. Wegen der hohen Empfindlichkeit der Massenspektrometrie können Methylformiatkonzentrationen im unteren ppb-Bereich gemessen werden.

Die Verwendung der FDM für technische Zwecke zielte maßgeblich auf die Beseitigung von Formaldehyd ab. Aus diesem Grund mussten in der Doktorarbeit neue Prozesslösungen gefunden werden, wie beispielsweise die in-situ Produktgewinnung von Methanol und Ameisensäure. Gängige Verfahren zur Herstellung von Ameisensäure beinhalten die Adsorption von Ameisensäure auf Ionenaustauschern oder die Abtrennung mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion aus einem wässrigen Milieu. Diese Verfahren sollten auf das in der Doktorarbeit entwickelte Verfahren übertragen werden (vergl. Kapitel 2.8). Zur Verwendung von Ionenaustauschern zur in-situ Abtrennung musste auf einen Puffer verzichtet werden, da ansonsten die Salze des Puffers bevorzugt an den Ionenaustauscher adsorbiert hätten. Eine Veränderung des pH-Werts kann hypothetisch vermieden werden, wenn die Adsorption der Ameisensäure an die Ionenaustauscher schneller vonstattengeht als die Ameisensäurebildung der FDM (vergl. Kapitel 2.8.2). Für die Verwendung von (in-situ) Extraktionsverfahren musste zudem der inhibitorische Einfluss der unterschiedlichen Extraktionsmittel (vergl. Kapitel 2.8.1) auf die Enzymaktivität überprüft werden.

In der Literatur wurden nur geringe Konzentrationen an Formaldehyd für die FDM Reaktion eingesetzt. Dementsprechend lagen die Methanolkonzentrationen bei kleiner fünf Volumenprozenten. Es war davon auszugehen, dass höhere Konzentrationen nicht erzielt werden konnten. Die Gewinnung von Methanol aus wässriger Lösung bei so geringen Konzentrationen ist schwierig. Rektifikationsanlagen verwenden eine Mindestkonzentration von 8 % (vergl. Kapitel 2.9). Die Verwendung von geringeren Konzentrationen in einer Rektifikationsanlage ist nicht publiziert und wurde deshalb computergestützt untersucht. Die Rektifikation stellt eine Methode dar, mit der aber nicht in-situ Methanol gewonnen werden kann. Eine Möglichkeit zur in-situ Abtrennung von Methanol aus einer wässrigen Lösung stellt die Pervaporation dar. Insbesondere war hier die Verwendung von neuartigen Poly[1-(trimethylsilyl)-1-propyne]-(PTMSP-) Membranen von Interesse (vergl. Kapitel 2.9). Dichte Membranen, deren transmembraner Stofftransport auf dem Lösungs- Diffusions- Modell beruhen, sollten eine bessere Abtrennung von Methanol aus der wässrigen Lösung als poröse Membranen (Membrandestillation) erreichen. Zur Pervaporation von flüchtigen organischen Substanzen können auch anorganische Materialien, wie beispielsweise Sintermetalle, verwendet werden. Allerdings bestand die Idee, die Oberfläche von Pervaporationsmembran mit der FDM zu beschichten. Dadurch sollte die Reaktion mit der Produktabtrennung kombiniert werden. Hypothetisch sollten durch die räumlich nahe Abtrennung des Methanols sowohl die Aktivität des Enzyms als auch die Effektivität der Produktabtrennung gesteigert werden können. Siloxane lassen sich chemisch aktivieren. Polydimethylsiloxan (PDMS-) und PTMSP-Membranen sollten sich deshalb ebenfalls chemisch aktivieren und Enzyme dadurch immobilisieren lassen (vergl. Kapitel 2.9).

2.2 Formaldehyd-Dismutase (FDM)

Einige *Pseudomonas putida*-Stämme sind in der Lage, Formaldehyd enzymatisch abzubauen. Die Disproportionierungs-Reaktion der Formaldehyd-Dismutase (FDM, EC 1.2.98.1) aus *Pseudomonas putida sp.* folgt einem sogenannten Flip-Flop-Mechanismus (Abbildung 2-1), durch den Ameisensäure und Methanol entstehen: Hydratisierter Formaldehyd (Formaldehydhydrat) wird dabei zu Ameisensäure oxidiert. Die Reduktionsäquivalente werden auf den am Enzym gebundenen Cofaktor NAD^+ übertragen, welcher durch die Reduzierung eines weiteren Formaldehyd-Moleküls wieder zu Methanol regeneriert wird. Wie von Rodewyk

(1998) beschrieben, ist das Enzym unabhängig von weiteren Cofaktoren und sehr robust [10]. Der fest assoziierte und sich selbst regenerierende Cofaktor macht die FDM für die Verwendung als technisches Enzym interessant, da kein zusätzlicher Cofaktor hinzugegeben oder ein alternativer Regenerationsweg entwickelt werden muss. Die Eigenschaften des Enzyms aus *P. putida J3.* [10] stimmen mit dem von Kato et al. [11] aufgeklärten Reaktionsmechanismus der Formaldehyd-Dismutase (EC 1.2.99.4 [12]) aus *Pseudomonas putida F61* überein. Sowohl der gebundene Cofaktor als auch der Nachweis von 2 mol Zink je Untereinheit der Dismutase wurden durch Kato et al. [13] nachgewiesen. Mason und Sanders [14] bestätigten den vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus unter Verwendung von Deuterium-NMR-Spektroskopie für *P. putida F61* und *Staphylococcus aureus*. Auch in gram-positiven Bakterien konnte eine Formaldehyd-Dismutase isoliert werden [15], allerdings unterscheidet sich das Enzym signifikant von dem aus *P. putida* isolierten Enzym. Aus dem Stamm *F61* konnte ein gegenüber Formaldehyd sehr stabiler Stamm *F61-a* abgeleitet werden. Der Unterschied zwischen den beiden Stämmen liegt darin, dass *F61* Formaldehyd sowohl mit einer Dismutase (apparenter Km-Wert von 350 mM) als auch mit einer Dehydrogenase (apparenter Km-Wert 0,39 mM, EC 1.2.1.1) abbauen kann, während *F61-a* ausschließlich die Formaldehyd-Dismutase ausbildet [16]. In Tabelle 2-1 sind die Eigenschaften der Formaldehyd-Dismutasen aus den unterschiedlichen Organismen zum Vergleich aufgeführt.

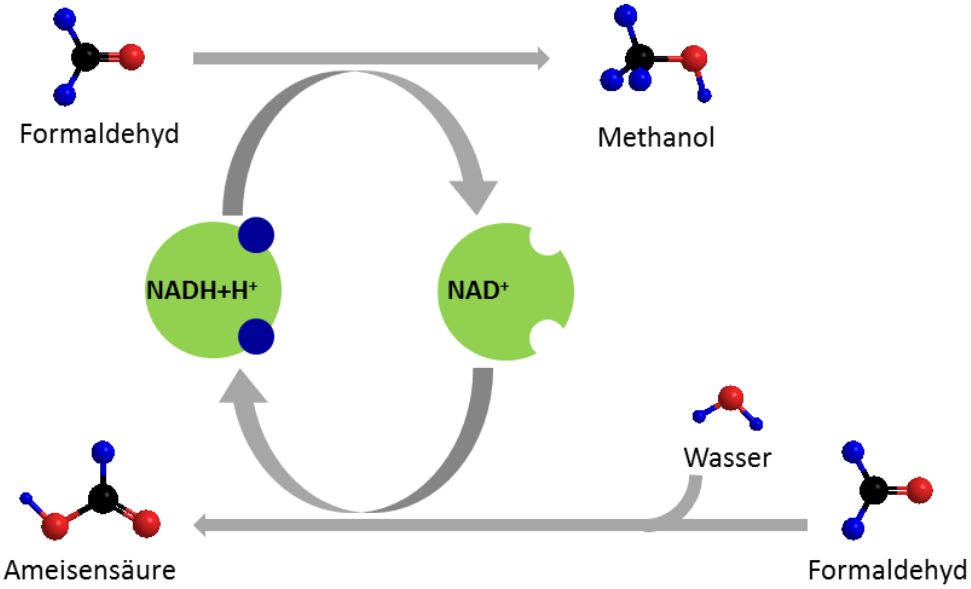


Abbildung 2-1 Reaktionsschema der Formaldehyd-Dismutase.

Tabelle 2-1 Vergleich der Eigenschaften der Formaldehyd-Dismutasen aus unterschiedlichen Mikroorganismen [10]

Eigenschaft	**Formaldehyd-Dismutase**		
	P. putida J3 [10]	*P. putida F61* [11]	*A. methanolica* [15]
Natives apparentes Molekulargewicht [kDa]	Gelfiltration: 216±16	Gelfiltration: 180±2	Gelfiltration: 268
Molekulargewicht der Untereinheit (UE) [kDa]	SDS-Page: 43	SDS-Page: 44	SDS-Page: 50
Assoziierter Cofaktor (nicht kovalent)	NAD/NADH	NAD/NADH	NADPH
Struktur des Holoenzyms	$\alpha_4 - \alpha_5$	α_4, je UE 1 mol NAD(H) und 2 mol Zink	-
Temperatur-Optimum [°C]	35-40	40	55
pH-Optimum	6-7,5	8	6,3
Spez. Enzymaktivität im Rohextrakt [a)] [U/mg]	30-60 [b)]	5,2 [c)]	-
Spez. Enzymaktivität des Enzyms [a)] [U/mg]	106*	386**	-
Apparenter K_m-Wert für Formaldehyd [mM]	>100	350	19,5
Inhibitoren	Hg^{2+} Cu^{2+} [e)] Ag^{+} NH_4^{+} [d)] Co^{2+} [e)] EDTA [e)]	Hg^{2+} Cu^{2+} [f)] Zn^{+} [f)] Fe^{3+} [f)] Jodacetat	EDTA
Keine Wirkung von	Zn^{+}	EDTA	-
Positive Effektoren	NADH	-	-

*) Im Rohextrakt
**) Gereinigtes Enzym
a) Getestet mit 20 mM Formaldehyd als Substrat
b) Zellen mit Formaldehyd als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle gezüchtet
c) Zellen mit Komplexmedium und 33 mM Formaldehyd gezüchtet.
d) Ammonium hemmt die Aktivität der Dismutase indirekt, da es die Verfügbarkeit von Formaldehyd bei pH 7 stark herabsetzt (HMTA-Bildung)
e) Schwache Hemmung von 11-31 % bei Konzentrationen von 0,1 mM bzw. bei EDTA 1mM.
f) Starke Hemmung von 95-100 % bei einer Konzentration von 0,1 mM.

Die Formaldehyd-Dismutase aus *P. putida F61* zeigt gegenüber primären Alkoholen Aktivität. In Tabelle 2-2 ist die relative Aktivität der Formaldehyd-Dismutase gegenüber unterschiedlichen Alkoholen dargestellt [13]. Von Mizuno und Imada (1986) wurde eine Methode

im Labormaßstab zur Herstellung von Ameisensäure aus Methanol durch Kopplung einer Alkoholoxidase, Katalase und der Formaldehyd-Dismutase entwickelt [17]. Dieses Verfahren wurde durch Kato et al. [18] durch Immobilisierung der Formaldehyd-Dismutase in Polyurethan weiterentwickelt. Andere Immobilisierungsformen, wie die Bindung an Trägerpartikel, wurden nicht publiziert.

Tabelle 2-2 Substratspezifität der Formaldehyd-Dismutase aus *P. putida* F61 [13]

Komponente	Relative Aktivität [%]	Km [mM]
Methanol	0	k.A.
Ethanol	100	40
1-Propanol	100	20
1-Butanol	96,2	3,2
1-Pentanol	9,62	1,4
2-Propanol	0,21	k.A.
2-Butanol	0,09	k.A.
2-Methyl-1-propanol	1,21	k.A.
2-Hexanol	0,05	k.A.
3-Hexanol	0,05	k.A.
2-Pentanol	0,25	k.A.
1,4-Butandiol	0,93	k.A.
1,2,6-Hexantriol	0,93	k.A.
Furfurylalkohol	0,24	k.A.
Benzylalkohol	0,14	k.A.
Cyclohexanol	52,6	330

2.3 Der Organismus Pseudomonas putida

Die FDM wurde in der Doktorarbeit überwiegend mit Hilfe des Wildtyps *Pseudomonas putida sp.* gewonnen. Dabei wurde der von Rodewyk [10] isolierte Stamm *Pseudomonas putida J3* verwendet. *P. putida J3* ist ein gram-negatives, strikt aerob wachsendes, polar begeißeltes, stäbchenförmiges, etwa 0,8 µm bis 0,9 µm breites und 2,5 µm bis 4 µm langes Bakterium (Abbildung 2-2). Es bildet auf Nutrient-Broth-Platten (NB-Platten) runde, weiße, undurchsichtige Kolonien mit glattem Rand. Bei fortgeschrittenen Wachstumsstadien wurden ausge-

franste Kolonieränder beobachtet. Taxonomisch bestimmt wurde der am Fraunhofer IGB isolierte Stamm *Pseudomonas putida J3* durch die DSMZ (DSM ID 12-974II, 16. Januar 2013). Das Profil der zellulären Fettsäuren ist typisch für dieses Taxon. Die partielle Sequenzierung der 16SrDNA ergab Ähnlichkeiten bis zu 99,6 % zu verschiedenen Stämmen von *Pseudomonas putida*. Die Ähnlichkeit zum Typstamm beträgt 98,9 % und die Ähnlichkeit zu *Pseudomonas japonica* 99,3 %. Die phänotypischen Tests lassen keine eindeutige Zuordnung zu einer dieser beiden Spezies zu.

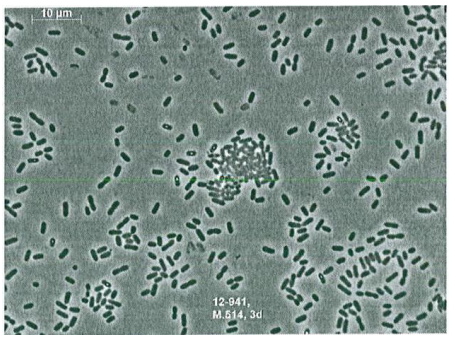


Abbildung 2-2 Mikroskopische Aufnahmen der DSMZ vom Stamm *Pseudomonas putida J3 (DSM ID 12-974II, 16. Januar 2013).*

2.4 Fermentation zur Herstellung der Formaldehyd-Dismutase

2.4.1 Auswirkung der Fermentationsparameter auf die FDM-Konzentration

Kato et al. [11] kultivierten *Pseudomonas putida F61* im Maßstab von 28 Litern und erzielten eine Ausbeute von 200 g Feuchtmasse. Als Nährmedium wurde eine Lösung mit 10 g/l Pepton, 5 g/l Fleischextrakt, 1 g Dikaliumhydrogenphosphat und 5 g Kochsalz mit pH 7 verwendet. Um die Expression der Formaldehyd-Dismutase sicherzustellen, wurde eine Formaldehyd-Konzentration von 1 g/l über die gesamte Fermentationsdauer konstant gehalten und der Stamm bei 30 °C kultiviert. Vergleicht man die spezifische Aktivität der Rohextrakte von Rodewyk (33,2 U/mg) und Kato et al. [11] (2,56 U/mg), so wird ein Unterschied bezüglich der spezifischen Dismutase-Aktivität deutlich. Rodewyk verwendete Formaldehyd als alleinige Kohlenstoffquelle [5]. Um Zellen mit hoher Formaldehyd-Dismutase-Aktivität zu erhalten, haben Kato et al. [16] die Kulturbedingungen untersucht. Tabelle 2-3 zeigt das Wachstum auf verschiedenen Medien und die spezifische Dismutase-Aktivität der einzelnen Rohextrakte.

Tabelle 2-3 Aktivität der Formaldehyd-Dismutase nach Kultivierung von *P. putida* F61 auf unterschiedlichen Medien [16]. Medium I besteht aus einer Mineralsalzlösung [12]. Medium II besteht aus Pepton, Fleischextrakt, NaCl und K2HPO4. Medium III besteht aus Medium II mit zusätzlicher Glukose.

Medium	Kohlenstoffquelle	Maximale Zellausbeute (OD_{610nm})	Spezifische FDM-Aktivität (µmol/min*mg)
I	Glukose	1,7	0
I	Succinat	1,1	4,6
I	Acetat	0,9	3,7
I	Ethanol	1,6	2,35
I	Glyzerin	1,7	1,81
II	Glyzerin	7,2	2,1
III	Glukose	8	4,3

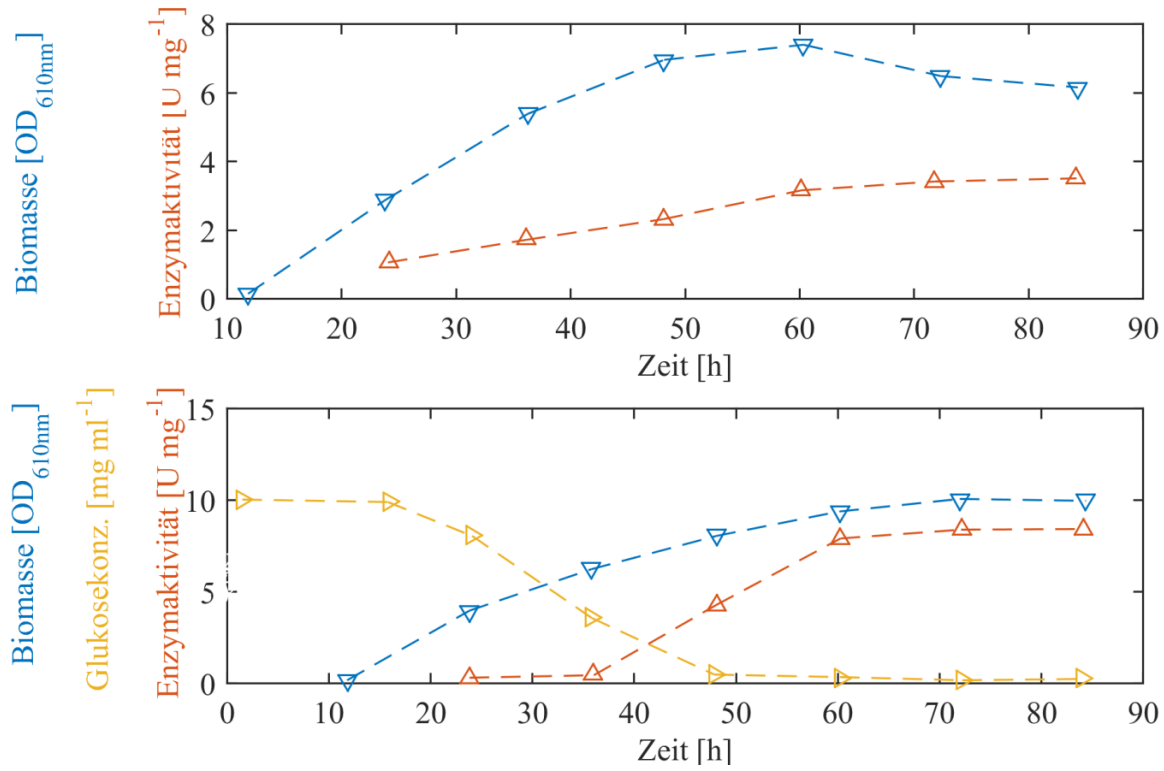


Abbildung 2-3 Wachstumskurve von *P. putida* F61-a und Formaldehyd-Dismutase Aktivität im Medium II (mit Glycerin als Kohlenstoffquelle, *obere Abbildung*)) und Medium III (mit zusätzlich Glukose als Kohlenstoffquelle, *untere Abbildung*) zu unterschiedlichen Fermentationszeitpunkten (Werte nach [16]).

Es zeigte sich, dass vor allem die Wahl der Kohlenstoffquelle ausschlaggebend für die Bildung der FDM ist. *P. putida F61-a* produziert die Dismutase im Medium I mit Succinat, Acetat, Ethanol oder Glyzerin als Kohlenstoffquelle.

Bei Verwendung des Mediums III ist, den Werten aus Tabelle 2-3 zufolge, ein verstärktes Zellwachstum aufgetreten. Bei der Verwendung von Glukose als alleinige Kohlenstoffquelle (Medium I) wurde keine Aktivität erhalten. Wurde Glucose zusätzlich zu Glycerin (Medium III) verwendet, so wurde die spezifische Aktivität im Rohextrakt gesteigert. Die Beziehung zwischen Glukoseverbrauch und Enzymproduktion wurde von Kato et al. untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die spezifische Aktivität des Rohextrakts stark zugenommen hatte, nachdem Glukose vollständig verbraucht worden war (Abbildung 2-3 *unten*). Dies sollte bei der Fermentation mit Glukose berücksichtigt werden.

2.4.2 Struktur und Klonierung der Formaldehyd-Dismutase

Die Gensequenz der Formaldehyd-Dismutase aus *Pseudomonas putida F61* wurde bereits entschlüsselt und in diesem Zuge auch rekombinant hergestellt [19]. In einer späteren Veröffentlichung wurden zusätzlich zur rekombinanten Dismutase auch Faltungsproteine coexprimiert, wodurch die Enzymausbeute erhöht werden konnte [20]. Die Formaldehyd-Dismutase aus dem Stamm *F61* ist der aus *J3* physiologisch sehr ähnlich. Eine N-terminale Ansequenzierung der FDM aus *P. putida J3* und genauere Untersuchungen zur Struktur des Enzyms wurden von Rodewyk [10] nicht durchgeführt. Yanase et al. [19] haben die Sequenz der Formaldehyd-Dismutase für *P. putida F61* entschlüsselt und das Enzym erfolgreich kloniert. Die N-terminale Aminosäuresequenz der Formaldehyd-Dismutasen aus dem Stamm *F61* [11] und der gram-positiven Stämme *Amycolatopsis methanolica* und *Mycobacterium gastri* [15] zeigen keine Ähnlichkeit (Tabelle 2-4).

Tabelle 2-4 Die ersten 20 N-terminalen Aminosäuren der FDM aus unterschiedlichen Stämmen.

Stamm / Quelle	N-terminal
F61 [19]	Ala-Gly-Asn-Lys-Ser-Val-Val-Tyr-His-Gly-Thr-Arg-Asp-Leu-Arg-Val-Glu-Thr-Val-Pro-
E. coli JM109/pKFDM+PKY206 [20]	Ala-Gly-Asn-Lys-Ser-Val-Val-Tyr-His-Gly-Thr-Arg-Asp-Leu-Arg-Val-Glu-Thr-Val-Pro-
Achromobacter [19]	Gly-Trp-Ser-Gly-Gly-Gln-Ala-Glu-Thr-Val-Leu-Val-Pro-Tyr-Ala-Asp-Tyr-Met-Leu-Leu-

2.5 Downstream Processing zur Gewinnung der Formaldehyd-Dismutase

In der Literatur wurden verschiedene Methoden beschrieben, mit denen eine reine Formaldehyd-Dismutase zu gewinnen ist. Dabei waren die Ausbeuten aus den Wildtypen deutlich geringer als die aus den rekombinanten Stämmen. In Tabelle 2-5 bis Tabelle 2-8 sind die Reinigungsschritte für die Formaldehyd-Dismutase aus verschiedenen Veröffentlichungen vergleichend dargestellt. Die maximale Ausbeute an Formaldehyd-Dismutase aus *P. putida* lag bei 26,78 % der ursprünglichen Enzymaktivität. Rekombinant gewonnene Enzyme konnten durch Coexpression von Faltungsproteinen mit einer Ausbeute von bis zu 40,7 % gereinigt werden.

Tabelle 2-5 Reinigung der FDM aus dem Wildtyp F61 nach Kato [11].

KATO; The Dismutation of Aldehydes by a Bacterial Enzyme; 1983 [11]					
Pseudomonas putida F61					
Schritt	Gesamt Protein	Gesamt Aktivität	spezifische Aktivität	Reinigungs-faktor	Ausbeute
	mg	U	U/mg		%
Rohextrakt	25100	64300	2,56	1,00	100,00
Protaminsulfat	24000	62400	2,60	1,01	97,05
Ammoniumsulfat (60-95%iger Sättigung)	1650	16500	10,00	3,90	25,66
Phenyl-Sepharose CL-4B	200	11400	57,00	22,25	17,73
DEAE-Sephacel	99	8150	82,32	32,14	12,67
Hydroxyapatide	18	3470	192,78	75,25	5,40

Tabelle 2-6 Reinigung der FDM aus dem Wildtyp F61 nach Kato [21].

KATO; Properties of Formaldehyde Dismutation Catalyzing; 1984 [21]					
Pseudomonas putida F61					
Schritt	Gesamt Protein	Gesamt Aktivität	spezifische Aktivität	Reinigungs-faktor	Aus-beute
	mg	U	U/mg		%
Rohextrakt	21400	90000	4,21	1,00	100,00
Protaminsulfat	20600	87200	4,23	1,01	96,89
Aceton Fraktion	5700	52600	9,23	2,19	58,44
DEAE-Sephacel	256	24100	94,14	22,38	26,78

Tabelle 2-7 Reinigung der FDM aus dem Wildtyp F61 nach Yanase [19].

YANASE; Cloning, sequence analysis, and expression of the gene encoding formaldehyde dismutase from *Pseudomonas putida F61*; 1995 [19]					
E. coli (rekombinant)					
Schritt	Gesamt Protein	Gesamt Aktivität	spezifische Aktivität	Reinigungs-faktor	Aus-beute
	mg	U	U/mg		%
30g Feuchtmasse					
Rohextrakt	4290	81600	19,02	1,00	100,00
1. DEAE-Sephacel	548	41100	75,00	3,95	50,37
2. DEAE-Sephacel	145	18100	124,83	6,57	22,18
Hydroxylapatit Chrom.	26,8	3720	138,81	7,31	4,56
Phenyl-Sepharose CL 4B	6,4	1380	215,63	11,35	1,69

Tabelle 2-8 Reinigung der FDM aus einem rekombinanten Stamm nach Yanase [20].

YANASE, MORIYA, MUKAI; Effects of GroESL Coexpression on the Folding of Nicotinoprotein Formaldehyde Dismutase from *Pseudomonas putida F61*; Japan, 2001 [20]					
E. coli (rekombinant) + Chaparon Koexpression					
Schritt	Gesamt Protein	Gesamt Aktivität	Spezifische Aktivität	Reinigungs-faktor	Aus-beute
	mg	U	U/mg		%
Rohextrakt	360	20375	56,60	1,00	100,00
1. $NH_4(SO_4)$ Fällung	125	16438	131,50	2,32	80,68
2. $NH_4(SO_4)$ Fällung	71	10788	151,94	2,68	52,95
HiTrap Q	47	8292	176,43	3,11	40,70

2.6 Enzymatische Umsetzung von Formaldehyd

2.6.1 Analysemethoden zur Charakterisierung der FDM

Die Aktivität der FDM kann über die Abnahme der Formaldehydkonzentration oder über die Zunahme der Methanol- oder Ameisensäurekonzentration bestimmt werden. Zur Berechnung der spezifischen Aktivität ist darüber hinaus die Bestimmung der Proteinkonzentration notwendig. Für die FDM F61 konnte gezeigt werden, dass Zink an der Reaktion beteiligt ist [13]. Für die Dismutase aus *P. putida J3* wurde nicht überprüft, ob Zink im Enzym vorhanden oder am Reaktionsmechanismus beteiligt ist. In Tabelle 2-9 sind die Mess-/Nachweismethoden für die Formaldehyd-Dismutase-Aktivität aus unterschiedlichen Quellen zusammengefasst.

Tabelle 2-9 Nachweismethoden für die Bestimmung der Dismutase-Aktivität und zur Charakterisierung der Formaldehyd-Dismutase aus unterschiedlichen Publikationen.

Komponente	Nachweismethode			
	Kato et al. [11]	Kato et al. [16]	Kato et al. [13]	Rodewyk [10]
Formaldehyd (Abnahme)	Nash-Reagenz, MBTH[1], GC[2]	Nash-Reagenz, MBTH, GC	*(nicht gemessen)*	HPLC, Farb-test
Methanol (Bildung)	GC	GC	NDMA[3]	HPLC
Ameisensäure (Bildung)	Formiat-Dehydrogenase NaOH-Titration	NaOH-Titration	NaOH-Titration	pH-Wert
Protein Konzentration	Bradford (Bio-Rad)	Bradford (Bio-Rad)	Bradford (Bio-Rad)	Bradford (Bio-Rad)
Glukose (Fermentation)	*(nicht gemessen)*	Glukoseoxidase und peroxidase System	*(nicht gemessen)*	HPLC
Zink (Enzym)	*(nicht gemessen)*	*(nicht gemessen)*	Chromatographie (Sephadex G-25), Atomemissions-spektrometrie	*(nicht gemessen)*

2.6.2 On-line-Messverfahren

Um die Enzymkinetiken möglichst gut abbilden zu können, sind Analysemethoden mit Datenaufzeichnung in Echtzeit vorteilhaft. Neben einfachen off-line Messverfahren wie Farbtests oder Rückschlüsse über den pH-Wert können auch andere Analysegeräte, wie spezielle Methanol-Sensoren, verwendet werden. Die beste Vorrausetzung für die Verfahrensentwicklung besteht in einer on-line-Messung aller Komponenten. Für den Nachweis von Methanol, Ameisensäure und Formaldehyd gibt es mehrere Möglichkeiten.

[1] 3-Methyl-2-benzothiazolinon hydrazon hydrochlorid hydrat
[2] Gaschromatographie
[3] p-nitroso-N,N-dimethylaniline

2.6.2.1 Methanol-Sensor-System

Die Firma Raven Biotech Inc. bietet einen Sensor zur on-line-Bestimmung der Methanolkonzentration in Fermentern an [22]. Dazu wird ein Sensor direkt in die Fermentationsbrühe eingebracht. Die Nachweisgrenze gibt der Hersteller mit einer Konzentration von 0,05 % an. Der Messbereich liegt bei 0 % bis 1 %. Das Messsystem besteht aus einem Detektorelement, das einen Halbleiterchip enthält. Auf dem Chip befindet sich eine gesinterte Zinnoxidschicht. Adsorbiert und reagiert eine oxidierbare Komponente an der Oberfläche, führt das Reduktionsäquivalent zu einer Erhöhung der elektrischen Leitfähigkeit und kann detektiert werden. Der Vorteil des Messsystems ist das einfache Messprinzip. Der Nachteil ist der kleine Messbereich und ein relativ großes Rauschen des Messsignals.

2.6.2.2 Molekülspektroskopie

On-line-Messungen können durch Sensoren, wie IR, NIR, FTIR, UV/Vis und Raman [23], [24], [25], [26] durchgeführt werden, die für eine in-situ-Messung geeignet sind. In diesen Sensoren werden Moleküle mittels elektromagnetischer Wellen in unterschiedlichen Spektralbereichen zur Schwingung oder Rotation angeregt. Die Adsorption der Strahlung durch die Moleküle wird als Messgröße detektiert. Der Vorteil der optischen Messverfahren ist ihr breiter Anwendungsbereich. Es ist möglich, sowohl Gase, Flüssigkeiten aber auch Feststoffe zu analysieren. Der Nachteil dieser Messverfahren liegt in Interferenzen die bei der Messung von Mehrstoffsystemen auftreten.

2.6.2.3 Massenspektrometer mit Membraneinlassverfahren

Das Messprinzip eines Massenspektrometers basiert auf der Ionisierung und anschließenden Auftrennung der verschiedenen Verbindungen nach ihrem Molekülmasse-Ladungsverhältnis.

Gängige Massenspektrometer werden auch als Quadrupol-Massenspektrometer bezeichnet, da der Analysator ein Quadrupol ist [27][28]. Der Name leitet sich von vier parallelen, in einem Quadrat angeordneten Stäben ab, die das Filtersystem eines Quadrupol-Massenspektrometers bilden. Je zwei gegenüberliegende Stäbe sind verbunden und es liegt eine Gleichspannung mit anteiliger Wechselspannung an. Die Ionen aus der Ionenquelle mit verschiedenen Massen werden durch ein elektrisches Feld axial in das Stabsystem geleitet, in dem sie sich mit einer

gleichförmigen Geschwindigkeit hindurch bewegen. Das Quadrupolfeld lenkt die Ionen, in Abhängigkeit ihres Massen-Ladungs-Verhältnisses, in X- und Y-Richtung ab, so dass sie schraubenförmige Bahnen beschreiben [29]. Bei einer definierten Feldstärke können nur Ionen mit einem bestimmten Masse-Ladungsverhältnis den Quadrupol passieren und in einem Ionendetektor gemessen werden. Alle anderen Ionen werden an einem der Stäbe adsorbiert und neutralisiert. Durch die Variation des Quadrupolfeldes können Ionen verschiedener Masse-Ladungsverhältnisse detektiert werden. Die Ionen aus der Ionenquelle werden also nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis getrennt.

Wegen ihrer vielen Vorteile wird die Massenspektrometrie häufig mit anderen Analysenmethoden und Trenntechniken gekoppelt. Vorteile eines Massenspektrometers sind die sehr schnelle Ansprechzeit mit weniger als 100 Millisekunden, die sehr hohe Nachweisempfindlichkeit im unteren ppb-Bereich für alle Substanzen und der große Messbereich über 8 Dekaden (unterer ppb- bis 100 %-Bereich) mit guter Linearität. Es können bis zu 30 Komponenten identifiziert und simultan gemessen werden.

Am Fraunhofer-Institut für Chemische Technologie ICT wurde ein Membraneinlasssystem entwickelt, das mit einem Massenspektrometer gekoppelt werden kann. Dieses System ermöglicht eine on-line-Analyse flüchtiger Stoffe in Flüssigkeiten [30].

Eine Probe wird dazu mittels einer HPLC-Pumpe kontinuierlich an einer mikroporösen Membran vorbeigeführt, die für flüchtige und gasförmige Komponenten durchlässig ist. Durch ein angelegtes Vakuum werden diese Komponenten durch die Membran transportiert.

2.6.3 Bestimmung der Michaelis-Menten-Parameter und Modellierung der FDM Raktion

Kato [11] konnte nach Lineweaver-Burk für die FDM aus *P. putida F61* eine Michaelis-Menten-Konstante (Km-Wert) von 350 mM bestimmen. Die Inhibitionskonstante Ki wurde von Kato [21] lediglich für Quecksilber (0,0002 mM) und Semicarbazid (0,52 mM) bestimmt. Rodewyk [10] verwendete die nichtlineare Regression zur Bestimmung der Parameter und erhielt einen Km-Wert von >100 mM. Es gelang aber nicht, mit den berechneten Parametern die FDM-Reaktion zu beschreiben. Eine Ursache könnte sein, dass es zur Produktinhibierung kam. Diese Form der Inhibierung wurde bisher noch nicht in den mathematischen Modellen

berücksichtigt. In der Doktorarbeit sollte deshalb der Einfluss der Produkte Methanol und Ameisensäure auf die FDM Reaktion untersucht werden.

2.6.4 Enzymimmobilisierung

Für die Herstellung von Ameisensäure aus Methanol wurde von Kato et al. [18] die gereinigte Formaldehyd-Dismutase aus *P. putida F61* in Polyurethan und Polyacrylamid immobilisiert und mit dem immobilisierten Enzym die Umsetzung von Formaldehyd getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2-10 zusammengefasst.

Mit jeweils 1 mg aller Enzympräparate wurden 20 ml einer Formaldehyd-Lösung von 100 mM vollständig umgesetzt. Die Reaktionszeit war mit den immobilisierten Enzympräparate 3 bis 7-mal länger als mit dem freien Enzym. Mit dem in Polyurethan eingeschlossenen Enzym (PU-6) konnte die Reaktion 30-mal mit einer Reaktionsdauer von jeweils acht Stunden wiederholt werden, ohne dass ein nennenswerter Verlust der Aktivität zu beobachten war.

In der vorangegangenen Studie von Kato et al. [16] wurde festgestellt, dass die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion mit dem freien Enzym bis zu einer Formaldehyd-Konzentration von 1000 mM proportional ansteigt. Allerdings wird bei einer Konzentration von 1000 mM der Formaldehyd durch das freie Enzym nicht vollständig umgesetzt (Tabelle 2-10). Mit dem immobilisierten Enzym gelang es jedoch, auch die 1000 mM Formaldehydlösung vollständig in äquimolare Anteile von Ameisensäure und Methanol zu disproportionieren.

Rodewyk [10] immobilisierte die FDM aus einem Rohextrakt an einer Membran durch Quervernetzung der Enzyme. Dazu wurde die Dismutase mit Polyvinylalkohol versetzt, auf die Membranoberfläche aufgetragen und zur Fixierung in eine Glutaraldehydlösung getaucht. Wurde mit dieser Membran das Diaphragma einer pH-Elektrode überzogen, konnte eine pH-Änderung im Analyt direkt mit der gebildeten Ameisensäurekonzentration und damit auch mit der ursprünglichen Formaldehydkonzentration korreliert werden. Es wurde eine Eichgerade von 1-20 mM Formaldehyd erstellt. Die Enzymaktivität des vernetzen Enzyms auf der Sonde betrug 17,5 Units. Es wurde eine Nachweisgrenze von 0,3 mM Formaldehyd erreicht.

Tabelle 2-10 Formaldehyd-Umsetzung durch unterschiedlich immobilisierte Formaldehyd-Dismutase und deren Stabilität. Das Reaktionsvolumen (20 ml) enthielt 1 mg der gereinigten freien Formaldehyd-Dismutase oder das immobilisierte Enzympräparat mit 1 mg des gereinigten Enzyms. Die Reaktion wurde bei 30 °C unter N_2-Atmosphäre durchgeführt. Die Reaktion wurde in einem frischen Reaktionsgemisch wiederholt, bis eine signifikante Aktivitätsänderung eintrat [18].

Präparation	Zugeführter Formaldehyd [mM]	Gebildetes Methanol[a] [mM]	Gebildete Ameisensäure[a] [mM]	Reaktionszeit[b] [min]	Anzahl der Batch-Reaktionen[c]
Freies Enzym	100	49	50	5	2
	1000	203	200	15	1
PU-6[d]	100	52	50	15	30
	1000	482	495	150	3
PU-3[d]	100	50	48	35	18
	1000	440	451	200	2
Polyacryl Amid	100	53	50	25	15
	1000	473	482	150	2

[a] Die Werte stellen die maximalen Produktkonzentrationen dar, die im ersten Reaktionsansatz erreicht wurden
[b] Die Reaktionszeit bis zur vollständigen Umsetzung des Formaldehyds im ersten Reaktionsansatz
[c] Anzahl der Wiederholungen mit einer Enzymaktivität über 90 % der Ausgangsaktivität
[d] Polyurethan-Arten

2.7 Herstellung von Formaldehyd

2017 wurden weltweit 52 Millionen Tonnen Formaldehyd pro Jahr hergestellt [31]. Die BASF betreibt die größte Formaldehyd-Anlage und produziert an unterschiedlichen Standorten 500.000 Tonnen im Jahr. Formaldehyd wird durch oxidative Dehydrierung von Methanol an einem Silberkristall- Katalysator bei 600 °C bis 700 °C erzeugt [32]. In modernen Anlagen fällt als Nebenprodukt Ameisensäure (etwa 100–300 ppm) an. In älteren Anlagen fielen größere Menge an Ameisensäure an, die mittels Ionenaustauscher abgetrennt werden mussten [33].

2.8 Herstellung von Ameisensäure und die Verwendung von Extraktionsverfahren

Weltmarkführer im Bereich Ameisensäureproduktion ist die BASF [34]. In Ludwigshafen sowie in Nanjing, China und in Geismar im US-Bundesstaat Louisiana werden rund 300.000

Tonnen Ameisensäure pro Jahr hergestellt. Bis in die siebziger Jahre des 20. Jahrhunderts wurde Ameisensäure nach dem Verfahren von Marcellin Berthelot hergestellt [35]. Natriumhydroxid wird mit Kohlenstoffmonoxid bei etwa 6-8 bar und 130 °C zu Natriumformiat umgesetzt. Natriumformiat reagiert mit Schwefelsäure zu Ameisensäure und Natriumsulfat.

Ein weiteres, heutzutage aber nicht mehr eingesetztes, Verfahren besteht darin, Methanol und Kohlenstoffmonoxid zu Ameisensäuremethylester bei 80 °C und 40 bar umzuwandeln. Da eine Hydrolyse des Ameisensäuremethylesters viel Wasser verbraucht, wurde großtechnisch Ammoniak eingesetzt, um aus Ameisensäuremethylester Formamid und Methanol herzustellen. Methanol wurde in den Prozess zurückgeführt und das Formamid mit Schwefelsäure zu Ameisensäure und Ammoniumsulfat umgesetzt. Das Ammoniumsulfat setzte sich im Reaktor fest und musste aufwendig entfernt werden. Ammoniumsulfat fand früher Anwendung als Dünger, wird aber heutzutage nicht mehr eingesetzt.

Deshalb wird in modernen Anlagen Ameisensäure durch die direkte Hydrolyse über Methylformiat hergestellt [36]. Methanol wird mit Kohlenstoffmonoxid direkt zu Methylformiat und Wasser umgesetzt. Dabei entstehen Ameisensäure und Methanol, welches mit Kohlenstoffmonoxid wieder zu Methylformiat umgesetzt wird. In der Bilanz entsteht Ameisensäure also aus Kohlenstoffmonoxid und Wasser [35]. Wasser liegt dabei im Überschuss vor.

2.8.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion von Ameisensäure aus einer wässrigen Lösung

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion (L-L-Extraktion) ist ein Verfahren, bei dem eine oder mehrere Komponenten eines Gemisches in einer flüssigen Phase vorliegen und in eine weitere flüssige Phase überführt werden sollen. Die beiden flüssigen Phasen lassen sich üblicherweise nicht mischen und liegen, aufgrund der größeren Grenzfläche zueinander, für den Stoffübergang dispergiert vor.

Die Extraktion sollte als Alternative zur Destillation in Betracht gezogen werden, wenn die Siedepunkte der Einzelkomponenten im Gemisch sehr nah beieinander liegen [37]. Die Herausforderung bei der Herstellung von Ameisensäure besteht darin, die gewonnene Ameisensäure vom vorliegenden Wasser abzutrennen. Eine Destillation der wässrigen Lösung ist im Produktionsmaßstab wegen ähnlicher Siedepunkte von Wasser (100 °C) und Ameisensäure

(100,8 ºC) zu energieaufwendig. Aus diesem Grund wird eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit einem organischen Lösemittel durchgeführt.

Die Extraktion kann erfolgen, wenn sich die Substanz in den beiden flüssigen Phasen unterschiedlich verteilt. Die Verteilung einer Substanz wird durch den Nernstschen Verteilungssatz beschrieben und durch den sogenannten K_D-Wert (Verteilungskoeffizient) ausgedrückt. Im Fall der Ameisensäure ist der K_D-Wert definiert als die Gesamtkonzentration der gelösten Säure in der organischen Phase geteilt durch die Gesamtkonzentration des gelösten Stoffes in der wässrigen Phase:

$$K_D = \frac{c_{AS,org}}{c_{AS,H_2O}} \tag{2.1}$$

Daraus lässt sich zudem die Menge an Lösungsmittel und das Volumenverhältnis beider Phasen berechnen. Je weniger Lösungsmittel benötigt wird, desto geringer sind die Kosten für die Lösungsmittelrückgewinnung. Daher sollte das Lösungsmittel idealerweise einen hohen Verteilungskoeffizienten mit hoher Selektivität aufweisen.

Die Extraktionslösungsmittel werden in drei Gruppen eingeteilt [38], [39]:

- Chemische Verbindungen aus Kohlenstoff und Sauerstoff, wie beispielsweise CO_2, (vergl. Kapitel 2.8.1.1),
- Organophosphorverbindungen enthaltende Extraktionsmittel, z.B. Tributylphosphinoxid, Trioctylphosphinoxid, Butyldibutylphosphinat, Dibutylbutylphosphonat, Dibutylisobutylphosphonat, Di-isobutylbutylphosphonat, Di-isobutylisobutylphosphonat und Di-(2-Ethyl-hexyl)-2-Ethylhexylphosphonat [40],
- und hochmolekulare aliphatische Amine sowie Ammoniumverbindungen.

Die Effizienz der Extraktion (D_E) von Ameisensäure aus einer wässrigen Phase ist abhängig vom pH-Wert der wässrigen Phase, vom K_D-Wert, von der anfänglichen Konzentration der Ameisensäure, vom Volumenverhältnis zwischen den Phasen und von der Temperatur. D_E entspricht dem Massenanteil der Ameisensäure in der organischen Phase:

$$D_E[\%] = \frac{m_{AS,org}}{m_{AS,org} + m_{AS,H_2O}} \cdot 100 \tag{2.2}$$

2.8.1.1 Verwendung von chemischen Verbindungen aus Kohlenstoff und Sauerstoff

Verbindungen aus Kohlenstoff und Sauerstoff sind nicht reaktiv und extrahieren Ameisensäure durch physikalische Extraktion. Seyd et al. [30] berichten über die Verwendung von Alkoholen als Extraktionslösungsmittel zur Gewinnung von Ameisensäure. Butan-1-ol wurde bei verschiedenen pH-Werten, Temperaturen und Volumenverhältnissen (Phasenverhältnis) getestet. Niedriger pH-Wert, hohes Volumen an organischem Lösungsmittel sowie steigenden Temperaturen führten zu einer besseren Ausbeute bei der Extraktion. Bei einem pH-Wert von 2,29 mit einem Volumenverhältnis von organischer Phase zu wässriger Phase von 3:1 und bei einer Temperatur von 20 °C konnte eine Ausbeute von 69,45 % erzielt werden.

Tabelle 2-11 Verteilungskoeffizienten und Effizienz der Extraktion (D_E) mehrerer organischer Lösemittel (Ester, Ketone, Alkohole) bei bestimmten Ameisensäurekonzentrationen (c_{AS}) [41], [42].

	Solvent	c_{AS} (mol/L)	K_D	D_E (%)
Ester	Dimethylphthalat	0.229	0.118	10.538
	Dimethyladipat	0.356	0.196	16.383
	Dimethylglutarat	0.406	0.229	18.684
	Dimethylsuccinat	0.437	0.252	20.110
	Diethylcarbonat	0.586	0.369	26.967
Ketone	Diisobutylketon	0.546	0.335	22.640
	Methylisobutylketon	0.625	0.403	25.834
Alkohole	3-Methyl-1-butanol	0.819	0.605	37.690
	1-Hexanol	0.696	0.471	32.029
	1-Octanol	0.612	0.392	28.164
	1-Nonanol	0.591	0.374	27.197
	1-Decanol	0.560	0.335	25.771

Uslu et al. [41], [42] untersuchten die physikalische Extraktion von Ameisensäure mit reinen Lösungsmitteln, einschließlich Estern, Ketonen und Alkoholen (Tabelle 2-11). Die Verwendung von 3-Methyl-1-butanol ergab die höchste Extraktionseffizienz mit 37,69 %. Aufgrund der höheren Löslichkeit von Ameisensäure in Wasser als in organischen Lösungsmitteln ist die Trennung durch physikalische Extraktion nicht effizient; die Extraktion ist stark abhängig von der Lösungsmittelpolarität und ist für das 3-Methyl-1-butanol maximal, da dieses Lösungsmittel das höchste Dipolmoment aufweist [43]. Flüssig-Phasengleichgewichte für ternä-

re Systeme bestehend aus Wasser, Ameisensäure und einem Ester wurden bereits untersucht [44]–[47]. Das Phasengleichgewicht wurde im Gibbs'schen Dreiecksdiagramm [48] dargestellt, mit dem UNIFAC-Verfahren verglichen und mittels der NRTL- und UNIQUAC-Modelle abgebildet. Die gleiche Analyse wurde mit vier aliphatischen Alkoholen als Extraktionslösungsmittel durchgeführt [43], [49].

2.8.1.2 Verwendung von Extraktionsmitteln mit Organophosphorverbindungen

Wardell und König [41] haben mehrere Phosphorylverbindungen, wie Tributylphosphat (TBP) und Trioctylphosphinoxid (TOPO), als Extraktionslösungsmittel für Ameisensäure verwendet. Dabei waren die Verteilungskoeffizienten von Phosphinoxiden größer als für Phosphate, wie beispielsweise TBP und Phosphonate.

Flüssig-Flüssig-Gleichgewichte von unterschiedlichen Säuren mit Wasser, TBP und Dodecan wurde von Roy et al. [50] und Malmary et al. [51] untersucht. Obwohl die Extrahierbarkeit im Vergleich mit aliphatischen Aminextraktionsmitteln schlechter ist, werden sie für Bioprozesse wegen ihrer geringeren Toxizität bevorzugt eingesetzt. So wurde beispielsweise TOPO in Hexan als optimales Extraktionsmittel zur in-situ-Gewinnung von Milchsäure mittels Extraktion aus einer Fermentation von *Rhizopus oryzae* [44] verwendet.

2.8.1.3 Verwendung von hochmolekularen aliphatischen Aminen und Ammoniumverbindungen

Aliphatische Amine fallen in die Kategorie der Reaktivextraktionsmittel, da sie mit dem gelösten Stoff (z.B. Ameisensäure) an der Grenzfläche der wässrigen und der organischen Phase reagieren und Säure-Amin-Komplexe bilden. Dies bewirkt eine deutliche Erhöhung des Verteilungskoeffizienten der Säure [52]. Uslu [41], [42] hat die Bildung von langkettigen Komplexen, bestehend aus Säure- und Amin-Molekülen, gezeigt und gibt Mischungen an Säure und Amin in den Verhältnissen von 5:1, 6:1 und 7:1 an.

Langkettige aliphatische primäre, sekundäre und tertiäre Amine sowie Ammoniumverbindungen, d.h. primäre, sekundäre, tertiäre und quaternäre Ammoniumsalze oder ionische Flüssigkeiten und quartäre Ammoniumhydroxide, können prinzipiell als Extraktionsmittel in der Ameisensäureextraktion verwendet werden. Primäre und sekundäre Alkylamine werden nor-

malerweise wegen ihrer zu hohen Löslichkeit in Wasser und aufgrund einer möglichen Gelbildung, die bei einer späteren Phasentrennung Schwierigkeiten bereitet, nicht als Extraktionsmittel verwendet [39]. Außerdem können Alkylamine bei höheren Temperaturen irreversibel mit den Säuren reagieren, was beispielsweise bei der Destillation oder dem Rückextraktionsverfahren auftreten kann [53]. Jedoch haben mehrere Studien eine gute Extrahierbarkeit von Carbonsäuren mit tertiären Alkylaminen, insbesondere Tri-n-octyalmine (TOA) und Alamine 336, gelöst in geeigneten organischen Lösungsmitteln, gezeigt [41]. Uslu verwendete verschiedene Alkohole, wie Isoamylalkohol, Hexan-1-ol, Octan-1-ol und Decan-1-ol als Lösungsmittel. Der Verteilungskoeffizient wurde mit zunehmender Konzentration an TOA in der organischen Phase erhöht, um eine größere Ameisensäure Extraktionseffizienz zu erreichen. Bei der Verwendung von Isoamylalkohol (2,03 mol/L) als Lösungsmittel und TOA (1,73 mol/l) als Extraktionsmittel konnten 93,55 % der Ameisensäure aus der wässrigen Phase in die organische Phase überführt werden.

2.8.2 Verwendung von Ionenaustauschern

Eine Möglichkeit Ameisensäure aus einer wässrigen Phase zu adsorbieren, besteht in der Verwendung eines Ionenaustauschers [54]. Hier stehen feste und flüssige Ionenaustauscher zur Verfügung. Feste Ionenaustauscher sind klassische Adsorber aus unterschiedlichen Materialien. Ein gängiger technisch eingesetzter flüssiger Ionenaustauscher ist das Trioctylamin [55], das für die Reaktivextraktion eingesetzt wird.

Bei der Verwendung von Ionenaustauschern und Extraktionsmitteln zur in-situ Produkabtrennung muss die Interaktion mit Enzymen und Salzen, wie beispielsweise Puffer, beachtet werden, da ansonsten der Ionenaustauscher bevorzugt die Enzyme und den Puffer adsorbiert. Bei dem Einsatz eines Ionentauschers bestünde die Möglichkeit auf einen Puffer zu verzichten, wenn sich der Ionenaustauscher räumlich nah an immobilisierten Enzymen befindet, damit der pH-Wert durch die gebildete Ameisensäure nicht zu stark abfällt. In diesem Fall müsste die Adsorptionsgeschwindigkeit der Ameisensäure an den Ionenaustauschern mindestens gleich der Ameisensäurebildungsrate der FDM sein. Für die Modellierung des Stofftransports in Ionenaustauschern müssen Diffusion und Konvektion beachtet werden. Darüber hinaus ist der Stofftransport abhängig von Sorptionsgleichgewichten in den unterschiedlichen Schichten

der Ionenaustauscher Partikel und an der Grenzfläche zum umgebenden Medium. Die wichtigsten Diffusionsmechanismen sind in Abbildung 2-4 dargestellt.

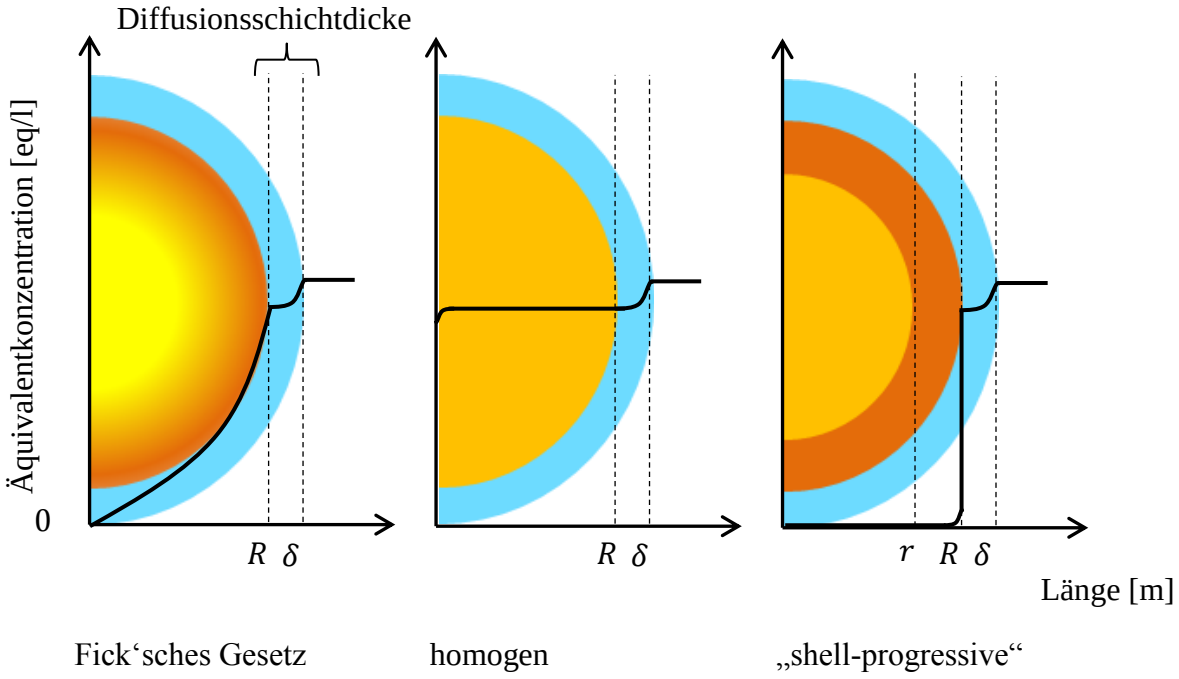


Abbildung 2-4 Darstellung verschiedener Diffusionsmodelle eines Ionenaustauscher Partikels.

Die drei Modelle beschreiben unterschiedliche Konzentrationsverläufe durch den Querschnitt eines Ionenaustauschers. Das Fick’sche Gesetz beschreibt einen Gradienten vom Kern bis an die Oberfläche des Ionenaustauschers, wie es in der Abbildung am Farbverlauf zu erkennen ist. Zusätzlich berücksichtigt das Fick’sche Gesetz die sogenannte Nernst'sche Diffusionsschicht. Dieser Fluidfilm an der Oberfläche des Ionenaustauschers wirkt sich diffusionshemmend aus. Das homogene Modell beschreibt nicht den Gradienten im Inneren des Ionenaustauschers, sondern geht von einer homogenen Konzentration an jedem Punkt im Ionenaustauscher aus. Zur Beschleunigung der Stoffübergänge sind Ionenaustauscher erhältlich, die die Diffusion nur im äußeren Bereich des Ionenaustauschers zulassen. Dieses Verhalten kann mit dem „shell-progressive“ Model beschrieben werden.

Für die Aufnahme der Ameisensäure sind daher generell zwei Kinetiken geschwindigkeitsbestimmend:

Partikel-Kinetik: Interdiffusion der Ionen A und B im Innern des Austauscher Partikels.

Film-Kinetik: Interdiffusion von A und B in einer Nernst‘schen Diffusionsschicht, dem sogenannten Film, der von der Strömung der Lösung nicht erfasst wird.

2.9 Herstellung von Methanol und die Verwendung von Pervaporationsverfahren

Im Jahr 2017 wurden 110 Millionen Tonnen Methanol produziert [56]. Wie bereits im Kapitel 1 beschrieben, wird Methanol derzeit im großen Maßstab aus Erdgas mittels Reforming hergestellt. Dieses Verfahren ist sehr energieaufwendig. Die Rückgewinnung von Methanol bei der Biodieselproduktion oder anderen Herstellungsverfahren, bei denen Methanol als Nebenprodukt anfällt oder zugesetzt wird, findet meist durch einen thermischen Prozess statt. Hersteller für Anlagen zur Methanol Rückgewinnung bieten Verfahren an, mit denen mindestens achtprozentige wässrige Methanol Lösungen zu 99 %-igem Methanol regeneriert werden können [57]. Alkohole können auch mittels Pervaporationsverfahren entwässert oder aus einer wässrigen Lösung entfernt werden. Die Gewinnung von Methanol aus einer wässrigen Lösung wird im technischen Maßstab bisher aber nicht praktiziert [58]. Ein Maß für die Fähigkeit einer Pervaporationsmembran Stoffe anzureichern, ist die sogenannte Selektivität (vergl. Kapitel 3.8.2) sowie das Produkt aus dem Flux und der Selektivität dem sogenannte „Pervaporation Separation Index“ PSI. Die Methanol Abtrennung aus wässrigen Lösungen durch Pervaporation wurde bisher wenig erforscht. Das Hauptaugenmerk in der industriellen Anwendung liegt meist auf der Dehydrierung [59].

Bisher noch nicht kommerziell erhältliche Poly[1-(trimethylsilyl)-1-propyne] (PTMSP) Membranen sind alkoholspezifische Pervaporationsmembranen und sollten gegenüber Methanol eine höhere Selektivität als im Vergleich zu gängigen Polydimethylsiloxan- (PDMS) Membranen zeigen [60]. Für die Pervaporation von niedrigen Methanolkonzentrationen mittels PTMSP-Membranen sind in der Literatur keine Daten vorhanden. In Tabelle 2-12 sind einige PDMS-Membranen, die in der Literatur zur Abtrennung von Methanol eingesetzt wurden, zusammengefasst [61].

Tabelle 2-12 Zusammenfassung der Parameter unterschiedlicher PDMS-Membranen für die Pervaporation von Methanol **[61].**

PDMS / PTMSP Membranen	Aktive Trennfläche	Temperatur	Feedkonz.	Flux	Selektivität	PSI	Quelle
	[m²]	[°C]	[Gew.-%]	[kg/m²h]	[-]	[kg/m²h]	
Celfa CMG-OM-10	0,0131	40-70	2,5	0,3-1,1	1,5-3	0,44-3,42	[61]
Celfa CMG-OM-10	0,0131	40-70	13-20	0,48-1,8	2,7-4,5	1,11-8,43	[61]
Sulzer PERVAP-1060		30	5		6		[62]
Sulzer PERVAP-1060	0,0131	40-70	2,5-5	0,3-1,2	1,2-3	0,41-3,74	[63]
Sulzer PERVAP-1060	0,0131	40-70	13-20	0,51-1,7	3-3,4	1,54-7,8	[63]
Sulzer PERVAP-1070		30	5		3,6		[62]
Sulzer PERVAP-1070	0,00283	60	5	0,071	8,5	0,53	[64]
PDMS CA	0,024	25-50	5	0,48-0,58	6,2-7,0	2,98-4,06	[61]
PDMS CA	0,024	25-50	5	0,53-1,2	5,2-6,5	3,64-7,8	[61]
PDMS CA	0,0024	30-50	0,3-3	0,4-2,0	1,8-7,8	0,9-11,05	[61]

In Tabelle 2-13 sind die Eigenschaften von Zeolit- und Silicalit-Membranen dargestellt. Aus beiden Tabellen wird deutlich, dass die Verwendung von niedrigen Methanolkonzentrationen und geringen Temperaturen zu einem vergleichsweise schlechten Anreicherungsfaktor führen. Der für die FDM-Reaktion relevante Konzentrationsbereich liegt bei 3,5 % Methanol (vergl. Kapitel 4.4.3.2). Für diesen Bereich sind keine Literaturdaten zur Pervaporation verfügbar.

Tabelle 2-13 Zusammenfassung der Parameter unterschiedlicher Zeolit- und Silicalit-Membranen für die Pervaporation von Methanol

Zeolit / Silicalit Membranen	Aktive Trennfläche	Temp.	Feedkonz.	Flux	Selekt.	PSI	Quelle
	[m²]	[°C]	[Gew.-%]	[kg/m²h]	[-]	[kg/m²h]	
PEBAX			5		1,8		[65]
Silicalit gefüllte PVA (GFT 1170)			5,3	0,1	5		[66]
nicht quervernetzes Polybutadien	0,00196	25	2,5-90	0,0008-0,001	0,6-1,0	0,0003-0,003	[67]
quervernetzes Polybutadien	0,00196	25	2,5-90	0,0005-0,005	1,5-13	0,0008-0,033	[67]
Zeolith gefüllt (0 Gew.-% Füllung)	0,00849	22,5	5	0,187	7,6	1,23	[68]
Zeolith gefüllt (30 Gew.-% Füllung)	0,00849	22,5	5	0,321	9,5	2,73	[68]
Zeolith gefüllt (60 Gew.-% Füllung)	0,00849	22,5	5	0,7	13	8,45	[68]
B-ZSM-5 Zeolith Edelstahl- Trägerschicht	0,00052	30-60	5	0,17-0,35	80-100	16,83-27,65	[69]
B-ZSM-5 Zeolith α-Al2O3 Trägerschicht	0,0063	30-60	5	0,12	12	1,32	[69]
B-ZSM-5 Zeolith γ-Al2O3 Trägerschicht	0,0093	30-60	5	0,21-0,9	5	1,58	[69]
Silicalit-1 Zeolith Al2O3- Trägerschicht	0,00052	32	3,5	0,6	2,5	0,9	[70]
Silicalit-1 Zeolith mit Edelstahl- Trägerschicht	0,00052	30-60	5	0,12	45-55	5,28-6,48	[71]
Silicalit-1 Zeolith Edelstahl- Trägerschicht	0,00052	30-60	1,8-5	0,51-0,56	11-17	5,60-8,16	[72]
Silicalit-1 Zeolith Edelstahl- Trägerschicht	0,00052	32	3,5-16,5	1,0-1,3	7,2-14,3	6,20-17,29	[70]
Silicalit-1 Zeolith Edelstahl- Trägerschicht		30-80	3	2,63	22	55,23	[73]
Ge-ZSM-5 Edelstahl		30	5	0,5	36	17,50	[74]

Untersuchungen zur Verwendung und Charakterisierung von Pervaporationsmembranen zur Aufbereitung von Stoffen unterschiedlicher Zusammensetzung aus der Gas- oder Flüssigphase sind komplex und aufwendig [75]. Folgende Größen haben einen Einfluss auf den Pervaporationserfolg:

- die Membrandicke,
- die Druckdifferenz zwischen Feed- und Permeatseite,
- die Strömung der Flüssigkeit auf der Oberfläche der Membran und
- die Temperatur.

Im Rahmen dieser Arbeit ist vor allem interessant, ob die Verwendung einer Pervaporation zu einer ersten Anreicherung des Methanols mit Konzentrationen <5 % führen kann. Wie nachfolgend verdeutlicht wird, wurde die Versuchsdurchführung so konzipiert, dass alle diffusionsabhängigen Parameter vergleichbar sind. In Abbildung 2-5 ist der Stofftransport durch eine Pervaporationsmembran schematisch dargestellt.

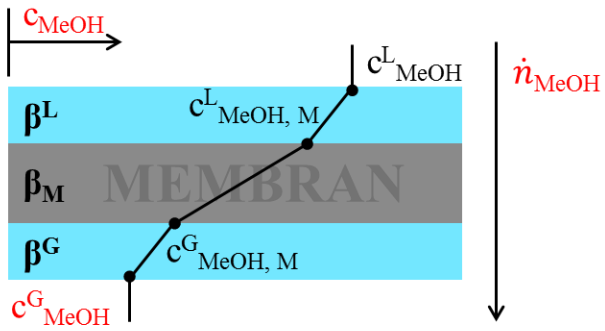


Abbildung 2-5 Konzentrationsverlauf von Methanol durch eine Pervaporationsmembran. Stoffübergangskoeffizienten: β^L feedseitige Grenzschicht zur Membran; β_M Membran (aktive Schicht); β^G permeatseitige Grenzschicht zur Membran

2.9.1 Triebkraft in einer Pervaporationsmembran

Die treibende Kraft für den Stoffstrom durch die Membran besteht im Konzentrationsgradienten des Methanols zwischen Feed und Permeat [76]:

$$\dot{n} = k_{ges} \cdot (c^L_{MeOH} - c^G_{MeOH}) \qquad (2.3)$$

Sowohl die Grenzschichten auf der Membranoberfläche als auch die Schichten der Kompositmembran, bestehend aus Trägerschicht und Löslichkeitsmembran, wirken sich auf den

Stoffdurchgang aus. Der Stoffdurchgangskoeffizient k_{ges} fasst alle Diffusionskoeffizienten, einschließlich der Sorptionsgleichgewichte q und des Henry-Koeffizienten$H$, zusammen:

$$k_{ges} = \mathrm{f}(\beta^L, \beta_M, \beta^G, q\ , H) \tag{2.4}$$

β^L *Schichtdicke der Flüssigkeit auf der Membran*

β_M *Membrandicke*

β^G *Schichtdicke des Gases auf der Membranoberfläche*

q *Sorptionsgleichgewicht*

H *Henry − Koeffizient*

Einfluss auf den Stoffdurchgang hat demzufolge auch die Konzentrationsveränderung der Feed Lösung. Die Konzentrationsabnahme einer Lösung durch einen Pervaporationsschritt kann durch eine Exponentialfunktion abgebildet werden [77]:

$$c^L_{MeOH}(\mathrm{t}) = c^L_{MeOH,0} \cdot e^{-Bt} \tag{2.5}$$

$c^L_{MeOH,0}$ entspricht der Konzentration zu Beginn der Pervaporation ($t = 0$). B ist ein Anpassungsparameter in dem die Diffusionsparameter zusammengefasst sind und auf dessen Basis die Membranpermeabilität berechnet werden kann. Je nach Konzentrations- und Temperaturbereich kommt es zu einem unterschiedlich starken Quellen der Membran, was sich direkt auf die Membranpermeabilität auswirkt [78].

2.9.2 Selektivität und Flux von Pervaporationsmembranen

Zur Bewertung der Trenneigenschaften von Pervaporationsmembranen wird die Selektivität verwendet. Die Selektivität kann entweder feedseitig als Seperationsfaktor oder permeatseitig als Anreicherungsfaktor bestimmt werden [79]. In dieser Arbeit wurde ausschließlich der Anreicherungsfaktor als Maß für die Selektivität S_{Pervap}verwendet, der für das binäre Gemisch aus dem Verhältnis von Methanolkonzentration im Permeat $c_{Permeat}$ zu Methanolkonzentration im Feed c_{Feed} berechnet werden kann [80]:

$$S_{Pervap} = \frac{c_{Permeat}}{c_{Feed}} \tag{2.6}$$

Der Flux J eines Stoffes durch die Membran ergibt sich aus der Masse des Permeats $m_{Permeat}$, die durch eine bestimmte Membranfläche A in einer bestimmte Zeit t hindurchtritt:

$$J = \frac{m_{Permeat}}{A \cdot t} \tag{2.7}$$

Der sogenannte „pervaporation separation index“ PSI berechnet sich für ein binäres Stoffgemisch aus der Selektivität und dem Flux:

$$PSI = J\,(S_{Pervap} - 1) \tag{2.8}$$

Wird eine Methanollösung an ein Vakuum angeschlossen, kann wegen der unterschiedlichen Partialdrücke mehr Methanol als Wasser über die Flüssigkeitsoberfläche in die Gasphase überführt werden. Wird eine durchlässige Membran eingesetzt, um eine Methanollösung und das Vakuum voneinander zu trennen, wird ebenfalls mehr Methanol verdampfen. Dieses Verfahren wird auch als Membrandestillation bezeichnet. Einen Einfluss auf die Anreicherung von Methanol durch die PDMS-Schicht der Pervaporationsmembran kann durch das Heranziehen eines Rotationsverdampfers oder durch die Membrandestillation ermittelt werden.

$$S_{Destillation} = \frac{c_{Destillat}}{c_{Feed}} \tag{2.9}$$

In den nachfolgend beschriebenen Versuchsaufbauten können sowohl c^{L}_{MeOH} als auch c^{G}_{MeOH} gemessen werden und der Stoffdurchgang (Flux) $\dot{n}$ ebenfalls mit Hilfe einer Kühlfalle oder direkt mittels Massenspektrometrie (vergl. Abbildung 3-25) bestimmt werden. Das Vakuum auf der Permeatseite und die Temperatur im Pervaporationsmodul werden konstant gehalten.

2.10 Kombination der Enzymimmobilisierung und Produktabtrennung

Es besteht die Möglichkeit, Enzyme an der Oberfläche einer Polymermatrix zu immobilisieren. Insbesondere sollen die Oberflächen der hydrophoben Pervaporationsmembranen PDMS und PTMSP modifiziert werden, um Bindungsmöglichkeiten für Enzyme zu realisieren. Generell ist die Bindung zum einen durch die physikalische Adsorption und zum anderen durch kovalente Bindung möglich. Bei der sogenannten Physisorption sind die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Oberfläche sehr schwach, aber es werden keine Veränderungen am Enzym hervorgerufen [81]. Bei der Chemisorption werden stabile Verbindungen erzielt, allerding auch auf die Gefahr hin, das Enzym irreversibel zu schädigen. Die größte Heraus-

forderung besteht darin, ein hydrophiles Enzym auf einem hydrophoben Träger zu immobilisieren. Das kann durch die Verwendung von schwach bindenden ambiphilen Verbindungen überwunden werden, die als Linker zwischen dem hydrophilen Enzym und der hydrophoben Oberfläche der PDMS- oder PTMSP-Membran eingesetzt werden können [82]. Mittels kovalenter Modifikation kann eine größere Stabilität des immobilisierten Enzyms durch Verwendung von funktionellen Gruppen auf der Oberfläche der Membran erzielt werden. Das ist durch die Behandlung der PDMS- oder PTMSP-Oberflächen mit Sauerstoff- oder Stickstoffplasma oder mit UV-Bestrahlung und Ozonbehandlung möglich.

Es werden zwei Arten von Plasmen unterschieden. Zum einen findet das sogenannte thermische Plasma Anwendung, das bei hoher Temperatur erzeugt wird, und zum anderen das kalte Plasma, das bei Normaltemperatur gehalten wird. Beim thermischen Plasma kann ein lokales thermodynamisches Gleichgewicht bei sehr hohen Temperaturen von 10^6 bis 10^8 K erzeugt werden, bei dem geladene schwere Teilchen bei Atmosphärendruck vorhanden sind. Beim Niederdruck-Plasma (kaltes Plasma) liegt das Neutralgas bei Raumtemperatur vor und ausschließlich die Elektronentemperatur ist hoch. Damit lassen sich auch thermisch sensible Materialien mit einem Plasma behandeln. Aus diesem Grund wurde auch für dieses Vorhaben kaltes Plasma zur Aktivierung der Pervaporationsmembranen verwendet. Auf die aktivierten Membranen können beispielsweise Silane als Linker aufgebracht werden und anschließend an der freien Seite des Linkers das Enzym gebunden werden [83]. Sowohl die Parameter des Plasmas als auch die richtige Wahl des Linkers haben erheblichen Einfluss auf den Immobilisierungserfolg und mussten untersucht werden.

2.11 Technische Prozesse zur Nutzung der Formaldehyd-Dismutase

Im Oktober 2010 wurde von der BASF Ludwigshafen ein Patent [84] mit dem Titel „Use of enzymes to reduce formaldehyde from formaldehyde-containing products“ veröffentlicht (EP 2 239 322 A1). Es bezieht sich auf alle Anwendungen, in denen Formaldehyd aus bestimmten Produkten mittels einer Formaldehyd-Dismutase entfernt werden soll. Es bezieht sich nicht auf die Herstellung von Methanol und Ameisensäure aus Formaldehyd. Das Patent bezieht sich auf eine Formaldehyd-Dismutase (accession number: L25862), die aus dem Stamm *Pseudomonas putida F61* rekombinant nach Yanase et al. [19] gewonnen wurde.

Des Weiteren gibt es ein Patent aus Japan zur Produktion von Ameisensäure aus Formaldehyd mittels einer Formaldehyd-Dismutase unter der Patentnummer JP61128891A [85]. Die Verwendung der Dismutase in einem Biosensor wurde von der Fraunhofer-Gesellschaft aus den Arbeiten von Rodewyk unter der Nummer DE19728663C patentiert [86]. Auf biotechnologischer Ebene haben Kato und Yanase (MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION) sowohl die Formaldehyd-Dismutase als auch deren Sequenz patentiert [87].

3 Materialien und Methoden

Eine Reihe der im Folgenden beschriebenen Materialien und Methoden im Umgang mit der Formaldehyd-Dismutase (FDM) wurden aus den Arbeiten von Rodewyk [10] und Spieth [88] übernommen. Einige Methoden wurden während der Doktorarbeit überarbeitet, andere wurden gänzlich selbst entwickelt.

3.1 Analytik zur Bestimmung der Formaldehyd-Dismutase-Aktivität

Die Methoden zur Bestimmung der Protein-, Edukt- und Produktkonzentration wurden an die Bedingungen der FDM-Reaktion angepasst. Im nächsten Schritt wurden die Methoden optimiert, um in Mikrotiterplatten eine größere Anzahl an Messungen durchführen zu können. Ein großer Teil der Methodenentwicklung bezog sich auf die Etablierung der on-line-Massenspektrometrie.

3.1.1 Bradford-Test zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford [89] bestimmt. Zur Anwendung kamen die definierten Lösungen von Bio-Rad [90] und AppliChem [91]. Die Kalibrierung erfolgte mit Rinderserumalbumin BSA (Abbildung 3-1). Auf 800 µl Probe wurden 200 µl Bio-Rad-Lösung gegeben.

Die Extinktion des Farbtests wird bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wird mit einer linearen Gleichung berechnet:

$$y = mx + n \qquad (3.1)$$

Das Farbreagenz der Bradfordlösung ist in Methanol gelöst. Da in der FDM-Reaktion Methanol entsteht, musste der Einfluss von Methanol auf den Farbtest überprüft werden. Eine Methanolkonzentration von bis zu 20 % (v/v) zeigte keinen Einfluss auf den Bradford-Farbtest (Abbildung 3-2).

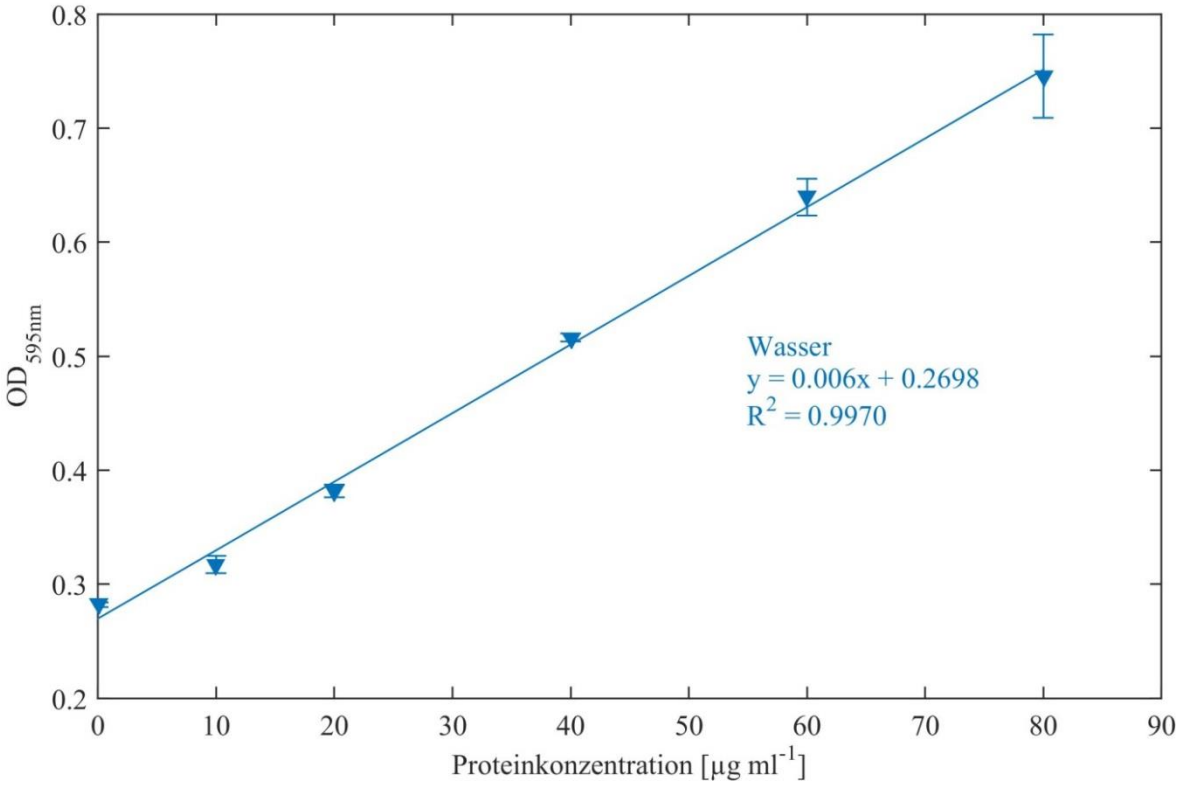


Abbildung 3-1 Kalibrierung der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.

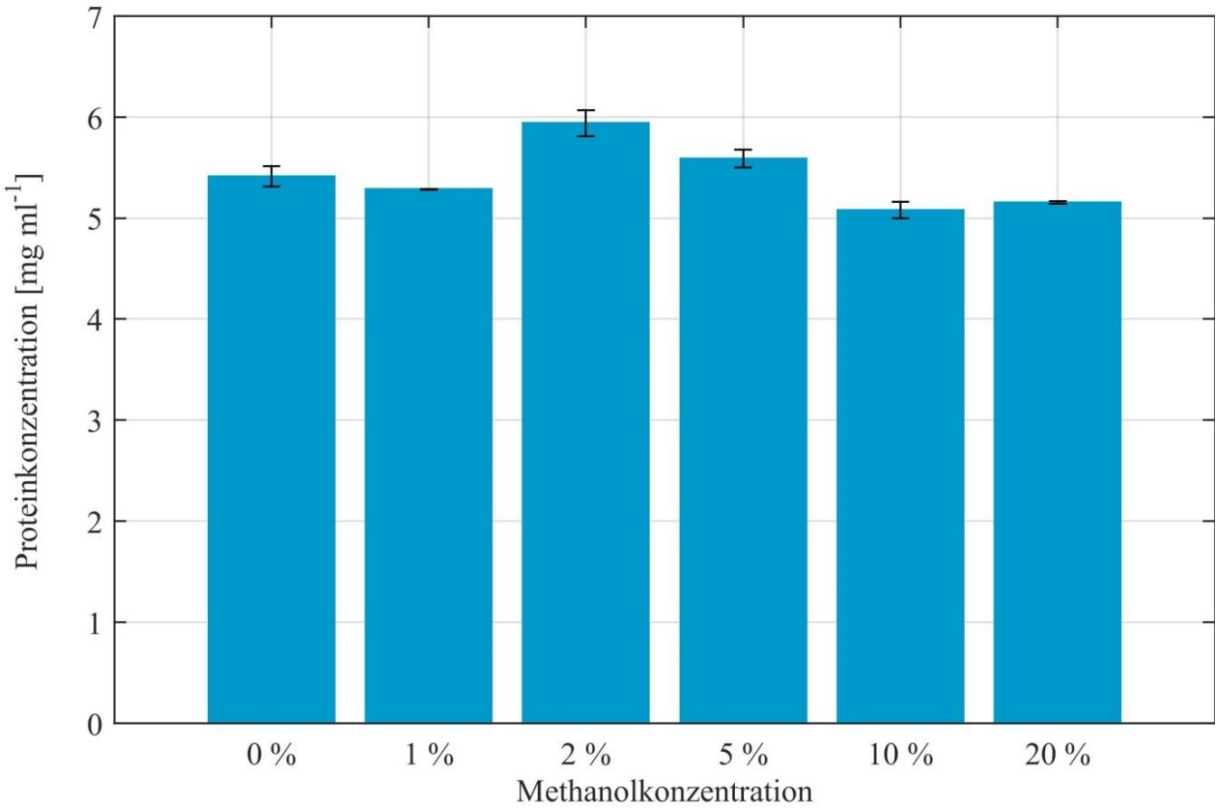


Abbildung 3-2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford in Abhängigkeit von der Methanolkonzentration in der Probe.

Da die FDM Formaldehyd zu Methanol und Ameisensäure disproportioniert, würde in einer ungepufferten Reaktionslösung der pH-Wert schnell absinken. Der pH-Wert in der Lösung wurde durch die Verwendung eines Phosphatpuffers konstant gehalten. Demzufolge musste für den Bradfordtest der Einfluss des Puffers untersucht werden.

Wie in Abbildung 3-3 gezeigt, besteht ein Einfluss der Pufferkonzentration. Eine 0,5 M Pufferlösung zeigte bereits einen Einfluss auf den Farbtest im Vergleich zu Wasser, kann aber zur Bestimmung der Proteinkonzentration dennoch herangezogen werden, da noch eine deutliche Steigung der Kalibriergeraden zu erkennen ist. Im Gegensatz dazu kann der Bradford-Test in einer 1 M Pufferlösung durch die geringe Steigung der Kalibriergeraden und die große Standardabweichung der Messpunkte nicht verwendet werden.

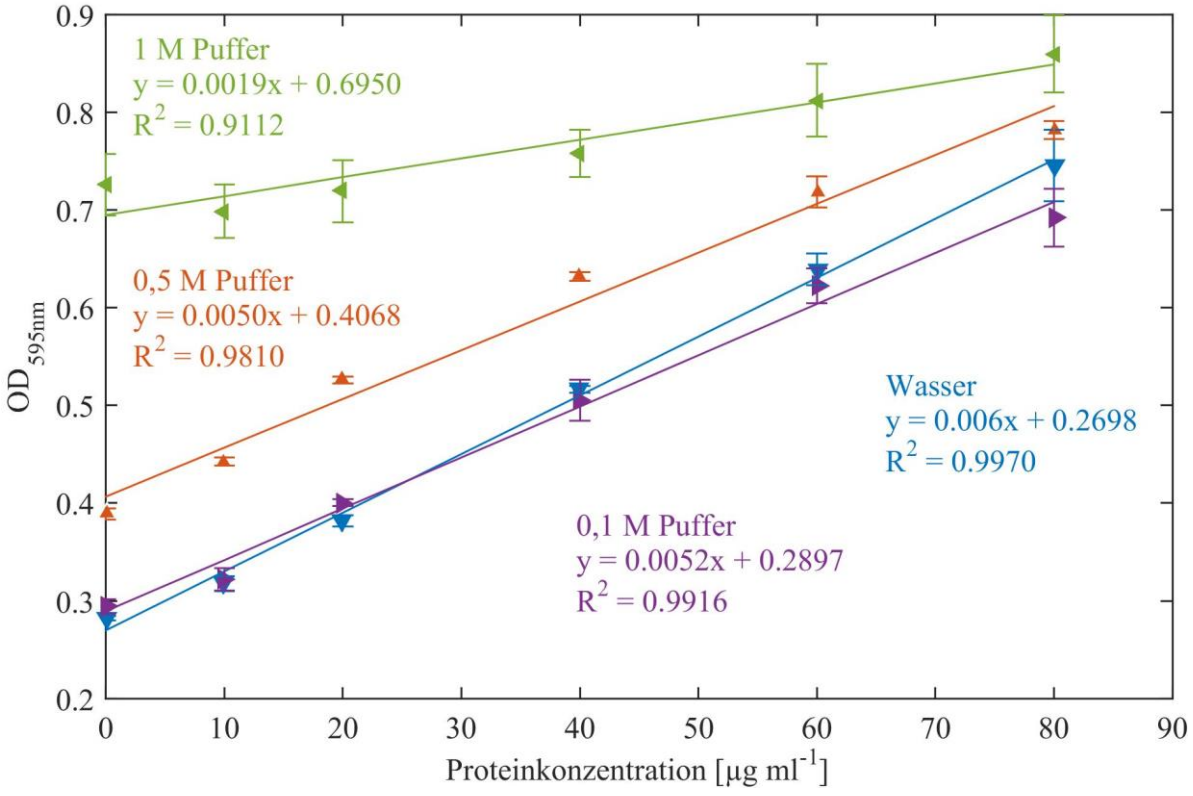


Abbildung 3-3 Kalibriergeraden für die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford für verschiedene Pufferkonzentrationen.

3.1.2 Acetylaceton-Methode zur Bestimmung der Formaldehydkonzentration

Die Aktivität der FDM kann sowohl über die Produktbildungsrate als auch über die Abnahme des Formaldehydkonzentration bestimmt werden [10]. Die Bestimmung der Formaldehyd-

konzentration kann nach der sogenannten Acetylaceton-Methode (VDI 3484 Blatt 2) erfolgen. Verwendet wurde eine Lösung aus einem Formaldehyd-Küvetten-Test von Hach Lange (LCK 325). Die Kalibrierung der Lösung ist herstellerseitig vorgegeben. Allerdings musste die Anwendbarkeit des Küvettentests bezüglich des Phosphatpuffers untersucht werden. Dazu wurden, ausgehend von einer Formaldehyd-Stammlösung, sechs Proben mit unterschiedlichen Pufferlösungen (0 M bis 5 M) versetzt. Dadurch konnten Proben mit gleicher Formaldehydkonzentration, aber unterschiedlicher Pufferkonzentration erhalten werden. Die Formaldehydbestimmung erfolgte nach Anleitung des Formaldehyd-Küvettentests. In Abbildung 3-4 ist kein Einfluss des Puffers bis zu einer Konzentration von 5 M zu erkennen.

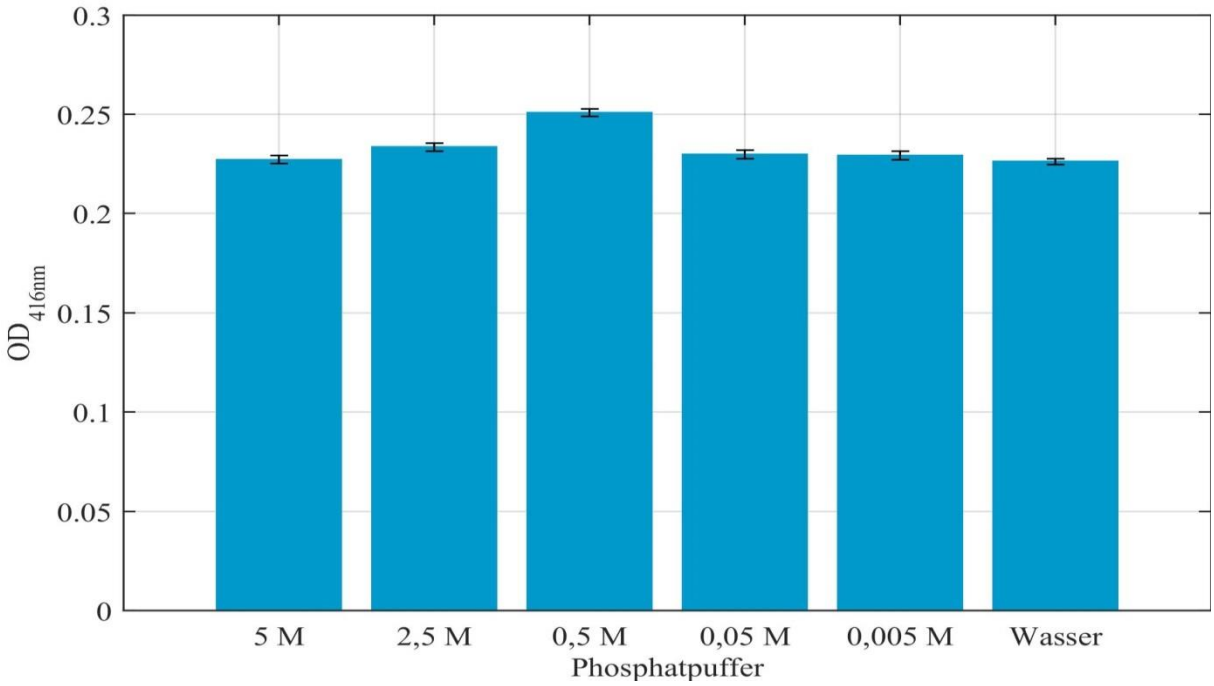


Abbildung 3-4 Bestimmung der Absorption bei 416 nm als Maß für die Formaldehydkonzentration mittels Hach Lange Acetylaceton-Methode in Abhängigkeit der Pufferkonzentration.

3.1.3 Sulfit-Pararosanilin-Verfahren zur Bestimmung der Formaldehydkonzentration

Formaldehyd kann mit einer Pararosanilin- und Natriumsulfit-Lösung nachgewiesen werden (VDI 3484 Blatt 1). Der Messbereich liegt zwischen 0,5 mg/l und 3 mg/l. Dazu werden 2 ml Probelösung mit 200 µl Pararosanilin-Lösung (Reagenz I) sowie 200 µl frisch angesetzter Na_2SO_3-Lösung (Reagenz II) versetzt und 90 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wird die Extinktion im Spektrometer bei 570 nm gemessen:

Reagenz I: 160 mg Pararosanilin (vorsichtig handhaben!) in 24 ml konzentrierte HCl lösen und mit bidest. Wasser eine 100 ml Lösung herstellen (mehrere Wochen haltbar).

Reagenz II: 50 mg Na_2SO_3 (wasserfrei, p.A.) in 50 ml bidest. Wasser lösen (täglich frisch ansetzen).

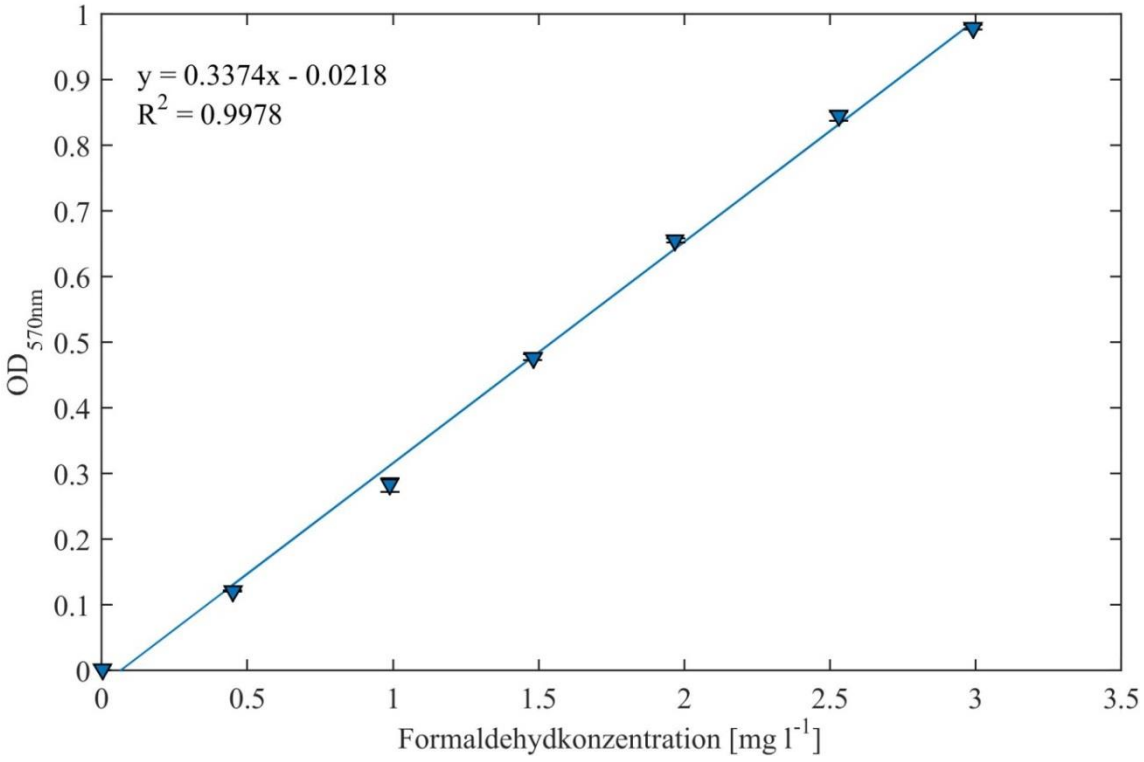


Abbildung 3-5 Kalibrierung der Formaldehydkonzentrationsbestimmung mittels Pararosanilin-Lösung.

In Abbildung 3-5 ist beispielhaft eine Kalibriergerade zur Formaldehydkonzentrationsbestimmung mittels Pararosanilin dargestellt. Analog zur Acetylaceton-Methode wurde auch hier der Einfluss des verwendeten Phosphatpuffers auf den Farbtest untersucht. Es zeigte sich mit zunehmender Pufferkonzentration ein starkes Schwanken der Messwerte. Ab einer Pufferkonzentration von 0,5 M nimmt der Messfehler deutlich zu (Abbildung 3-6).

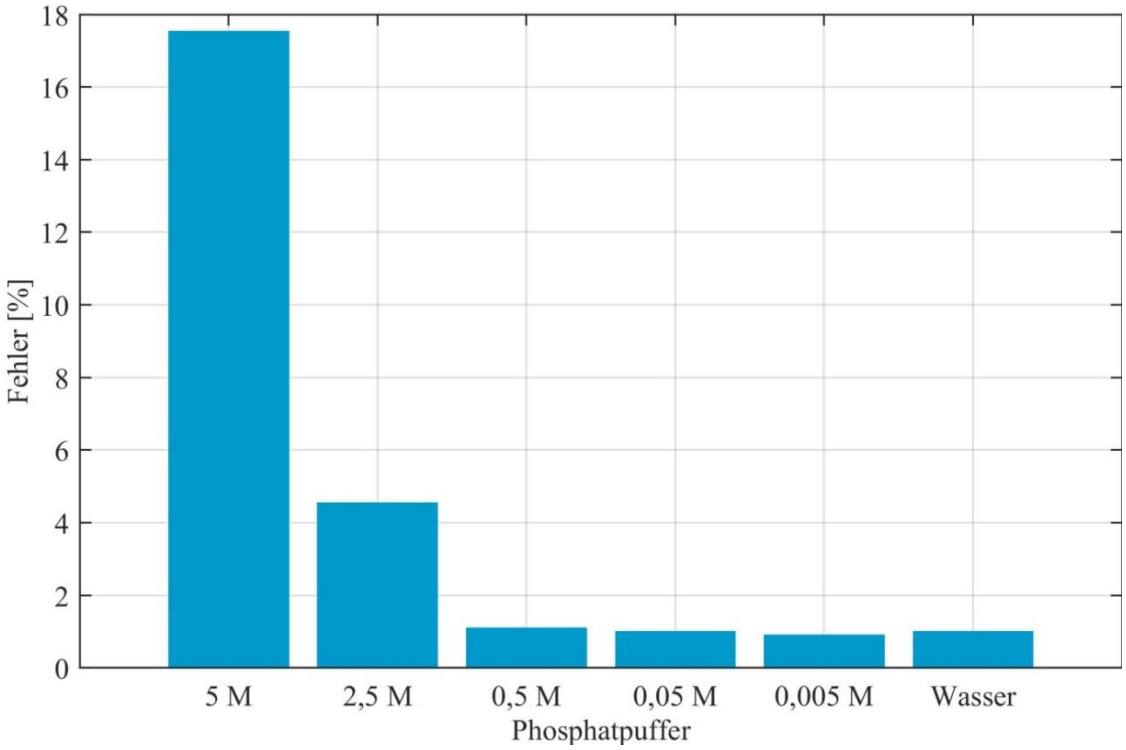


Abbildung 3-6 Standardabweichung aus der Bestimmung der Formaldehydkonzentration mittels Pararosanilin in Abhängigkeit der Pufferkonzentration.

3.1.4 MBTH-Methode zur Bestimmung der Formaldehydkonzentration

Die Messung der Formaldehydkonzentration in wässrigen Lösungen ist auch mittels Methylbenzothiazolonhydrazon (MBTH) und einer Eisenoxidlösung (Fe_2O_3) möglich. Dazu wurde ein Fertigpräparat von Hach Lange verwendet, das normalerweise nicht als Küvettenlösung vorgesehen ist. 3 g MBTH wurden als Feststoff in 25 ml Wasser gelöst. 900 µl dieser Lösung wurden in einem Eppendorff-Reaktionsgefäß vorgelegt und 100 µl Probe addiert. Nach 20 Sekunden starken Mischens im Vortexer und fünf Minuten Wartezeit wurden 100 µl Entwicklungslösung hinzugefügt und sofort bei 630 nm im Photometer vermessen. Durch die Farbreaktion bilden sich an der Oberfläche der Küvette Blasen, welche die Messung beeinflussten. In einer 1 ml Küvette konnte dennoch eine brauchbare Kalibriergerade erhalten werden, in kleineren Gefäßen war es nur teilweise möglich (Abbildung 3-7).

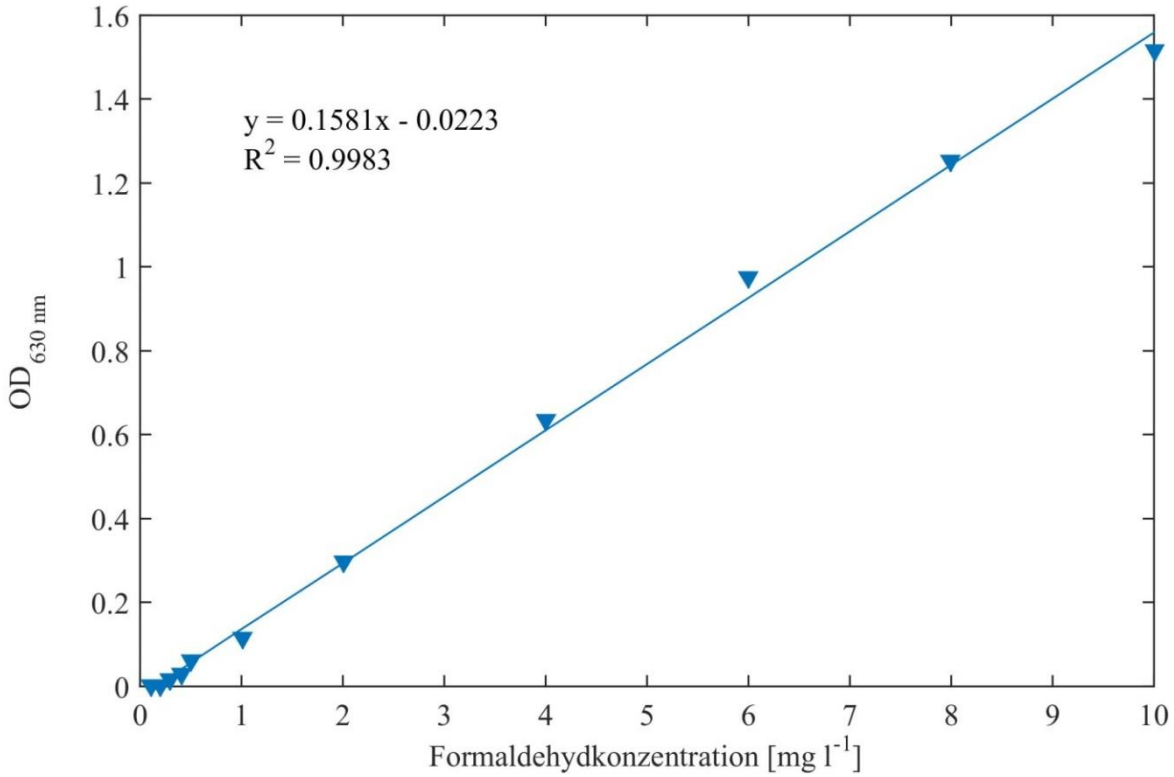


Abbildung 3-7 Kalibrierung der Formaldehydkonzentrationsbestimmung mittels MBTH-Test in 1 ml Küvetten.

3.1.5 Verwendung von Mikrotiterplatten

Für eine schnellere Konzentrationsmessung mit mehreren Enzymlösungen eignen sich Mikrotiterplatten (96-Well-Plates). Damit lassen sich sowohl Proteinkonzentrationen als auch Formaldehydkonzentrationen zur Bestimmung der Aktivität messen. Für die photometrischen Messungen wurde das Gerät Infinite 200 PRO von Tecan [92] verwendet. Je nach Anwendung wurden Ablaufsteuerungen zum Temperieren, Schütteln und Messen programmiert.

3.1.5.1 Bradford-Assay für 96-Well-Mikrotiterplatten

Aufgrund des viskosen Verhaltens der Bradford-Lösung kam es teilweise zu einer schlechten Durchmischung der Lösung in den einzelnen Wells. Der Bradfordtest ist uneingeschränkt in Mikrotiterplatten anwendbar und sollte für jede Messung mittels Mikrotiterplatte kalibriert werden. Dazu wird ein Teil Bradford-Lösung (Bio-Rad) mit vier Teilen bidest. Wasser verdünnt und gefiltert (zwei Wochen bei Raumtemperatur haltbar). Die Kalibrierung erfolgt mit einer BSA-Verdünnungsreihe mit einer Konzentration zwischen 0,05 mg/ml bis 5 mg/ml. 10 µl Probe wird in die Kammern der Mikrotiterplatte gegeben. Daraufhin werden 200 µl der

verdünnten Bradford-Lösung hinzugegeben und gemischt. Nach fünf Minuten Inkubationszeit kann innerhalb von einer Stunde die Adsorption bei 595 nm gemessen werden.

3.1.5.2 Acetylaceton-Assay für 96-Well-Mikrotiterplatten

Verwendet wurden die Lösungen von Hach Lange. Es wurde im Mikrotiterplatten-Photometer eine Absorptionskinetik über 90 Minuten aufgezeichnet. Die größte Messsicherheit wird nach 60 Minuten erhalten. Die Verwendung von Mikrotiterplatten zur Bestimmung der Formaldehydkonzentration mittels Acetylaceton-Methode wurde bisher nicht veröffentlicht. In Abbildung 3-8 ist die entwickelte Methode anhand eines Aktivitätstests dargestellt. Verwendet werden können alle Enzymproben. Es kann frisches oder gefriergetrocknetes Lysat verwendet werden. Zur Durchführung des Aktivitätstests wurde meist getrockneter Rohextrakt verwendet. Dazu wurde eine Lösung von 10 mg trockenem Rohextrakt pro Milliliter hergestellt und diese mit 1 mg/ml Serumalbumin als Schutzprotein versetzt. 900 µl der Proteinlösung wurden mit einer 10 g/l Formaldehydlösung zum Starten des Aktivitätstests vermischt, so dass die initiale Formaldehydkonzentration 1 g/l betrug. Zum Stoppen der Reaktion wurde eine 0,5 M Essigsäurelösung verwendet.

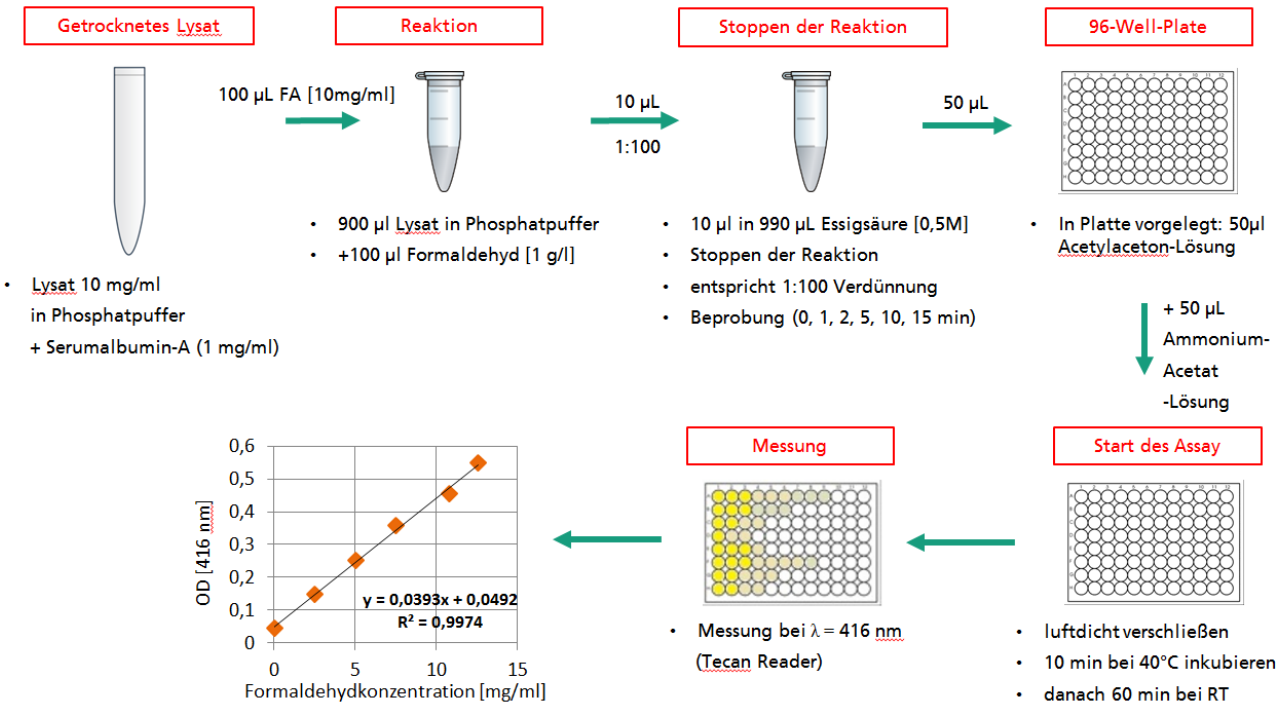


Abbildung 3-8 Ablaufdiagramm zur Messung der Formaldehydkonzentration zur Bestimmung der Enzymaktivität in 96-Well-Mikrotiterplatten mittels Acetylaceton-Methode nach Hach Lange.

3.1.5.3 Pararosanilin-Assay für 96-Well-Mikrotiterplatten

Reproduzierbare Ergebnisse wurden durch das Vorlegen von 100 µl Pararosanilin-Lösung (Reagenz I, vergl. Kapitel 3.1.3) und Zugabe von 10 µl der Probe erzielt. Nach kurzer Wartezeit von 2 Minuten wurden 100 µl frisch angesetzte Na_2SO_3-Lösung (Reagenz II, vergl. Kapitel 3.1.3) als Entwicklungslösung hinzugegeben. Nach 30 Sekunden Schütteln im Mikrotiterplatten-Photometer wurde die Absorption bei 570 nm gemessen. Die Extinktion ändert sich mit der Inkubationszeit, daher musste sie nach einer definierten Inkunbationszeit gemessen werden (Abbildung 3-9).

Die Inkubationszeit beträgt minimal 40 Minuten. In dieser Arbeit wurde in allen Messungen mit Pararosanilin 90 Minuten inkubiert. Die Kalibrierung nach 90 Minuten Inkubationszeit liefert die in Abbildung 3-10 dargestellte Kalibriergerade. Im Gegensatz zur Küvetten-Methode (vergl. 3.1.3), mit einem Messbereich zwischen 0,02 mg/l und 4 mg/l, liegt der Messbereich der angepassten Mikrotitermethode zwischen 0,02 mg/l und 10 mg/l.

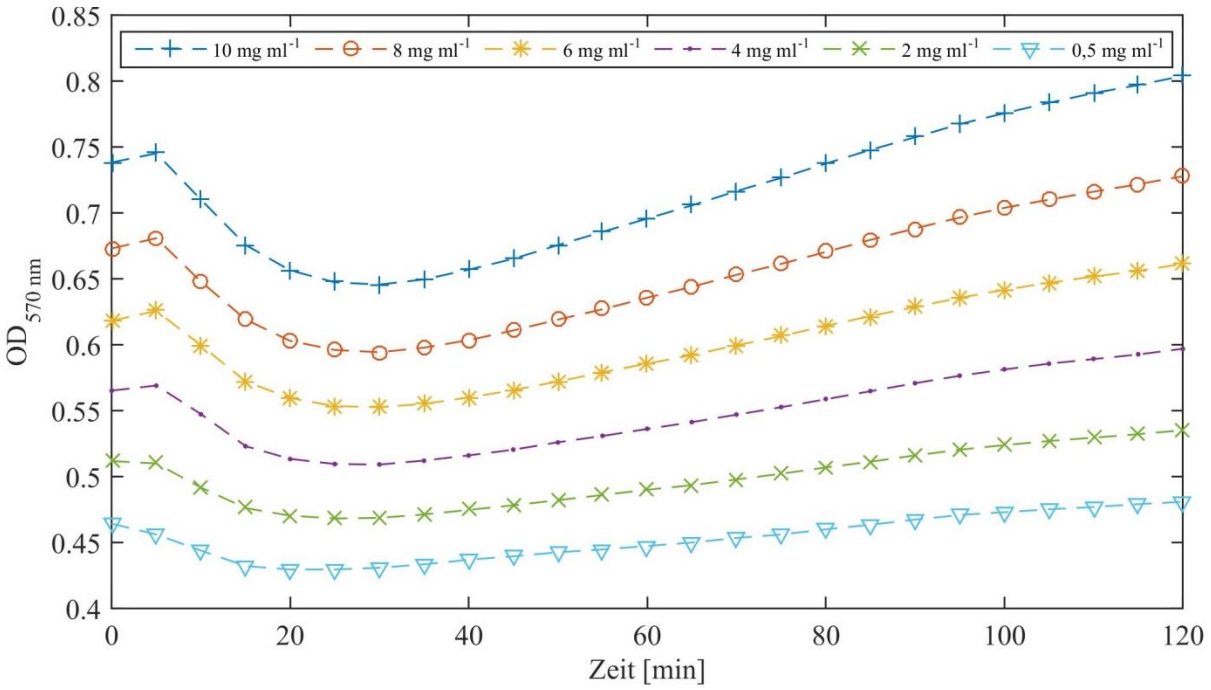


Abbildung 3-9 Kinetik der Absorption des Pararosanilin-Tests für verschiedene Formaldehydkonzentrationen in einer Mikrotiterplatte.

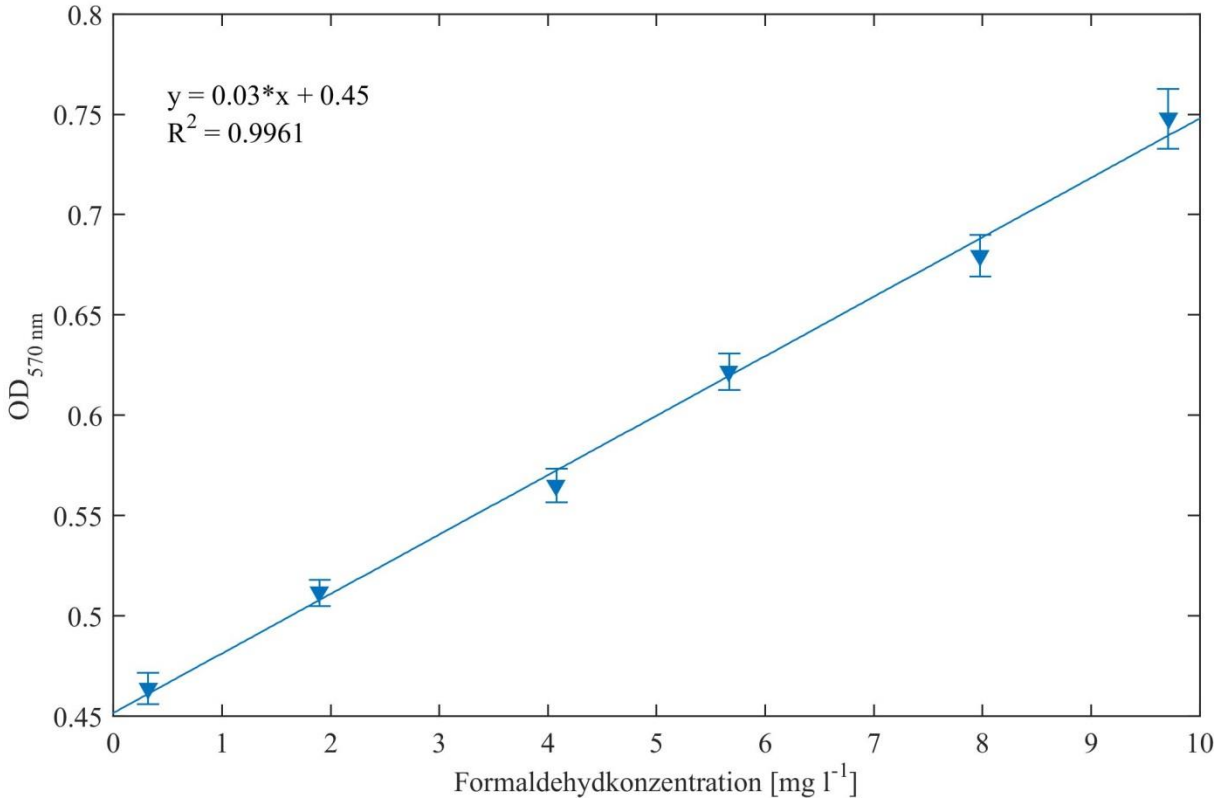


Abbildung 3-10 Kalibrierungsgerade der Pararosanilin-Methode in einer Mikrotiterplatte.

3.1.5.4 MBTH-Assay für 96-Well-Mikrotiterplatten

Die MBTH-Methode konnte nicht auf Mikotiterplatten übertragen werden. Die bei der Farbreaktion entstehenden Blasen wirken sich sehr stark auf die Messung aus, so dass aus vielen Wells einer Messung keine plausiblen Messwerte erhalten werden können.

3.1.5.5 Vergleich der verschiedenen Aktivität-Assays

Die Verwendung von Mikrotiterplatten wurde für verschiedene Farbreaktionen getestet und hinsichtlich der Verwendung für die FDM-Reaktion überprüft. Dabei dürfen Puffer- und Methanolkonzentration keinen Einfluss auf die Farbreaktionen haben. Bestehende Methoden für 1 ml Küvetten wurden angepasst und für alle Methoden eine Absorptionskinetik zur Evaluierung des Messzeitpunktes aufgezeichnet. Daraus konnte der maximale Fehler bestimmt werden. In Tabelle 3-1 sind die Methoden zum Vergleich aufgeführt.

Tabelle 3-1 Vergleich verschiedener Methoden zur Aktivitätsbestimmung.

Methode	Messbereich	Fehler	Puffertoleranz
Acetylaceton-Methode (Hach-Lange)	0,2 mg/ml bis 12 mg/ml	<1 %	Uneingeschränkt gegenüber Phosphatpuffer
Pararosanilin (giftig)	0,2 mg/ml bis 10 mg/ml	1 %	Bis 0,5 M Phosphatpuffer
MTBH*	0,5 mg/ml bis 10 mg/ml	3,2 % (Blasenbildung)	k.A.
Bradford Proteinkonzentration	0,1 µg/ml bis 100 µg/ml	<1 %	Bis 0,1 M

3.2 On-line-Massenspektrometer zur Konzentrationsmessung

Für den gleichzeitigen Nachweis von Methanol, Ameisensäure und Formaldehyd wurde ein Massenspektrometer mit Membraneinlasssystem verwendet, das vom Fraunhofer ICT entwickelt [30] und im Rahmen der Doktorarbeit um zwei Gaseinlässe erweitert wurde. Mit diesen Einlässen ist es möglich, flüchtige Komponenten aus einer Flüssigkeit und durch Wechselschalten von Ventilen ebenfalls aus einer Gasphase zu messen. Dafür wird eine inerte poröse Membran verwendet. Dieses System wurde zuvor noch nicht für biotechnologische Zwecke eingesetzt.

3.2.1 Aufbau des Massenspektrometers mit Flüssigeinlass

In Abbildung 3-11 ist der Aufbau des on-line-Massenspektrometers mit Membraneinlass dargestellt. Der Aufbau wurde mit einem Enzym-Druckreaktor gekoppelt (vergl. Kapitel 3.9.3). Zentrales Element ist der Membraneinlass, in dem eine Flüssigkeit an einer Membran vorbeigeführt wird. Dabei können über Ventile zwei verschieden Flüssigkeitsströme gewählt werden. Mit Position 1 (Pos1) können beispielsweise aus einem Vorratsgefäß Kalibrierlösungen durch eine pulsationsarme HPLC-Pumpe der Firma Knauer (P401 mit Drucksensor) gepumpt werden. In der Stellung Pos1 der Ventile wird die Pumpe nach dem Flüssigeinlass in ein weiteres Gefäß (Rest) gepumpt. In der Stellung 2 der Ventile (Pos2) wird Flüssigkeit aus dem

Reaktor herausgepumpt, durch den Membraneinlass geführt und anschließend wieder zurück in den Reaktor gegeben. Diese Stellung ist stromlos offen (normally open NO). Auf der Permeatseite liegt ein Vakuum (0,14 mbar bis 0,19 mbar) an, das durch die Drehschieberpumpe P101, auch als Vorvakuumpumpe bezeichnet, erzeugt wird. Über das Vakuum wird ein kontinuierlicher Dampfstrom an dem Handventil H101 vorbeigeführt. Auf der anderen Seite des Ventils wird mittels einer Turbopumpe (P102) und nachgeschalteter Drehschieberpumpe (P103) ein Hochvakuum ($5 \cdot 10^{-7}$ mbar bis $5 \cdot 10^{-6}$ mbar) erzeugt. Auf diese Weise gelangt eine kleine Probe des Dampfs im Vorvakuum in das Hochvakuum und kann mittels eines Quadrupol-Massenspektrometers detektiert werden. Grün eingekreiste Komponenten sind direkt mit einer SPS verbunden. Blau eingekreiste Komponenten kommunizieren über eine OPC-Schnittstelle mit der Anlagensteuerung.

3.2.2 Kalibrierung des Massenspektrometers

Das Massenspektrometer wurde für alle an der Enzymreaktion beteiligten Verbindungen im Druckreaktor (vergl. 3.9.3) kalibriert. Dazu wurde destilliertes Wasser oder Puffer im Reaktor vorgelegt und Formaldehyd (FA), Methanol (MeOH), Ameisensäure (AS) oder Methylformiat (MF) schrittweise mittels einer Membrandosierpumpe hinzugegeben. Die Messung mit dem Massenspektrometer erfolgte kontinuierlich. Als Referenzwert dienten Wasser oder Puffer ohne die genannten Verbindungen. Die Kalibrierung ergibt für jede Masse eine lineare Abhängigkeit

$$I = m \cdot c_i + n \tag{3.2}$$

des Ionenstroms I von der Konzentration des jeweiligen Stoffes c_i (Abbildung 3-12 bis Abbildung 3-15). Je nach Molekül und Ionisierungswahrscheinlichkeit durch das Filament (vergl. 2.6.2.3) werden unterschiedliche Ionenströme erhalten. Der Ionisierungsgrad lässt sich nicht durch ein Modell beschreiben [93]. Er ist sowohl stoffabhängig als auch abhängig von den Parametern im Massenspektrometer. Daher werden Stoffe in jedem Messsystem mit unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit ionisiert, was eine stetige Kalibrierung notwendig macht. Organische Säuren adsorbieren an den innenliegenden Wandungen des Massenspektrometers. Durch das Erhitzen der Wandungen kann der Adsorption entgegengewirkt werden. Tritt eine

Adsorption auf, kommt es zu einer Abweichung vom linearen Verlauf, wie am Beispiel Ameisensäure in Abbildung 3-14 zu erkennen ist.

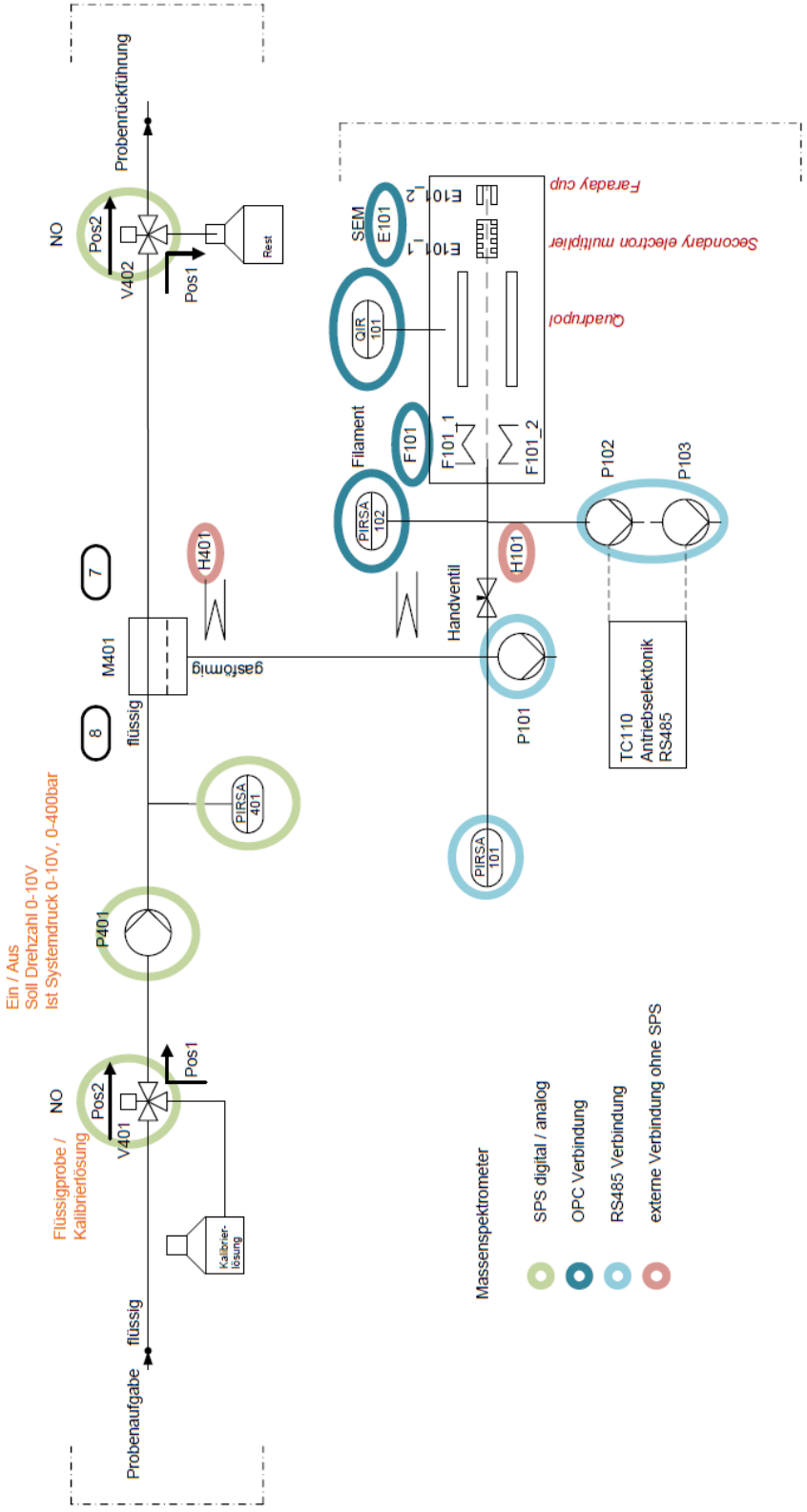


Abbildung 3-11 RI-Schema Massenspektrometer mit Flüssigkeitseinlass. Dargestellt sind alle Komponenten des Messaufbaus. Zudem sind die Anbindungen an die Steuerungstechnik farblich gekennzeichnet.

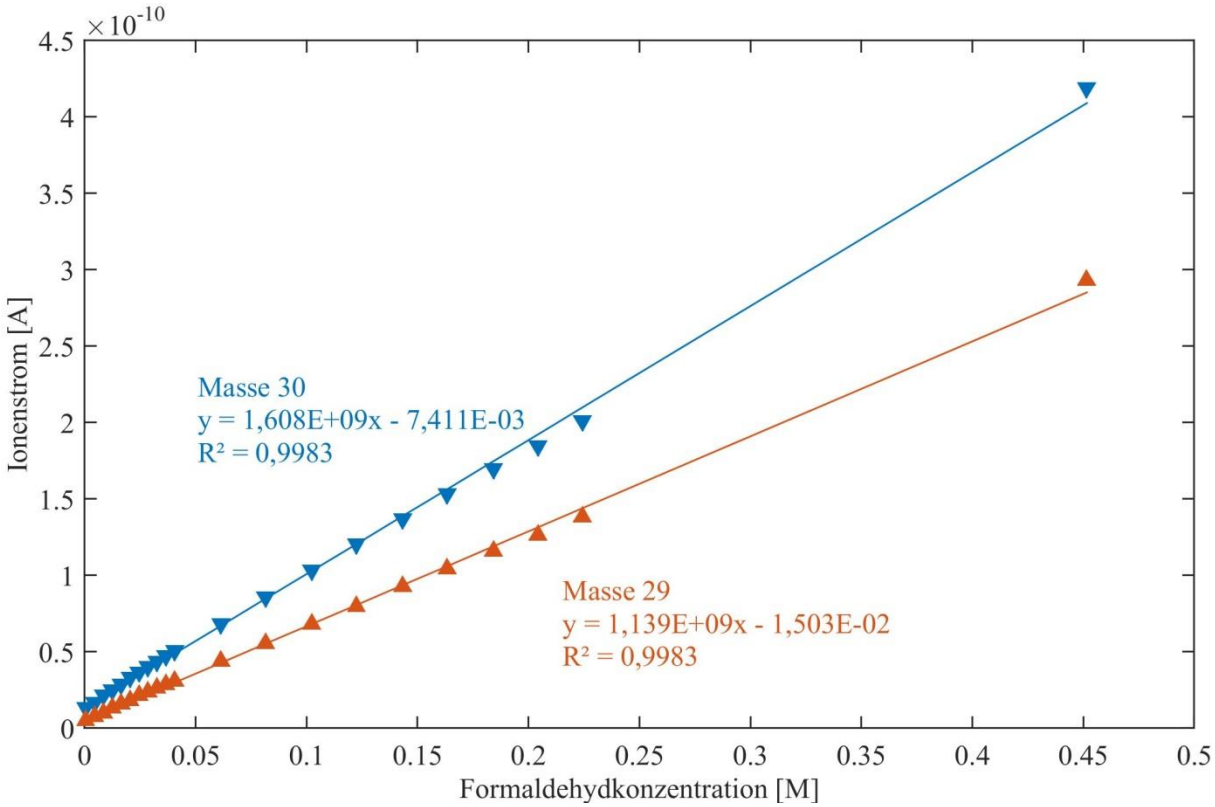


Abbildung 3-12 Kalibrierungsgeraden der Massen 29 und 30 für Formaldehyd in Wasser (ungepuffert).

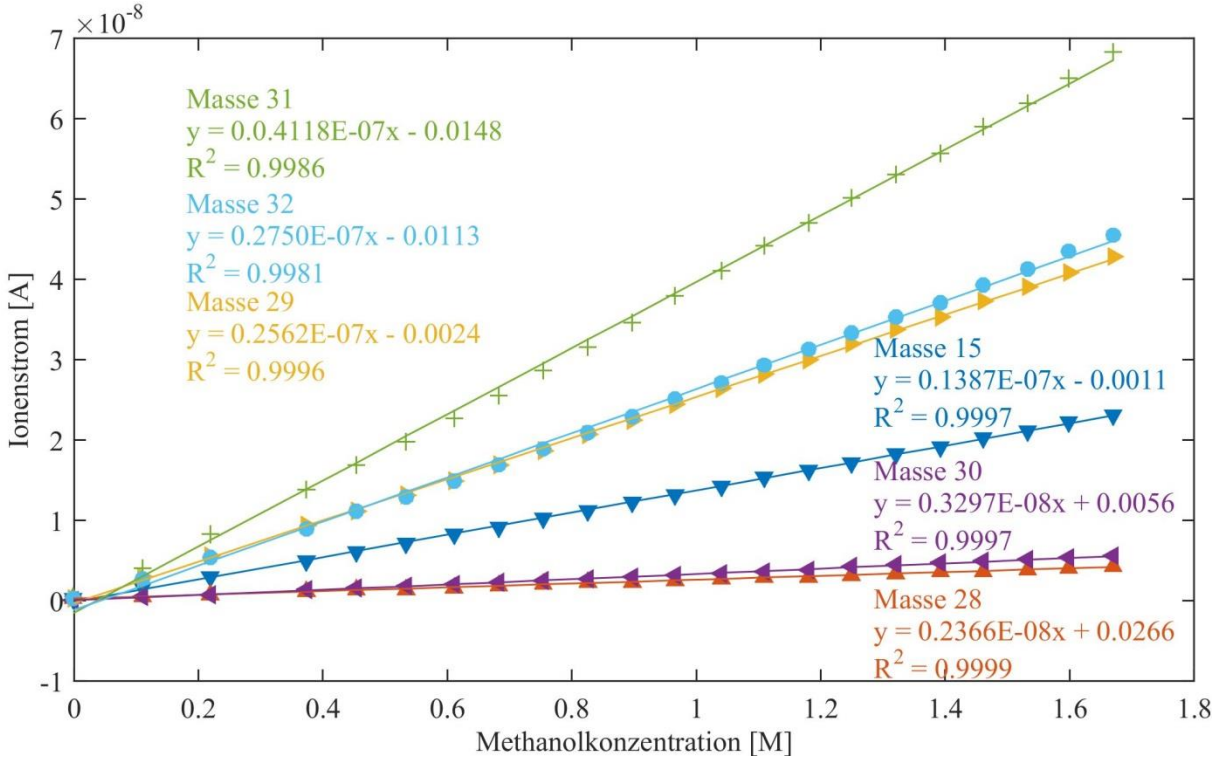


Abbildung 3-13 Kalibrierungsgeraden unterschiedlicher Massen für Methanol in Wasser (ungepuffert).

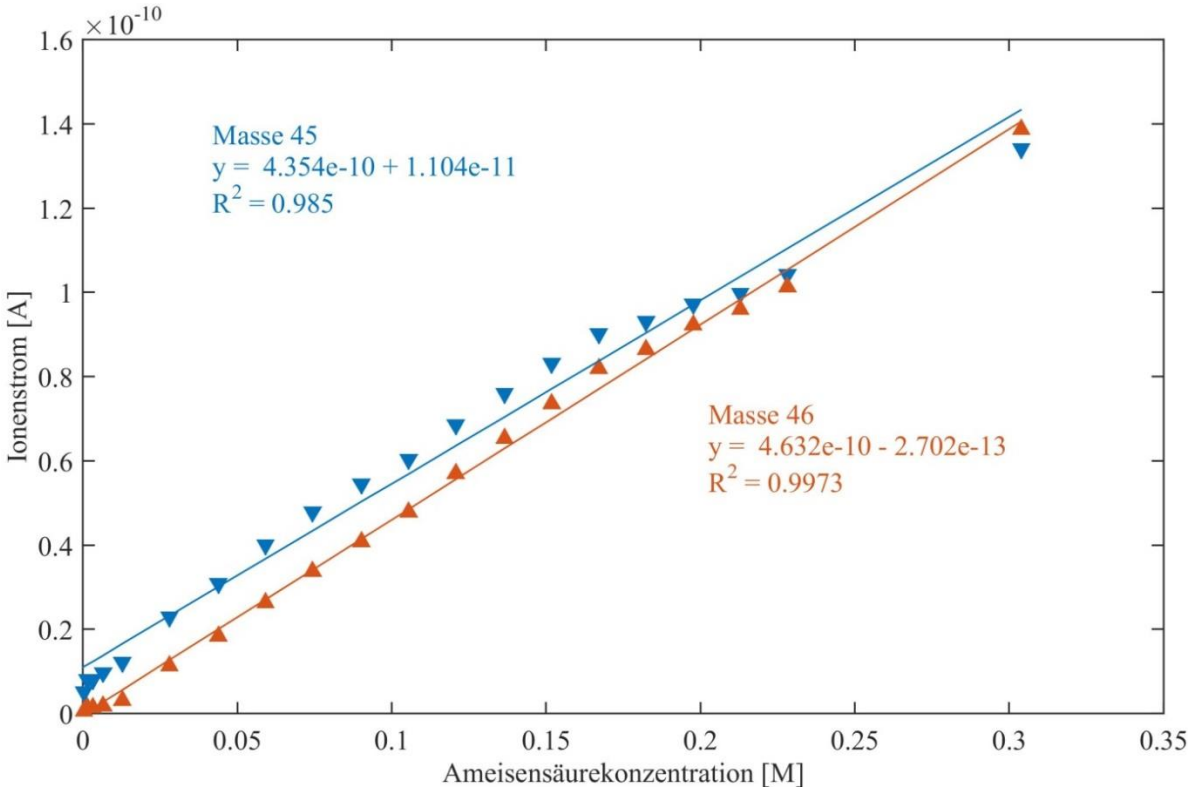


Abbildung 3-14 Kalibrierungsgeraden unterschiedlicher Massen für Ameisensäure in Wasser (ungepuffert).

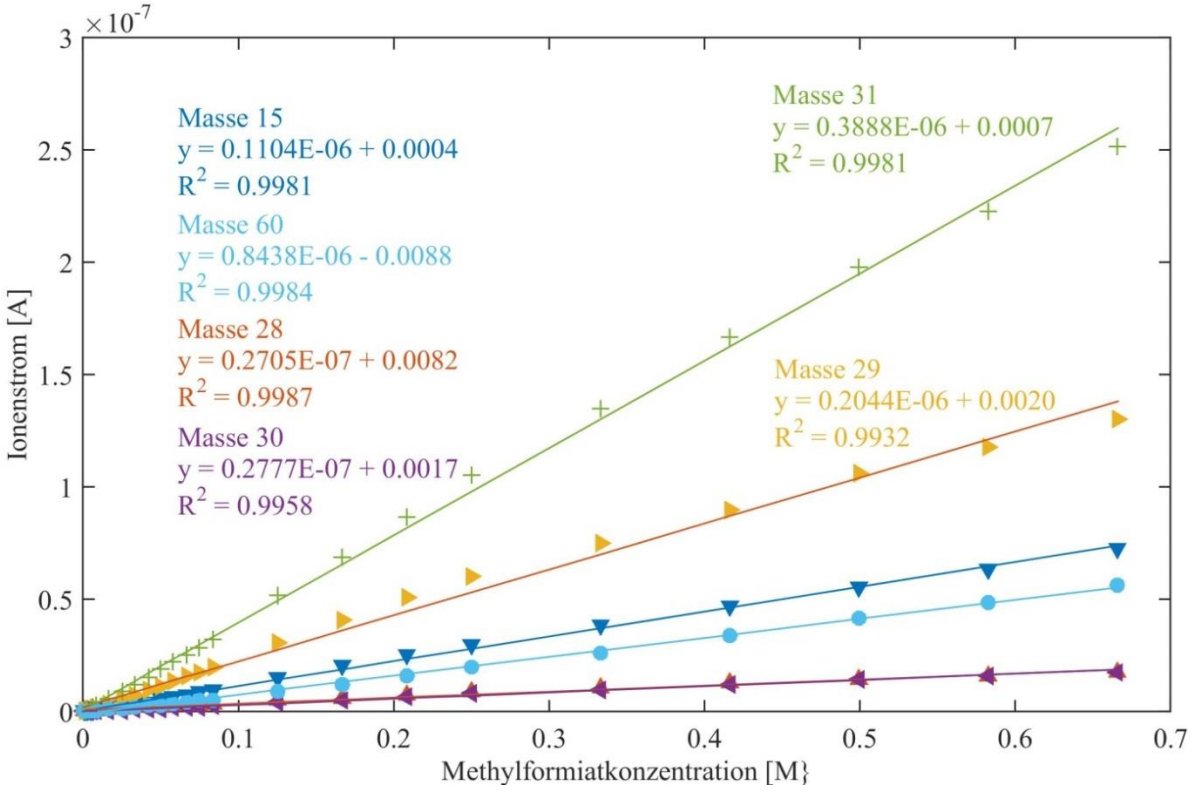


Abbildung 3-15 Kalibrierungsgeraden unterschiedlicher Massen für Methylformiat in Wasser (ungepuffert).

3.2.3 Messung eines Testsystems

Das Substrat/Produkt-Gemisch einer Dismutase-Reaktion wurde mit einer Verdünnungsreihe, ausgehend von einer 0,5 M Formaldehydlösung (15 g/l), nachgestellt, der zu gleichen Teilen Methanol und Ameisensäure zu einer Gesamtkonzentration von 0,5 M zugegeben wurde. Auf diese Weise wurden sieben 100 ml Proben hergestellt. Die einzelnen Proben wurden nacheinander mit dem on-line-Massenspektrometer gemessen (Abbildung 3-16).

Das Messsystem ist temperaturabhängig. Der Messfehler der unterschiedlichen Proben durch Temperaturschwankung während der Messung konnte durch Normierung über die Masse für Wasser (Masse 18) beseitigt werden, da die Wasserkonzentration im Dampf des Vorvakuums konstant bleibt. Eine Veränderung im Ionenstrom der Masse 18 ist demnach auf eine Temperaturveränderung und die damit verbundene Änderung des Partialdrucks von Wasser zurückzuführen und kann über das Verhältnis aus den Ionenströmen der laufenden Messung und der ersten Messung rechnerisch eliminiert werden:

$$k = \frac{I_{\mathrm{i}}^{m18}}{I_0^{m18}} \qquad mit\ i = Messung\ und\ 0 = Bezugsmessung \tag{3.3}$$

Dieser Anteil beschreibt die Temperaturschwankung und ist für alle Massen gleich, so dass für alle Massen gilt:

$$I_i^{norm\,mj} = k \cdot I_i^{mj} \qquad mit\ j = Masse \tag{3.4}$$

Aus Abbildung 3-16 können die gegenseitigen Abhängigkeiten der Massen für die einzelnen Stoffe abgeleitet werden. Durch die Anwesenheit von Methanol und Ameisensäure (AS) in einem System entsteht in geringen Konzentrationen Methylformiat (MF). Diese Reaktion und die Überlagerung der Massen der beteiligten Stoffe macht eine systematische Berechnung der Konzentrationen notwendig. Es wird mit Methylformiat begonnen. Aus der Geradengleichung der Kalibrierung mit Methylformiat kann mit Hilfe der Masse 60 die Methylformiatkonzentration berechnet werden:

$$c_{MF} = \frac{I_{m60} \mp n_{m60}}{m_{m60}} \tag{3.5}$$

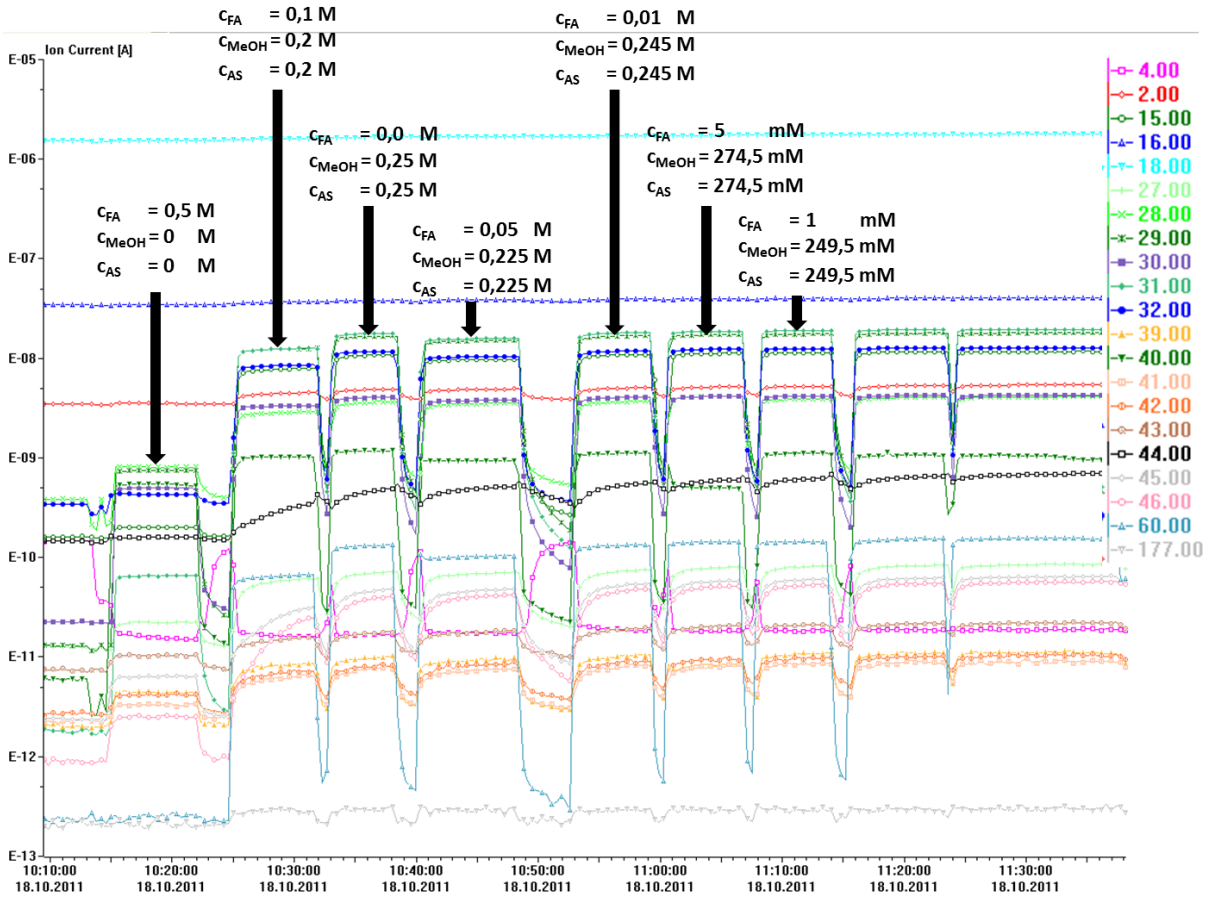


Abbildung 3-16 Verlauf der Messung von Gemischen aus Formaldehyd, Methanol und Ameisensäure mit dem Testsystem. Begonnen wurde mit einer 0,5 M Formaldehydlösung. Sukzessiv wurde die Formaldehydkonzentration verringert und die äquimolaren Anteile Methanol und Ameisensäure bis zu einer Gesamtkonzentration von 0,5 M ergänzt.

Ameisensäure ist ebenfalls unabhängig bestimmbar durch die ionisierten Massen 45 und 46:

$$c_{AS} = \frac{I_{m45} \mp n_{m45}}{m_{m45}} \tag{3.6}$$

In Abhängigkeit von der Methylformiat-Konzentration kann die Methanol-Konzentration berechnet werden. Dazu muss vom Ionenstrom der Masse 31 der Anteil abgezogen werden, der von Methylformiat stammt um den Ionenstrom zu erhalten, welcher von Methanol stammt. Das setzt voraus, dass das Massenverhältnis m31 zu m60 für Methylformiat konstant ist:

$$I_{c_{MF}}^{m31} = m_{MF(m31)} \cdot c_{MF} + n_{MF(m31)} \tag{3.7}$$

$$c_{MeOH} = \frac{(I_{MeOH}^{m31} - (I_{c_{MF}}^{m31} - I_{Blank}^{m31})) \mp n_{MeOH(m31)}}{m_{MeOH(m31)}} \tag{3.8}$$

Ebenso wird mit der Berechnung der Formaldehyd-Konzentration verfahren. Das Massenspektrum des Formaldehyds im Stoffgemisch steht allerdings in Abhängigkeit zur Methyl-

formiat-, Ameisensäure- und Methanol-Konzentration. Die Ionenströme der Stoffe für die Masse 29 müssen also von der Masse 29 für Formaldehyd abgezogen werden:

$$c_{FA} = \frac{(I_{FA}^{m29} - (I_{c_{MF}}^{m29} - I_{Blank}^{m29}) - (I_{c_{Formiat}}^{m29} - I_{\text{Blank}}^{m29}) - (I_{c_{MeOH}}^{m29} - I_{\text{Blank}}^{m29})) \mp n_{FA(m29)}}{m_{FA(m29)}} \quad (3.9)$$

In Abbildung 3-17 sind die Ergebnisse der Messung dargestellt. Die Soll-Konzentration entspricht der dosierten Menge aus der Messreihe. Der Verlauf der Ameisensäuremessung zeigte eine erheblich längere Ansprechzeit. Ursache ist die starke Neigung der Ameisensäure an die Oberfläche im Inneren des MS zu adsorbieren. Tritt eine Sättigung an den Wandungen des Massenspektrometers mit Ameisensäure ein, verbessert sich die Ansprechzeit und die Konzentration kann unverfälscht gemessen werden. Außerdem muss die Dissoziation der Ameisensäure in Pufferlösungen beachtet werden. Da nur die freie Säure flüchtig ist, ist die Messung abhängig vom pH-Wert der Lösung. Die Messungen wurden mit abnehmender Formaldehydkonzentration in ungepufferter wässriger Lösung durchgeführt. In Abbildung 3-17 ist das Abnehmen des Fehlers der Ameisensäurekonzentration im fortschreitenden Verlauf der Messung zu erkennen.

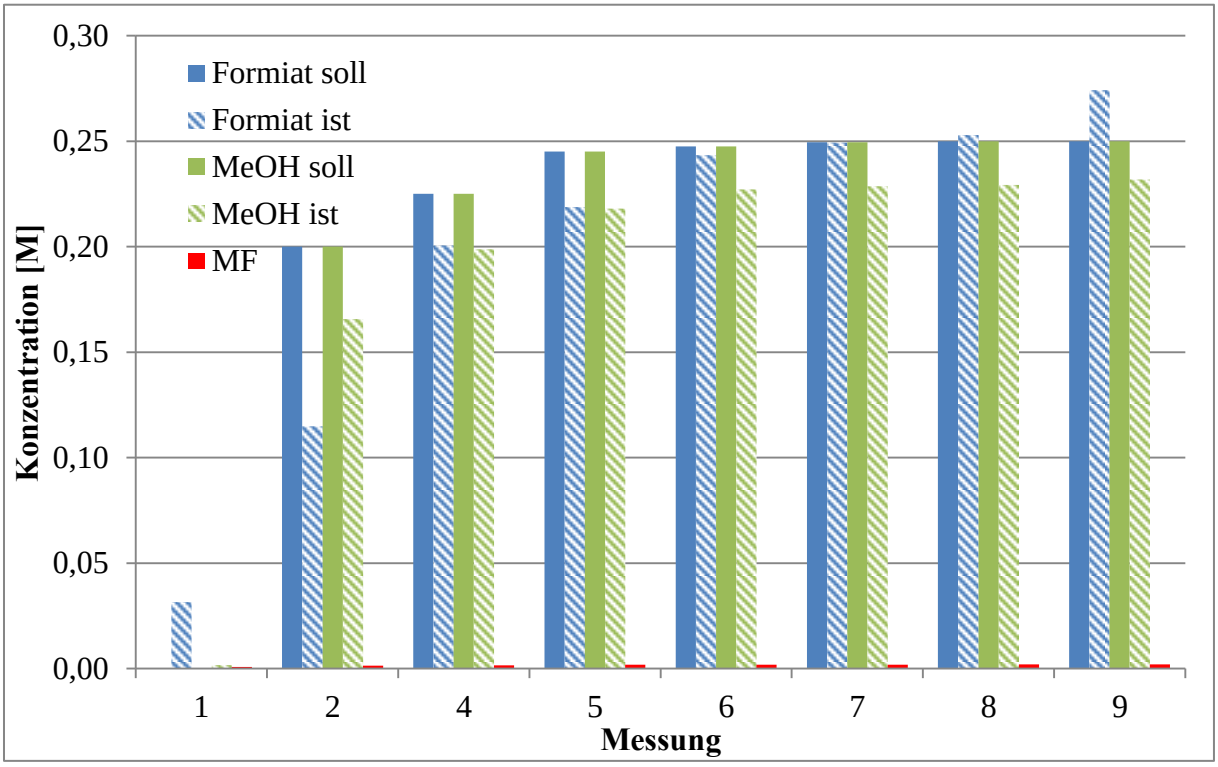


Abbildung 3-17 Vergleich der vorgelegten (Soll-) und gemessenen (Ist-) Konzentration von Methanol und Formiat in Wasser.

3.3 Bestimmung der Pufferkapazität

Für die Vergleichbarkeit der Enzymreaktionen ist es wichtig, dass die Hemmung der Aktivität durch die Änderung des pH-Werts ausgeschlossen wird. Dazu muss die Pufferkapazität der verwendeten Pufferlösungen experimentell bestimmt werden. Die Pufferkapazität wurde durch Titration ermittelt (Abbildung 3-18). In einen temperierten und gerührten Behälter wurde puffer- oder säurehaltige Lösung vorgelegt und komplementär jeweils säure- oder pufferhaltige Lösung tröpfchenweise titriert. Es wurden 0,25 M Pufferlösung und eine 0,25 M Ameisensäurelösung verwendet. Die zugegebene Menge wurde über eine Waage und der pH-Wert der Lösung im Behälter mittels einer pH-Sonde kontinuierlich erfasst. Damit war es möglich, die pH-Wert-Änderung mit dem Stoffmengenverhältnis an Puffer und Säure zu korrelieren und die Pufferkapazität zu berechnen.

Ein Puffer gilt üblicherweise als erschöpft, wenn sich der pH-Wert um ±1 ausgehend vom ursprünglichen pH-Wert eines Puffers bei der Titration einer Säure oder Base verändert. Mit diesem Versuchsaufbau konnte exakt die Konzentration an Ameisensäure bestimmt werden, an dem der pH-Wert rapide abgesunken ist. Die Einheit der Pufferkapazität ist üblicherweise Mol pro Liter. Für diese Arbeit wurde zusätzlich die pH-Veränderung des Puffersystems über ein Polynom ausgedrückt, damit bei der enzymatischen Reaktion gezielt ein pH-Wert erreicht bzw. nicht unterschritten werden kann.

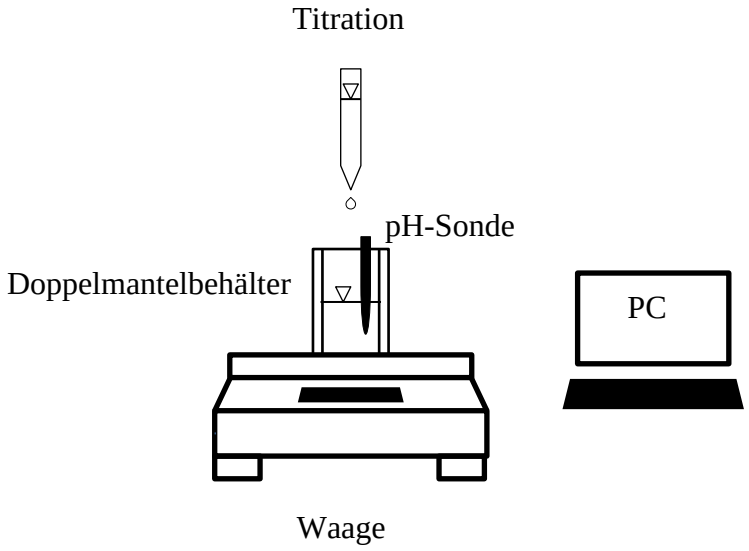


Abbildung 3-18 Versuchsaufbau zur Bestimmung einer Pufferkapazität mit Datenerfassung.

3.3.1 KH_2PO_4-Na_2HPO_4-Pufferkapazität

Rodewyk [10] verwendete zur Charakterisierung der FDM für alle Reaktionen einen KH_2PO_4-Na_2HPO_4-Puffer. Aufgrund der Löslichkeitsgrenze des Kaliumdihydrogenphosphats bei 77 g/l mit 100 g/l Dinatriumhydrogenphophat lässt sich lediglich eine 1,1 M Pufferlösung herstellen. Im Fall der Säure-Base-Titration liegt der pKs-Wert im Wendepunkt der Sigmoidfunktion. Bei der Verwendung eines Puffers erhält man keine Sigmoidfunktion. Die Pufferkapazität betrug 0,3 mM bei einer pH-Veränderung von -0,07. Hier entspricht der pKs-Wert dem Mittelwert des pH-Werts im Pufferbereich und wurde auf 6,73 bestimmt. (Abbildung 3-19).

3.3.2 NaH_2PO_4-K_2HPO_4-Pufferkapazität

Im Vergleich zum obigen Puffersystem lösen sich Dikaliumhydrogenphosphat (250 g/l) und Natriumdihydrogenphosphat (200 g/l) in Wasser deutlich besser. Damit lassen sich 4 M Lösungen herstellen. Analog zum vorherigen Puffersystem wurde die Pufferkapazität und der pKs-Wert bestimmt. Die Pufferkapazität betrug 0,9 mM bei einer pH-Veränderung von -0,24. Der pKs-Wert liegt bei 6,77 (Abbildung 3-20).

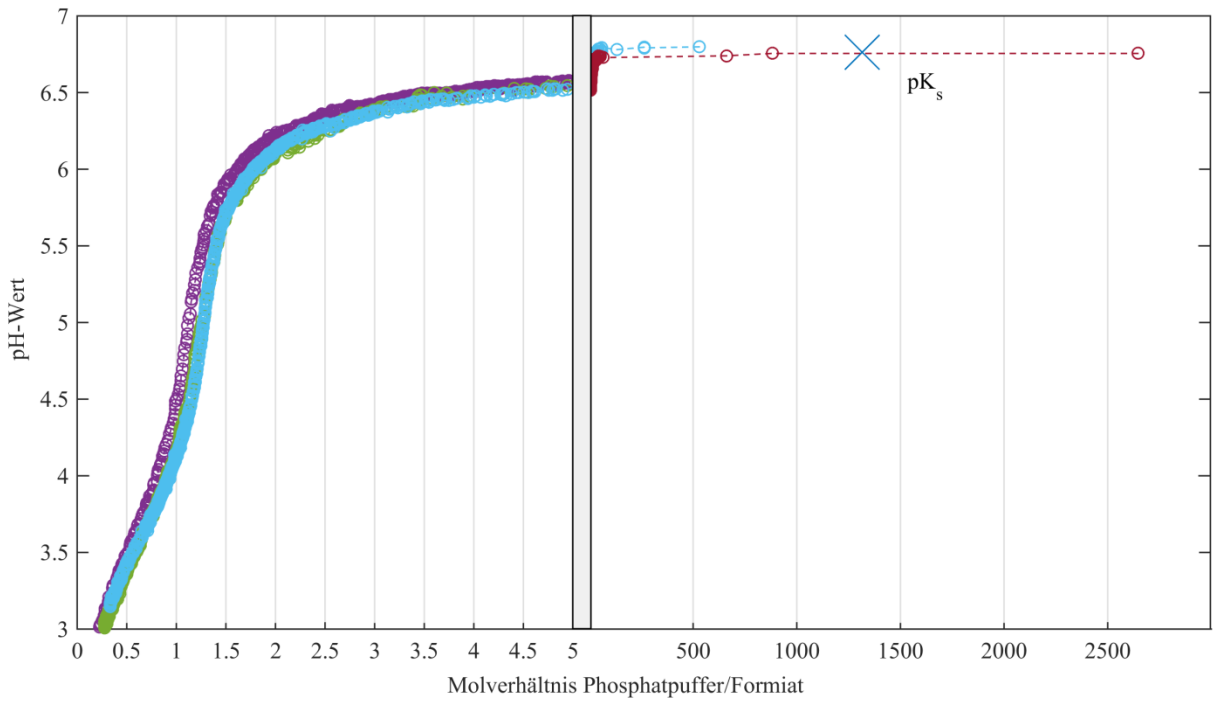


Abbildung 3-19 Titrationskurven eines 0,25 M KH_2PO_4-Na_2HPO_4-Puffers und einer 0,25 M Ameisensäurelösung in Abhängigkeit des Molverhältnisses beider Stoffe. Dargestellt ist zudem der pKs-Wert von 6,73.

Tabelle 3-2 Dosierungstabelle des Phosphatpuffers in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (FA). Bei vollständigem Umsatz des Formaldehyds durch die FDM hat die Reaktionslösung einen pH-Wert von 6.

Formaldehyd	Ameisensäure	Phosphatpuffer	NaH_2PO_4	K_2HPO_4
mol/l	mol/l	mol/l	g/l	g/l
0,02	0,010	0,07	4,96	6,09
0,20	0,100	0,70	49,64	60,91
0,50	0,250	1,75	124,09	152,27

Für die Durchführung der FDM-Reaktion sind die zu verwendende Pufferkonzentration und die tolerierbare pH-Wert-Änderung während der Reaktion interessant. Rodewyk [10] hat gezeigt, dass bei pH 6 die Aktivität des Enzyms um etwa 20 % nachlässt.

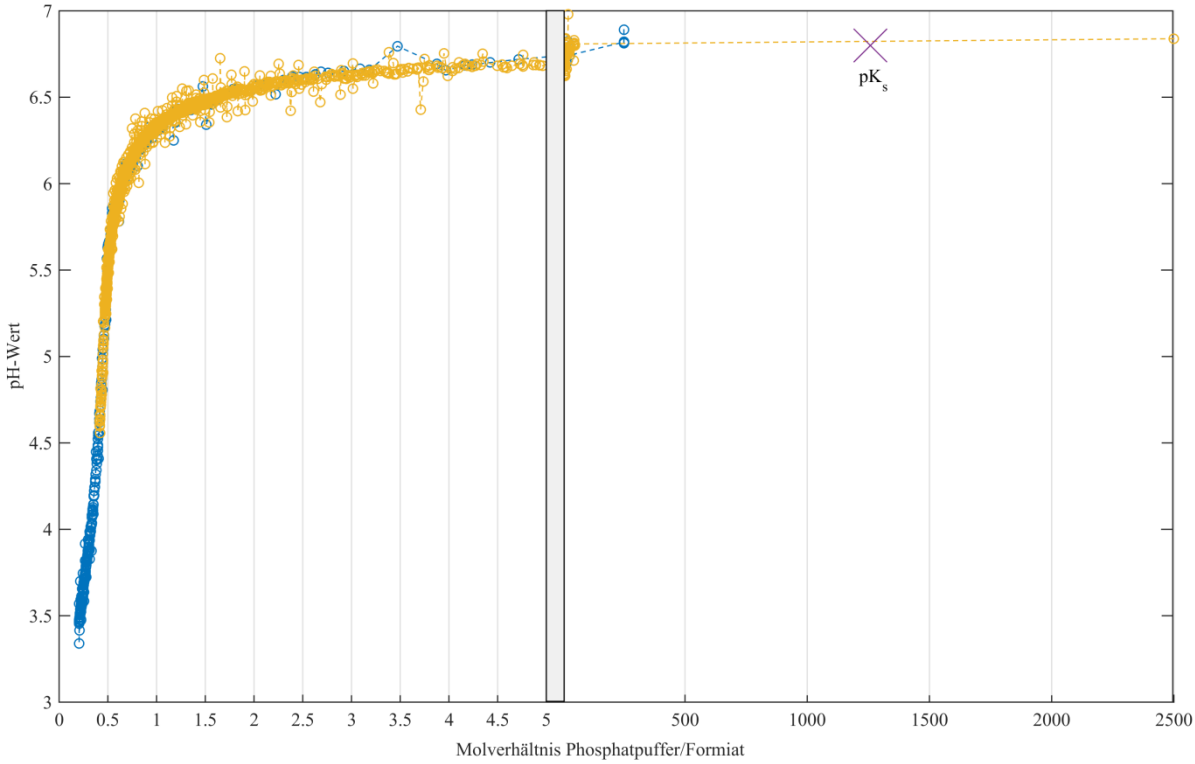


Abbildung 3-20 Titrationskurven eines 0,25 M NaH_2PO_4-K_2HPO_4-Puffers und einer 0,25 M Ameisensäurelösung in Abhängigkeit des Molverhältnisses beider Stoffe. Dargestellt ist zudem der pKs-Wert von 6,77.

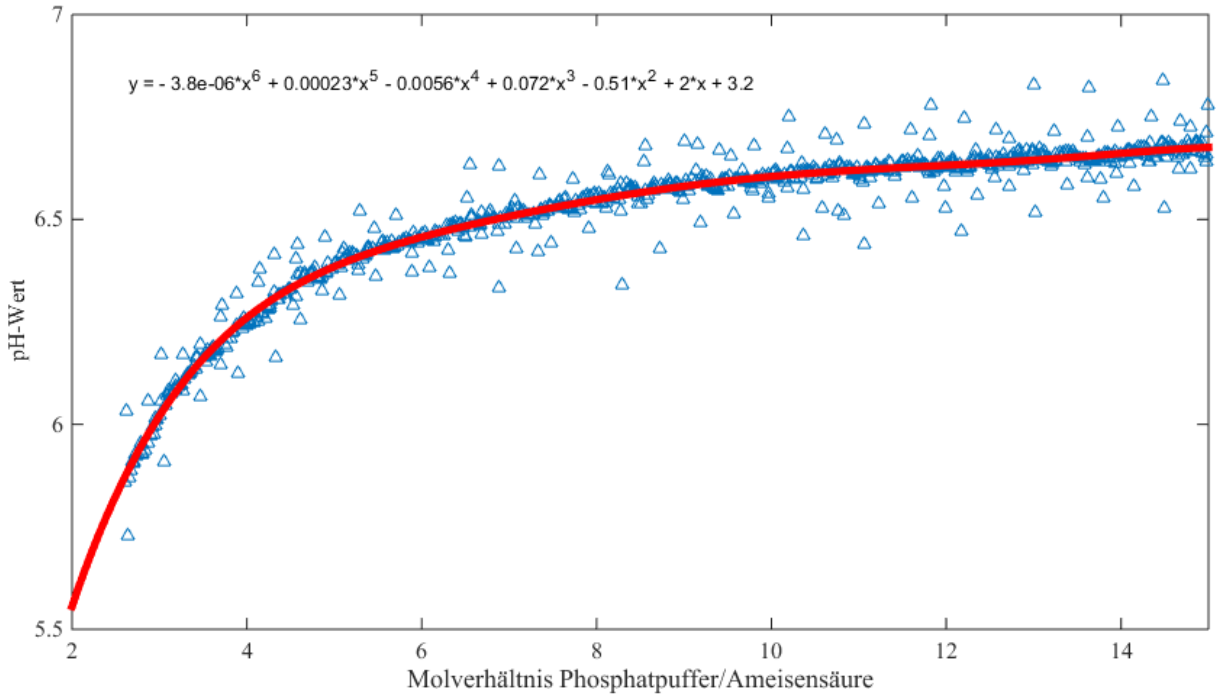


Abbildung 3-21 Titration des NaH_2PO_4-K_2HPO_4-Puffers in eine Ameisensäurelösung und gemessene pH-Werte. Die Änderung des pH-Werts in Abhängigkeit vom Molverhältnis zwischen Phosphatpuffer und Ameisensäure wurde durch ein Polynom 6. Grades beschrieben.

Diese Aktivitätsverminderung wird für die Enzymreaktionen als tolerierbar eingestuft. Die zu verwendende Pufferkonzentration (Tabelle 3-2) kann näherungsweise mit Hilfe eines Polynoms 6. Grades (Abbildung 3-21) aus der pH-Wert-Änderung der Titration von Ameisensäure mit Puffer berechnet werden, so dass zum Ende der Enzymreaktion mit 100 % Umsatz ein pH-Wert von 6 erreicht wird. Das Molverhältnis von Phosphatpuffer zu Formiat ermöglicht die Berechnung des pH-Werts nach Zugabe einer bestimmten Menge Ameisensäure in Abhängigkeit der Pufferkonzentration.

3.4 Aktivitätstest

Die Enzymreaktion wurde mit einer initialen Formaldehydkonzentration von 1 g/l gestartet und nach einer Minute wurde eine Probe zur Bestimmung der Enzymaktivität genommen. Die Probe wurde hundertfach verdünnt, um in den Messbereich von 0,02 mg/l bis 10 mg/l des Küvettentests zu kommen (vergl. Kapitel 3.1). Die FDM-Aktivität mit der Einheit Units und die spezifische Aktivität mit der Einheit Units pro Milligramm Protein wurden nach den Formeln (3.10) und (3.11) berechnet:

$$Aktivität\ [U] = \frac{Formaldehyd\ [\mu mol]}{Zeit\ [min]} \tag{3.10}$$

$$spezifische\ Aktivität\ \left[\frac{U}{mg}\right] = \frac{Aktivität\ [U]}{Proteinkonzentration\ [mg]} \tag{3.11}$$

Die Aktivität lässt sich auch in Bezug zu einem Probevolumen setzen, wodurch man die volumetrische Aktivität erhält (3.12):

$$volumetrische\ Aktivität\ \left[\frac{U}{ml}\right] = \frac{Aktivität\ [U]}{Probevolumen\ [ml]} \tag{3.12}$$

Nach der Michaelis-Menten-Theorie bilden das Enzym und das Substrat mit bestimmten Geschwindigkeitskonstanten für die Hinreaktion k_1 und die Rückreaktion k_1' einen Enzym-Substrat-Komplex:

$$E + S \underset{k'_1}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} [ES] \tag{3.13}$$

Die Geschwindigkeitskonstante ist abhängig von der Substrat- und Enzymkonzentration bzw. von dem Verhältnis der Enzym- und Substratmenge. Je kleiner das Verhältnis, desto größer ist nach der Stoßtheorie die Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes. Bei sehr hohen Substratkonzentrationen kann die Umsatzgeschwindigkeit v nicht weiter gesteigert werden. Es wird ein Wert v_{max} erreicht. In Abbildung 3-22 wurden bei einer gleichen initialen Formaldehydkonzentration unterschiedliche Proteinmengen aus derselben Produktionscharge verwendet.

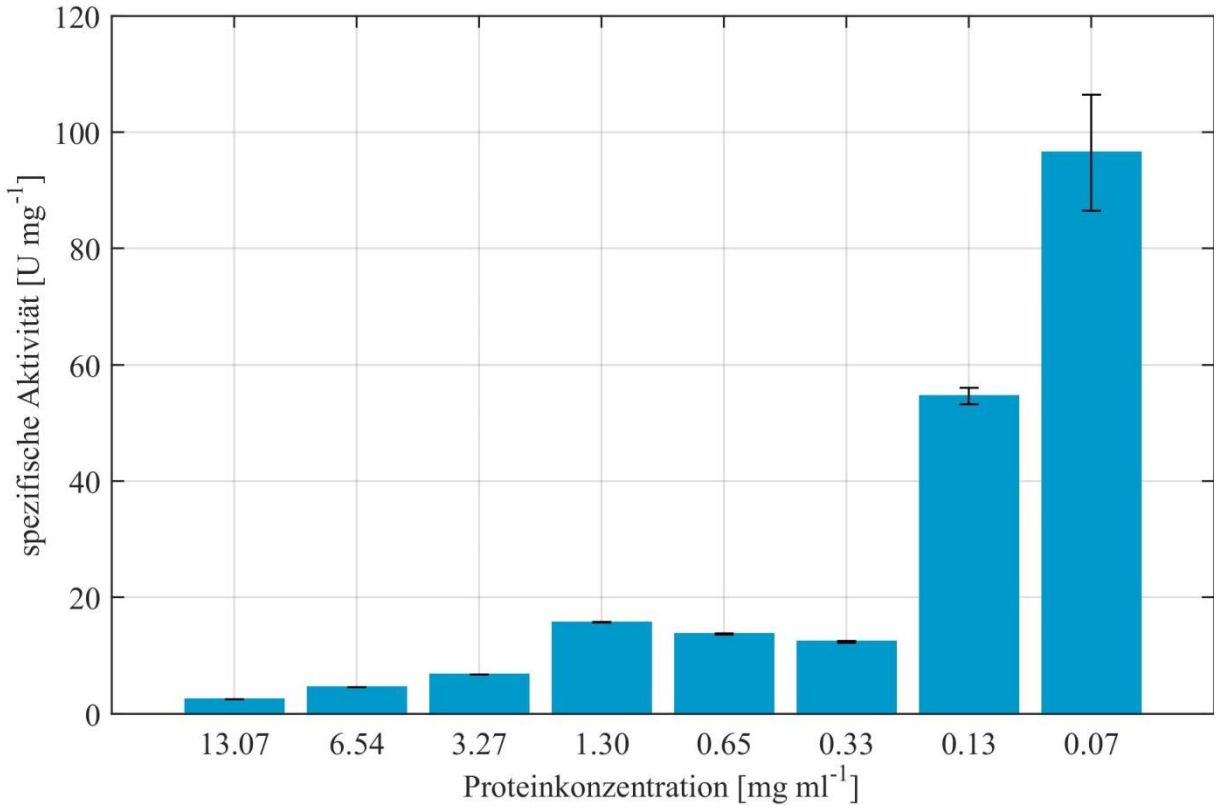


Abbildung 3-22 Variation des Substrat-Protein-Verhältnisses zur Bestimmung der maximalen spezifischen Aktivität.

In der Regel werden für solche Vergleiche Substrat- und Enzymkonzentrationen gewählt, bis ein Grenzwert in der Bildungsgeschwindigkeit des Enzym-Substrat-Komplexes durch einen Überschuss an Substrat erreicht ist. Dies wäre sichtbar, wenn sich die spezifische Aktivität ab einem bestimmten Verhältnis von Substrat zu Protein nicht mehr verändert. In Abbildung 3-22 konnte dieses Verhältnis nicht erreicht werden und die spezifische Aktivität nahm zu. Hochkonzentrierte Formaldehydlösungen werden mit zusätzlichen Stoffen, wie beispielsweise Methanol, stabilisiert. Wegen eines möglichen Einflusses des Stabilisators wurde in dieser Arbeit auf höhere Formaldehydkonzentrationen verzichtet. Bei noch geringeren Proteinkonzentrationen nahm der Fehler zu. Deshalb sollte für Aktivitätstests darauf geachtet werden, dass bei einer Versuchsreihe immer mit der gleichen Formaldehyd- und Enzymkonzentration gearbeitet wird. Andernfalls sind die Aktivitäten nur eingeschränkt vergleichbar.

3.5 Fermentation

Die Kultivierung des *P. putida* erfolgte emers und submers. Dabei war stets darauf zu achten, dass Formaldehyd als selektive C-Quelle eingesetzt wurde, um einen Selektionsdruck zur Expression der FDM aufrecht zu erhalten.

3.5.1 Formaldehydlösung

Formaldehydlösungen wurden aus einer Paraformaldehyd-Wasser-Suspension hergestellt. Je nach gewünschter Zielkonzentration wurde die entsprechende Menge Paraformaldehyd eingewogen. Die Suspension wurde in eine Schottflasche gefüllt und mit geschlossenem Deckel bei 121 °C (mindestens 10 Minuten) autoklaviert. Bei Konzentrationen über 15 g/l wird Paraformaldehyd auf diese Weise nicht vollständig zu freiem Formaldehyd zersetzt.

3.5.2 Bestimmung der Biomassekonzentration

Die Korrelation von Biotrockenmasse (TS) und Optischer Dichte (OD) erfolgten gleichermaßen in der Dissertation von Rodewyk [10] und der Diplomarbeit von Spieth [88]. Die Biomassekonzentration wurde, wie in Tabelle 3-3 beschrieben, bestimmt. Es werden ausschließlich die Daten der OD/TS-Korrelation von Spieth zitiert. Die OD/TS-Korrelation ergab folgende lineare Gleichung:

$$TS\ \left[\frac{g}{l}\right] = OD_{546nm} \cdot 0{,}338 \tag{3.14}$$

Tabelle 3-3 Bestimmung der Biomassekonzentration nach Rodewyk [10] und Spieth [88].

Trübungsmessung	
Spektralphotometer Wellenlänge	546 nm
Halbmikroküvette Schichtdicke	1 cm
Nullabgleich	Bidest.-Wasser
Trockengewichtsbestimmung	
Probevolumen	500 ml
Zentrifugieren, Resuspendieren	6000 rpm für 20 min, in 500 ml Ammoniumacetatpuffer (50 mM, pH 6,5)

Zentrifugieren Resuspendieren	6000 rpm für 20 min, in 20 ml Ammoniumacetatpuffer (50 mM, pH 6,5)
Zentrifugieren Resuspendieren	17350 rpm für 20 min, in 7 ml Ammoniumacetatpuffer (50 mM, pH 6,5)
In präparierte Reagenzgläser überführen und trocknen	Bei 100°C
Im Exsikkator abkühlen	Trockengewicht bestimmen
Bestimmung der Lebendzellzahl	
Verdünnungsreihe herstellen	Je 1:10 in 0,9 %iger NaCl-Lösung
Ausplattieren	Von jeder Verdünnungsstufe 100 µl auf NB-Agar
Inkubieren	Bei 30°C
Auszählen	Nach 1 bis 3 Tagen

3.5.3 Emerskultivierung auf Nährböden

Pseudomonas putida J3 neigt dazu die Fähigkeit zur Expression der FDM zu verlieren. Um den Stamm mit aktiver FDM dauerhaft zu kultivieren, bieten sich Agarplatten an, die in einem geschlossenen Gefäß unter Formaldehydatmosphäre inkubiert werden. Auf Agarplatten ist eine gekühlte Lagerung auch ohne Formaldehyd über mehrere Monate möglich. Zusätzlich können Glukose oder NB-Medium als weitere C-Quellen verwendet werden (Tabelle 3-4).

Tabelle 3-4 Emerskultivierung auf Agarplatten

Nährboden Formaldehyd als Substrat MeOH, Glukose, 1-Propanol oder Ethanol als Substrat	Agarplatte mit minimalmedium 1 g/l Substrat auf 0,8 % NB-Medium (w/v) mit 1,6 % Agar (w/v)
Formaldehyd-Zufuhr	Über die Gasphase in einem Exsikkator
Inkubationstemperatur	30°C
Inkubationszeit	10 Tage
Überimpfen	Nach 2 bis 4 Wochen
Lagerung	Kühlraum bei 6°C

3.5.4 Submerskultivierung von *P. putida sp.*

Nachfolgend sind in Tabelle 3-5 bis Tabelle 3-8 die Medien für die Kultivierung des Wildtyps dargestellt. Die Inkubation von *Pseudomonas putida* J3 erfolgte bei 30°C.

Tabelle 3-5 Phosphatpuffer 1 zur Fermentation (250 mM) nach Rodewyk [7]

KH_2PO_4	34 g
$Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	36,69 g

Tabelle 3-6 Spurenelementlösung SL11b = SL4

H_3BO_4	150 mg
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	50 mg
$CoCl_2 \times 6H_2O$	100 mg
$MnCl_2 \times 4H_2O$	15 mg
$CuCl_2 \times 2H_2O$	5 mg
$NiCl_2 \times 6H_2O$	10 mg
$NaMoO_4 \times 2H_2O$	15 mg

Tabelle 3-7 Mineralsalzlösung A1 1:5

Ansatzvolumen / ml	250	500	1000	2000
$(NH_4)_2SO_4$ / g	5	10	20	40
$MgSO_4 \times 7H_2O$ / g	1	2	4	8
$CaCl_2 \times 2H_2O$ / g	0,25	0,5	1	2
$Fe(III)NH_4 - Citrat$ ($Fe > 25\%$ / g	0,05	0,1	0,2	0,4
Auf ml Bidest.-Wasser auffüllen	245	490	980	1960
$CaCl_2$ vorab in etwas Wasser auflösen und autoklavieren.				
Danach SL4 (steril) zugeben / ml	5	10	20	40

Tabelle 3-8 Minimalmedium

Mineralsalzlösung A1	50 ml
Phosphatpuffer 1	50 ml
Bidest.-Wasser	900 ml

3.5.4.1 Kultivierung von P. putida sp. im Schüttelkolben

Die Kultivierung im Schüttelkolben diente zum einen der Fortführung sowie Erhaltung des Stamms und zum anderen zum Herstellen eines Inokulums für die Fermentation.

Tabelle 3-9 Kultivierung von *P. putida J3* im Schüttelkolben.

Gefäß (Füllvolumen)	1 l (200 ml) oder 3 l (500 ml) Schikanenkolben
Inkubation	Bei 30 °C auf einem Rotationsschüttler bei 110 rpm
Substrat Formaldehyd als alleiniges Substrat	
MeOH, Glukose, 1-Propanol oder Ethanol als zusätzliches Wachstumssubstrat Batch, 21 mM Formaldehyd, OD_{546nm} = 0,282	Fed-Batch Kultivierung (max. 10 mM), Diffusionskolben (übersättigter FA-Lösung), Batch mittels HMTA (1 g/l, pH 5,5) Endkonzentrationen von 0,5 g/l bis 2 g/l

Die Wahl der C-Quelle und die Anzahl der Generationen, die ausschließlich auf Formaldehyd gewachsen sind, haben erheblichen Einfluss auf die Enzymkonzentration und spezifische Aktivität des Rohextrakts. Es wurde das Medium aus Tabelle 3-8 verwendet und wie in Tabelle 3-9 beschrieben vorgegangen.

3.5.4.2 Kultivierung von P. putida sp. im Bioreaktor

Für eine Fermentation des Wildtyps zur Produktion der FDM ist es notwendig, Formaldehyd als C-Quelle einzusetzen. Es ist möglich, zunächst auf einer anderen C-Quelle die Biomassekonzentration zu steigern und anschließend auf Formaldehyd hinzuzugeben (vergl. Kapitel 2.3). Die Kultivierungsbedingungen der Vorkultur haben, wie auch in der Fermentation, Einfluss auf die FDM-Produktion. Die Betriebsparameter der Fermentation sind in Tabelle 3-10 aufgeführt. Die Fermentationen zur Produktion der Formaldehyd-Dismutase erfolgten in automatisierten Laborbioreaktoren unter kontrollierten Bedingungen.

Tabelle 3-10 Fermentation von *P. putida* J3 im Bioreaktor

Reaktor/Größe/Fassungsvermögen	Rührkessel/1,5 L/1,2 L/1 L
Betriebstemperatur	30°C
Betriebsführung	Fed-Batch oder semikontinuierlich

Inokulum	Submerskultur (vergl. 3.5.4) abzentrifugiert, in 0,9%-iger NaCl-Lösung gewaschen und in 5 ml Minimalmedium resuspendiert
Biomasseanfangskonzentration	Mindestens OD_{546nm} 0,4 im Reaktor
Begasung	60 cm³/min bis 100 cm³/min mit Luft

Paralleles DASGIP-Bioreaktorsystem

Mit dem DASGIP-Fermentationssystem [94] können mehrere Reaktoren gleichzeitig betrieben werden. Ein Systemblock besteht aus vier Reaktoren, einem Pumpenblock und einem Computer zur Steuerung und Datenerfassung. Das System ist frei programmierbar und ermöglicht vielseitige Prozessvariationen.

Durch die vorgegebene Prozesssteuerung können die Sauerstoffsättigung, die Temperatur und der pH-Wert geregelt und konstant gehalten werden. Automatisierte Reinigungsmethoden sind ebenfalls in das System integriert (CIP). An jeden Reaktor können vier Zulaufleitungen angeschlossen werden. Über spezielle Ventile ist eine sterile Probenentnahme möglich.

Infors HT Fermentationsanlage

Die Infors HT Fermentationsanlage [95] ist, ähnlich dem Bioreaktorsystem von DASGIP, eine Komplettlösung zur Prozesssteuerung von Fermentationen und Aufzeichnung von Fermentationsverläufen. Über Pumpen können Flüssigkeiten zugeführt werden. Es besteht die Möglichkeit, weitere Komponenten, wie Sensoren und Waagen, in das System zu integrieren.

3.6 Herstellung des FDM-Rohextrakts

Für ein Aufschlussvolumen bis 100 ml wurden *P. putida sp.*-Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Der wesentliche Aufschlussparameter ist die eingetragene Leistung. Der Aufschluss wurde unter Verwendung einer Ultraschallsonde (Branson 102C (CE)) durchgeführt. Für diese Sonden gibt es sieben Leistungsstufen und die Möglichkeit, ein Intervall einzustellen. Der Aufschluss wurde bei unterschiedlichen Leistungsstufen durchgeführt. Die Herstellung des Rohextrakts ist in Tabelle 3-11 beschrieben. Als Aufschlussmethoden wurden ab-

hängig von der aufzuschließenden Menge entweder Ultraschall (bis 50 ml) oder für größere Volumina ein Hochdruckhomogenisator (HDH) verwendet.

Zur Herstellung von 10 ml Rohextrakt für das Starten der Reaktion im Druckreaktor (vergl. 3.9.3) wurde in der Regel eine 100 ml Zellsuspension mit 0,9 % NaCl-Lösung auf 300 ml aufgefüllt. Nach Zentrifugation in 500 ml Behältern für 15 Minuten bei 10000 rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet wiederum in 300 ml 0,9 % NaCl-Lösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde das gewaschene Pellet in jeweils 10 ml Phosphatpuffer resuspendiert. Der Ultraschallaufschluss erfolgte in 10 ml Glasreagenzgläsern mit einer Amplitude von 60 % und im Intervall von 50 %.

Für den Aufschluss einer größeren Menge Bakteriensuspension bietet sich die Verwendung eines Hochdruckhomogenisators (HDH) an. Verwendet wurde das Gerät PandaPlus 2000 (GEA Niro Soavi). Für viele Anwendungen in der Nahrungsmittelindustrie, der Pharmazie, der Kosmetik, der Biotechnologie und der Umwelttechnik werden Hochdruckhomogenisatoren zum Homogenisieren von zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten, zur Zerkleinerung von Feststoffen in Flüssigkeiten und zum Aufschluss von eukaryotischen und prokaryotischen Zellen verwendet. Der Druck in der Arbeitskammer des Hochdruckhomogenisators wird durch Hochdruckpumpen oder durch das Anlegen eines Gasdrucks erzeugt. Für einen schlagartig zunehmenden Druck im Hochdruckhomogenisator sorgt in der Regel eine Querschnittsverengung.

Tabelle 3-11 Herstellung des Rohextrakts aus *P. putida* J3

Emers angezogene Zellen	**Submerskulturen**
Abschwemmen der Agarplatten mit 3-4 ml 0,9 %-iger NaCl-Lösung	Zentrifugieren bei 8000 Rpm für 15 min
Zentrifugieren bei 8000 Rpm für 15 min	Mit 100 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung waschen und zentrifugieren (8000 Rpm für 15 min)
In 5 ml 50 mM (oder 0,5 M) Phosphatpuffer (pH 6,8) resuspendieren	
Hochdruckhomogenisator: 1500 bar, 2 – 3 Passagen oder Ultraschall (Amplitude 60 %, Intervall 50 %)	
Zelltrümmer bei 30000 rpm für 30 min zentrifugiert und abgetrennt	
Dialyse: 16 – 20 Stunden, 1 Liter 50 mM Phosphatpuffer (optional)	
Lagerung: bei -20°C (optional, da Aktivitätsverlust)	

Hinter einem sehr engen, einstellbaren Spalt des Ventils wird die Flüssigkeit plötzlich entspannt. Dadurch entstehen hochturbulente Strömungen und Kavitationen, die zur Homogenisierung und dem Aufbrechen der Zellwände führen. Um bessere Ergebnisse zu erhalten, kann das Medium mehrmals homogenisiert werden, indem die ausströmende Flüssigkeit wieder in den Vorbehälter des Homogenisators zurückgeführt wird. Mit dieser Technik wurden Zellsuspensionen sowohl von *P. putida* als auch von *E. coli* bei 1500 bar aufgeschlossen (Tabelle 3-11).

3.7 Immobilisierung der Formaldehyd-Dismutase

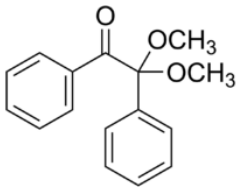
Um die FDM im Reaktor zurückzuhalten und die beste Immobilisierungsart zu ermitteln, werden unterschiedliche Systeme eingesetzt. Dabei wurden verschiedene Modifikationen von Enzymen vergleichend untersucht [96]:

- Einschließen des Enzyms in (Gel-)Kapseln oder Fasern.
- Kovalente, ionogene oder adsorptive Bindung des Enzyms an Trägermaterialien.

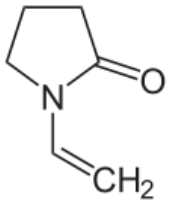
3.7.1 Matrixeinschluss im Hydrogel (pVP-co-PEG)

In der Enzymtechnologie werden zur Immobilisierung oftmals Hydrogele eingesetzt. Zur Herstellung von Hydrogelen werden folgende Substanzen verwendet:

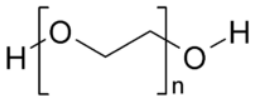
- Photoinitiator 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenone (DMPA)



- N-Vinyl-2-pyrrolidon (NVP)



- Polyethylen Glykol (PEG)



Es wurden 300 mg DMPA in NVP gelöst. Von dieser Lösung wurden 7,2 µl auf 1 ml wässriger PEG-Enzymlösung gegeben. Der PEG-Anteil gegenüber der wässrigen (Enzym-)Lösung kann variiert werden:

$$\begin{gathered} x = PEG \\ 100\,\% - x\,\% = \%\ \text{PEG in}\ w\ddot{a}ssriger\ L\ddot{o}sung \end{gathered} \tag{3.15}$$

Verwendet wurde eine nach Tabelle 3-11 hergestellte Enzymlösung aus *P. putida J3* mit einer spezifischen Aktivität von 4,7 U/mg und einer Proteinkonzentration von 1,13 g/l. Es wurden jeweils 10 ml von vier Polyethylen Glykol Gelen mit PEG-Anteilen von 50 % und 25 % hergestellt. Die Polymerisationsreaktion erfolgte in Einweg-Petrischalen. Die PEG-Gele wurden mit 10 ml 0,5 M PP bei pH 6,8 gewaschen. Von der Waschlösung wurde jeweils 1 ml entnommen und die Proteinkonzentration bestimmt. Daraus kann die Menge an immobilisiertem Enzym berechnet werden. Die Reaktion des im Gel eingeschlossenen Enzyms wurde mit 1 ml einer 13,8 % FA-Lösung gestartet.

3.7.2 Trägerfixierte Bindung

Für eine trägerfixierte Bindung zur Immobilisierung von Enzymen wurden Partikel der Firma Align Chemicals England [97] verwendet. Die verschiedenen Träger unterscheiden sich in ihrem Material, der Partikelgröße, dem Schüttungsverhalten, dem Wassergehalt, dem Porenvolumen und der funktionellen Gruppe, die den Bindungstyp definiert.

Unter Annahme einer Normalverteilung lässt sich der mittlere Partikeldurchmesser d_P aus der vom Hersteller angegebenen Verteilungsbreite berechnen:

$$d_P = \frac{d_{min} + d_{max}}{2} \tag{3.16}$$

Mit der weiteren Annahme ideal sphärischer Kugeln kann aus d_P die mittlere Partikeloberfläche berechnet werden, um daraus eine oberflächenspezifische Aktivität zu bestimmen:

$$A_P[\mathrm{mm^2}] = \pi \cdot {d_P}^2 \cdot \varphi \tag{3.17}$$

$\varphi = 1$ (Formfaktor für Kugeln)

$$\text{Oberflächenaktivität } [\mathrm{U/mm^2}] = \frac{U}{A_P} \tag{3.18}$$

Die oberflächenspezifische Aktivität ermöglicht einen Vergleich der verschiedenen Träger. Die Versuche wurden in Säulen mit einem Volumen von jeweils 1 ml durchgeführt. Auf diese Weise gehen bei aufeinanderfolgenden Versuchen keine Partikel verloren.

Zur Vorbereitung der Immobilisierung wurden zunächst das Säulenleergewicht gemessen, die Partikel in Säulen gepackt, das Trockengewicht der Säule bestimmt, die Packung mit zwei Säulenvolumen 2-Propanol zur Aktivierung gespült und nach 10 min erneut gewogen. Aus dem Nassgewicht der gespülten Säule und der Dichte des 2-Propanols kann das Porenvolumen berechnet werden:

$$V_{Pore} = \frac{m_{nass} - m_{trocken}}{\rho_{propanol}} \tag{3.19}$$

Danach wurde die Säule mit dem fünffachen Säulenvolumen Phosphatpuffer (0,5 M pH 6,8) gespült. Für 1 ml Säulen wurden für jeden Träger zwei Säulen verwendet, aber nur eine Säule mit Enzym beladen. Die nichtbeladene Säule dient als Referenzsäule zur Bestimmung der Aktivität. Für einen 200 ml Festbettreaktor wurde nur eine Säule verwendet und die Aktivität mittels Massenspektrometrie durch das Messen der Formaldehydkonzentration am Säuleneingang und Säulenausgang bestimmt (vergl. Kapitel 3.9.2). Zur Immobilisierung wurden das dreifache Säulenvolumen (für die 1 ml Säule demnach 3 ml) sterilgefilteter (Spritzenvorsatzfilter 45 µm) oder scharf zentrifugierter (30 Minuten bei maximaler Drehzahl) Rohextrakte verwendet und mit einer Spritze oder mit einer Kolbenpumpe die Säule durchströmt. Die Immobilisierung erfolgte dann über 12 Stunden bei 4 °C mit dem verbleibenden Rohextrakt in der Säule. Nach der Immobilisierung wurde mit einer Luft befüllten Spritze oder Kolbenpumpe der Rohextrakt aus der Säule gedrückt und die Proteinkonzentration gemessen (vergl. Ka-

pitel 3.1.1). Mit der Proteinkonzentration und dem Porenvolumen kann die Menge immobilisierten Proteins berechnet werden.

Die Aktivität der 1 ml Säulen wurde bestimmt, indem die Säulen mit 3 ml einer 1 g/l Formaldehydlösung gespült, nach 30 Minuten die Flüssigkeit mit einer Luft befüllten Spritze herausgedrückt und die Formaldehydkonzentration gemessen wurden (vergl. Kapitel 3.1). Die Enzymaktivität wurde aus der Differenz der Formaldehydkonzentrationen zwischen beladener und nicht beladener Säule (Referenzsäule) berechnet. Die für die Immobilisierung vorgesehenen Enzyme stammen aus dem rekombinanten *E. coli J3* (12.02.14) Stamm (vergl. Kapitel Tabelle 4-1).

3.7.3 Immobilisierung der FDM an Pervaporationsmembranen

Die Immobilisierung der FDM an die Oberfläche von PDMS- und PTMSP-Membranen (vergl. Kapitel 3.8.1) wurde im Rahmen einer Masterarbeit durchgeführt [98]. Die Prozedur zur Immobilisierung wurde nach folgenden Schritten durchgeführt:

- Zunächst erfolgte die Aktivierung der Membranoberfläche mit Sauerstoff- oder Stickstoffplasma durch das Ausbilden von Hydroxylgruppen.
- Dann wurde die Aktivierung des Linkers Silan durch die Hydrolyse von Silan zu Silanol durchgeführt.
- Die Aufbringung des Linkers war durch eine 24-stündige Benetzung der aktivierten Membran mit der Silanol-Lösung möglich. Anhand der Bestimmung der Silanolkonzentration im Überstand durch die Karl-Fischer-Titration konnte die Linker-Dichte auf der Oberfläche der Membran ermittelt werden.
- Letztendlich erfolgte die Immobilisierung der Enzyme an den Epoxygruppen des Silanols.

3.7.3.1 Plasmabehandlung der Pervaporationsmembranen

Die Aktivierung der Polydimethylsiloxan (PDMS) oder Poly (1-trimethylsilyl-1-propin) (PTMSP) erfolgte mit O_2- oder N_2-Plasma. Die direkte Oxidation mit Sauerstoff ist im Vergleich zur Stickstoffbehandlung reaktiver und kann zur Verglasung der Membran führen.

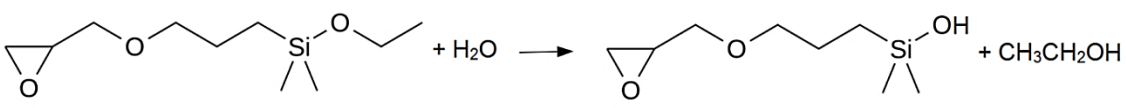
Das Plasma wurde in einer Niederdruck-Reaktorkammer erzeugt, die mit einem Plasmafrequenz-Generator mit einer Anregungsfrequenz von 13,56 MHz und mit einem Vakuum-Pumpsystem ausgestattet ist. Zudem können der zugeführte Gasstrom und der Druck überwacht und geregelt werden. Nebenprodukte im Plasma und Verunreinigungen der Reaktorkammer durch das Pumpenöl werden durch eine Kühlfalle in der Pumpleitung entfernt und so eine Kontamination vermieden.

Die Plasmareaktionskammer besteht aus zwei parallelen, DIN A3 großen, Aluminiumelektroden. Die obere Elektrode ist mit dem Frequenzgenerator und dem Gaseinlass verbunden. Die untere Elektrode ist geerdet und mit dem Pumpsystem verbunden. Den Abstandhalter zwischen den beiden Elektroden bildet ein Polycarbonatrahmen.

Die Membranproben wurden mit der zu behandelnden Oberfläche nach oben auf den Boden des Plasmareaktors gelegt. Danach wurde der Reaktor verschlossen und ein Basisdruck von weniger als $10 \cdot 10^{-3}$ mbar eingestellt. Das Gas, O_2 oder N_2, wurde dann in die Kammer mit einer Rate von 10 sccm eingeströmt. Nachdem ein stabilisierter Druck von 0,1 mbar erreicht wurde, startete die Aktivierung durch das Zuschalten des Plasmafrequenz-Generators für eine Minute. Die Ausgangsleistung des Generators wurde auf 20 W, 50 W oder 80 W eingestellt. Anhand der emittierenden Farbe des Plasmas kann die Qualität des Plasmas ermittelt werden. Plasma aus reinem Sauerstoff hat eine hellblaue Färbung, während Plasma aus Stickstoff rosa erscheint. Nach der Behandlung wurde das Ventil zur Vakuumpumpe verschlossen und die Kammer mit Stickstoff auf Atmosphärendruck belüftet. Sobald der Druck ausgeglichen war, konnte die Kammer geöffnet und die Membranproben entnommen werden.

3.7.3.2 Herstellen der Silanol-Lösung

3- Glycidoxypropyldimethoxymethylsilan (Sigma-Aldrich, flüssig, 97 % wt) bildet durch Zugabe von einem Molekül Wasser und der Bildung eines Moleküls Ethanol eine Silanol-Gruppe aus:



Zur Durchführung dieser Reaktion wurden 10 ml einer Lösung mit je 95 Vol.-% Ethanol und 5 Vol.-% hergestellt und der pH-Wert auf 4,5-5,5 mit Essigsäure eingestellt. 1 ml der Lösung wurde entnommen und diente als Referenz für die spätere Analyse.

In die wässrige Alkohollösung wurde unter ständigem Rühren das flüssige Silan bis zu einer Endkonzentration von 2,5 Vol.-% langsam hineingetropft, da es ansonsten zur Bildung von kolloidalen Teilchen kommen kann. Nach der Zugabe des Silans wurde weiterhin für 60 Minuten gerührt. Die Hydrolyse ist vollständig abgelaufen, wenn die Lösung nahezu klar ist. Das Silan wurde 60 Minuten vor Ende der Plasmabehandlung zugegeben, so dass die resultierende Silanol-Lösung unmittelbar mit den aktivierten Membranen reagieren konnte.

3.7.3.3 Aufbringen des Silanols auf die Membranen und Karl-Fischer-Titration

Sofort nach der Plasmabehandlung der Membranen wurde 1 ml der Silanol-Lösung auf die aktivierte Seite der Pervaporationsmembran getropft. Dazu wurden Petrischalen aus Glas verwendet, um mögliche Reaktionen des Silanols mit der Oberfläche des Gefäßes zu vermeiden. Außerdem wurde nur die aktivierte Seite der Pervaporationsmembran benässt und vermieden, dass die Zellulose-Trägerschicht der Membran nicht mit der Lösung in Kontakt kam. Bei Raumtemperatur wurden die Membranen mit der Silanol-Lösung für 24 Stunden behandelt.

Bei einer erfolgreichen Bindung des Silanols auf der Oberfläche der Membran nimmt die Konzentration des Silanols in der Lösung ab. Das verbleibende Silanol kann mit der sogenannten Karl-Fischer-Titrationsmethode (KFT) bestimmt werden. Normalerweise wird die KFT für die Bestimmung von Wasser verwendet [99]. Grundlage dafür ist, dass Schwefeldioxid und Iod in Anwesenheit von Wasser miteinander reagieren:

$$2H_2O + SO_2 + \mathrm{I}_2 \rightarrow SO_4^{2-} + 2I^- + 4H^+ \qquad (3.20)$$

Methanol und Schwefeldioxid bilden einen sauren Ester, der durch eine Base (RN) neutralisiert wird:

$$CH_3OH + SO_2 + RN \rightarrow [RNH]SO_3CH_3 \qquad (3.21)$$

Wird statt Wasser Silanol verwendet, so reagiert das Silanol mit Methanol unter äquimolarer Abspaltung von Wasser:

$$R - SiOH + CH_3OH \rightarrow R - SiOCH_3 + H_2O \quad (3.22)$$

Der Wassergehalt kann dann nach der klassischen KFT bestimmt und mit der Silanolkonzentration gleichgesetzt werden:

$$H_2O + I_2 + [RNH]SO_3CH_3 + 2 \cdot RN \rightarrow [RNH]SO_4CH_3 + 2 \cdot [RNH] \quad (3.23)$$

Bei der KFT wird zwischen volumetrischer und colormetrischer KFT unterschieden. Ersteres ist für einen weiten Bereich zwischen 100 ppm und 100 % Wasser anwendbar und wird in der Regel für einen Wassergehalt größer als 5 % verwendet. Für Proben mit sehr niedrigem Wassergehalt wird die colormetrische KFT angewendet. Der wesentliche Unterschied zwischen den beiden Techniken besteht darin, wie das Titriermittel zu der Lösungsmittellösung zugegeben wird. Bei der volumetrischen KFT wird das Titriermittel mit einer Bürette hinzugefügt, während bei der colormetrischen KFT das Titriermittel elektrochemisch durch anodische Oxidation in die Titrierzelle eingebracht wird. In allen Experimenten wurde die colormetrische KFT mit dem Gerät Mettler Toledo C20 durchgeführt.

Die resultierende Silanol-Probe wurde nach der Membranbenetzung zu Analysezwecken entnommen und mit Ethanol (> 99,9 %) 1:100 verdünnt sowie 1 ml der Verdünnung in ein Glasröhrchen zur Lagerung gegeben. Der Verdünnungsschritt wurde für jede Membran dreifach wiederholt. Außerdem wurden die vorangegangenen Proben, die 95 %ige wässrige Ethanol-Lösung, sowie die Silanol-Lösung vor der Zugabe zu der Membran ebenfalls mit Ethanol 1:100 verdünnt. Alle Glasröhrchen, die jeweils 1 ml Probe enthielten, wurden mit Argon gespült, um die Adsorption von Wasser und die Verdampfung von Ethanol zu vermeiden.

Die Versuche wurden laut Herstellerangaben durchgeführt [100]. Das Gerät Mettler Toledo C20 Coulometrischer KF-Titrator verfügt über eine automatische Vortitration. Die Proben wurden aus den Glasröhrchen in eine 1 ml Spritze überführt. Dazu wurde die Spritze vor und nach dem Befüllen gewogen. Die Spritze mit der Probe wurde direkt durch das Septum in die Titrierzelle gestochen, sobald der Endpunkt der Vortitration erreicht wurde. Danach wurde die Probe in die Titrierzelle eingetragen. Nach der Titration kann die hinzugegebene Menge durch Rückwiegen der Spritze ermittelt und der Wassergehalt der Probe in ppm berechnet und mit der Silanolkonzentration gleichgesetzt werden.

3.7.3.4 Immobilisierung des FDM-Rohextrakts an die Pervaporationsmembran

Nach der 24 stündigen Behandlung der Membranoberfläche mit der Silanol-Lösung wurde die Oberfläche mit destilliertem Wasser oder 50 mM Phosphatpufferlösung gereinigt. Die Epoxygruppe des Silanols bindet unspezifisch an das Enzym. Es wurde eine 1 g/l Lösung aus lyophilisiertem Rohextrakt in Wasser hergestellt. Jede Membran wurde mit 0,5 ml der Lösung benetzt und für sechs Stunden inkubiert. Danach wurde 0,5 ml destilliertes Wasser verwendet, um die Oberfläche der Membran von nicht gebundener FDM zu reinigen. Vom Überstand und der Waschlösung wurde die Proteinkonzentration in dreifacher Wiederholung bestimmt und über die Differenz zur Ursprungslösung die immobilisierte Menge Protein ermittelt.

3.7.3.5 Bestimmung der Aktivität der an die Membran immobilisierten Enzyme

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurden Formaldehyd-Lösungen mit einer Konzentration von 5 mg/l oder 10 mg/l verwendet. Um die Membranen vollständig in die Formaldehyd-Lösung eintauchen zu können, wurden 5 ml der Lösung in ein Reagenzglas gefüllt. Nach 30 Minuten wurde eine Probe entnommen und die Formaldehydkonzentration gemessen. Aus der Differenz der Konzentration der Ausgangslösung und der Probe kann die Aktivität berechnet werden.

3.8 In-situ-Produktgewinnung von Methanol und Ameisensäure

Die Aktivität der FDM ist maßgeblich von der Konzentration der Produkte abhängig (vergl. Kapitel 4.4). Je niedriger die Konzentrationen sind, desto größer ist die Aktivität. Nachfolgend werden die Methoden für die in-situ-Produktgewinnung beschrieben.

3.8.1 Rektifikation zur Gewinnung flüchtiger Produkte

Die Rektifikation ist ein physikalisches Verfahren zur Trennung einzelner Komponenten in einem Stoffgemisch. Die abzutrennenden Komponenten sind im Allgemeinen miteinander mischbar und haben unterschiedliche Siedepunkte. Über die unterschiedlichen Dampfdrücke der Einzelkomponenten des Gemischs kann durch Wärmezufuhr eine Trennung erzielt werden.

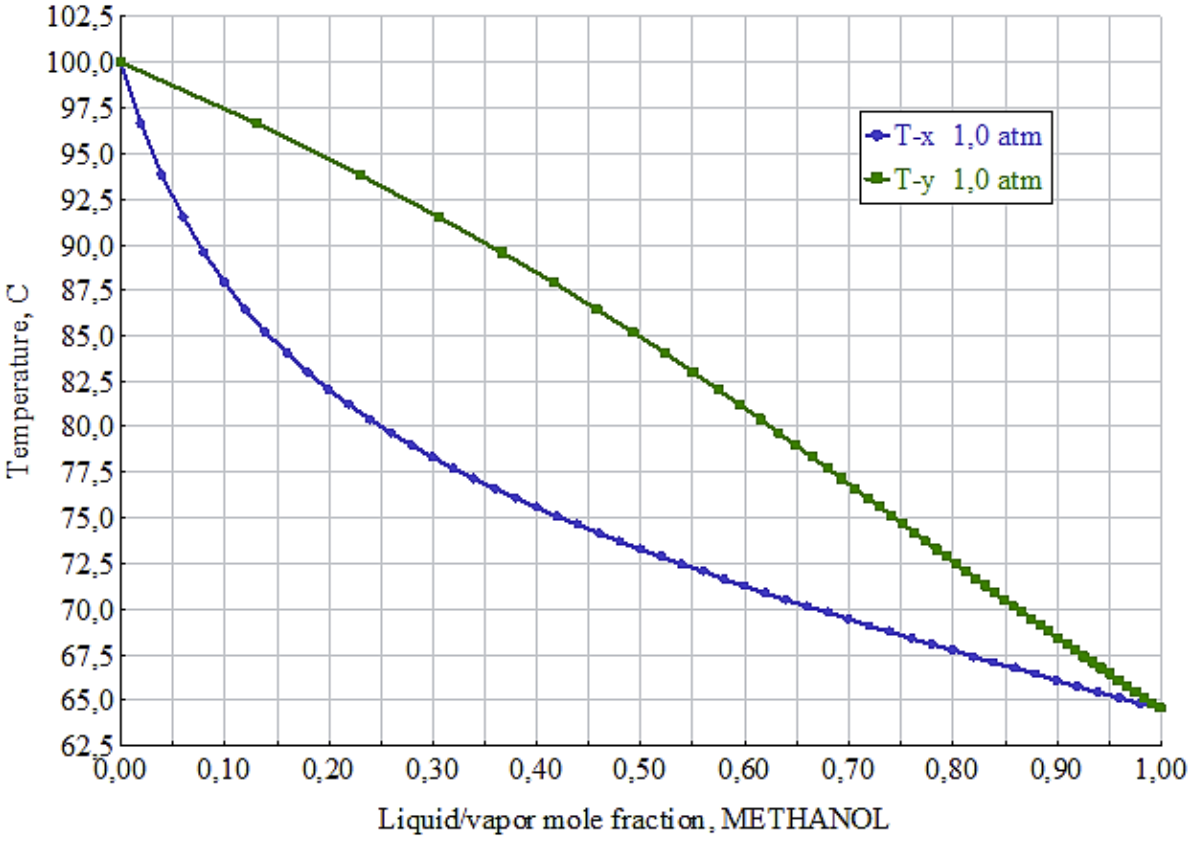


Abbildung 3-23 T-x-Diagramm für das Gemisch aus Methanol und Wasser (erstellt mit der Software Aspen [101]).

Das Dampf-Flüssigkeits-Gleichgewicht von Methanol und Wasser ist als Auszug aus der Software AspenPlus in Abbildung 3-23 dargestellt, wobei die obere Kurve (grün) die sogenannte Kondensationskurve und die untere (blau) die Siedekurve darstellen. Dazwischen liegt der Zweiphasenbereich [101].

Zur Auslegung von Rektifikationskolonnen und Darstellung gesamter Prozesse mit anschließender Rektifikation kann das Prozesssimulationsprogramm Aspen verwendet werden [101]. Damit ist es möglich Stoff- und Energiebilanzen für unterschiedlichste Prozesse computergestützt darzustellen.

3.8.2 Pervaporation zur Produktgewinnung

Eine vielversprechende Methode, Methanol in-situ während der Enzymreaktion in einem ersten Schritt bei Raumtemperatur aufzubereiten, besteht in der Verwendung von Pervaporationsmembranen. Die Kombination von Pervaporationsanlagen mit Rektifikationsanlagen können zu einer Effizienzsteigerung führen [102]. Die Pervaporation könnte beispielsweise ver-

wendet werden, um in einem ersten Schritt die für eine Rektifikation benötigte Methanolkonzentration von 5 % wt. zu erhalten.

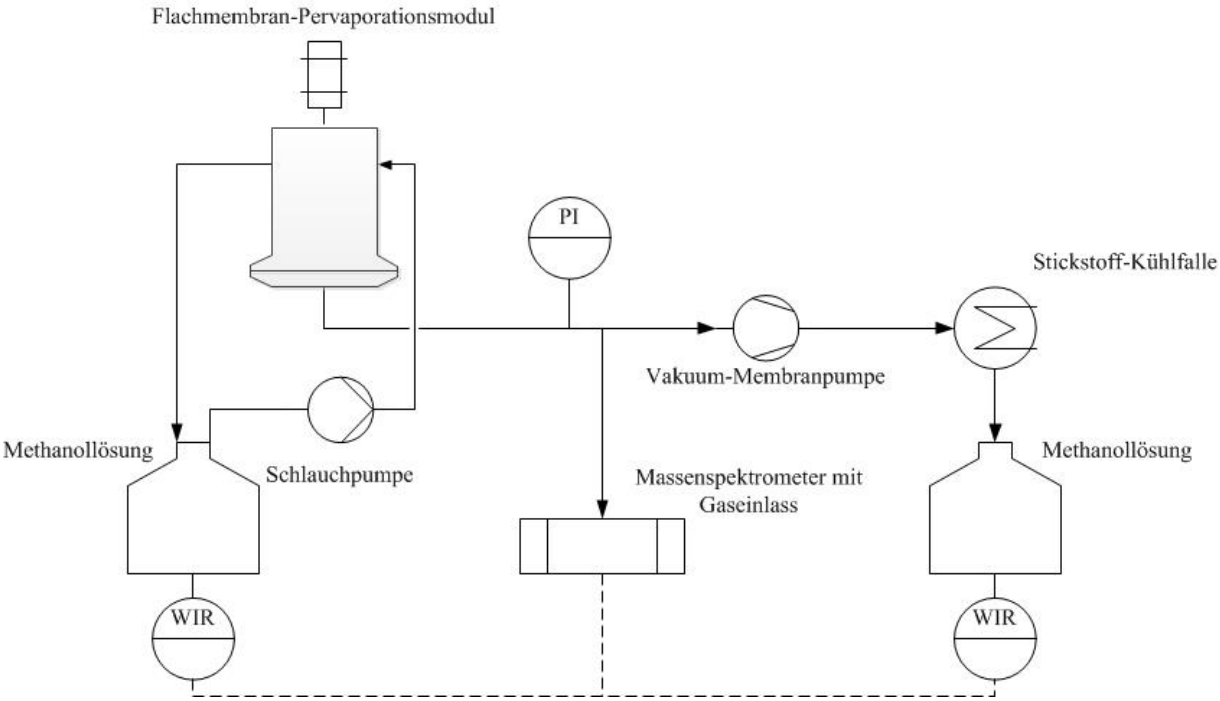


Abbildung 3-24 Schematische Darstellung einer Versuchsanlage mit einem Pervaporationsmodul für Flachmembranen.

In Abbildung 3-24 ist das Fließbild einer Anlage zur Verwendung von Flachmembranen dargestellt. Das Modul besteht aus einem Edelstahlbehälter mit einer Pervaporationsmembran als Flachboden. Der Behälter ist mit Flüssigkeit gefüllt. Auf der Permeatseite liegt ein Vakuum an, durch das der abzutrennende Stoff desorbiert und abtransportiert wird.

Auf der Feedseite hat die Strömung der Flüssigkeit Einfluss auf die Flüssigkeitsschichtdicke β^L (Abbildung 2-5) und damit auch auf den konvektiven sowie diffusiven Stofftransport. In dem Flachmembranmodul wurden deshalb die Rührerdrehzahl und das Füllvolumen so angepasst, dass es nicht zur Trombenbildung, aber dennoch zu einer maximalen Durchmischung kommt. Die Rührerdrehzahl betrug 200 rpm. Mittels Vakuumpumpe wurde ein Vakuum von 25 mbar eingestellt. In einer Kühlfalle kann flüssiges Methanol aus dem gasförmigen Permeatstrom aufgefangen werden. Die Betriebstemperatrur lag für alle Versuche bei 25 °C. Verwendet wurden PDMS-Membranen von PolyAn, Deutschland (POL_OR). Die verwendete Membranfläche betrug 0,005 m². Vor Verwendung muss die Membran mindestens 12 Stunden in der jeweiligen Ausgangslösung quellen, um funktionsfähig zu sein. Es wurden

500 ml Lösung verwendet. Pervaporationsmodule sind auch als Röhrenmodule erhältlich. Als Trägerschicht werden aus Titanoxid gefertigte Mikrofiltrationsmodule verwendet, die mit einer Pervaporationsmembran beschichtet werden. Ein solches Modul wurde ebenfalls in eine Anlage integriert (Abbildung 3-25). Das Röhrenmodul wurde mit einem Feedstrom von 50 ml/min durchströmt und es lag ein Vakuum mit 25 mbar an.

Die Pervaporationsmembran kann auch direkt in den Membraneinlass des Massenspektrometers eingebaut und damit die Pervaporation untersucht werden. Das bietet sich vor allem für ein Screening nach geeigneten Pervaporationsmembranen an (vergl. 4.5.2.4). Der Membraneinlass des Massenspektrometers ist in Abbildung 3-26 schematisch dargestellt.

Der Einlass ist strömungsdynamisch auf einen Volumenstrom von 5 ml/min bis 10 ml/min optimiert. Deshalb wurde der Durchfluss durch den Einlass bei 10 ml/min konstant gehalten. Die jeweilige Membran wurde in das Modul eingebaut und ein Flüssigkeitsstrom kontinuierlich an der Membran vorbeigeführt. Die Zusammensetzung der permeatseitigen Gasphase wurde mittels Massenspektrometrie vermessen. Sowohl bei der Verwendung der für die reguläre Messung eingesetzten porösen Membran (vergl. Kapitel 3.2) als auch bei der Pervaporationsmembran wurde ein Druck im Vorvakuum von 0,19 mbar erhalten, womit die Membranen vergleichbar sind und die nicht selektive poröse Membran als Referenzmembran (Membrandestillation) eingesetzt werden kann.

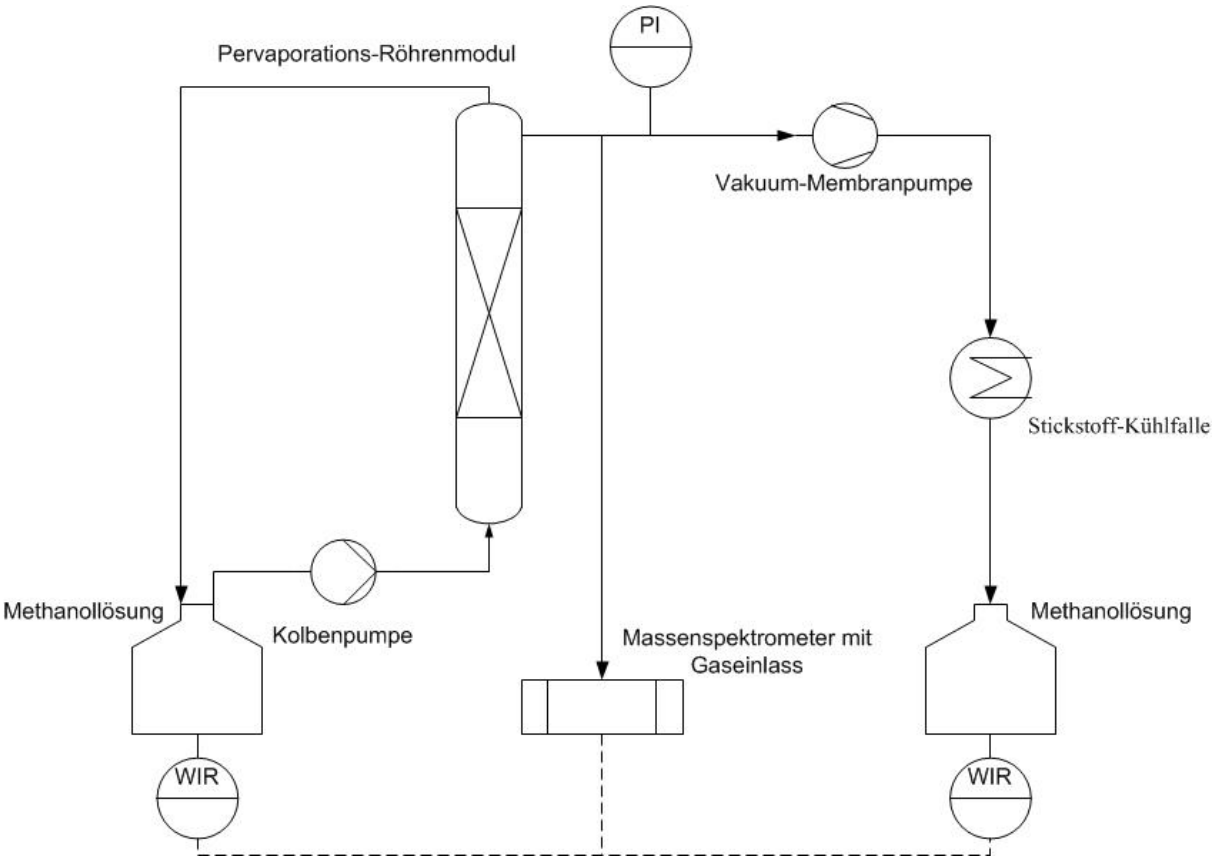


Abbildung 3-25 Schematische Darstellung einer Versuchsanlage mit einem Pervaporations-Röhrenmodul.

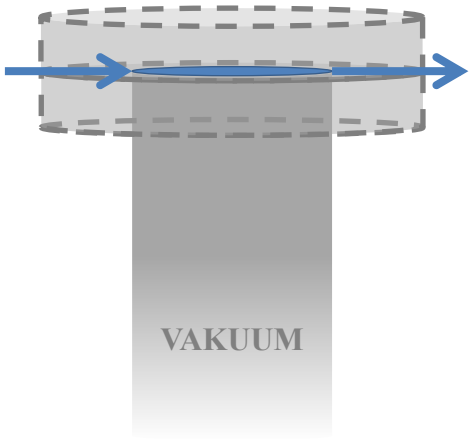


Abbildung 3-26 Schematische Darstellung des Membraneinlasses. Ein Flüssigkeitsstrom wird kontinuierlich an einer Membran (blau) vorbeigeführt. Auf der Permeatseite liegt ein Vakuum an und sorgt für die Triebkraft der flüchtigen Komponenten durch die Membran.

3.8.3 Verwendung eines Ionenaustauschers

Die Adsorption der Ameisensäure an einen Anionenaustauscher kann empirisch bestimmt werden. Es wurde ein Anionenaustauschers (Purolite A111) zur Adsorption von Ameisensäu-

re verwendet. Die Eigenschaften des OH-Anionenaustauschers sind in Tabelle 3-12 aufgeführt.

Tabelle 3-12 Eigenschaften des OH-Anionenaustauschers Purolite A111

Totale Kapazität (min.)	1.7 eq/l (37.1 Kgr/ft3) (Freie Base)
Wassergehalt	56 – 62 %
Partikeldurchmesser	300 – 1200 µm
<300 µm (max.)	1 %
Temperaturlimit	60 °C

Zur Aktivierung des Ionenaustauschers wurden die Partikel für eine Stunde mit 4°%iger Natronlaugelösung gewaschen. Dann wurden die Partikel mit einem Sieb aus der Lauge herausgefiltert und unter fließendem bidest. Wasser abgewaschen.

Das Adsorptionsverhalten des Ionenaustauschers kann mit Hilfe des Massenspektrometers aufgezeichnet werden (vergl. Kapitel 3.2). Die Ansaugkapillare des Massenspektrometers wurde mit einem groben Sinterfilter bestückt, damit keine Partikel in das Messsystem gelangen konnten.

200 ml einer 80 mM Ameisensäurelösung wurden in ein Becherglas gegeben und die massenspektrometrische Messung gestartet. Unter ständigem Rühren wurden 51,5 g des Anionenaustauschers auf einmal in die Ameisensäurelösung gegeben und die Konzentrationsabnahme in der Flüssigkeit detektiert.

3.8.4 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Die Abtrennung der Produkte Ameisensäure und Methanol lässt sich über die Flüssig-Flüssig-Extraktion durchführen. Ameisensäure wird im technischen Maßstab mittels Extraktion abgetrennt (vergl. Kapitel 2.8). Methanol kann aufgrund seiner Polarität nur schlecht mittels Extraktion gewonnen werden. Für die in-situ Produktabtrennung muss allerdings die Auswirkung des Extraktionsmittels auf die FDM untersucht werden. Außerdem mussten für das Stoffsystem Formaldehyd, Methanol und Ameisensäure Extraktionsversuche durchgeführt werden.

3.8.4.1 Inhibierung der FDM durch Extraktionsmittel

Zur Extraktion von Ameisensäure können unterschiedliche Lösungsmittel wie Alkohole, Ester, Organophosphorverbindungen und Amine verwendet werden. Die Inhibierung des Enzyms wurde durch einen Aktivitätstest bestimmt (vergl. Kapitel 3.4), bei dem zusätzlich unterschiedliche Konzentrationen des Lösungsmittels zugegeben und mit den entsprechenden Ergebnissen ohne Lösungsmittel verglichen wurden.

3.8.4.2 Herstellung und Analyse der Extraktionsproben

Zur Untersuchung der Flüssig-Flüssig-Extraktion wurden unterschiedliche Extraktionsmittel mit verschiedenen Konzentrationen an Methanol und Ameisensäure versehen. Die Ameisensäurekonzentration in den Extraktionsproben wurde mit HPLC-UV und Methanol mit Headspace-Gaschromatographie-FID für Methanol analysiert. Folgende Arbeitsschritte wurden durchgeführt:

15 ml der wässrigen und 15 ml der organischen Phase wurden in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und durchmischt.

Für eine gute Entmischung beider Phasen wurde für 30 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert (Beckmann-Coulter Avanti J-26-Zentrifuge XP JA-25-50) und eine Ruhezeit von zwei Stunden eingehalten. Danach wurden etwa 10 ml jeder Phase aus dem Zentrifugenröhrchen entnommen und in separate Reagenzgläser übertragen und verschlossen. Die Proben wurden im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Die Analyse wurde von der Zentralen Analytik des Fraunhofer IGB durchgeführt.

Zunächst wurden drei verschiedene wässrige Phasen hergestellt. Zum einen eine Methanol-Lösung und eine Ameisensäure-Lösung mit jeweils einer Konzentration von 0,45 g/L, was der Produktkonzentration nach der enzymatischen Umsetzung einer 1 g/l Formaldehydlösung entspricht. Zum anderen eine Probe mit beiden Produkten in äquimolaren Anteilen.

Die organische Phase bestand aus einem Verdünnungsmittel und einem Extraktionsmittel in jeweils unterschiedlichen Anteilen:

- Extraktionsmittel (0%) + Verdünnungsmittel (100%)

- Extraktionsmittel (5%) + Verdünnungsmittel (95%)
- Extraktionsmittel (20%) + Verdünnungsmittel (80%)
- Extraktionsmittel (50%) + Verdünnungsmittel (50%)
- Extraktionsmittel (100%) + Verdünnungsmittel (0%)

Die Auswirkung des Extraktionsmittel-Gehalts in der organischen Phase wurde durch Vergleichen der jeweiligen Verteilungskoeffizienten (K_D) und der daraus resultierenden Extraktionseffizienz (D_E) untersucht. K_D ist definiert als das Verhältnis aus der Säurekonzentration in der organischen Phase zu der in der wässrigen Phase.

3.9 Versuchsanlagen zur Durchführung der FDM-Reaktion

Zur Prozessentwicklung wurden unterschiedliche Versuchsstände aufgebaut und schließlich zu einer Pilotanlage zusammengefügt. Versuche mit der gelösten FDM aus dem Rohextrakt wurden in einem gerührten Druckreaktor (Autoklav) durchgeführt, immobilisierte Enzyme in einem Festbettreaktor eingesetzt und zur in-situ-Produktabtrennung wurden Pervaporationsmodule verwendet.

3.9.1 Anlagenaufbau für Versuche mit gelöster oder immobilisierter FDM

Für Versuche mit gelöster und auch mit immobilisierter FDM wurde eine Infors HT Fermentationsanlage verwendet. Durch die bei der Dismutase-Reaktion entstehende Ameisensäure wird der pH-Wert der Reaktionslösung gesenkt. Mittels einer pH-Regelung unter Zugabe einer definierten basischen Lösung waren Rückschlüsse auf die Menge der gebildeten Ameisensäure und damit auch auf die Methanolkonzentration möglich. Die Temperatur und der pH-Wert wurden konstant gehalten. Die Mengen an hinzugegebener Lauge (0,5 M NaOH) und Formaldehydlösung werden durch wägen erfasst und dadurch eine Berechnung der Stoffumsätze ermöglicht (Abbildung 3-27).

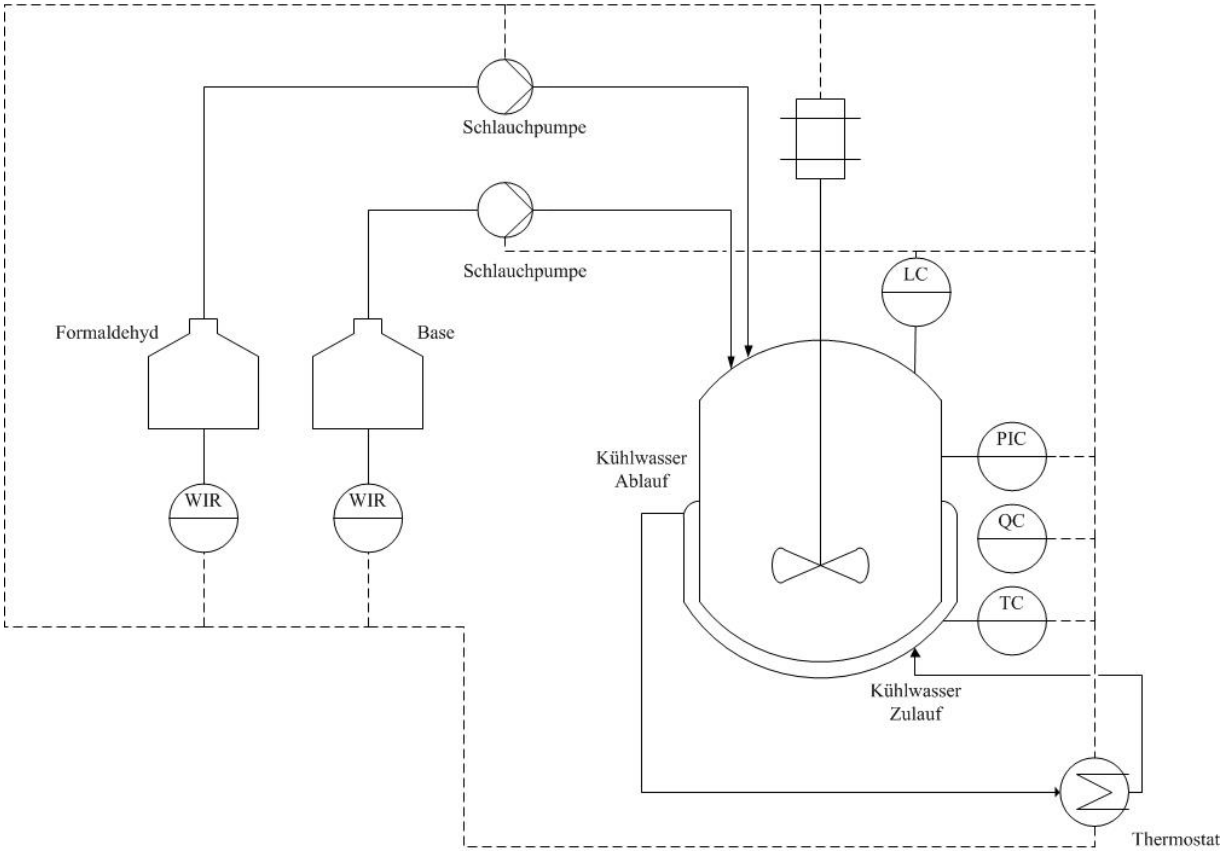


Abbildung 3-27 Schematische Darstellung eines Versuchsaufbaus für die Aktivitätsbestimmung von gelöster und immobilisierter FDM. Der Verbrauch von Formaldehyd und Base wurden über Waagen erfasst. Durch ein Regelsystem wurden Temperatur und pH-Wert im Reaktor konstant gehalten.

3.9.2 Festbettreaktor für Trägerpackungen

Festbettreaktoren werden in der Enzymtechnologie verwendet, um immobilisierte Enzyme in einem kontinuierlichen Prozess zurückzuhalten. Vorteile von trägerfixierten Enzymen in einem Festbettreaktor sind:

1) Nach dem Modell der Pfropfenströmung [103] kann die hydraulische Verweilzeit sehr genau eingestellt werden.
2) Der Festbettreaktor kann gleichzeitig für die Immobilisierung der Enzyme an den Träger genutzt werden.
3) Durch eine feste Packung der Träger im Festbettreaktor kommt es nicht zu Reibungen der Trägeroberflächen untereinander, wie es beispielsweise in einem Rührkessel der Fall wäre. So kann die mechanische Belastung des Enzym-Träger-Katalysators auf die Umströmung der einzelnen Trägerpartikel reduziert werden.

Ein Nachteil ist eine mögliche Kanalbildung der Flüssigkeit durch das Partikelbett. Eine pH-Regelung ist in diesem Fall nicht möglich, da sich durch die gebildete Ameisensäure innerhalb des Festbettreaktors ein pH-Gradient ausbildet. Die Messung der Produktkonzentrationen ist zum Beispiel mittels on-line-Massenspektrometer am Ausgang des Festbetts möglich (Abbildung 3-28).

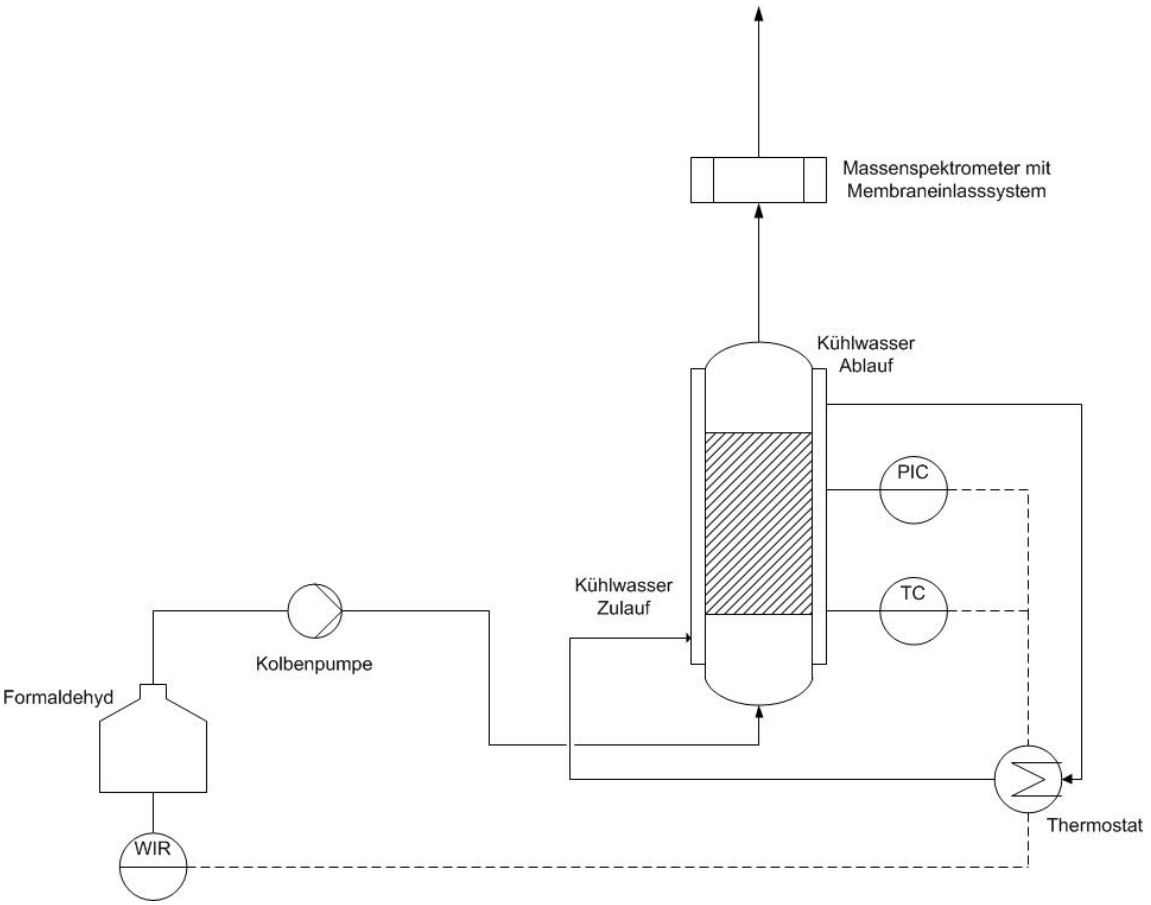


Abbildung 3-28 Schematische Darstellung eines mit Enzymträger gefüllten Festbettreaktors. Die Zugabe von Formaldehyd erfolgt über eine Kolbenpumpe. Die Temperatur im Reaktor wird konstant gehalten. Die Produkte können mittels on-line Analytik direkt am Ausgang des Reaktors detektiert werden.

3.9.3 Aufbau eines Druckreaktors für gelöstes Enzym oder Trägersuspensionen

Ein wesentlicher Parameter für Gasphasenprozesse ist der Prozessdruck. Enzyme verhalten sich unter Druck unterschiedlich. Dabei reicht die Spanne von vollständiger Inaktivierung der Enzyme bis zu einer Aktivitätssteigerung. Auch das Stoffübergangsverhalten von Substraten und Produkten ist druckabhängig. Daher wurde ein Druckreaktor ausgelegt, mit dem unter

anderem Langzeitversuche und Stoffdatenversuche durchgeführt werden können (Abbildung 3-29).

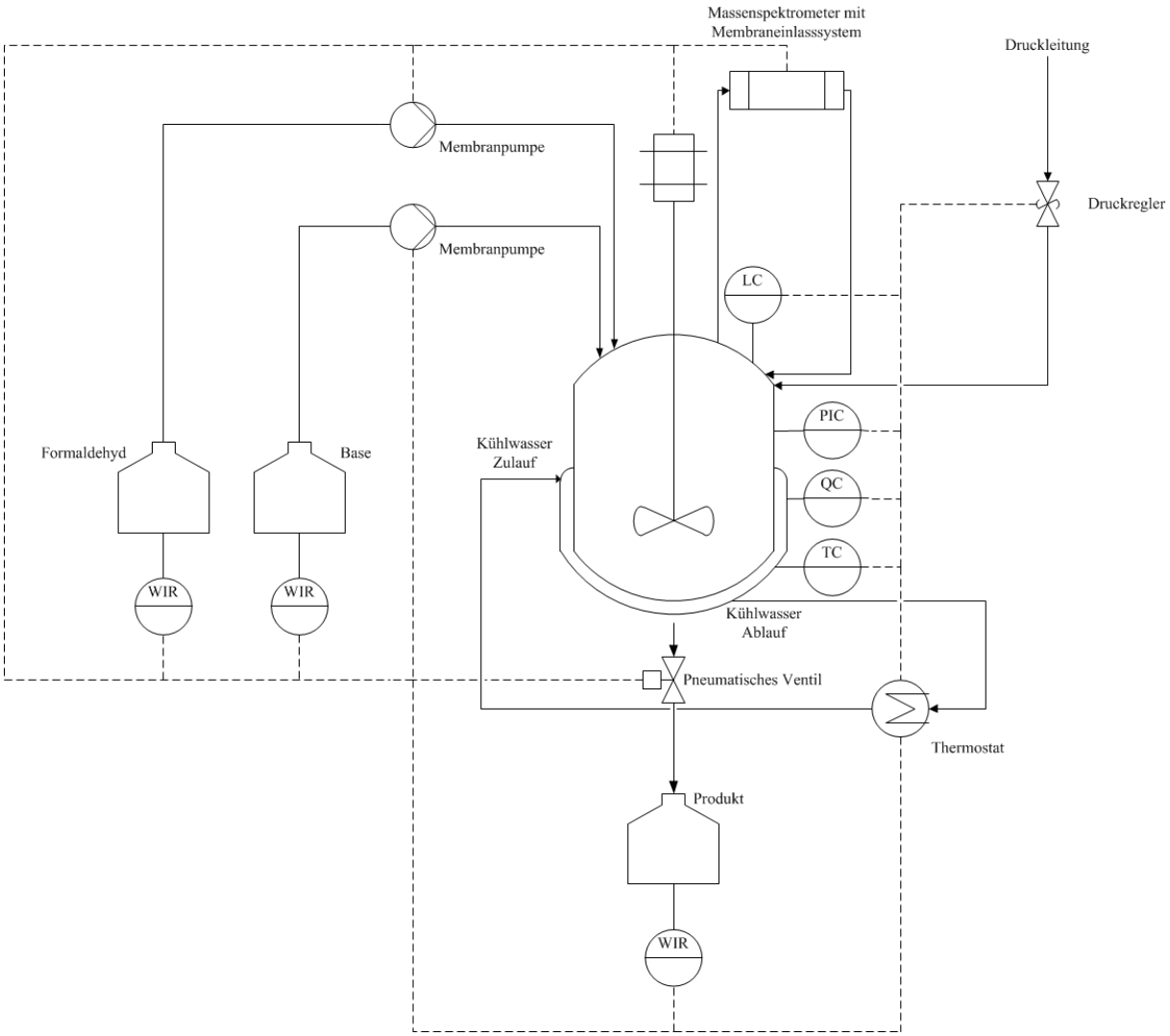


Abbildung 3-29 Schematische Darstellung eines Versuchsaufbaus für den Einsatz von gelösten Enzymen und Enzymträgersuspensionen unter Druck. Die Zugabe von Formaldehyd erfolgt über eine Membrandosierpumpe. Eine on-line-Analyse erfolgt über das Massenspektrometer. Alle Ventile und die Druckregelung sind über eine Prozesssteuerung automatisiert.

3.9.4 Versuchsanlage zur Entwicklung eines Enzymprozesses mit kontinuierlicher Produktabtrennung

Um für die Entwicklung eines enzymtechnischen Prozesses zur Herstellung von Methanol, Ameisensäure und Methylformiat aus Formaldehyd verschiedene Reaktortypen vergleichend untersuchen zu können, wurde eine flexibel einsetzbare Anlage aufgebaut, in der Substrat und

Produkte sowohl in der Gasphase als auch in der Flüssigphase kontinuierlich gemessen werden können (Abbildung 3-30).

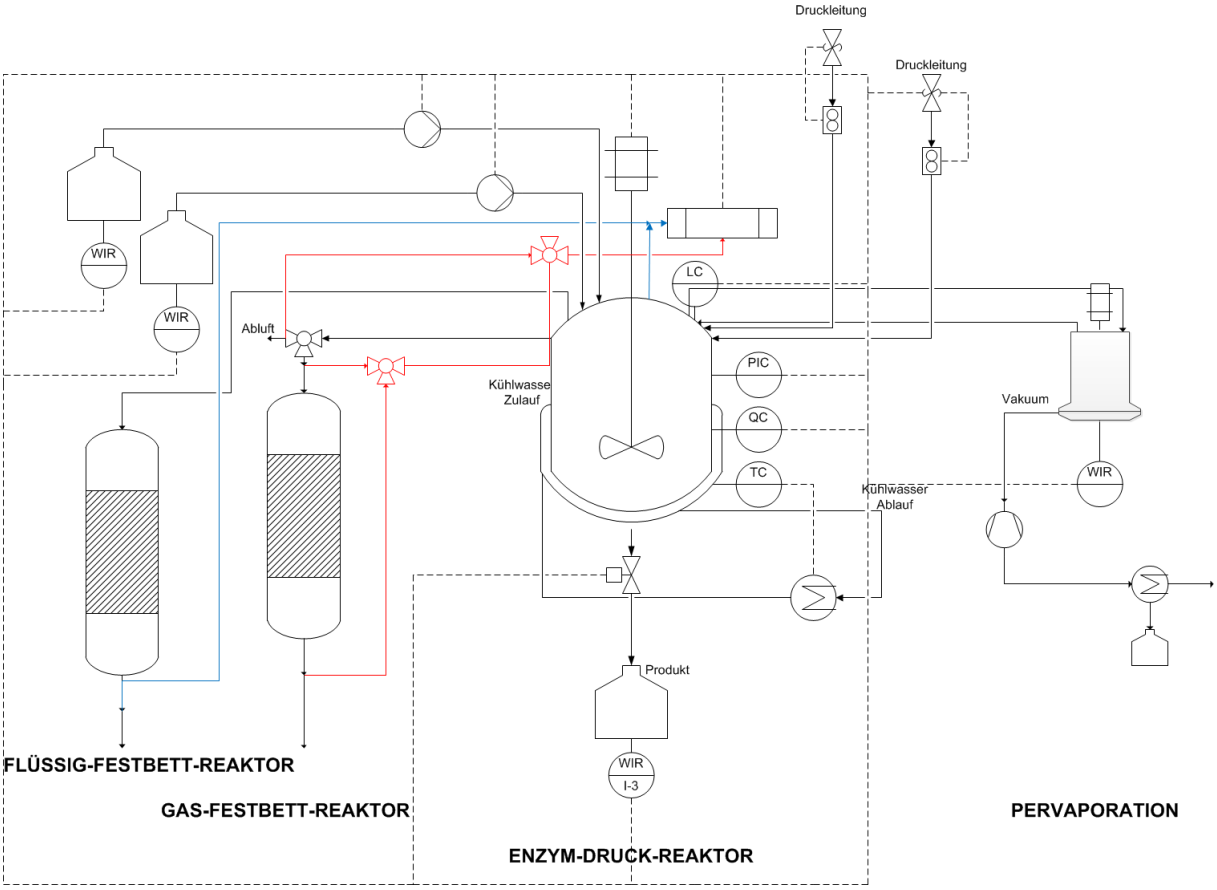


Abbildung 3-30 Gesamter Versuchsaufbau zur Prozessentwicklung einschließlich der Produktgewinnung

In dieser Anlage sind ein Flüssig-Festbettreaktor, ein Gas-Festbettreaktor, ein Enzym-Druckreaktor und eine Pervaporationsanlage miteinander kombiniert. Zu- und Abflüsse dieser Komponenten können über das on-line-Massenspektrometer analysiert werden. Über den Membraneinlass ist es möglich, alle Flüssigkeitsströme zu messen. Der Gaseinlass ermöglicht die Messung sowohl aus der Gasphase der Reaktoren als auch aus der Permeatseite der Pervaporationsmembran. Die Anlage ist mit zwei Gasanschlüssen ausgestattet. Auf diese Weise ist es möglich, den Druck im Reaktor aufzubauen, den Reaktorinhalt zu begasen oder zu strippen sowie ein Trägergas in das System einzubringen. Die Anlage ist über eine Speicherprogrammierbare Steuerung (SPS) von Siemens automatisiert und ermöglicht eine Reaktion unter kontrollierten Bedingungen.

3.9.5 Charakterisierung des gerührten 1 Liter-Druckreaktors

Die Enzymreaktion kann nur dann reproduzierbar aufgezeichnet werden, wenn eine möglichst homogene Durchmischung im Enzym-Druck-Reaktor erfolgt. Alle strömungsmechanischen Bewegungen in einem Rührkesselreaktor werden durch den Rührer verursacht. Entscheidende Kriterien bei der Beurteilung von Rührprozessen sind die vom Rührer in das Rührgut eingebrachte Leistung und die Mischzeit.

3.9.5.1 Leistungseintrag

Zur Bestimmung des Leistungseintrags in das Medium im Reaktor wurde ein Rührwerk mit integriertem Drehmomentsensor (Heidolph RZR 2051) verwendet. Die bezeichnende Größe ist der Netto-Leistungseintrag, da der Leistungseintrag in das durchmischte Medium nicht nur durch den Rührer, sondern auch durch die Reaktorbeschaffenheit beeinflusst wird. So finden häufig Strömungsstörer unterschiedlicher Bauweise ihre Anwendung in der Rührtechnik. Sie verhindern in erster Linie das Mitrotieren der Flüssigkeit. Dadurch sind das Einbringen zusätzlicher Turbulenz und ein damit verbundener erhöhter Leistungseintrag möglich.

Die Leistungscharakteristik von Rührern lässt sich nur ungenügend theoretisch berechnen. Daher muss sie für jeden Rührertyp und für die sich unterscheidenden Rührkessel direkt gemessen werden. Anhand der Drehmomentmessdaten lässt sich die Newton-Zahl (Ne-Zahl) berechnen, die den Strömungswiderstand eines Rührers kennzeichnet. Die Ne-Zahl ist eine Funktion der Reynolds-Zahl (Re), die wiederum das Verhältnis von Trägheit- zu Zähigkeitskraft, bzw. das Verhältnis von spezifischer Impulskonvektion zu Impulsdiffusion im System darstellt. Wird die Ne-Zahl über die Re-Zahl aufgetragen, so ergeben sich für den Rührkessel charakteristische Verläufe. Der Verlauf lässt sich in drei Bereiche aufteilen:

Bereich I. Die Durchmischung ist durch das „Teilen und Verschieben“ des Fluides gekennzeichnet und äußert sich in einer **laminaren** Strömung. Der Leistungsbedarf wird durch die Zähigkeit der Flüssigkeit bestimmt (bis ca. Re-Zahl 10-60).

Bereich II. Der Übergang von laminarer zu turbulenter Strömung wird als **Übergangsbereich** bezeichnet. In diesem Bereich hat zusätzlich die Dichte des Fluides einen Einfluss.

Bereich III. Es bildet sich eine **vollturbulente** Strömung aus. Dieser Bereich wird als vollturbulenter oder Newton-Bereich bezeichnet. Der Zähigkeit kann vernachlässigt werden.

Die Bereiche spielen insofern eine Rolle, da sich die Berechnungen der Leistung für jeden Bereich unterscheiden. Um die verschiedenen Leistungsbereiche miteinander zu vergleichen, wird in der Rührtechnik meist mit dem volumetrischen Leistungseintrag $\frac{P}{V}$ gearbeitet.

Unter der Voraussetzung, dass die geometrische Ähnlichkeit der Rührkesselmaße gewahrt bleibt und die Strömungsverhältnisse stationär sind, gilt für die charakteristische Umfangsgeschwindigkeit des Rührers,

$$u = 2\,\pi\,n\,d \tag{3.24}$$

das Drehmoment,

$$M = F\,r = F\,\frac{d}{2} \tag{3.25}$$

die Leistung,

$$P = F\,u = 2\,F\,\pi\,n\,d = 2\,M\,\pi\,n \text{ (überschlagsmäßig)} \tag{3.26}$$

$$P = KI\,\mu\,n^2\,d^3 \text{ mit } KI = Ne\,Re^m \text{ (für Bereich I)} \tag{3.27}$$

$$P = KII\,\rho\,n^3\,d^5 \text{ mit } KI = Ne\,Re \text{ (für Bereich II)} \tag{3.28}$$

$$P = KIII\,\rho\,n^3\,d^5 \text{ mit } KI = Ne = const \approx 0{,}1 \ldots 5{,}0 \text{ (für Bereich I)} \tag{3.29}$$

bzw. die spezifische Leistung,

$$\frac{P}{V} = \frac{2\,M\,\pi\,n}{V} \tag{3.30}$$

die Newton-Zahl und die Rührer-Reynolds-Zahl

$$Ne = \frac{F}{\mu\,u^2\,A} = \frac{2M}{d\,\rho\,u^2\,A} = \frac{P}{\rho\,n^3 d^5} \tag{3.31}$$

$$Re = \frac{n\,d^2\,\rho}{\mu} \tag{3.32}$$

$$mit\ M\ [Nm]; n\ [s^{-1}]; V\ [m^3]; A\ [m^2];\ u\ [ms^{-1}];\ \rho[kg\ m^{-3}];\ \mu[kg\ m^{-1}s^{-1}]$$

Das Erreichen eines bestimmten Leistungseintrags und einer Mischgüte beim Homogenisieren in einer Reaktionslösung ist von großer Bedeutung. Der Druckreaktor wurde für eine flexible Betriebsweise, sowohl für Flüssigkeiten als auch zur Durchführung von Festbettreaktionen, ausgelegt. Aus diesem Grund weicht die bevorzugte geometrische Abmessung eines Standard-Rührkessels in einigen Punkten von gängigen Rührkesseln ab. Verwendet wurde ein individuell für die FDM-Reaktion angefertigter Autoklav der Firma Büchi, der in Abbildung 3-31 dargestellt ist. Der Reaktor ist zylindrisch mit Flachboden und besitzt ein konisches Bodenauslassventil. Als Strömungsbrecher wird eine von der Deckelplatte aus montierte Platte verwendet.

Zur Charakterisierung der Spezialanfertigung wurden Rührversuche zur Ermittlung von Leistungscharakteristik und Mischzeit für unterschiedliche Drehzahlen für Wasser und Reaktionsmedium (Phosphatpuffer bis zur Konzentration von 1 M) aufgenommen.

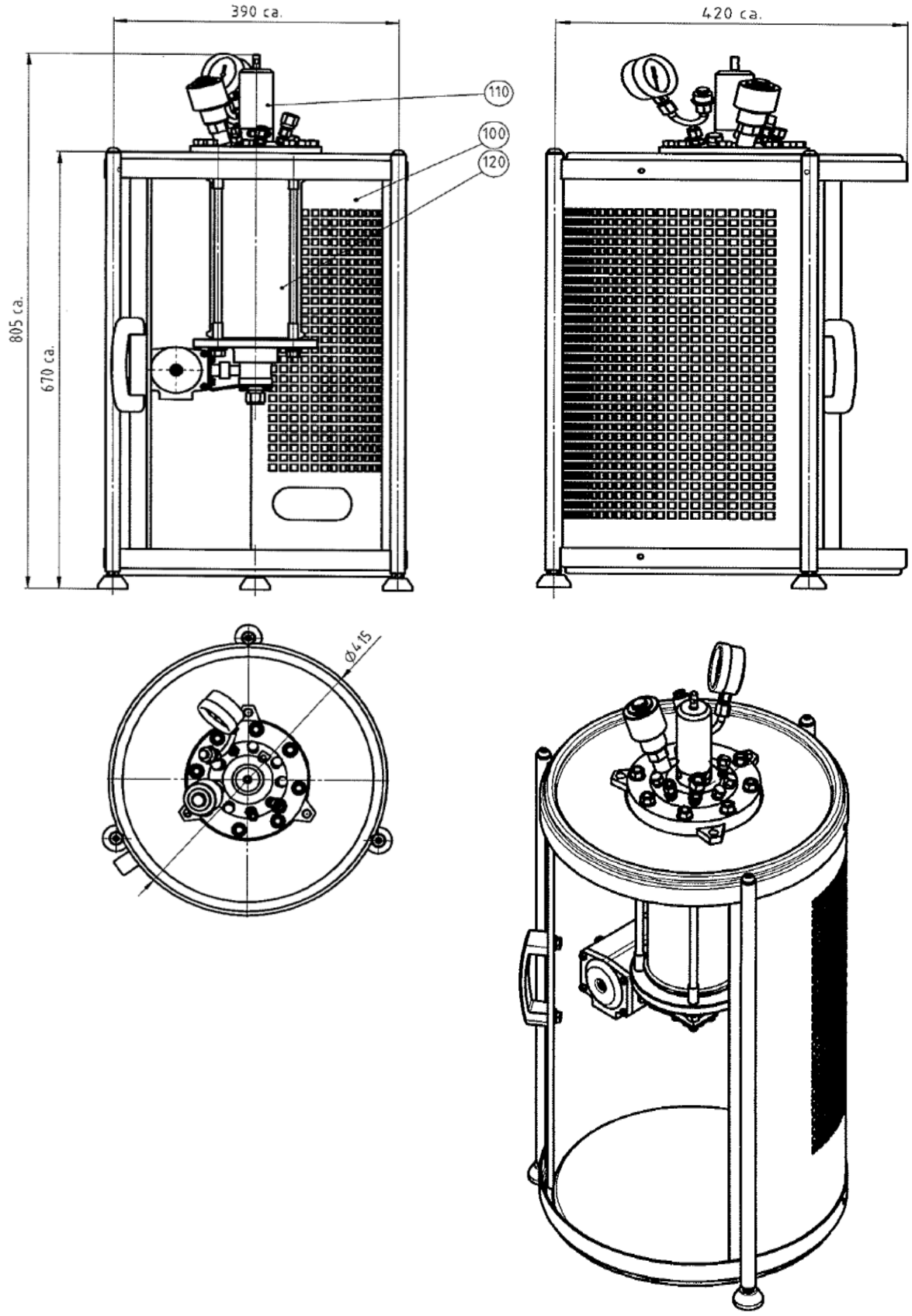


Abbildung 3-31 CAD-Zeichnung des verwendeten Autoklaven der Firma Büchi.

3.9.5.2 Mischzeit im Reaktor

Die Zielgröße beim Homogenisieren ist die Mischgüte [104]. Diese kann je nach Anwendungsbereich variiert werden. Ein vollständig homogenes Fluid entspricht einer Mischgüte von 100 %. Zum Erreichen einer definierten Mischgüte ist die Mischzeit [Θ] von ausschlaggebender Bedeutung. Die Mischzeit wird experimentell bestimmt. Die gängigsten Methoden sind die „Entfärbe-Methode“ und die „Schlierenmethode“. Hier wurde die „Entfärbe-Methode“ verwendet.

Eine Jod-Kaliumiodidlösung färbt eine Stärkelösung im Reaktor tiefblau. Durch Zugabe einer Natriumthiosulfatlösung wird die Flüssigkeit entfärbt. Die Dauer bis zur Entfärbung entspricht der Mischzeit.

Beim stationären Mischen zweier Newtonscher Fluide mit ähnlichen Stoffwerten (ρ und μ) hängt die Mischzeit von den Stoffwerten, der Drehzahl n und den Rührer Abmessungen ab:

$$\theta = f(n, d, \rho, \mu) \tag{3.33}$$

Der Leistungseintrag und die Mischzeit im Reaktor wurden bei einem Füllvolumen von einem Liter bestimmt. Zur Ermittlung der Mischzeit mittels Entfärbemethode wurden drei Lösungen verwendet:

- Jod-Kaliumiodidlösung: 250 g Kaliumjodid und 128 g Jod in 1 l entionisiertes Wasser,
- Natriumthiosulfatlösung: 247,94 g in 1 l Wasser und
- Stärkelösung: 1 g in 1 l Wasser gekocht.

Zur Durchführung des Experiments muss der Titrationspunkt der Lösungen ermittelt werden. Dazu werden 20 ml Stärkelösung in einem Becherglas vorgelegt und 2 ml der Jodlösung hinzugegeben. Unter ständigem Rühren wird tröpfchenweise Natriumthiosulfatlösung pipettiert, bis es zu einem Farbumschlag kommt und die Lösung klar wird. Die restliche Natriumthiosulfatlösung in der Pipette kann gravimetrisch bestimmt und die hinzugegebene Menge berechnet werden. Damit kann das Mengenverhältnis Jod- zu Natriumthiosulfatlösung bei der gewünschten Temperatur ermittelt werden. Die Färbeversuche in dieser Arbeit wurden bei 20 °C durchgeführt.

3.9.6 Pilotanlage zur Herstellung von Methanol und Ameisensäure aus Biogas

Zur Herstellung von Methanol und Ameisensäure aus Biogas wurde der in Kapitel 3.9.3 beschriebene Druckreaktor verwendet. Synthetisches Biogas wurde über einen Mass Flow Controller (MFC) mit unterschiedlichen Volumenströmen zwischen 100 ml/min bis 400 ml/min in den chemokatalytischen Reaktor geleitet und teilweise zu Formaldehyd umgesetzt. Im Reaktor zur Chemokatalyse befanden sich 25 mg eines Vanadiumkatalysators [105].

Bei der Umsetzung von synthetischem Biogas (AirLiquid, 47,62 Vol.-% Methan N45, 47,62 Vol.-% Kohlenstoffdioxid N45, Rest Sauerstoff N45) wurden die in Tabelle 3-13 dargestellten Zusammensetzungen erhalten. Der Reaktor wurde vom Leibniz-Institut für Katalyse (LIKAT) bereitgestellt. Das formaldehydhaltige Biogas wurde dann über eine 150 °C beheizte Edelstahlkapillare in 500 ml (vergl. Kapitel 3.9.5) einer vorgelegten Pufferlösung im Druckreaktor geleitet. Mit einem Rührer wurden die Gasblasen bei einer Drehzahl von 1500 rpm für einen besseren Stoffaustausch von der Gasphase in die Flüssigphase zerschert. Im Druckreaktor wurde zudem freie und auf Partikeln immobilisierte FDM vorgelegt und die Temperatur der Pufferlösung über einen Thermostaten bei 37 °C gehalten.

Der Formaldehyd konnte auf diese Weise in der Pufferlösung zu Methanol und Ameisensäure umgesetzt werden. Das Biogas, Formaldehyd und Methanol konnten mittels Massenspektrometrie (vergl. Kapitel 3.2) sowohl in der Pufferlösung als auch im Abluftstrom gemessen werden. Um alle Luftbestandteile aus dem Reaktor zu entfernen, wurde mit Argon gestrippt.

Tabelle 3-13 Umsetzung von synthetischem Biogas (30 Vol.-% Methan N25, Rest synthetische Luft N50) an 25 mg eines Vanadiumkatalysators in Abhängigkeit vom Volumenstrom und der Temperatur [105].

Volumenstrom ml/min	Temperatur °C	CH_4 %	CH_3OH %	CH_2O %	CO %	CO_2 %	H_2O %
400	580	44,5	0,00601	0,397	2,51	47,9	4,73
300	600	44,2	0,00483	0,335	2,69	47,7	5,02

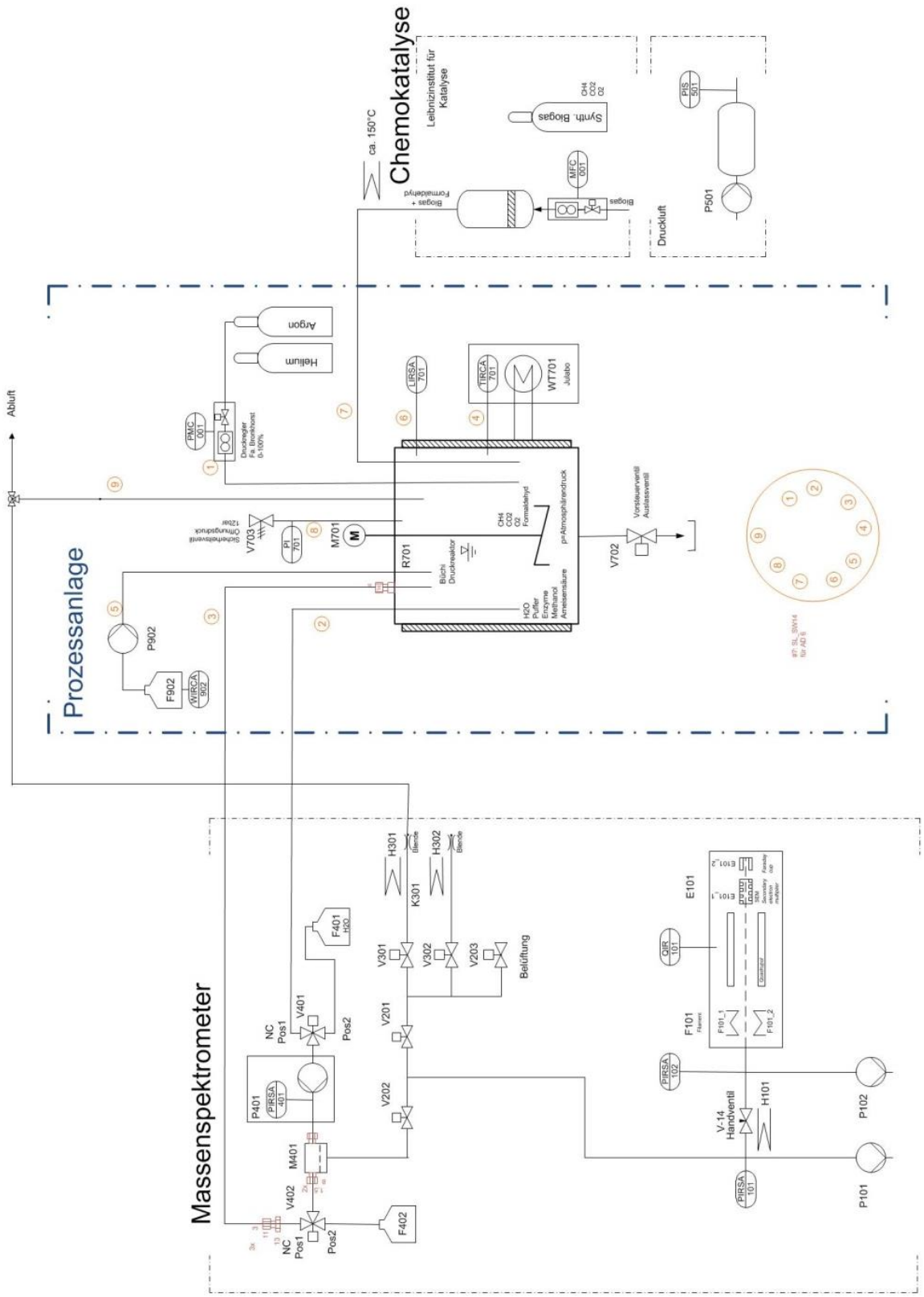


Abbildung 3-32 Pilotanlage zur Herstellung von Methanol und Ameisensäure aus Biogas. *links*: Massenspektrometer zur Bestimmung von Stoffkonzentrationen; *Mitte*: Prozessanlage einschließlich eines Druckreaktors für die enzymatische Umsetzung von Formaldehyd; *rechts*: Gasreaktor zur Umsetzung von Biogas zu Formaldehyd.

3.10 Geräte- und Materialliste

In Tabelle 3-14 sind alle verwendeten Geräte und Materialien zusammengefasst.

Tabelle 3-14 Zusammenfassung aller verwendeten Geräte und Materialien

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Analysenwaage	Satorius AG	Cubis MSA
Analysenwaage	Satorius AG	LP 6200 S
Autoklav	Systec	VX-95
Autoklav	Fedegari Autoclavi Spa	FNR 3924 E
Autoklav	Fedegari Autoclavi Spa	FNR 4409 E
Bioreaktor	DASGIP GmbH	DASGIP®
	Infors HT	
Hochdruckhomogenisator	GEA Niro Soavi	PandaPLUS 2000
HPLC Pumpe	Knauer	P401 (mit Drucksensor)
HPLC Säule	Bio-Rad	Aminex® HPX-87H
HPLC System	Perkin Elmer	Flexar™
Kolbenpumpe	Pharmacia-LKB	Pump P-500
Magnetrührgerät	IKA	IKAMAG® REO
Manometer	unbekannt	-
Membranmodul	unbekannt	-
Membran-Vakuumpumpe	Vacuumbrand GmbH+Co	MZ 2C
Messpipette	Brand	Silberbrand Eterna 5 ml
Messpipette	Brand	Silberbrand Eterna 10 ml
Messpipette	Brand	Silberbrand Eterna 20 ml
Mikropipette	Brand GmbH	Transferpette S 100 µl
Mikropipette	Brand GmbH	Transferpette S 200 µl
Mikropipette	Brand GmbH	Transferpette S 1000 µl
Mikropipette	Gilson	Pipetman P200
Mikroplattenleser	Tecan	Infinite 200 PRO
Mikroskop	ZEISS - West Germany	Axiophot
pH-Elektrode	METTLER TOLEDO	InLab®Semi-Mircro
pH-Messgerät	METROHM	632 pH-Meter

Photometer	Dr Lange	LP 400
Photometer	Scientific-Instruments	Hitachi U-2900
Pipettierhilfe	Brand	Accu-jet® pro
Rührwerk	Heidolph	RZR 2051
Schlauchpumpe	Watson-Marlow	520U
Schlauchpumpe	Watson-Marlow	101U
Sterilbank	Thermo Fisher Scientific	HERA Safe KS18
Tischzentrifuge	Eppendorf	MiniSpin
Ultraschallsonde	Branson	102C (CE)
Vortex-Gerät	Bender & Hobein AG	Vortex Genie 2
Waage	Precisa	8000D-24000 G PAG
Wärme-und Trockenschrank	Thermo Scientific Heraeus	UT 6060
Zahnradpumpe	Gather Industrie GmbH	TMC/24/X-SS
Zentrifuge	Beckmann-Coulter	Avanti J-26-Zentrifuge XP JA-25-50, JA-14, JLA 9.1000
Zentrifuge	Thermo Scientific	Heraeus Multifuge 1 S-R

4 Ergebnisse

Wie in der Zielsetzung beschrieben (vergl. Kapitel 1) erfolgte zunächst die Fermentation von *Pseudomonas putida J3* (vergl. Kapitel 4.1) mit anschließender Herstellung des Rohextrakts (vergl. Kapitel 4.2). Die enzymatische Umsetzung von Formaldehyd zu Methanol und Ameisensäure wurde im Labor und überwiegend in der entwickelten Pilotanlage (vergl. Kapitel 3.9) durchgeführt. Deshalb wurde der verwendete Druckreaktor hinsichtlich seiner Rühreigenschaften charakterisiert (vergl. Kapitel 4.3) und verschiedene Möglichkeiten der Produktabtrennung von Methanol und Ameisensäure untersucht. Letztendlich wurden die Chemokatalyse in die Pilotanlage integriert und Methanol und Ameisensäure aus synthetischem Biogas in der Prozesskaskade hergestellt (vergl. Kapitel 4.7).

4.1 Fermentation zur Herstellung der Formaldehyd-Dismutase

Zur Entwicklung eines Verfahrens auf Basis der Formaldehyd-Dismutase (FDM) muss eine ausreichende Menge an Enzym hergestellt werden. Dies war nicht mit einer Fermentation darstellbar, sondern es mussten mehrere Fermentationen durchgeführt werden. In der Literatur unterscheidet sich die gewonnene Biomasse bezogen auf die Proteinkonzentration und die spezifische Aktivität des aus der Biomasse gewonnenen Rohextraktes sehr voneinander und die Reproduzierbarkeit der Fermentationen konnte nicht gezeigt werden (vergl. Kapitel 2.5).

Ziel war es demnach, möglichst vergleichbare Rohextrakte durch die unterschiedlichen Fermentationen zu erhalten. Deshalb wurde die Formaldehyd-Dismutase sowohl aus dem Wildtyp *Pseudomonas putida J3* als auch rekombinant aus *E. coli* gewonnen. Die Fermentation des Wildtyps erfordert die Anwesenheit von Formaldehyd zur Expression der FDM. In *E. coli* kann die Expression des Enzyms über Induktionsmittel gestartet werden.

Im Multireaktorsystem mit vier parallel laufenden Reaktoren wurden zunächst vier Fermentationen mit unterschiedlichen Substraten im Maßstab von einem Liter durchgeführt (vergl. Kapitel 3.5.4.2). Durch das parallele Fermentieren kann das gleiche Inokulum verwendet und

eine bessere Vergleichbarkeit der Fermentationen erzielt werden. Die verschiedenen Ansätze sind in Abbildung 4-1 dargestellt. Alle Reaktionen wurden im Batchbetrieb gestartet und nach 24 Stunden auf einen semikontinuierlichen Betrieb umgestellt. Der Volumenstrom der jeweiligen Feed-Lösung wurde nach 24, 48 und 170 Stunden unterschiedlich eingestellt.

Im Reaktor 1 (R1) wurde die Batch-Fermentation bei einer Glukosekonzentration von 10 g/l gestartet. Nach 24 Stunden war die Glukose vollständig aufgebraucht und es wurde kontinuierlich eine 15 g/l Formaldehydlösung hinzugegeben und im semikontinuierlichen Betrieb Fermentationsbrühe abgelassen. Um diese Betriebsweise zu ermöglichen wurde nach 24 Stunden die Formaldehydlösung mit einem Volumenstrom von 40 ml/h, nach 48 Stunden mit 5 ml/h und nach170 Stunden mit 2,5 ml/h eingebracht. Die Biomassekonzentration betrug nach der Batchphase lediglich 1,72 g(TM)/l, da es zu einer versehentlichen Verdünnung im Reaktor kam.

Im Reaktor 2 (R2) wurde 1 g/l vorgelegt. Der semikontinuierliche Betrieb erfolgte mit einer formaldehydhaltigen (15 g/l) Glukoselösung (25 g/l). Der Volumenstrom der Feed-Lösung wurde von 80 ml/h auf 10 ml/h und schließlich auf 5 ml/h reduziert.

Im Reaktor 3 (R3) wurde statt Glukose Methanol mit einer Konzentration von 1 g/l für die Batchphase verwendet. Danach erfolgte die Zugabe einer 15 g/l Formaldehydlösung. Der Volumenstrom betrug zunächst 40 ml/h, dann 5 ml/h und schließlich 2,5 ml/h.

In Reaktor 4 (R4) wurde ausschließlich Formaldehyd als C-Quelle verwendet. Zu Beginn der Fermentation wurde eine Konzentration von 1 g/l vorgelegt. Die Feed-Lösung hatte eine Konzentration von 15 g/l. Der Feed-Strom wurde ebenfalls von 40 ml/h auf 5 ml/h und schließlich auf 2,5 ml/h eingestellt.

In den Reaktoren 1 und 2 wurden die größten Ausbeuten an Biomasse erzielt (Abbildung 4-1). Wegen des Glukose-Feeds im anschließenden semikontinuierlichen Betrieb wurde für Reaktor 2 ein höheres Zellwachstum erwartet und der Volumenstrom deshalb im Vergleich zu den anderen Reaktoren verdoppelt. Nach 142 Stunden kam es im Reaktor 2 zum Auswaschen der Biomasse. Mit halbierter Fütterungsrate konnte das weitere Auswaschen der Biomasse verhindert werden. Reaktor 3 und Reaktor 4 zeigten erwartungsgemäß ein geringes Wachstum.

Die Zugabe von Methanol führte zu einem geringeren Wachstum im Vergleich zur alleinigen Formaldehydzugabe.

Die Herstellung des Rohextrakts erfolgte, wie in Kapitel 3.6 beschrieben. Der Rohextrakt aus R2 zeigte nach 142 h Fermentationszeit die größte spezifische Formaldehyd-Dismutase-Aktivität von 30 U/mg bis 42 U/mg (Abbildung 4-2). Die großen Unterschiede der spezifischen Aktivitäten spiegeln die Problematik der anfangs erwähnten Reproduzierbarkeit wieder.

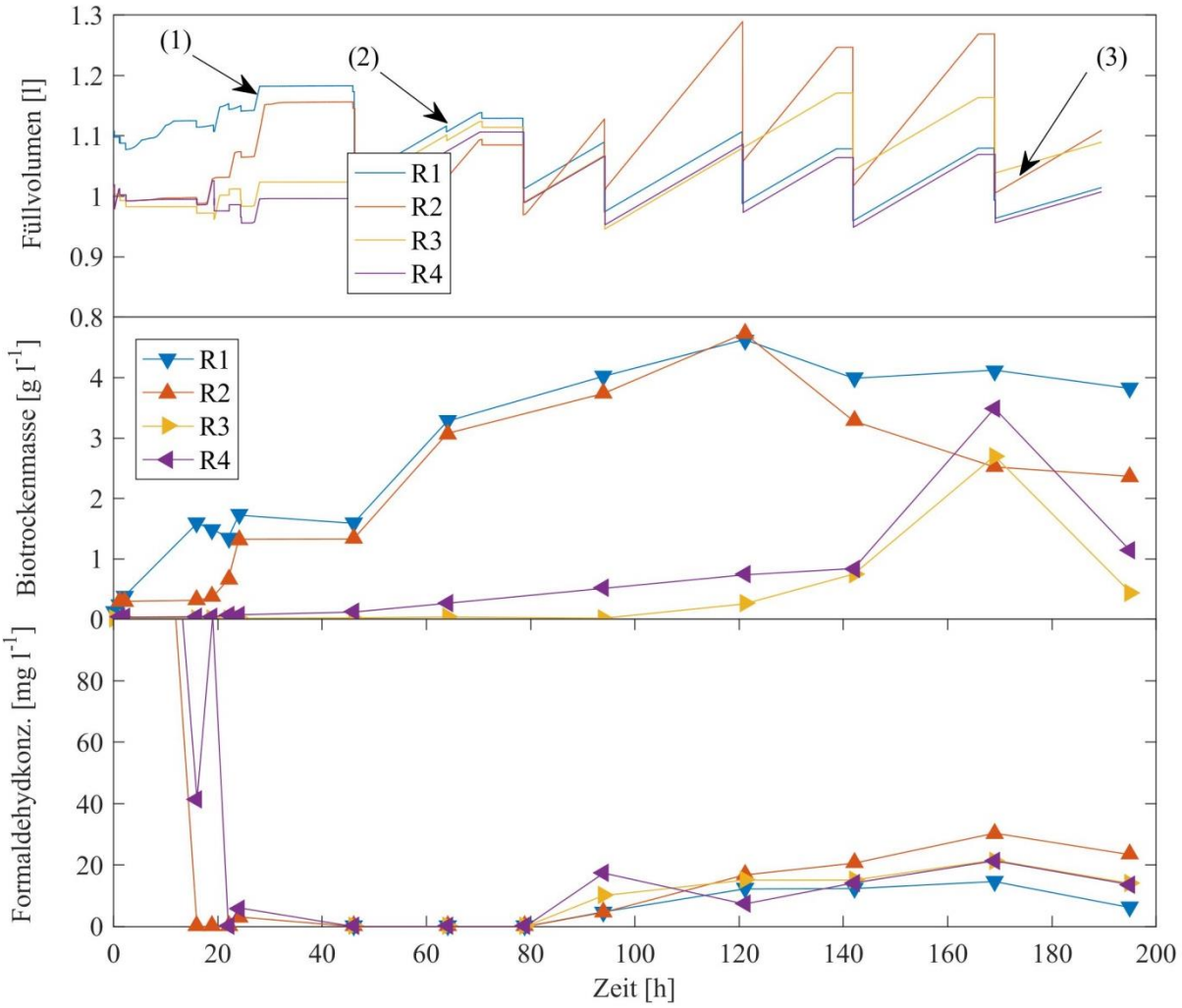


Abbildung 4-1 Vergleich von vier Fermentationsverfahren. Reaktor 1 mit Glukose (10 g/l) als Vorlage und Umstellung auf Fed Batch Betrieb mit Formaldehyd-Feed (15 g/l) nach 48 Stunden. Reaktor 2 mit Glukose als Vorlage (1 g/l) und Umstellung auf Fed Batch mit Formaldehyd/Glukose-Feed zur gleichen Zeit. Reaktor 3 mit Methanol (1 g/l) als Vorlage und Formaldehyd-Feed und Reaktor 4 mit ausschließlicher Kultivierung auf Formaldehyd. Der semikontinuierliche Betrieb wurde zu den eingezeichneten Zeitpunkten wie folgt angepasst:
(1) R1 = 40 ml/h, R2 = 80 ml/h, R3 = 40 ml/h, R4 = 40 ml/h
(2) R1 = 5 ml/h, R2 = 10 ml/h, R3 = 5 ml/h, R4 = 5 ml/h
(3) R1 = 2,5 ml/h, R2 = 5 ml/h, R3 = 2,5 ml/h,R4 = 2,5 ml/h

Formaldehyd wirkt sich auf das bakterielle Wachstum aus und erschwert die Steuerung des Fermentationsverlaufs. Das Einstellen einer konstanten Formaldehydkonzentration im Fermenter kann sich also negativ auf die Bakterien und deren Wachstum auswirken. Da die Formaldehydkonzentration im Reaktionsmedium nicht in Echtzeit messbar ist und es zur Hemmung des Stoffwechsels der Bakterien kommen kann, besteht die Gefahr der Überdosierung an Formaldehyd. Zudem kann Formaldehyd nur als wässrige Lösung hinzugegeben werden und es kam, wie beschrieben, zum Auswaschen der Bakterien aus dem Reaktor.

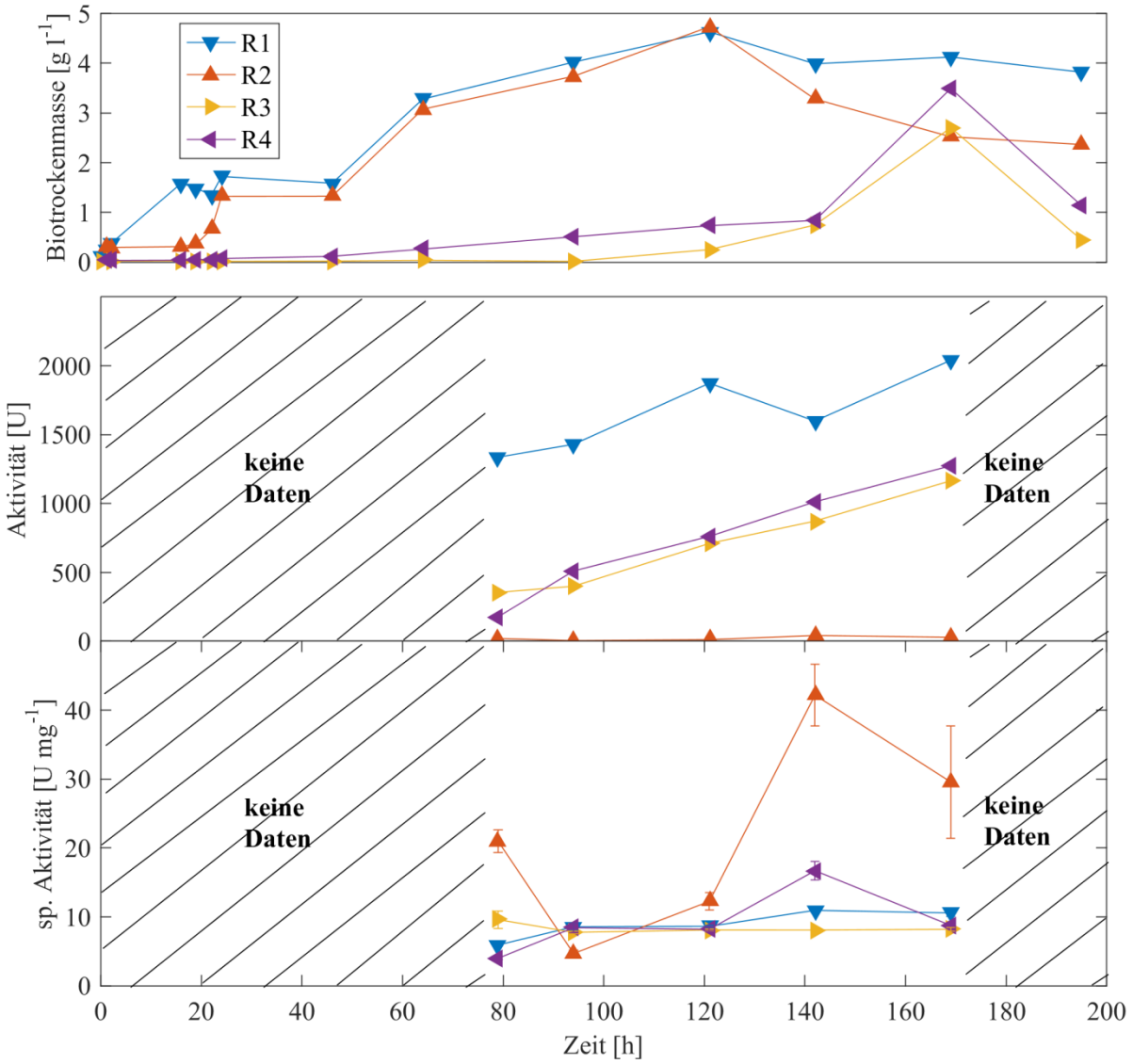


Abbildung 4-2 Biotrockenmasse, FDM-Aktivität und spezifische FDM-Aktivität in Abhängigkeit von der Fermentationszeit.

Eine Alternative besteht in der diskontinuierlichen Zugabe von Formaldehyd. Dabei wird eine bestimmte Formaldehydkonzentration im Fermenter eingestellt und mit der nächsten Zugabe bis zur gänzlichen Zehrung des Formaldehyds abgewartet. Eine Möglichkeit, diese Fütterung automatisiert ablaufen zu lassen, bietet die Nutzung der Gelöstsauerstoffkonzentration als Regelparameter. Die Vorlage von Glukose (20 g/l) im Batchverfahren bis zu einer Trockenbiomassekonzentration von 15 g/l mit anschließender Umstellung auf Fed-Batch-Betrieb und Fütterung mit Formaldehyd (50 g/l) als alleiniger C-Quelle mittels Feed-Regelung über die Gelöstsauerstoffkonzentration ist in Abbildung 4-3 dargestellt.

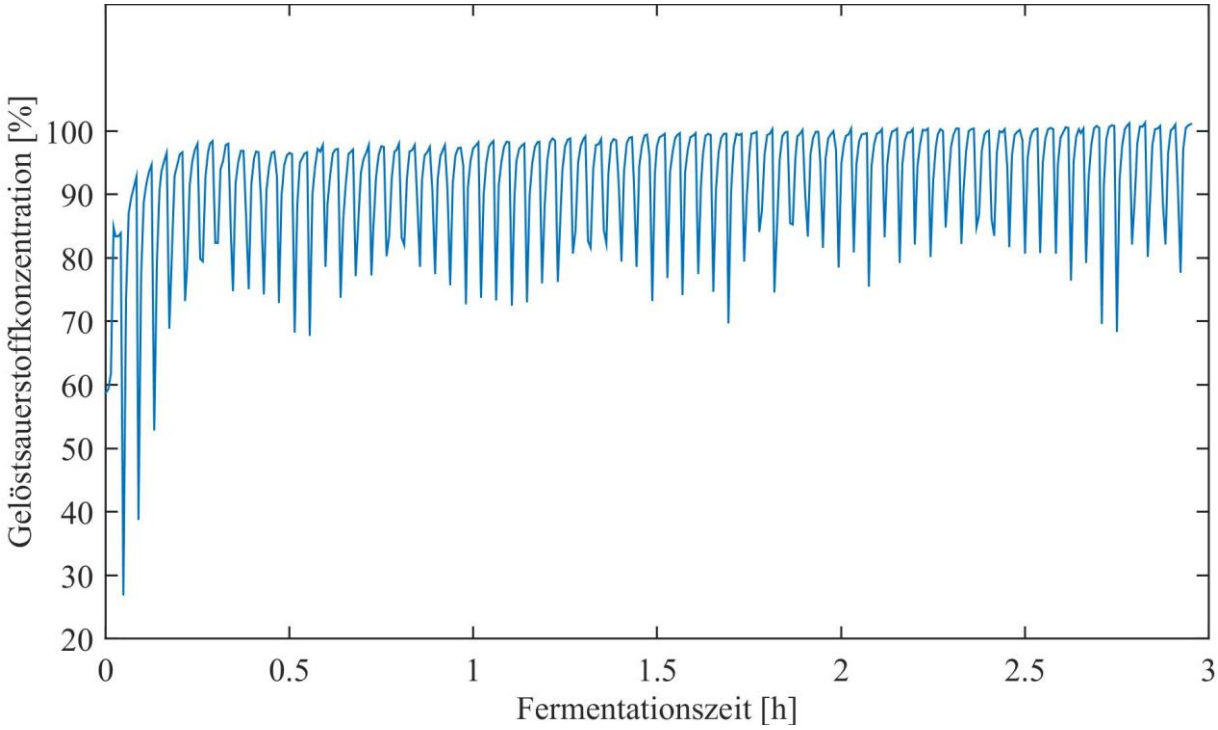


Abbildung 4-3 Fermentation von *Pseudomonas putida J3* im Fed-Batch Betrieb mittels Feed-Regelung der Formaldehyd-Dosierung über die Gelöstsauerstoffkonzentration.

Nach Zugabe des Formaldehyds sank die Gelöstsauerstoffkonzentration rapide ab. Wurde das Formaldehyd verstoffwechselt, erreichte die Gelöstsauerstoffkonzentration ihren Maximalwert und Formaldehyd wurde erneut hinzugegeben. Tabelle 4-1 zeigt die Proteinausbeuten und die spezifischen FDM-Aktivitäten aus den Fermentationen des Wildtyps mit dieser Technik. Die Fermentationen mittels Feed-Regelung über die Gelöstsauerstoffkonzentration liefern, wie an der spezifischen Aktivität (15 U/mg bis 20 U/mg nach 70 h) in Tabelle 4-1 zu sehen ist, ein reproduzierbares Ergebnis.

Tabelle 4-1 Vergleich der FDM-Aktivität nach Aufschluss mittels Hochdruckhomogenisation und Lyophilisierung der Biomasse aus verschiedenen Fermentationen von *Pseudomonas putida J3* mit Feed-Regelung der Formaldehyd-Dosierung über die Gelöstsauerstoffkonzentration.

Getrocknetes Lysat	Datum des Ansatzes	Proteinanteil [µg/mg]	Enzymaktivität [U/mg]
P. putida J3	15.10.12	31,41	19,29
P. putida J3	19.10.12	92,34	15,42
P. putida J3	26.10.12	149,36	14,63

Tabelle 4-2 Vergleich verschiedener Stämme und Fermentationsbedingungen auf FDM-Aktivität [106][107].

Lysat	His-Tag	Maßstab	Ausschluss Methode	Protein-konz. [mg/ml]	Enzymaktivität [U/mg]
E. coli JM109-PJOE-J3	-	Kolben	Ultraschall, zentrifugiert	3,77	11,33
E. coli JM109 PJOE-J3 (03.12.13)	-	Kolben	Ultraschall, zentrifugiert	1,41	*verfügbare Menge zu gering
E. coli JM109-PJOE-F61-His	X	Kolben	Ultraschall, zentrifugiert	1,03	37,53
E. coli JM109-PJOE-F61-His	X	Kolben	Ultraschall, zentrifugiert, filtriert	0,97	29,34
E. coli J3 (12.02.14)	-	Reaktor (30 Liter)	Homogenisator, zentrifugiert	13,07	26,15
E. coli J3 His-Tag (07.05.14)	X	Reaktor (30 Liter)	Homogenisator, zentrifugiert	9,86	17,45
P. putida J3 (15.10.12)	-	Reaktor (10 Liter)	Homogenisator, zentrifugiert	31,41	19,29
P. putida J3 (19.10.12)	-	Reaktor (10 Liter)	Homogenisator, zentrifugiert	92,34	15,42
P. putida J3 (26.10.12)	-	Reaktor (10 Liter)	Homogenisator, zentrifugiert	149,36	14,63

Die spezifische Aktivität der Biomasse aus der Fermentation im Reaktor 2 (Abbildung 4-2) ist im Vergleich zu diesen Ergebnissen größer. In Reaktor 2 wurde auch kontinuierlich Formaldehyd hinzugegeben. Ab acht Stunden bis sechzehn Stunden Fermentationszeit wurde durch die pH-Regelung kontinuierlich 17 ml/h einer 0,5 M Natronlaugelösung hinzugegeben. Vier Stunden später wurde schlagartig mit Säure gegengeregelt. Die Menge an Säure konnte wegen einer Fehlfunktion der Schlauchpumpe nicht bestimmt werden. Dieses Verhalten der pH-Regelung lässt auf die Bildung mit anschließender Verstoffwechselung von Ameisensäure schließen, was auch die stetige Zunahme der Proteinkonzentration in Tabelle 4-1 erklärt.

Die Gefahrenstufe der *Pseudomonas sp*. wurde im Jahre 2012 mit L2 neu eingeordnet, womit durch verschärfte Sicherheitsauflagen die Fermentationsbedingungen erschwert wurden. Neben der Fermentation des Wildtyps wurde auch ein rekombinanter Stamm als Enzymquelle verwendet. Die Entwicklung eines rekombinanten Stammes zur Herstellung der Formaldehyd-Dismutase erfolgte in der Abteilung Molekulare Biotechnologie (MBT) des Fraunhofer-Instituts für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik (IGB) [108][106]. Die rekombinante Formaldehyd-Dismutase wurde in der Masterarbeit von Christina Werkmeister [107] und der Doktorarbeit von Lisa Blaschke entwickelt [109]. Hierfür wurden die Formaldehyd-Dismutasen von *Pseudomonas putida J3* (IGB-eigener Stamm) und JCM9045 (=F61; Patent EP2239322A1) heterolog in IPTG-induzierbare *E. coli* Expressionssysteme exprimiert. In Tabelle 4-2 sind die *E.coli*-Stämme aus diesen Arbeiten aufgeführt.

In Untersuchungen in der Masterarbeit von Christina Werkmeister zur Lagerstabilität und Konservierung der Enzymaktivität im Hinblick auf eine großtechnische Herstellung wurde gezeigt, dass die Dismutase-Aktivität im Rohextrakt der *E. coli*-Stämme bei einer Lagertemperatur von 4 °C und -20 °C mindestens 8 Wochen stabil blieb [107].

4.2 Herstellung eines FDM-Rohextrakts

Wie im letzten Kapitel beschrieben, wurden zwei Expressionssysteme, der Wildtyp *P. putida J3* und rekombinant aus *E.coli,* verwendet. In diesem Kapitel werden die Ergebnisse unterschiedlicher Aufschlussmethoden, sowohl zur Herstellung kleiner als auch großer Mengen, gezeigt und gegenübergestellt (vergl. Kapitel 4.2.1). Neben der Herstellung einer großen

Menge Rohextrakt, mit möglichst vergleichbarer Qualität bezogen auf die FDM Aktivität, sollte die Enzymlösung auch in eine lagerfähige Form gebracht werden, damit für nachfolgende Versuche, wie beispielsweise die Enzymimmobilisierung, auch nach größeren Zeitabständen immer auf das gleiche Enzympräparat zurückgegriffen werden konnte. Zur Herstellung haltbarerer Pulver wurden zwei Trocknungsverfahren untersucht (vergl. Kapitel 4.2.2).

4.2.1 Zellaufschluss

Maßgeblichen Einfluss auf die Qualität des Rohextrakts bezüglich der spezifischen Aktivität hat der Zellaufschluss, da hierbei je nach Aufschlussmethode Druck, Kavitation oder/und Temperatur zur Denaturierung der Enzyme führen können. Zudem wurden verschiedene Aufschlussverfahren bei unterschiedlichen Volumina eingesetzt. Aus diesen Gründen wurde sowohl der Aufschluss mittels Ultraschall für kleine Proben als auch der Aufschluss mittels Hochdruckhomogenisation für große Mengen Biomasse untersucht. Der Zellaufschluss erfolgte wie in Kapitel 3.6 und nachfolgend beschrieben.

4.2.1.1 Aufschluss von P. putida sp. mittels Ultraschall

Ausschlaggebend für einen erfolgreichen Aufschluss ist die Zerstörung der Zellwand unter Erhalt der enzymatischen Aktivität. Der Aufschlusserfolg wurde nach jedem Zyklus am Mikroskop beobachtet (Tabelle 4-3).

Tabelle 4-3 Bewertung des Aufschlusserfolgs durch Variation des Leistungseintrags und der Beschallungszeit mittels mikroskopischer Aufnahmen.

Stufe	Intervall	Beschallungszeit	Aufschluss
1	100 %	4 min	Nein
3,5	100 %	4 min	Nein
3,5	100 %	10 min	Nein
7	100 %	4 min	Ja

Erst bei einer Amplitude von etwa 60 % (Stufe 7) erfolgt ein Aufschluss der Zellen. Um eine Inaktivierung des Enzyms durch die mit dem Leistungseintrag verbundene Wärmeentwicklung zu verhindern, ist eine Kühlung der aufzuschließenden Probe in Eiswasser notwendig und ein Intervall von höchstens 50 % einzustellen, d.h. 2 s Pause nach einer Beschallung von 2 s. Für eine weitere Optimierung wurde die Beschallungszeit variiert (Abbildung 4-4). Nach

dem Aufschluss wurde die Proteinkonzentration dreifach bestimmt. Die Zelltrümmer wurden bei 3000 rpm 10 min lang abzentrifugiert und der Überstand in 25 ml Bechergläsern auf einer Multirührerplatte auf FDM-Aktivität getestet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml gepufferter (0,5 M PP) Formaldehydlösung (15 g/l) gestartet. Nach definierten Reaktionszeiten wurden Proben genommen und die Formaldehyd-Konzentrationen mittels Hach Lange Küvetten-Test (vergl. Kapitel 3.1.2) bestimmt. Die größte spezifische Aktivität wurde nach 90 s Beschallungszeit gemessen. Bei längeren Beschallungszeiten wurde trotz steigender Proteinkonzentration keine Zunahme der FDM-Aktivität festgestellt.

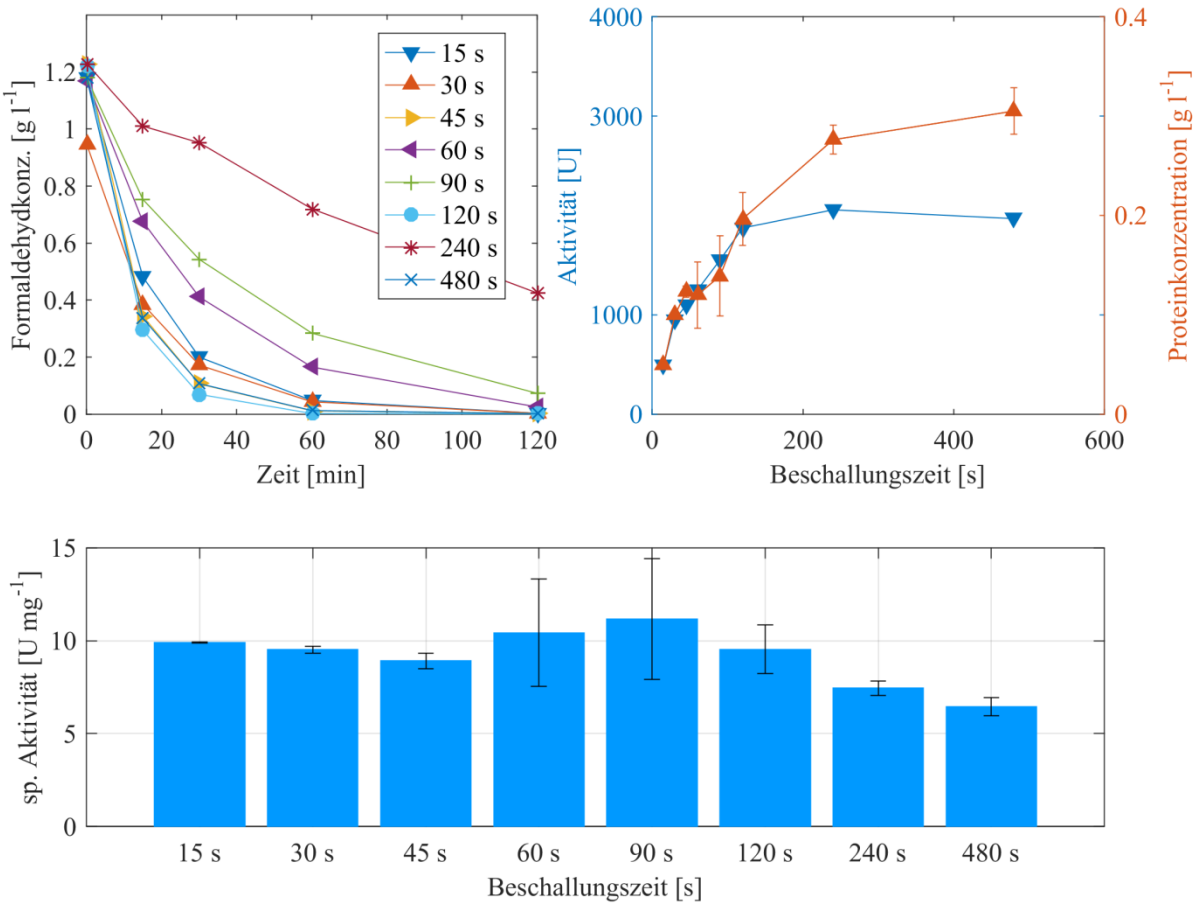


Abbildung 4-4 Optimierung des Zellaufschlusses von *P. putida sp*. mittels Ultraschall bei einer Amplitude von 60 % und einem Intervall von 50 %. *Links oben:* Abnahme der Formaldehydkonzentration in Enzym-Rohextrakten nach unterschiedlicher Ultraschall-Beschallungszeit. *Rechts oben:* FDM-Aktivität und Proteinkonzentration im Überstand in Abhängigkeit von der Beschallungszeit. *Unten:* spezifische FDM-Aktivität in Abhängigkeit von der Beschallungszeit.

4.2.1.2 Aufschluss von P. putida sp. und E.coli mittels Hochdruckhomogenisator

Der Aufschluss mittels Hochdruckhomogenisator ist in Kapitel 3.6 beschrieben. Nach jeder Passage wurden die Proteinkonzentration und die spezifische Aktivität bestimmt (Abbildung 4-5). Die Aktivitäten und Proteinkonzentrationen von *P. putida* und *E.coli* unterscheiden sich erheblich, da zum einen nicht die gleiche Biomassekonzentration eingesetzt wurde und es sich zum anderen um völlig unterschiedliche Expressionssysteme handelt. Von wesentlichem Interesse war die Bestimmung der optimalen Passagenzahl. Im Fall von *P. putida* nahm die spezifische Aktivität des Rohextrakts mit steigender Passagenzahl nach der zweiten Passage ab. Bei der Hochdruckhomogenisation von *E.coli* konnte keine Abnahme der Aktivität mit zunehmender Passagenzahl festgestellt werden.

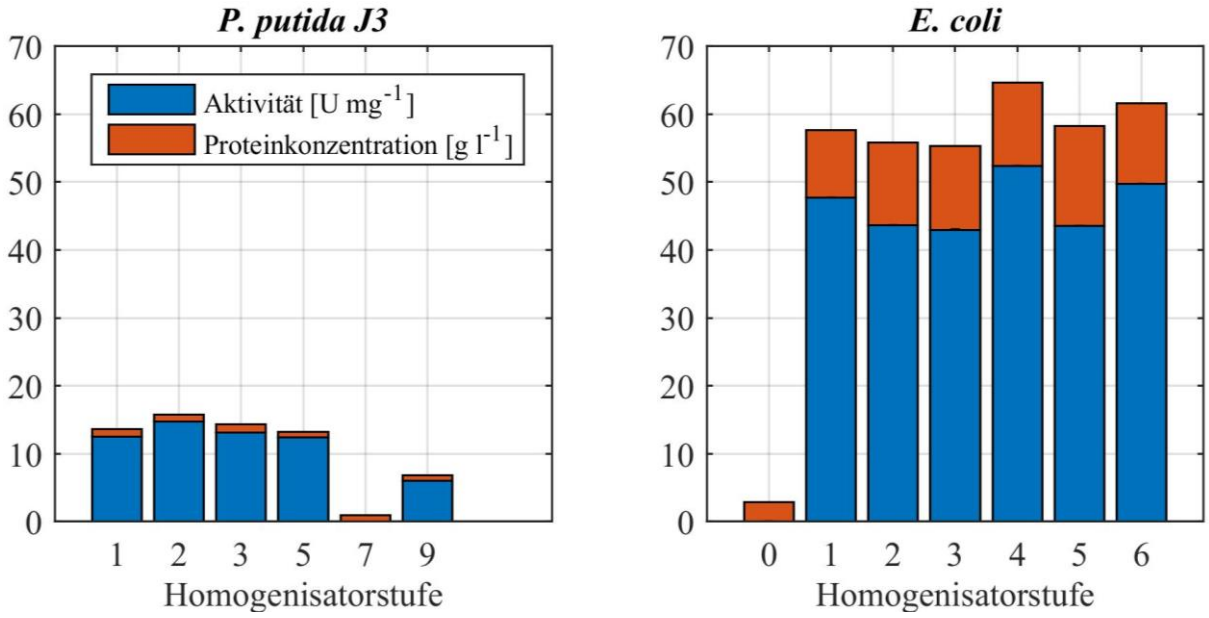


Abbildung 4-5 Zellaufschluss von *P. putida* und *E. coli* mittels Hochdruckhomogenisation bei 1500 bar über mehrere Passagen. Dargestellt sind die Proteinkonzentration und die spezifische Aktivität der FDM zur Quantifizierung des Aufschlusserfolgs.

4.2.2 Trocknung des Rohextrakts

Die Überführung eines Enzympräparats nach einem Zellaufschluss, wie das oben beschriebene Verfahren der Hochdruckhomogenisation, in eine haltbare Form besteht in der Trocknung des Enzyms zu einem Pulver. Hierbei besteht, wie auch schon bei dem Zellaufschluss, die Gefahr der Denaturierung des Enzyms. Zur Trocknung von Enzymlösungen werden technisch im Wesentlichen zwei Verfahren eingesetzt. Für große Produktströme wird in industriellen

Verfahren die Sprühtrocknung (vergl. Kapitel 4.2.2.2) eingesetzt. Dabei werden die Enzyme kurzzeitig Temperaturen bis zu 140 °C ausgesetzt, so dass es im Regelfall zu Verlusten an aktiven Enzymen kommt. Eine schonendere Methode, für beispielsweise temperaturempfindliche Enzyme, ist die sogenannte Lyophilisierung (Gefriertrocknung), bei der mit sehr niedrigen Temperaturen von bis zu -120 °C gearbeitet wird.

4.2.2.1 Lyophilisierung

Rohextrakte, sowohl aus dem Wildtyp als auch aus *E. coli*, wurden gefriergetrocknet. Der Extrakt wurde unter ständigem Rotieren in einem 250 ml Rundkolben mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und ein Vakuum von 5 mbar angelegt.

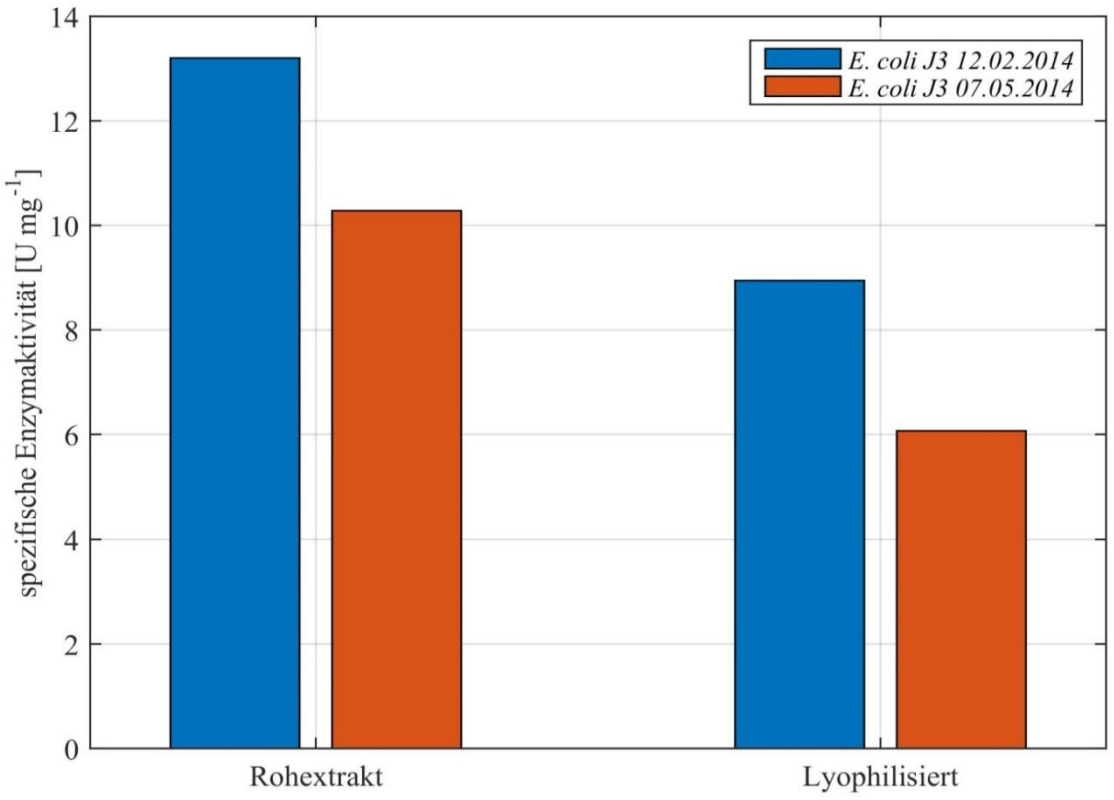


Abbildung 4-6 Lyophilisierung von *E. coli* Lysat mit (*E. coli J3* 07.05.2014) und ohne Tag (*E. coli J3* 12.02.2014).

Aus 10 ml-Rohextrakt wurden ca. 20 mg Lyophilisat hergestellt. Die Aktivität vor der Lyophilisation betrug 29 U/mL ± 1,1 U/mL und nach der Gefriertrocknung und Lösung in 0,5 M Puffer 34,7 U/mL ± 1,0 U/mL. Die volumetrische Aktivität (vergl. Kapitel 3.4) nach der Gefriertrocknung war größer als im Rohextrakt. Demnach ist es möglich, die Aktivität unvermindert zu erhalten. Allerdings kann es bei der Lyophilisierung durch den Umgang mit gro-

ßen Mengen auch zu einer Aktivitätsverminderung kommen. Die Lyophilisierung von *E. coli* ohne und mit His-Tag zeigten eine Verringerung der Aktivität bis zu 40 % (Abbildung 4-6). Der His-Tag hat keinen Einfluss auf Erhalt oder Verminderung der Aktivität nach der Gefriertrocknung, wie anhand der Balken und dem Verhältnis zueinander in Abbildung 4-6 zu erkennen ist. Die Ursache dafür liegt an der Temperatur der gefrorenen Probe zu Beginn der Lyophilisierung und der Qualität des Vakuums, das beispielsweise durch angetautes Lysat an der Oberfläche kurzzeitig verschlechtert wird.

4.2.2.2 Sprühtrocknung

Bei den Versuchen zur Sprühtrocknung wurde die Temperaturdifferenz zwischen Sprühkopf und Luftstromausgang variiert. Die ursprüngliche FDM-Aktivität des Lysats betrug 49,46 U/mg. Die Aktivität nach dem Sprühtrocken lag um durchschnittlich 66 % niedriger.

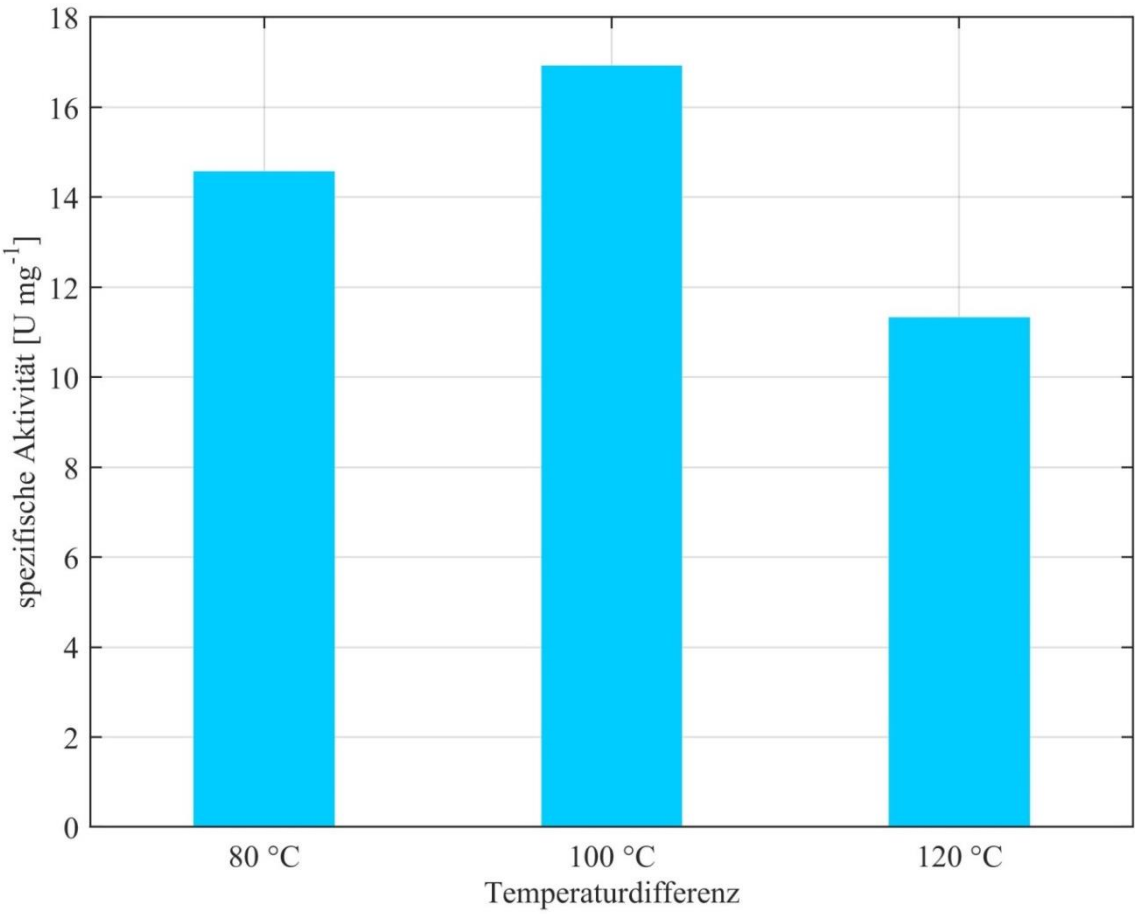


Abbildung 4-7 Spezifische Aktivität nach Trocknung eines *E. coli Lysats* mittels Sprühtrockner und Variation der Temperaturdifferenz zwischen Sprühkopf und Luftstromausgang. Die ursprüngliche FDM-Aktivität des Lysats betrug 49,46 U/mg.

Bei der größten Temperaturdifferenz von 120 °C entstand der größte Verlust an Enzymaktivität (Abbildung 4-7).

4.3 Rührreaktorcharakteristik

Der Ansatz dieser Arbeit besteht darin, die Reproduzierbarkeit der enzymatischen Reaktion zu erhalten, damit die Reaktion bestmöglich in einem mathematischen Modell abgebildet werden kann (vergl. Kapitel 2). In den vorangegangenen Kapiteln wurde beschrieben, wie von biologischer Seite bereits bei der Fermentation bis hin zur Gewinnung eines Enzympulvers negative Einflussgrößen auf die Aktivität minimiert oder beseitigt werden können. Damit ist der Teil der Einflussgrößen abgeschlossen, der die Enzymbereitstellung betrifft. Als nächstes wurden Untersuchungen getätigt, die sich mit den verfahrenstechnischen Rahmenbedingungen befassen.

Die enzymatische Reaktion ist maßgeblich abhängig von der Temperatur, der Substrat- und, wie später noch gezeigt wird, von der Produktkonzentration (vergl. Kapitel 4.4.4). In einem Reaktor kann es durch schlechte Durchmischung zu Temperatur- und Stoffkonzentrationsgradienten kommen. Dadurch ist zum einen die Aktivität der Enzyme im Reaktor nicht an jeder Stelle gleich und zum anderen geben Messgeräte nicht den tatsächlichen Zustand im Reaktor wieder. Rührkessel werden aus diesem Grund stets unter Beachtung geometrischer Maße ausgelegt. Für dieses Vorhaben wurde ein spezieller Reaktor ausgelegt, der sowohl als Rührkessel, als auch als Festbettreaktor oder Rieselbettreaktor betrieben werden kann (vergl. 3.9.5.1).

Um die Enzymreaktion in Echtzeit mittels Massenspektrometrie aufzeichnen zu können, ist es notwendig, die Homogenisierungseigenschaften des speziell angefertigten Rührreaktors zu kennen. Durch die Messung des Drehmoments an der Rührerwelle kann der Leistungseintrag und damit die Strömung im Reaktor berechnet werden (vergl. Kapitel 4.3.1.) Idealerweise stellt sich eine turbulente Strömung ein. Bei turbulenter Strömung ist die Mischzeit (vergl. Kapitel 4.3.2) zur Erreichung einer homogenen Lösung am kürzesten.

4.3.1 Leistungscharakteristik

Mit den Gleichungen (3.26) und (3.31) lassen sich aus dem Drehmoment die Ne-Zahl und nach Gleichung (3.32) mit der jeweiligen Drehzahl die Re-Zahl berechnen (vergl. Kapitel 3.9.5). Gegeneinander aufgetragen kann die in Abbildung 4-8 dargestellte Leistungscharakteristik dargestellt werden. Im Vergleich sind gängige Rührkessel dargestellt [110]. Ab einer Drehzahl von 1500 rpm bei einem Füllvolumen von einem Liter ist der Übergangsbereich erreicht. Der turbulente Bereich kann mit diesem Füllvolumen nicht erreicht werden. Das liegt an dem verwendeten Stromstörer. Hierbei handelt es sich um eine in der Mitte des Reaktors eingebracht Platte. Die Platte ist lediglich 5 cm hoch. Über der Füllstandsmarke von 400 ml endet die Platte.

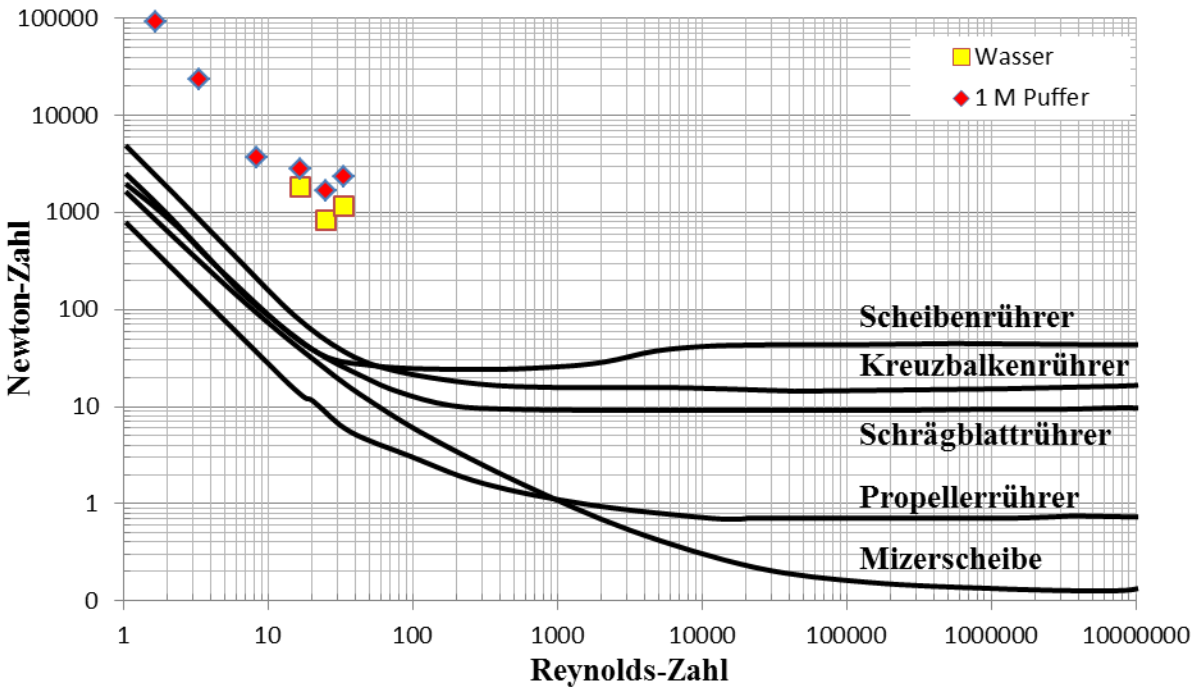


Abbildung 4-8 Leistungscharakteristik des Druckreaktors im Vergleich zu standardisierten Rührkesseln [110].

4.3.2 Mischzeit

Die Bestimmung der Mischzeiten wurde im Druckreaktor mit einem Füllvolumen von einem Liter durchgeführt. Dabei wurden die in Abbildung 4-9 dargestellten Verläufe erzielt. Die längste Mischzeit betrug 110 Sekunden bei einer Umdrehungszahl von 50 rpm.

Zur Bestimmung der Mischzeitcharakteristik werden mehrere Kennzahlen verwendet. Eine wichtige Kennzahl ergibt sich mit dem Produkt aus Mischzeit und Drehzahl:

$$K_1 = \theta\, n \qquad (4.1)$$

K_1 ist dabei abhängig von den im Rührkessel erzeugten Strömungen, also von der Re-Zahl. Trägt man K_1 als Funktion der Re-Zahl auf, so ergeben sich für verschiedene Rührertypen charakteristische Verläufe (Abbildung 4-10). Die Mischzeitcharakteristik des Druckreaktors mit einem 4-Blatt-Scheibenrührer liegt außerhalb der gängigen Misch-Eigenschaften von üblichen Rührkesseln und ist vergleichbar mit der Charakteristik von Wendel- oder Schneckenrührern.

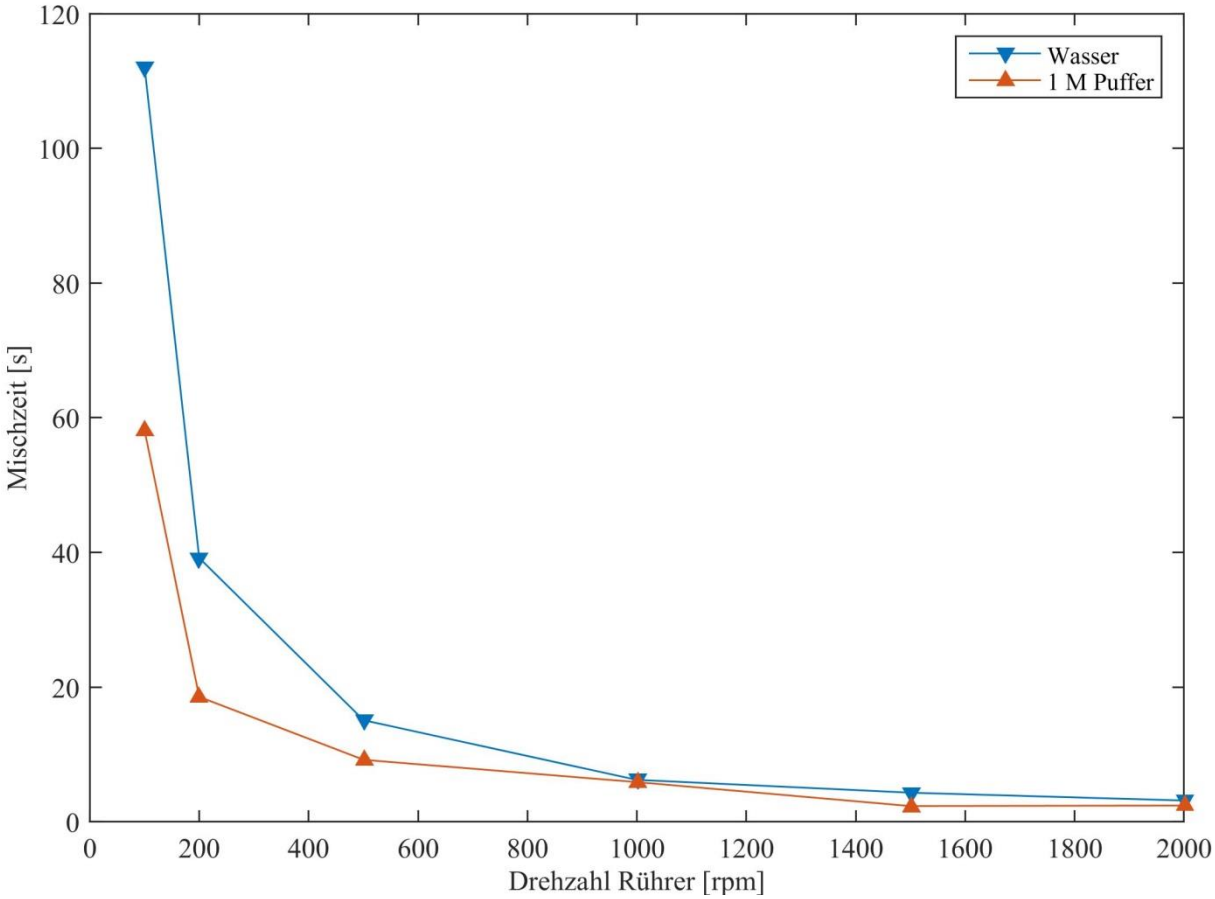


Abbildung 4-9 Mischzeit in Abhängigkeit der Rührerdrehzahl für 1 Liter-Füllvolumen im Druckreaktor.

Optimierte Bedingungen sind gegeben, wenn der Rührprozess mit kleinster Mischarbeit $P\theta$ [Ws] zur Erreichung einer maximalen Mischgüte durchgeführt werden kann. Dabei sind die Stoffeigenschaften wesentlich und es können zwei Kennzahlen definiert werden:

$$\Pi_1 = \frac{P\ D\ \rho^2}{n^3 d^5} \tag{4.2}$$

$$\Pi_2 = \frac{\theta\ \mu}{D^2 \rho} \tag{4.3}$$

Zur Rührercharakterisierung werden diese beiden Kennzahlen gegeneinander aufgetragen und man erhält das sogenannte Zlokarnik-Diagramm.

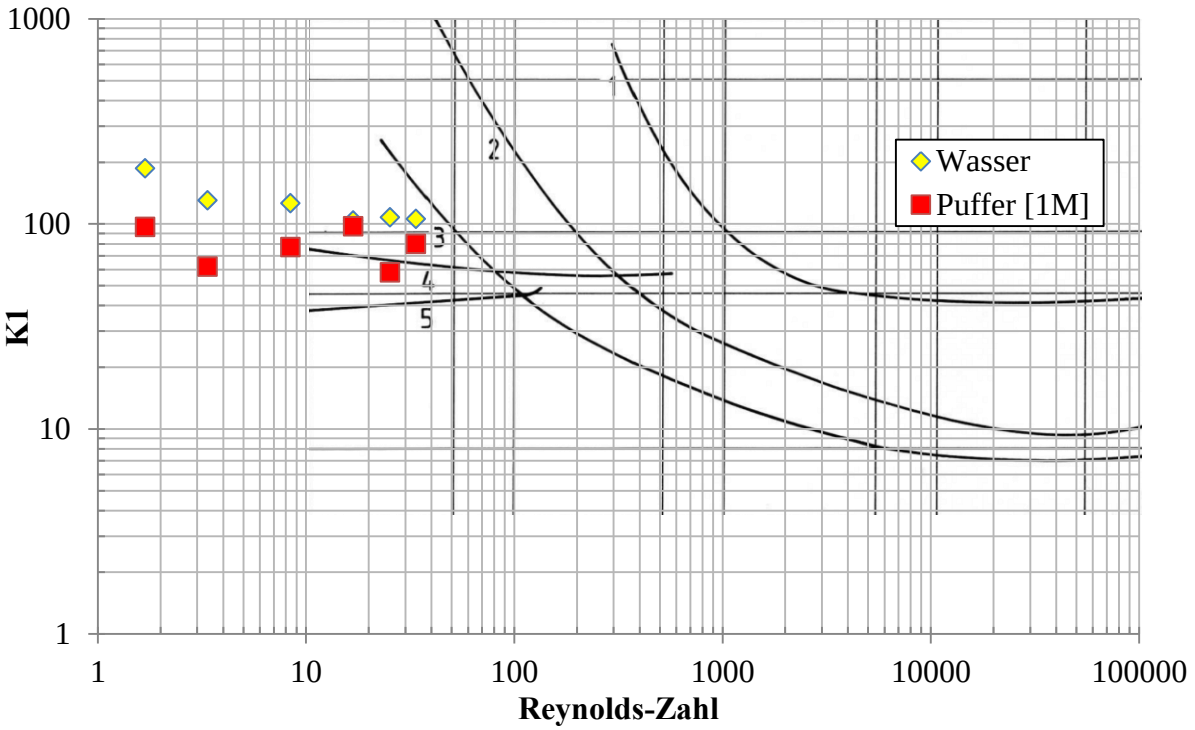


Abbildung 4-10 Mischzeit-Charakteristik im Druckreaktor mittels 4-Blatt-Scheibenrührer für Wasser und Puffer im Vergleich zu standardisierten Rührertypen [110]. 1 Ankerrührer, 2 Scheibenrührer mit vier Stromstörern, 3 Kreuzbalkenrührer vierstufig mit vier Stromstörern, 4 Wendelrührer d/D=8,95, 5 Schneckenrührer d/D=8,52 mit Leitrohr.

Für den laminaren und turbulenten Bereich lassen sich weitere Kennzahlen herleiten:

$$K_O = \frac{P\ \theta^3}{\rho\ D^5} (turbulent) \tag{4.4}$$

$$K_W = \frac{P\ \theta^2}{\mu\ D^3} (laminar) \tag{4.5}$$

Für den vollturbulenten Bereich gilt für viele Rührer $K_O \approx 300$, was günstigen Homogenisierungsbedingungen entspricht. Analog wird $K_W \approx 5{,}8 \cdot 10^5$ für den laminaren Bereich angegeben. Mit der laminaren Strömung im Druckreaktor wird bei höchster Drehzahl von 2000 rpm ein $K_W = 1{,}35 \cdot 10^4$ erreicht. Demnach ist die Durchmischung mit einem Füllvo-

lumen von 1 l nicht optimal. Aus diesem Grund sollten die im Reaktor durchgeführten Versuche mit einem maximalen Volumen von 500 ml durchgeführt werden.

4.4 Enzymatische Umsetzung von Formaldehyd

In den Kapiteln 4.1 bis 4.3 wurde aufgezeigt, wie die Bereitstellung des Rohextrakts als auch die Charakterisierung des Rührkessels erfolgten, um im gesamten Versuchszeitraum möglichst reproduzierbare Daten zu erhalten. Auf Basis der vorangegangenen Erkenntnisse war es möglich, sich dem zentralen Thema der Doktorarbeit „enzymatischen Umsetzung von Formaldehyd“ zu widmen, was nachfolgend beschrieben wird. Die Umsetzung erfolgte sowohl mit frei gelösten Enzymen (vergl. Kapitel 4.4.1) als auch mit immobilisierter FDM aus dem Rohextrakt (vergl. Kapitel 4.4.5).

Für die Prozessentwicklung und einen späteren Prozess muss die Reaktion bzw. die Reaktionsgeschwindigkeit unter bestimmten Bedingungen vorhersehbar sein. Dies ist nur über die Abbildung der Reaktion mit einem mathematischen Modell möglich. Die gängige Gleichung in der Enzymtechnik ist die Michaelis-Menten-Gleichung, die für die Beschreibung der FDM-Reaktion herangezogen (vergl. Kapitel 4.4.2.1) und unter Berücksichtigung der Eigenschaften der FDM hergeleitet wurde (vergl. Kapitel 4.4.2.3). Die Bestimmung der Parameter der Michaelis-Menten-Gleichung erfolgte anhand der Messdaten aus den FDM-Reaktionen unter optimierten Bedingungen und im Fall der FDM erstmals mittels nichtlinearer Regression. Das Modell konnte dann wiederum zur Bewertung der FDM-Reaktion unter besonderen Gegebenheiten, wie beispielsweise bei einem Reaktordruck von 10 bar und dem Vergleich von frei gelöstem Enzym, herangezogen werden (vergl. Kapitel 4.4.1). Zudem lieferte das Modell den Hinweis auf eine Produktinhibierung, die in weiterführenden Untersuchungen genauer beschrieben werden konnte (vergl. Kapitel 4.4.3.2). Die Erkenntnis über die Produktinhibierung führte zur Entwicklung einer kontinuierlichen Umsetzung von Formaldehyd durch Immobilisierung der FDM (vergl. Kapitel 4.4.5). Zudem konnte damit auch ein Vergleich von frei gelöstem und immobilisiertem Enzym bewerkstelligt werden (vergl. Kapitel 4.4.5.4).

4.4.1 Reaktion mit gelöstem Enzym aus dem Rohextrakt

Als erstes sollte gezeigt werden, ob sich die Enzymreaktion durch das Messen der Konzentrationen aller Komponenten mittels Massenspektrometrie aufzeichnen lässt. Das Reaktionsverhalten des gelösten Enzyms bietet die Grundlage für verschiedene Anwendungen und Immobilisierungsmöglichkeiten des Enzyms. Die Reaktionen wurden in einem Maßstab von 100 ml bis maximal 1,5 L durchgeführt.

4.4.1.1 Reaktion in einem 100 ml Reaktor

Für die Enzymreaktion wurden zwei Proben von jeweils 10 ml aus dem Rohextrakt des Wildstamms *P. putida J3* (15.10.12) hergestellt (vergl. Tabelle 4-2). Für die Enzymreaktion wurden 90 ml einer Formaldehydlösung vorgelegt, und so lange inkubiert, bis die Ionenströme der gemessenen Massen einen stationären Wert angenommen hatten.

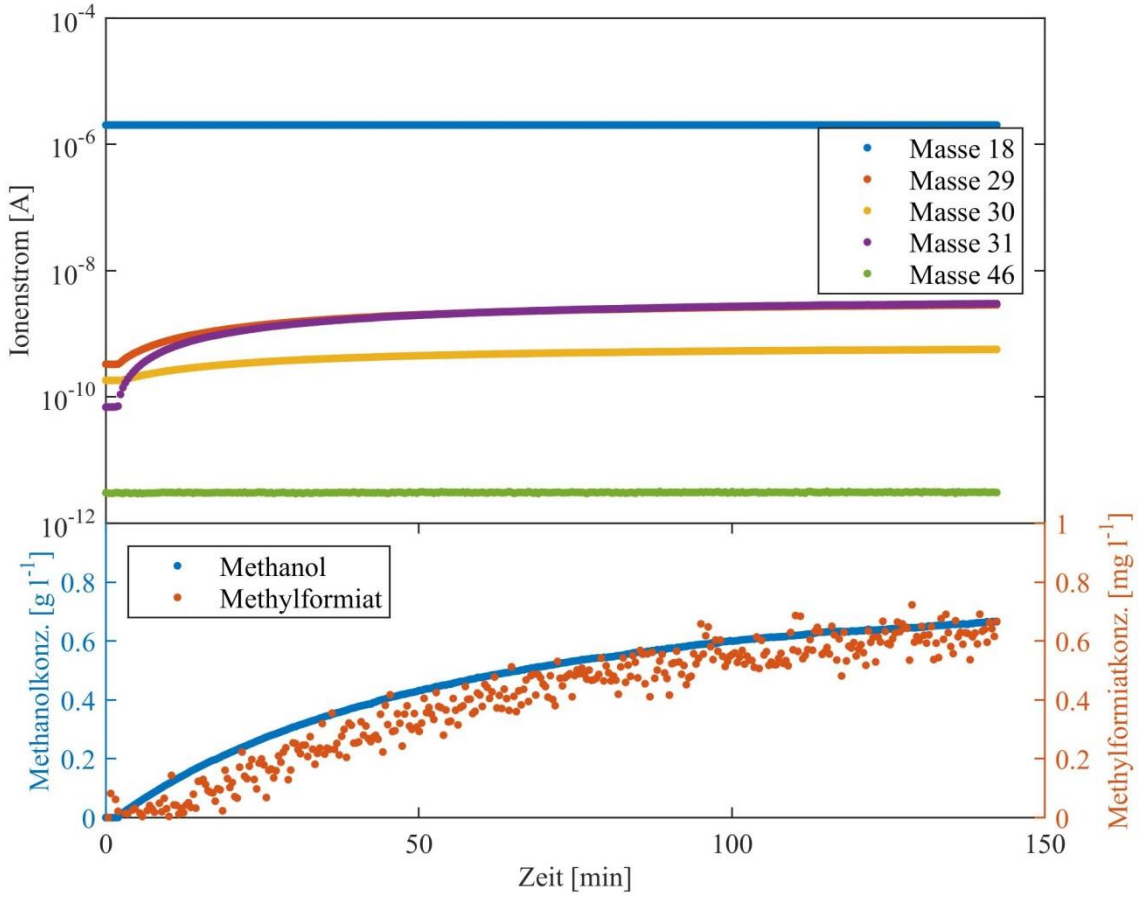


Abbildung 4-11 Enzymreaktion im 100 ml Reaktor. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Formaldehyd (1,4 g/l) gestartet. *Oben:* Ionenströme für verschiedene Massen. *Unten:* Umrechnung der Ionenströme in die jeweiligen Konzentrationen von Methanol und Methylformiat.

Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe des 10 ml Rohextrakts gestartet. Da über die Zeit der Messung keine konstanten Bedingungen herrschten und damit die Partialdrücke der Komponenten der Lösung nicht konstant blieben, wurden die Ionenströme auf die Masse für Wasser normiert (Masse 18). Wasserdampf liegt immer im Überschuss vor und macht die Normierung möglich. Im Versuch, der in Abbildung 4-11 gezeigt wird, lag zum Beginn der Reaktion eine Formaldehydkonzentration von 1,4 g/l vor. Abbildung 4-12 zeigt den Verlauf ausgehend von einer Formaldehydlösung mit einer Konzentration von 11 g/l. In beiden Fällen kann der Konzentrationsverlauf von Methanol mit sehr geringem Rauschen aufgezeichnet werden. Die Formaldehydkonzentration konnte aufgrund von Überlagerungen durch Methanol und Luft nicht direkt gemessen werden. Die Kinetik der Enzymreaktion wurde in beiden Messungen über den Nachweis von Methanol aufgezeichnet. Aufgrund der hohen Pufferkonzentration lag die Ameisensäure dissoziiert vor und konnte als nichtflüchtiges Formiat-Anion erwartungsgemäß nicht nachgewiesen werden.

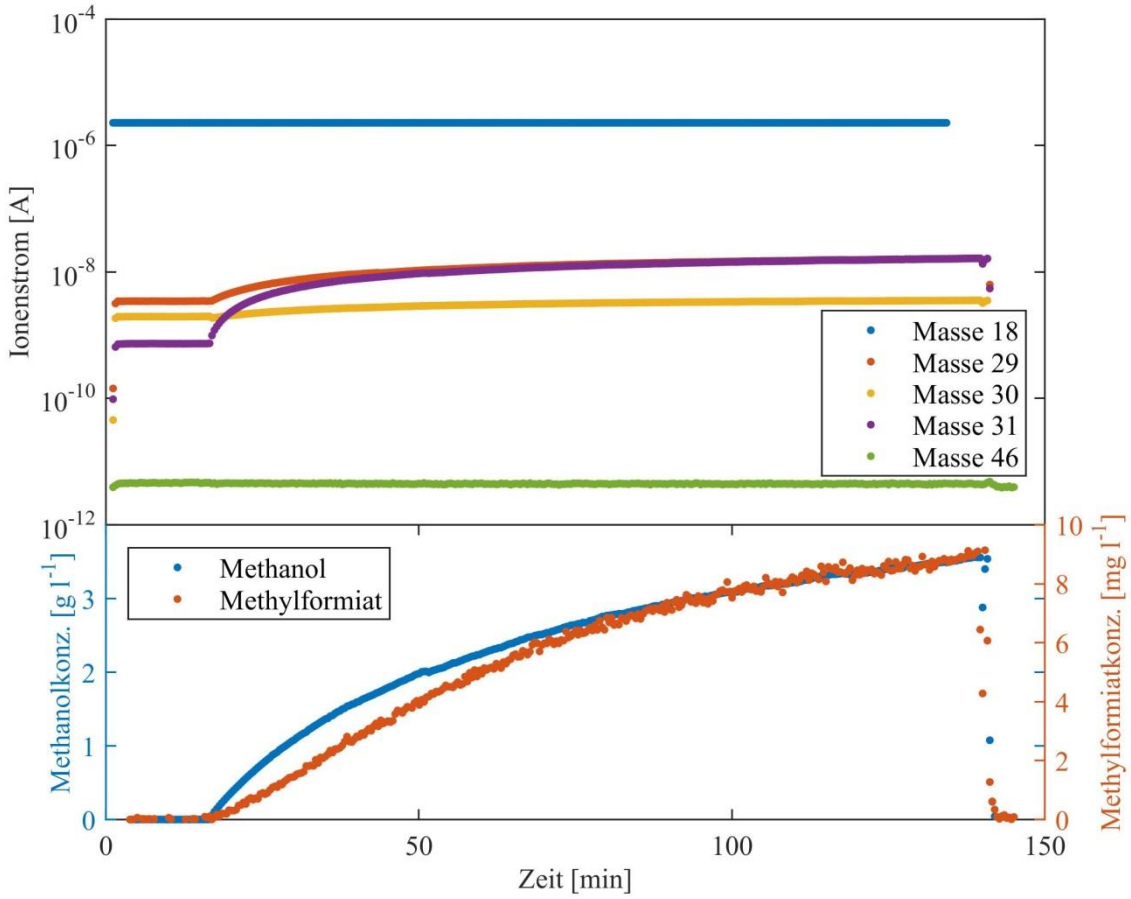


Abbildung 4-12 Enzymreaktion im 100 ml Reaktor. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Formaldehyd (11 g/l) gestartet. *Oben:* Ionenströme für verschiedene Massen. *Unten:* Umrechnung der Ionenströme in die jeweiligen Konzentrationen von Methanol und Methylformiat.

4.4.1.2 Reaktion in 1 l Druckreaktor

Die Verwendung des 1 l Druckreaktors (vergl. Kapitel 3.9.3) ermöglicht im Gegensatz zum 100 ml Reaktor das hermetische Abdichten des Reaktionsraumes und damit auch den Ausschluss von Luft. Auf diese Weise sollte es ermöglicht werden, neben der Methanol- und Methylformiatkonzentration auch die Formaldehydkonzentration zu erfassen. Zudem war es über die Doppelwandung des Reaktors und eines Thermostats mit Thermofühler im Reaktionsmedium möglich die Temperatur exakt einzustellen und konstant zu halten.

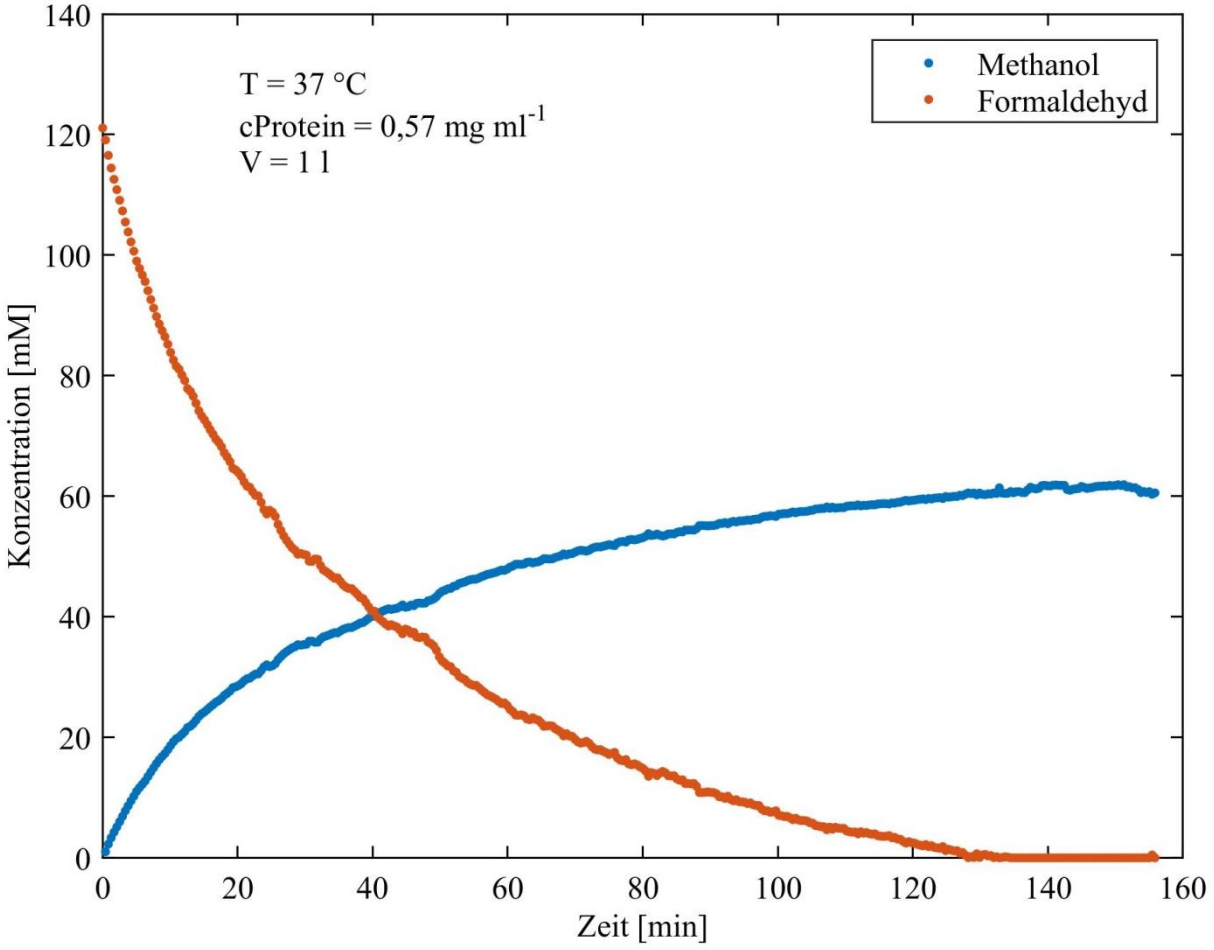


Abbildung 4-13 Reaktionsverlauf der FDM in einem 1 l Druckreaktor bei atmosphärischem Druck.

Für die Versuche zur Messung der Reaktion der FDM aus *P. putida* im 1 l Maßstab wurde eine Formaldehydlösung in 0,5 M Phosphatpuffer (pH 6,8) vorgelegt und bei 37 °C sowie einer Rührerdrehzahl von 2000 rpm mit Helium begast, um eine Überlagerung des Formaldehydmesswertes im Massenspektrometer durch Stickstoff aus der Luft zu vermeiden (Abbildung 4-13).

Zur Durchführung der Reaktion wurde die Rührerdrehzahl wegen Trombenbildung auf 1500 rpm gesenkt. Die Reaktion wurde durch Zugabe der FDM gestartet. Am Ende der Reaktion nach 2,5 Stunden war ein pH-Wert von 6 erreicht. Die Schwankungen im Reaktionsverlauf ergaben sich wegen auftretender Durchmischungsprobleme im Reaktor, da mit einem Reaktionsvolumen von einem Liter gearbeitet wurde (vergl. Kapitel 4.3).

4.4.2 Mathematische Herleitung der Michaelis-Menten-Kinetik und Modellierung

Enzymatische Reaktionen werden nach der Michaelis-Menten-Theorie durch folgende Gleichung abgebildet:

$$v = \frac{v_{max} \cdot [\mathrm{S}]}{[\mathrm{S}] + K_m} \qquad (4.6)$$

Dabei gibt v die initiale Reaktionsgeschwindigkeit bei einer bestimmten Substratkonzentration [S] an, während v_{max} die maximale Reaktionsgeschwindigkeit und ein Maß für die Aktivität des Enzyms ist. Die Michaelis-Konstante K_m ist ein Maß für die Substrataffinität. Die Gleichung stellt lediglich eine Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration dar, beschreibt aber keine stoffliche Hemmung der Enzymaktivität. Die Parameter v_{max} und K_m können entweder durch das Linearisierungsverfahren nach Lineweaver-Burk oder mittels nichtlinearer Regression berechnet werden. Die in Tabelle 2-1 aufgeführten K_m-Werte wurden mittels Linearisierungsverfahren berechnet. Diejenige Substratkonzentration von Formaldehyd zu erhalten, bei der die maximale Umsatzgeschwindigkeit erreicht wird, ist, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, schwierig. Daher sind die Linearisierungsverfahren nur mit Einschränkung verwendbar.

4.4.2.1 Michaelis-Menten-Gleichung ohne Hemmung

Die Funktionsparameter der Michaelis-Menten-Gleichung wurden mittels nichtlinearer Regression (lsqcurvefit) in Matlab und der Funktion ode45 an die im on-line-Massenspektrometer aufgezeichneten Daten angepasst (Abbildung 4-14).

Die Genauigkeit der Lage der Parameter wird dabei über ein Konfidenzintervall (Matlab: nlparci) mit einem Konfidenzniveau von 95 % dargestellt. Der Zusammenhang der Parameter wird über die Kovarianz [111] berechnet (Matlab: covar [112]) und gibt die in Abbildung

4-14 dargestellte Abweichung an. Die Anpassung der Parameter ohne Produktinhibierung liefert $v_{max} = 0{,}975 \pm 0{,}122$ mmol/min und $K_m = 32{,}125 \pm 7{,}297$ mM. Wie im Diagramm zu erkennen, ist das Modell nicht deckungsgleich mit den gemessenen Werten. Die Ursache dafür könnte an der Hemmung der Aktivität durch die Produkte Ameisensäure und Methanol liegen.

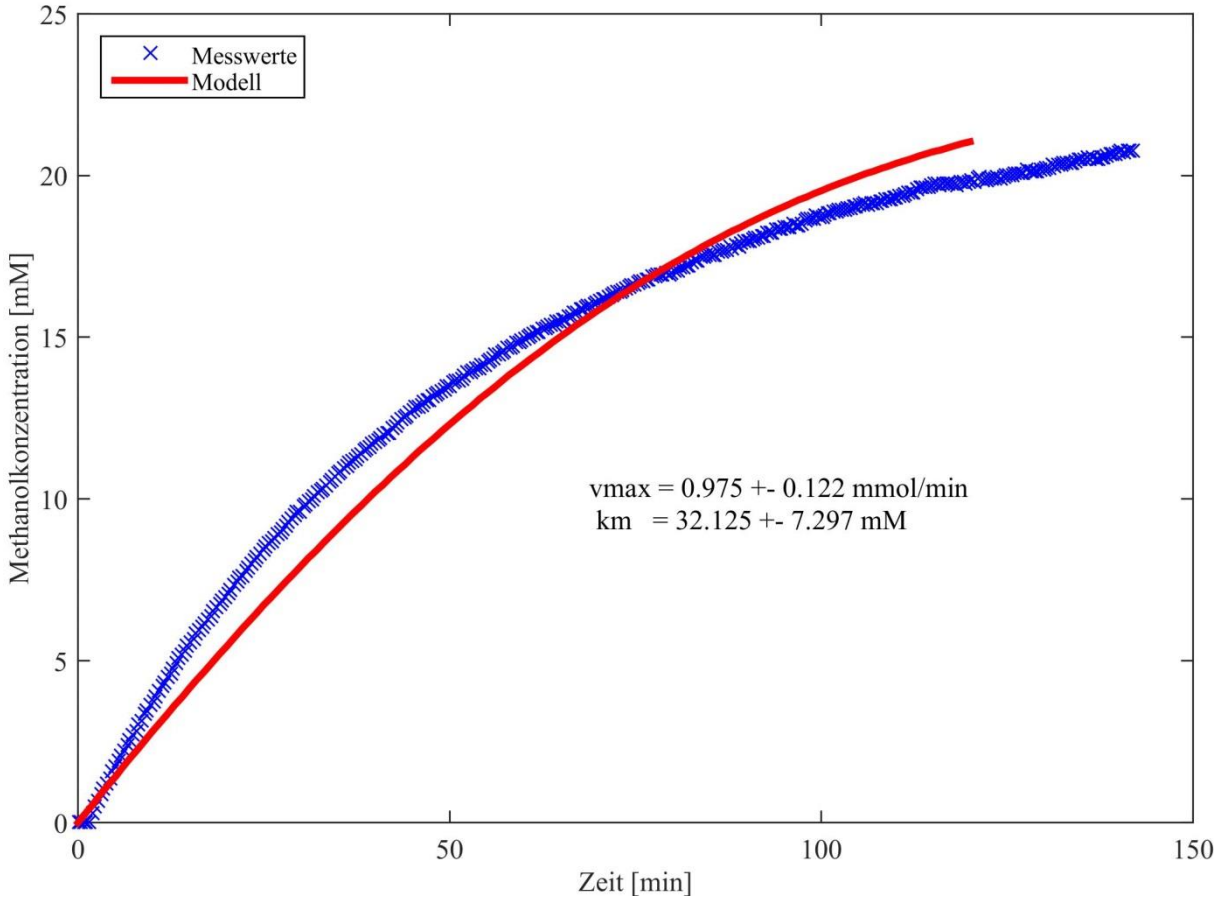


Abbildung 4-14 Berechnung der Konstanten der Michaelis-Menten-Kinetik über eine Gleichung ohne Produktinhibierung auf Basis der Daten einer on-line-Messung mittels Massenspektrometer. Die Formaldehydkonzentration zu Beginn der Reaktion war 50 mM.

4.4.2.2 Michaelis-Menten-Gleichung mit nicht-kompetitiver Hemmung

In der Theorie werden unterschiedliche Endprodukthemmungen beschrieben. Eine Möglichkeit besteht in der nicht-kompetitiven Hemmung der FDM durch Methanol und Ameisensäure. Dabei ändern sich die Bildungs- oder Zerfallsgeschwindigkeit des Enzym-Substrat-Komplexes durch die Bindung der beiden Produkte am Enzym außerhalb des aktiven Zentrums. Methanol wird in der Enzymtechnik beispielsweise als Fällungsmittel eingesetzt, weshalb die nicht-kompetitive Wirkung auf das Enzym durchaus wahrscheinlich ist. Allerdings

wird für eine Fällung eine Konzentration von 500 mM verwendet [113]. In Abbildung 4-14 kann maximal eine Methanolkonzentration von 25 mM vorliegen.

Die nicht-kompetitive Hemmung wird durch folgende Gleichung und die Definition einer Inhibierungskonstante K_I und die Ergänzung der Inhibitorkonzentration [I] beschrieben:

$$v = v_{max} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_m} \cdot \frac{K_I}{[I] + K_I} \tag{4.7}$$

Das Modell zur nicht-kompetitiven Hemmung aus Abbildung 4-15 bildet die gemessene Reaktionskinetik erheblich besser ab. Die Lage der Konstanten K_m und v_{max} ist sehr valide. K_i liegt mit 14,195±0,036 mM in einem guten Bereich.

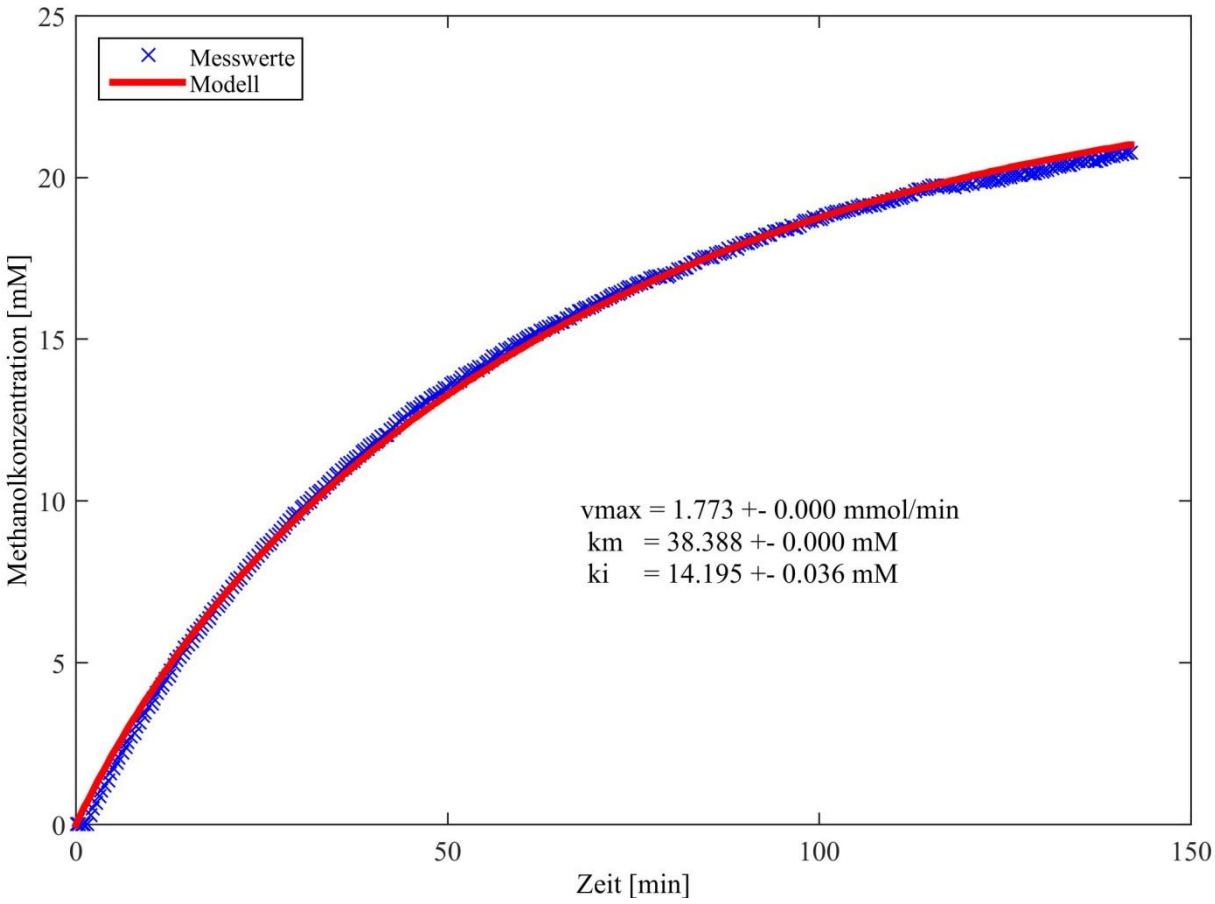


Abbildung 4-15 Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung mit nicht-kompetitiver Hemmung zur Berechnung der Konstanten. Die Formaldehydkonzentration zu Beginn der Reaktion war 50 mM.

4.4.2.3 Herleitung der Geschwindigkeitsgleichung für die FDM nach Michaelis-Menten

Die Michaelis-Menten-Gleichung mit nicht-kompetitiver Hemmung kann den Reaktionsverlauf zwar gut abbilden, es ist jedoch fraglich, ob dieses Modell, vor allem bei einer maximalen Methanolkonzentration von 25 mM, tatsächlich zutreffend ist. Methanol und Ameisensäure werden im aktiven Zentrum des Enzyms gebildet. Viel wahrscheinlicher ist, dass die beiden Produkte nach der Bildung im aktiven Zentrum verbleiben und dadurch die Reaktion hemmen. Dies würde einer kompetitiven Hemmung entsprechen. Um diese These zu stützen, soll nachfolgend die Herleitung der Michaelis-Menten-Gleichung unter Berücksichtigung der Eigenschaften der FDM durchgeführt werden.

Die Umsetzung von Formaldehyd zu Ameisensäure und Methanol durch die Formaldehyd-Dismutase stellt aufgrund des fest assoziierten und sich selbst regenerierenden Cofaktors einen Spezialfall dar. Um die Reaktionssequenz vollständig zu beschreiben, wurde der Cofaktor mit aufgenommen. Damit kann die Reaktion wie folgt dargestellt werden:

$$FDM(NAD) + CH_2O + H_2O \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} FDM(NAD)CH_4O_2 \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftarrows}} FDM(NADH + H) + CH_2O_2$$

$$FDM(NADH + H) + CH_2O + H_2O \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftarrows}} FDM(NADH + H)CH_4O_2 \underset{k_{-4}}{\overset{k_4}{\rightleftarrows}} FDM(NAD) + CH_4O + H_2O$$

$$FDM(NAD) + CH_4O \underset{k_{-5}}{\overset{k_5}{\rightleftarrows}} FDM(NAD)CH_4O$$

$$FDM(NADH + H) + CH_2O_2 \underset{k_{-6}}{\overset{k_6}{\rightleftarrows}} FDM(NADH + H)CH_2O_2$$

Formaldehyd (CH_2O, abgekürzt FA) liegt in wässriger Lösung zu 99,9 % als Formaldehydhydrat (CH_4O_2, abgekürzt FAH) vor [114]. Es bildet mit der Formaldehyd-Dismutase (FDM) einen Enzymsubstratkomplex mit assoziiertem oxidiertem Cofaktor (NAD). Durch die Reduktion des Cofaktors (NADH+H) entsteht Ameisensäure (CH_2O_2, abgekürzt AS) und das aktive Zentrum des Enzyms ist unbelegt. In den oberen Reaktionsgleichungen wird zugunsten einer besseren Darstellung des Enzymproduktkomplexes auf $FDM(NAD)CH_4O$ und $FDM(NADH + H)CH_2O_2$ verzichtet und gleich das freie Produkt dargestellt. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist laut Theorie die Produktbildung. Durch die gebildeten Produkte kann es zu

einer Produkthemmung kommen (vergl. die beiden unteren Gleichungen). Methanol (CH_4O, abgekürzt MeOH) und Ameisensäure werden äquimolar gebildet und die aktiven Zentren des Homotetramers werden jeweils nur durch ein Molekül besetzt. Damit können $k_5 = k_6 = k_i$ und $k_{-5} = k_{-6} = k_{-i}$ gesetzt und als Inhibierung gekennzeichnet werden. Ausgehend von einer ideal gepufferten Reaktionslösung findet keine Inhibierung durch Änderung des pH-Werts statt. Eine Änderung des pH-Wertes im Reaktionsmilieu würde zur Inaktivierung des Enzyms führen [10]. Aus der Massenbilanz lassen sich folgende Gleichungen herleiten:

$$\frac{dc_{FA}}{dt} = -k_1 \cdot c_{FDM(NAD)} \cdot c_{FA} + k_{-1} \cdot c_{FDM(NAD)FA} \tag{4.8}$$

$$\frac{dc_{AS}}{dt} = k_2 \cdot c_{FDM(NAD)FA} - k_{-2} \cdot c_{AS} \cdot c_{FDM(NADH)} - k_i \cdot c_{AS} + k_{-i} \cdot c_{AS} \tag{4.9}$$

Da die Rückreaktion von Ameisensäure oder Methanol (vergl. Tabelle 2-2) zu Formaldehyd nicht möglich ist und die Ameisensäure auch nicht zu Methanol umgewandelt wird, kann die Gleichung vereinfacht werden:

$$\frac{dc_{AS}}{dt} = k_2 \cdot c_{FDM(NAD)FA} - k_i \cdot c_{AS} + k_{-i} \cdot c_{AS} \tag{4.10}$$

Die Bildung der Enzym-Substrat-Komplexe ist nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt und unabhängig vom Zustand des Cofaktors, so dass $k_1 = k_3$ und $k_{-1} = k_{-3}$ ist. Durch den Flip-Flop-Mechanismus des Enzyms zur Cofaktor-Regenerierung sind die Reaktionen zu Ameisensäure und Methanol voneinander abhängig. Deshalb hängt die Reaktion entweder von k_2 oder k_4 ab. Da die Bildung von Ameisensäure von k_2 abhängig ist und der Cofaktor zur Bildung von Methanol regeneriert sein muss, kann $k_2 = k_4$ gesetzt werden. Damit kann die Reaktionsgleichung in vereinfachter Form mit Ameisensäure und Methanol als $[Produkt]$ dargestellt werden:

$$FDM + CH_2O \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} FDMCH_2O \xrightarrow{k_2} FDM + [Produkt] \underset{k_{-i}}{\overset{k_i}{\rightleftarrows}} FDM[Produkt]$$

Aus Methanol wird keine Ameisensäure gebildet:

$$\frac{dc_{MeOH}}{dt} = k_2 \cdot c_{FDMFA} - k_i \cdot c_{MeOH} + k_{-i} \cdot c_{FDMMeOH} \tag{4.11}$$

Die Gleichungen für das Enzym lauten:

$$\frac{dc_{FDM}}{dt} = -k_1 \cdot c_{FDM} \cdot c_{FA} + (k_{-1} + k_2) \cdot c_{FDMFA} \tag{4.12}$$

$$\frac{dc_{FDMFA}}{dt} = k_1 \cdot c_{FDM} \cdot c_{FA} - (k_{-1} + k_2) \cdot c_{FDMFA} \tag{4.13}$$

Es bleibt nur noch die Gleichung für die Produktinhibierung:

$$\frac{dc_{FDMMeOH}}{dt} = k_i \cdot c_{MeOH} \cdot c_{FDM} - k_{-i} \cdot c_{FDMMeOH} \tag{4.14}$$

Dabei ist es nicht notwendig, beide Produkte zu bilanzieren. Das Enzym liegt entweder in freier Form oder als Enzymsubstratkomplex vor. Methanol und Ameisensäure reagieren im wässrigen Medium bei Normalbedingungen spontan in geringem Maße zu Methylformiat (MF). Zum Beginn der Reaktion kommen nur freies Enzym c_{FDM}^0 und 100 % Formaldehydhydrat c_{FA}^0 vor. Es gilt das Gesetz der Massenerhaltung, das gleichzeitig die Anfangsbedingungen liefert:

$$c_{FDM}^0 = c_{FDM} + c_{FDMFA} \tag{4.15}$$

$$c_{FA} + c_{AS} + c_{MeOH} + c_{FDMFA} = c_{FA}^0 \tag{4.16}$$

Die Konzentration des Enzyms ändert sich nicht. Der Enzym-Substrat-Komplex stellt in der Gesamtreaktion nur eine reaktive Zwischenverbindung dar und reagiert im Fall des Formaldehyds schnell ab oder wird im Fall der Produkte schnell aufgelöst. Damit kann in guter Näherung die zeitliche Änderung der Enzymkomplexe nach dem Bodensteinschen Quasistationaritätsprinzip gleich Null gesetzt werden:

$$\frac{dc_{FDMFA}}{dt} = 0 \tag{4.17}$$

$$\frac{dc_{FDM}}{dt} = 0 \tag{4.18}$$

$$\frac{dc_{FDMMeOH}}{dt} = 0 \tag{4.19}$$

Damit folgt aus Gleichung (4.13)

$$c_{FDMFA} = \frac{k_1 \cdot c_{FDM} \cdot c_{FA}}{k_{-1} + k_2} \tag{4.20}$$

Daraus kann die Michaelis-Konstante definiert werden:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \tag{4.21}$$

Aus Gleichung (4.14) und unter Annahme des Fließgleichgewichts aus der Gleichung (4.19) kann die Inhibierungskonstante (Dissoziationskonstante) definiert werden:

$$c_{MeOH} = \frac{k_{-i} \cdot c_{FDMMeOH}}{k_i \cdot c_{FDM}} \tag{4.22}$$

$$K_I = \frac{k_{-i}}{k_i} \tag{4.23}$$

Somit kann aus der Enzymbilanz und den Gleichungen (4.22), (4.20) und (4.15) folgendes hergeleitet werden:

$$c_{FDM}^0 = c_{FDM}\left(1 + \frac{c_{MeOH}}{K_I}\right) + c_{FDMFA} \tag{4.24}$$

$$K_m = \frac{(c_{FDM}^0 + c_{FDMFA}) \cdot c_{FA}}{\left(1 + \frac{c_{MeOH}}{K_I}\right) c_{FDMFA}} \tag{4.25}$$

$$K_m \cdot \left(1 + \frac{c_{MeOH}}{K_I}\right) c_{FDMFA} = (c_{FDM}^0 + c_{FDMFA}) \cdot c_{FA} \tag{4.26}$$

$$c_{FDFA} = \frac{c_{FDM}^0 \cdot c_{FA}}{c_{FA} + K_m \cdot \left(1 + \frac{c_{MeOH}}{K_I}\right)} \tag{4.27}$$

Mit der Anfangsgeschwindigkeit $v_0 = k_2 * c_{FDMFA}$

$$v_0 = \frac{k_2 \cdot c_{FDM}^0 \cdot c_{FA}}{c_{FA} + K_m \cdot \left(1 + \frac{c_{MeOH}}{K_I}\right)} \tag{4.28}$$

und der maximalen Geschwindigkeit $v_{max} = k_2 * c_{FDM}^0$ folgt die Geschwindigkeitsgleichung mit Inhibierung

$$v = \frac{v_{max} \cdot c_{FA}}{c_{FA} + K_m \cdot \left(1 + \frac{c_{MeOH}}{K_I}\right)} \tag{4.29}$$

Die Gleichung entspricht einer Reaktion mit kompetitiver Hemmung und untermauert die eingangs angestellte Vermutung, dass die Produkte eine Hemmung im aktiven Zentrum des Enzyms hervorrufen. In Abbildung 4-16 ist das Modell mit Inhibierung nach Gleichung (4.29) dargestellt. Hier liegt das Modell exakt in den Messwerten. Zusätzlich ist ein Fehler aufgeführt, der den Vertrauensbereich der Parameter darstellt. Dieser ist mit $v_{max} = 1{,}731 \pm 0{,}000\, mol/min$ und $k_m = 43{,}535 \pm 0{,}000\, mM$ außerhalb des relevanten Bereichs und erheblich kleiner als es für das einfache Michaelis-Menten-Modell für K_m und v_{max} der Fall ist. Im Vergleich zum nicht-kompetitiven Modell liegen die Parameter, ausgedrückt durch $k_i = 12{,}823 \pm 0{,}026\, mM$, tatsächlich noch etwas besser. Das Modell lässt demnach den Schluss zu, dass bei einer Substratkonzentration von 50 mM das Formaldehyd mit den Produkten Methanol und Ameisensäure um die Bindung im aktiven Zentrum konkurrieren.

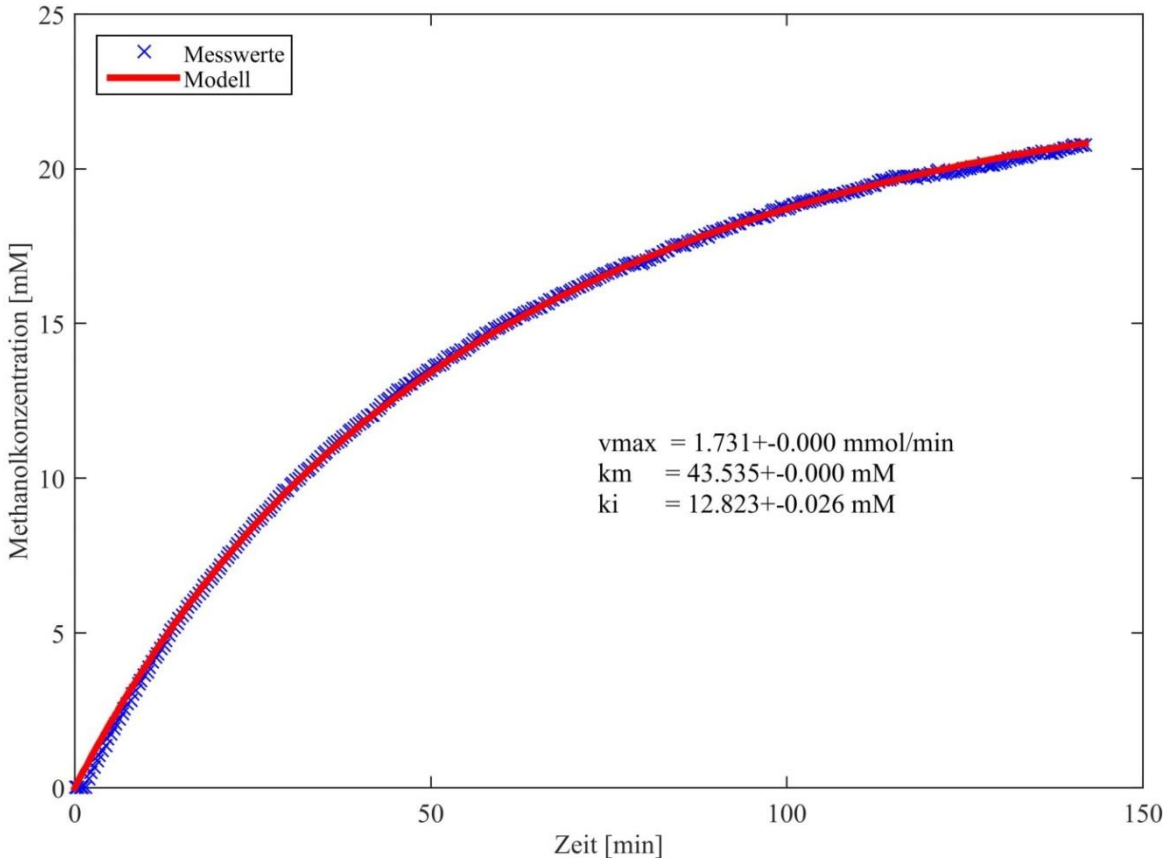


Abbildung 4-16 Berechnung der Michaelis-Menten-Kinetik-Konstanten anhand einer on-line-Messung mittels Massenspektrometer. Die Formaldehydkonzentration zu Beginn der Reaktion war 50 mM. Die Anpassung erfolgte über eine Gleichung mit kompetitiver Hemmung.

4.4.2.4 Modellierung der Reaktionen bei höheren Stoffkonzentrationen

Für die Prozessentwicklung sind die Verwendung des Modells bei höheren Formaldehydkonzentrationen und damit einhergehend auch die höheren Produktkonzentrationen interessant. Im Maßstab von 1 l (vergl. Kapitel 4.4.1.2) wurde deshalb eine Reaktion mit 15 g/l Formaldehyd gestartet und mittels on-line-Massenspektrometer die Methanolbildung aufgezeichnet (Abbildung 4-17). Die Verwendung von 500 ml Reaktionsvolumen wäre aus Durchmischungsgründen besser gewesen (vergl. Kapitel 4.3), allerdings konnte bei Normaldruck die im Bypass zum Massenspektrometer geführte Flüssigkeit (vergl. Kapitel 3.2) wegen Förderschwierigkeiten der HPLC-Pumpe nicht in den Reaktor zurückgeführt werden.

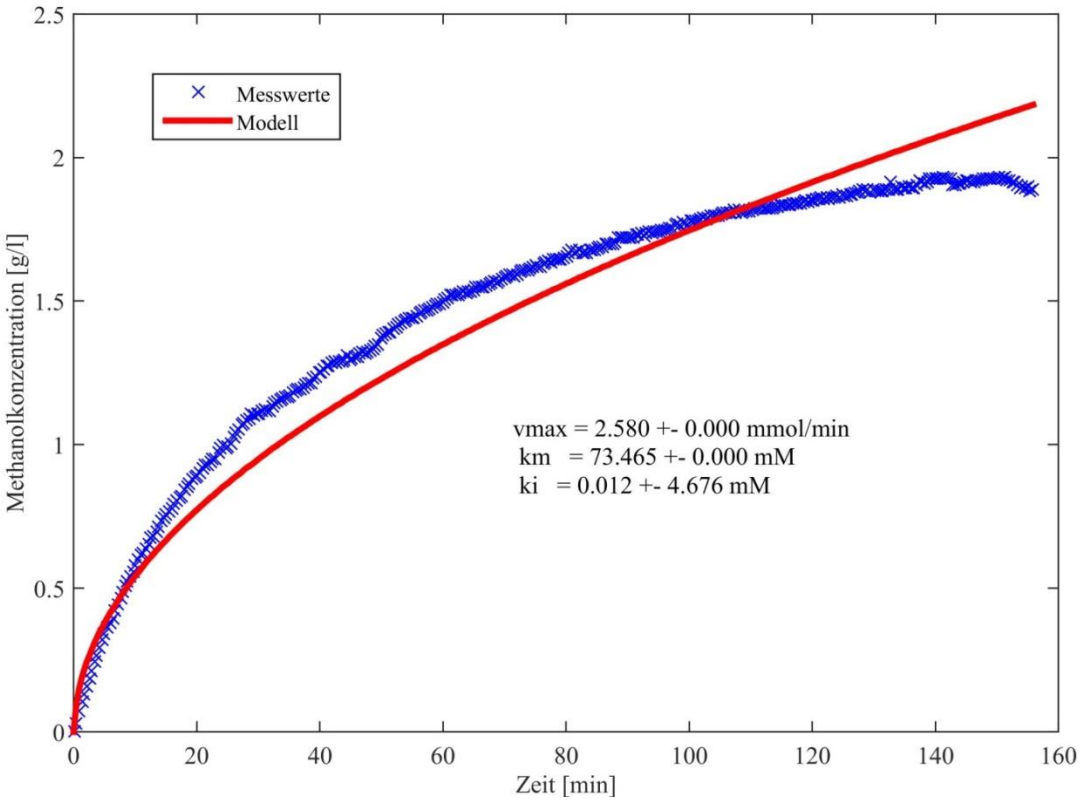


Abbildung 4-17 FDM-Reaktion im 1 l Maßstab mit einer Anfangskonzentration von 0,5 M Formaldehyd. Die Anpassung erfolgte über eine Gleichung mit kompetitiver Hemmung.

Das in Abbildung 4-17 verwendete Modell basiert auf der hergeleiteten Geschwindigkeitsgleichung mit kompetitiver Hemmung. Das Modell ist nicht mit den Messwerten deckungsgleich, was durch die Abweichung von $k_i = 0.012 \pm 4{,}676$ verdeutlicht wird. Die Interpretation des Verlaufs in Abbildung 4-17 deutet auf das Auftreten eines weiteren Hemmungstyps bei einer Formaldehydkonzentration von 0,5 M (15 g/l) hin. Bei diesen Konzentrationen

könnte nun die schon erwähnte Wirkung des Methanols als Fällungsmittel auftreten. Da aber schon die kompetitive Hemmung des Enzyms nachgewiesen wurde, die auch bei höheren Methanolkonzentrationen aber nicht ausbleibt, wäre die Verwendung der nicht-kompetitiven Gleichung (4.7) nicht korrekt. Deshalb bestand die Aufgabe darin, ein Modell zu verwenden, das es ermöglicht, beide Hemmungstypen zu erfassen.

Bisher wurden lineare Geschwindigkeitsgleichungen verwendet. Das Heranziehen einer hyperbolischen Geschwindigkeitsgleichung, analog zur Differenzialmethode aus der chemischen Reaktionstechnik [115], ermöglicht in der Enzymtechnik das Beschreiben aller Hemmungsvarianten und das Ableiten des Hemmungstyps [34].

Unabhängig von der Art der Hemmung hat die hyperbolische Geschwindigkeitsgleichung immer die gleiche Form [116]:

$$v = v_{max} \cdot \frac{\frac{c_{FA}}{K_m}\left(1 + \mathrm{b}\frac{c_{MeOH}}{aK_i}\right)}{1 + \frac{c_{MeOH}}{K_i} + \frac{c_{FA}}{K_m}\left(1 + \frac{c_{MeOH}}{aK_i}\right)} \qquad (4.30)$$

Diese Gleichung beschreibt, durch das Hinzufügen der Konstanten a und b, alle Mechanismen in einem Reaktionsschema, wie sie in Abbildung 4-18 dargestellt sind.

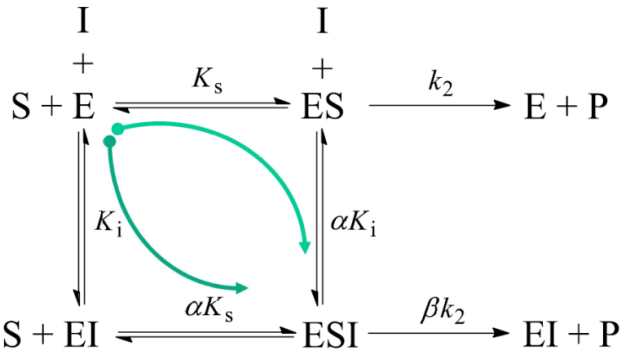


Abbildung 4-18 Darstellung aller Inhibierungstypen in einem Schema (α=a und β=b) [116].

Anhand der berechneten Konstanten a und b kann durch eine Grenzwertbetrachtung auf den Hemmungstyp geschlossen werden (Tabelle 4-4). Dadurch werden die einzelnen Teile der Gleichung je nach Hemmungstyp gewichtet. Mittels nichtlinearer Regression können a und b bestimmt werden, indem v_{max} ebenfalls variiert, aber k_m und k_i auf bestimmte Werte festgesetzt werden. Da bereits eine kompetitive Hemmung festgestellt wurde, wurden die Konstanten aus Abbildung 4-16 verwendet. Wird die Regression anhand der Reaktion mit 15 g/l For-

maldehyd durchgeführt (Abbildung 4-19), haben a und b den gleichen Wert von 0,059. Nach Tabelle 4-4 entspricht das einer unkompetitiver Hemmung. Demnach binden eines oder beide Produkte außerhalb des aktiven Zentrums an das Enzym, wodurch es zu einer Konformationsänderung des aktiven Zentrums kommt.

Tabelle 4-4 Bestimmung des Hemmungstyps mittels hyperbolischer Geschwindigkeitsgleichung anhand der Konstanten a und b [34][117].

A	b	Hemmungstyp
$\mathbf{0 < a < \infty}$	$b = 1$	Kompetitiv
$\mathbf{0 < a < 1}$	$0 < b < 1, \quad a = b$	Unkompetitiv
$\mathbf{1 \leq a < \infty}$	$0 < b < 1$	Gemischt

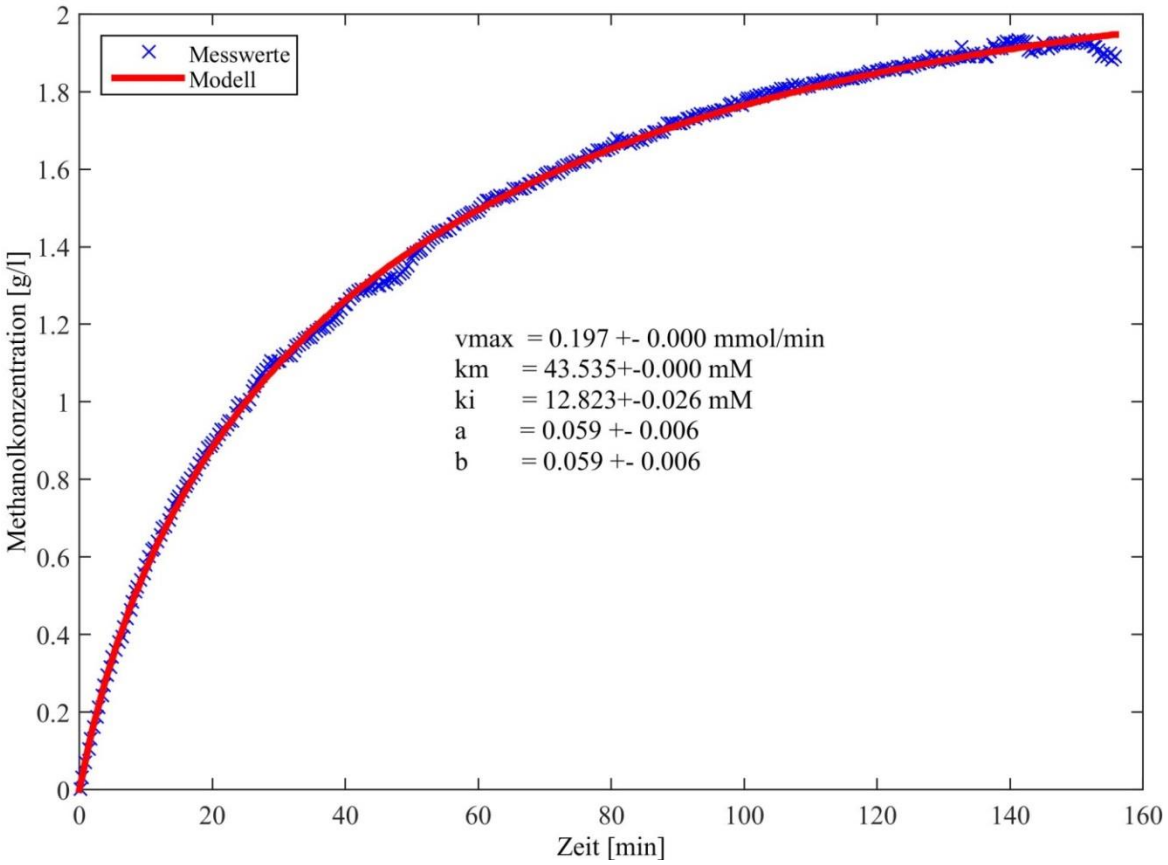


Abbildung 4-19 Beschreibung der FDM-Reaktion mit einer hyperbolischen Geschwindigkeitsgleichung.

4.4.3 Übertragbarkeit des Modells

Das Modell soll sowohl für Messungen mit geringerer Datendichte als auch mit veränderten Reaktionsbedingungen angewendet werden können. So ist beispielsweise für den späteren Prozess eine Verwendung des Enzyms bei höherem Druck denkbar. Eine Bestimmung der

Konstanten des Modells anhand der Labordaten ermöglicht einen Vergleich unterschiedlicher Expressionsquellen zur Charakterisierung der unterschiedlichen Enzympräparate.

4.4.3.1 Anwendung des Modells auf Laborergebnisse

Zur Auswertung von Laborversuchen mit einer Anfangskonzentration von 50 mM Formaldehyd und Messungen mittels Acetylaceton-Methode können die Daten der Reaktion mit kompetitiver Hemmung und der oben berechnete Wert für k_m verwendet werden (Abbildung 4-20).

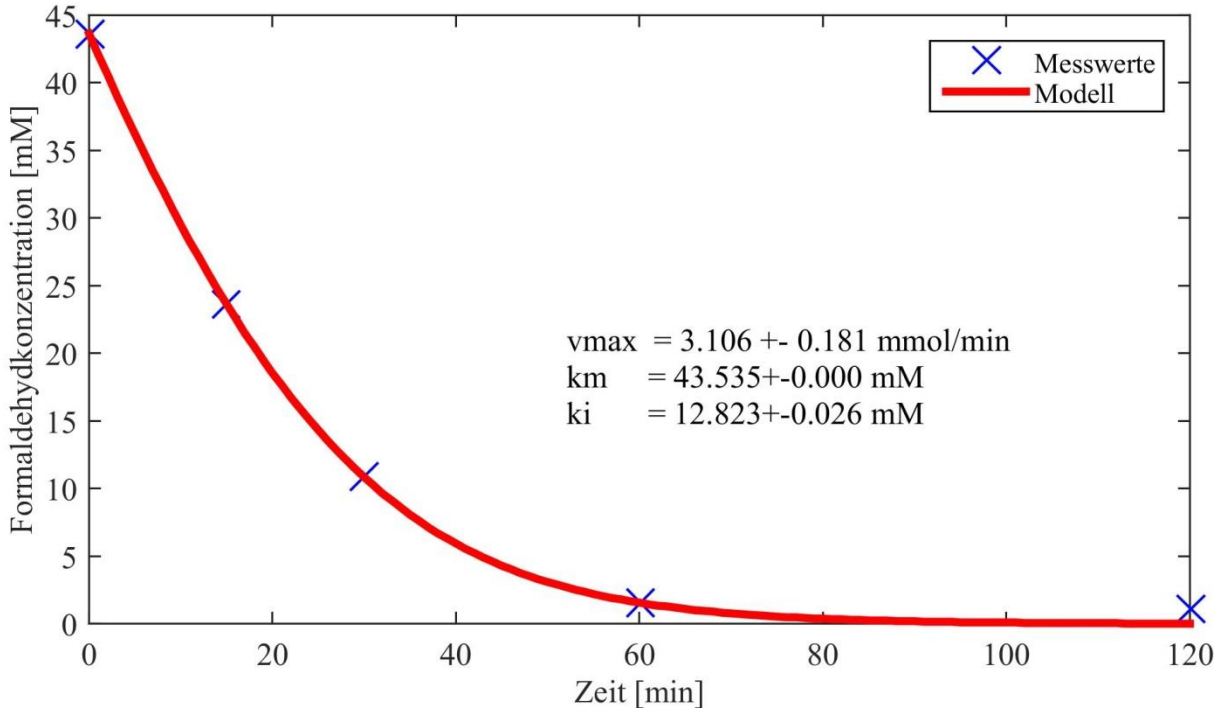


Abbildung 4-20 Verwendung der einfachen Michaelis-Menten-Gleichung ohne Produktinhibierung zur Modellierung der im Labormaßstab erhaltenen Ergebnisse. Es wurde lediglich v_{max} variiert und der k_m Wert aus der Simulation mit kompetitiver Hemmung verwendet.

Die Herausforderung bei Aktivitätstests im Labormaßstab sind die schwankenden Anteile der FDM im Gesamtprotein und die Durchführung der Reaktion ohne Temperaturregelung. Mit einer guten Näherung kann v_{max} in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinmenge geschätzt (Abbildung 4-21) und die Reaktion vorausgesagt werden. Dazu wurden Reaktionen aufgezeichnet, die sich in der eingesetzten Proteinkonzentration erheblich unterscheiden. Mit zunehmender Proteinkonzentration wird linear ein größerer Wert für v_{max} erhalten.

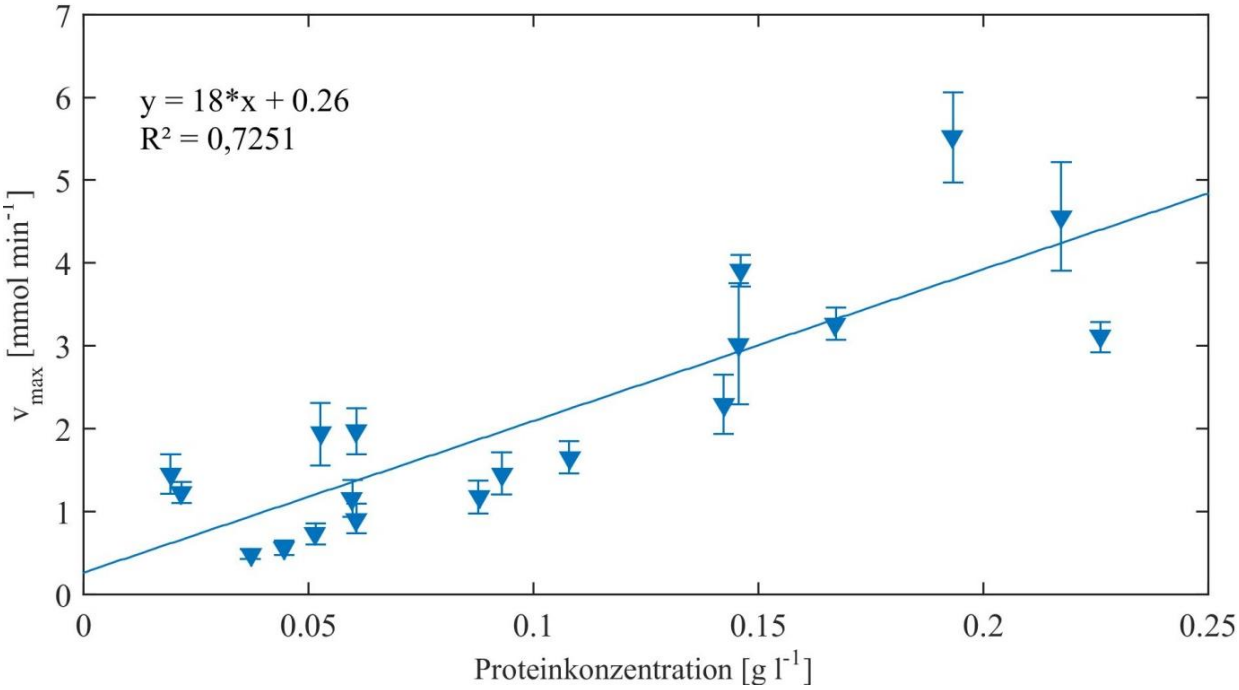


Abbildung 4-21 Berechnung von v_{max} mittels nichtlinearer Regression anhand von Reaktionskinetiken in Abhängigkeit von der Proteingesamtkonzentration des Rohextrakts.

4.4.3.2 Verwendung des Modells zur Charakterisierung der Druckabhängigkeit der FDM

Der Einfluss des Drucks auf Enzyme ist noch nicht geklärt und für jedes Enzym unterschiedlich. Da ein Einsatz der FDM im Produktionsmaßstab bei höherem Druck denkbar ist, um beispielsweise die Löslichkeit des Formaldehyds zu erhöhen bzw. die Bildung von Paraformaldehyd zu vermeiden [118], wurde die Reaktion bei verschiedenen Drücken durchgeführt. Die Reaktion erfolgte im 1 l Maßstab in einer 0,5 M Pufferlösung bei einem pH-Wert von 6,8 mit einer Substratkonzentration von 1,2 g/l Formaldehyd, bei welcher der pH-Wert durch die Bildung von Ameisensäure nicht unter pH 6,62 absinken konnte. Es wurde ein lyophilisierter Rohextrakt aus *E. coli* (12.2.2014) mit der heterolog exprimierten FDM aus *Pseudomonas putida J3* (vergl. Tabelle 4-2) verwendet. Die Reaktion wurde durch die Zugabe der FDM-Lösung gestartet. Die Methanolbildung unter verschiedenen Drücken ist in Abbildung 4-22 dargestellt. Trotz der Verwendung gleicher Lösungen verlaufen die Kurven nicht identisch. Auch hier traten Durchmischungsprobleme auf. Wegen des erhöhten Drucks musste die zu messende Flüssigkeit im Bypass auf Normaldruck entspannt werden, da ansonsten die Membran des Massenspektrometers hätte reißen können. Aus diesem Grund wurde die Flüssigkeit nicht wieder zurück in den Reaktor gepumpt und ein größeres Volumen war nötig.

Die Druckabhängigkeit kann über das mathematische Modell (vergl. Kapitel 4.4.1) abgeschätzt werden. Da sich sowohl die Gesamtproteinkonzentration als auch die FDM-Konzentration von Probe zu Probe unterscheiden können, wurde v_{max} als Variable gesetzt und die anderen Parameter festgelegt. Bei einer Formaldehydkonzentration 1 g/l tritt nach dem Modell keine unkompetitive Hemmung auf und es kann auf die Michaelis-Menten-Gleichung mit kompetitiver Hemmung zurückgegriffen werden. Die Ergebnisse der Berechnung sind in Tabelle 4-5 dargestellt. Eine Druckabhängigkeit des Parameters v_{max}, der die Reaktivität des Enzyms darstellt, konnte aufgrund dieser Versuchsergebnisse nicht festgestellt werden.

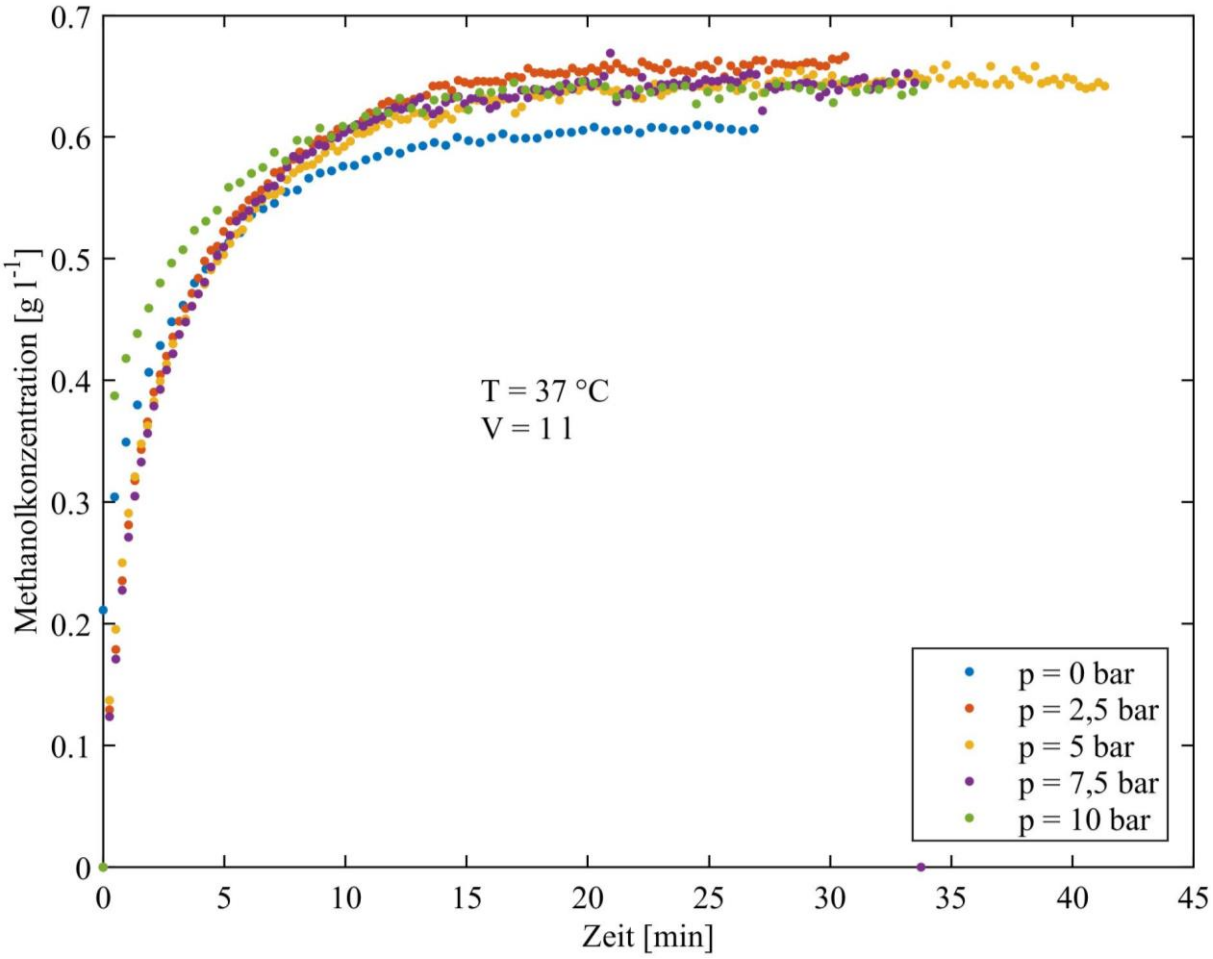


Abbildung 4-22 Methanolbildung durch die Dismutase-Reaktion mit der J3 FDM aus *E. coli* (12.2.2014) unter Variation des Drucks bei 37 °C.

Tabelle 4-5 Berechnete Werte für v_{max} mittels Michaelis-Menten-Gleichung mit kompetitiver Hemmung für verschiedene Reaktionsdrücke.

Druck [bar]	v_{max} [mol/min]	Formaldehydkonz. [g/l]	Proteinkonz. [g/l]
0	39,617 ± 3,049	1,14	0,198 ± 0,017
2,5	34,251 ± 1,440	1,23	0,201 ± 0,005
5	33,385 ± 1,305	1,21	0,194 ± 0,009
7,5	34,650 ± 1,089	1,2	0,191 ± 0,002
10	37,722 ± 2,887	1,2	0,185 ± 0,002

4.4.4 Produktinhibierung der Formaldehyd-Dismutase

In den im Folgenden beschriebenen Versuchen sollte die in dem mathematischen Modell postulierte Produkthemmung für das Reaktionsprodukt Methanol auch experimentell nachgewiesen werden. Aufgrund der Verwendung von Methanol als Fällungsmittel und den Erkenntnissen aus der Modellierung ist eine Hemmung wahrscheinlich. Unklar ist das Ausmaß der Hemmung durch Ameisensäure und Methylformiat.

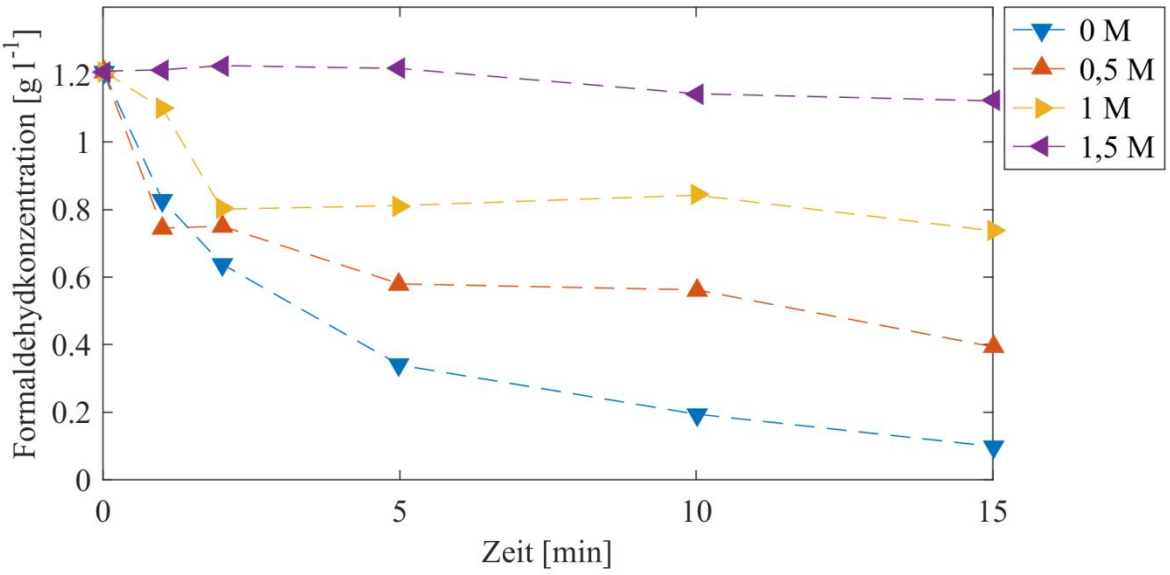


Abbildung 4-23 Produktinhibierung der FDM durch Methanol (MeOH) in initialen Konzentrationen bis 2,5 M, dargestellt durch den verminderten Formaldehydabbau der FDM.

4.4.4.1 Inhibierung durch Methanol

Die Versuche wurden mit einem Lysat aus *E. coli* durchgeführt. Die Proben wurden zu Beginn der Reaktion mit Methanol (0,25 % - 4,5 % v/v) versetzt. Eine Inhibierung durch Methanol war bereits bei einer Konzentration von 0,5 M nachweisbar (Abbildung 4-23). Vollständig inhibiert war das Enzym ab einer Konzentration von 1,5 M.

4.4.4.2 Inhibierung durch Ameisensäure

Für diesen Versuch wurde das gleiche Lysat aus *E. coli* wie im vorangegangenen Abschnitt verwendet. Mit Hilfe einer Pufferkonzentration bis 1,1 M wurde der pH-Wert während der Enzymreaktion konstant gehalten, um eine Inhibierung über den pH-Wert auszuschließen (vergl. Kapitel 3.3). Die Proben wurden zu Beginn der Reaktion mit Ameisensäure (0,25 % - 5 % v/v) versetzt. In Abbildung 4-24 ist der Formaldehydverbrauch dargestellt. Bereits eine Ameisensäurekonzentration von 0,05 M hemmt die Aktivität und ab Konzentrationen von 0,7 M ist keine signifikante Enzymaktivität mehr vorhanden. Die Inhibierung durch Ameisensäure wirkt sich nach diesen Ergebnissen stärker aus als diejenige von Methanol.

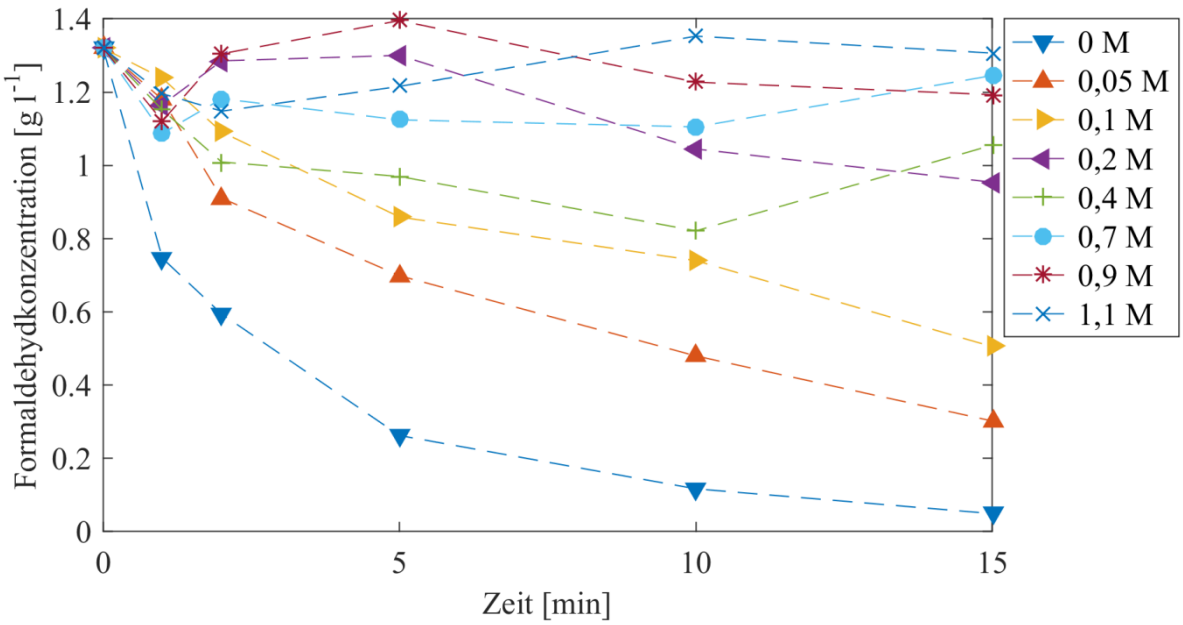


Abbildung 4-24 Produktinhibierung der FDM durch initial vorgelegte Ameisensäure (AM) in Konzentration bis 1,1 M, dargestellt durch den verminderten Formaldehydabbau der FDM.

4.4.4.3 Inhibierung durch Methylformiat

Methylformiat entsteht in wässriger Lösung in einer Folgereaktion aus Methanol und Ameisensäure auch während der FDM-Reaktion zu einem Anteil von 0,1 % wie mittels on-line Massenspektrometrie nachgewiesen werden konnte (vergl. Kapitel 4.4.1). Da es sich um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, zerfällt Methylformiat in wässriger Lösung zu Methanol und Ameisensäure, so dass der Nachweis einer Inhibierung von Methylformiat nur eingeschränkt und für geringe Konzentrationen möglich ist. Der Versuch wurde analog zu den vorangegangenen Versuchen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-25 dargestellt. Im relevanten Konzentrationsbereich von unter 0,25 M ist davon auszugehen, dass es hauptsächlich zu einer Hemmung der Aktivität durch die Ameisensäure kommt. Eine für Methylformiat zusätzlich auftretende Hemmung konnte auf diese Weise nicht festgestellt werden.

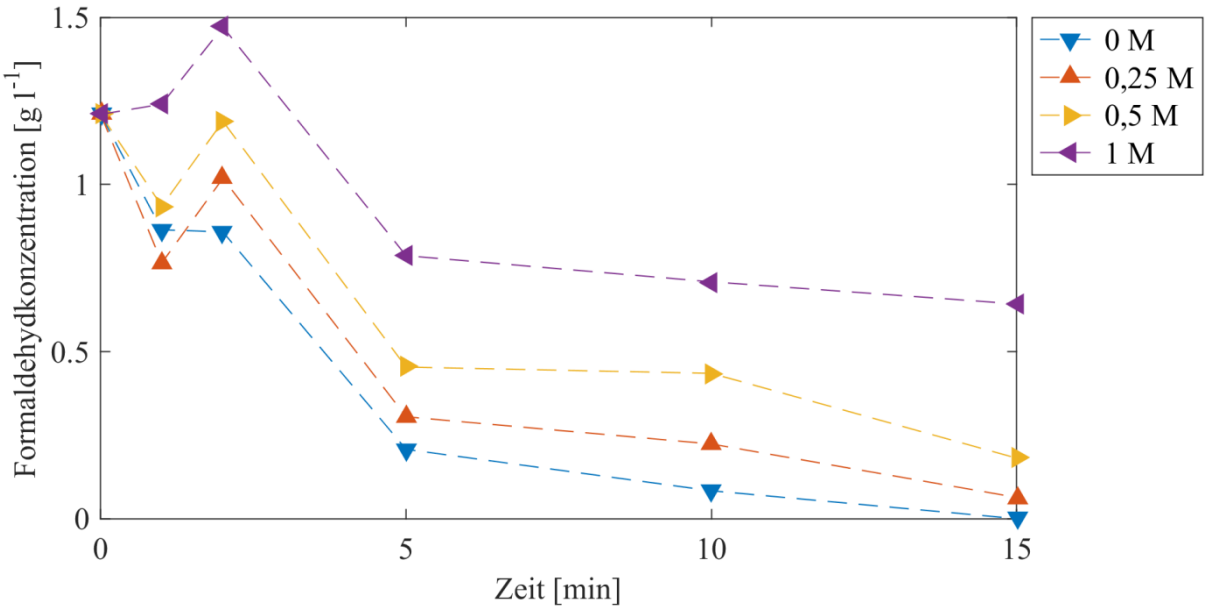


Abbildung 4-25 Produktinhibierung der FDM durch Methylformiat (MF) durch initiale Konzentrationen bis 1 M.

4.4.5 Reaktion mit immobilisierter FDM aus dem Rohextrakt

Da es, wie in Kapitel 4.4.4 beschrieben, nicht nur zu einer Hemmung der FDM durch Methanol, sondern sogar noch ausgeprägter durch die äquimolar gebildete Ameisensäure kommt, musste nun eine prozesstechnische Lösung zur Minimierung der Inhibierung gefunden werden. Eine Möglichkeit besteht in der kontinuierlichen Umsetzung des Formaldehyds und das Vermeiden zu hoher Produktkonzentrationen. Die Immobilisierung von Enzymen ermöglicht

eine Rückhaltung von Enzymen in semikontinuierlichen und kontinuierlichen Prozessen. Zudem kann die Stabilität der Enzyme in oder auf einem Trägermaterial erhöht werden. Nicht jedes Trägermaterial und jeder Bindungstyp sind für die spezifischen Eigenschaften des Enzyms oder für die Voraussetzungen des Prozesses geeignet. Aus diesem Grund wurden verschiedene Immobilisierungstechniken untersucht.

4.4.5.1 Immobilisierung mittels Matrixeinschluss in pVP-co-PEG

Der Matrixeinschluss erfolgte wie in Kapitel 3.7.1 beschrieben. Es wurden jeweils vier 10 ml FDM haltige Polyethylenglycol-Gele mit PEG-Anteilen von 50 % und 25 % hergestellt. Die Polymerisationsreaktion erfolgte in Einweg-Petrischalen. Die PEG-Gele wurden mit 10 ml 0,5 M PP bei pH 6,8 gewaschen. Von der Waschlösung wurde jeweils 1 ml entnommen und die Proteinkonzentration bestimmt.

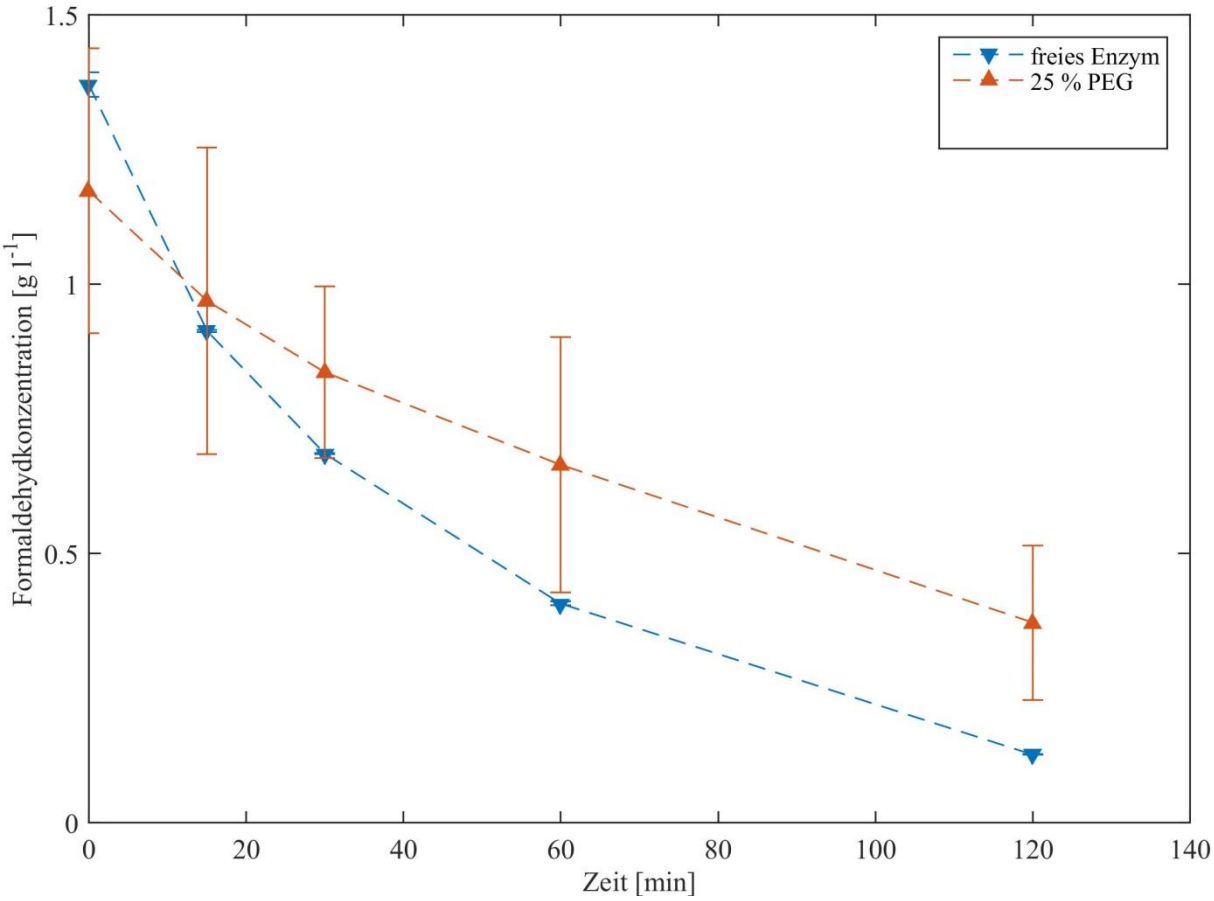


Abbildung 4-26 Vergleich der Aktivität der freien Enzyme (Proteinkonzentration 1,13 g/l, initiale FA-Konzentration 13,8 %) mit in 25% und 50 % Polyethylenglykol immobilisierten Enzymen.

Daraus konnte die Menge an immobilisiertem Gesamtprotein (0,83 mg) berechnet werden. 24 % der Proteinmenge wurde nicht im Gel eingeschlossen. Die Reaktion wurde mit 1 ml einer 13,8 % FA-Lösung gestartet. Die Gele mit einem PEG-Anteil von 50 % quollen stark auf. Sie rollten sich zusammen und waren im Gegensatz zu den 25 %-Gelen spröde. Die Gele mit kleinerem PEG-Anteil zeigten den dargestellten Reaktionsverlauf in Abbildung 4-26.

Sie behielten ihre Form in der Petrischale bei und blieben am Boden der Schale kleben, so dass sich die Reaktionsflüssigkeit über den Gelen befand. Die Aktivität des immobilisierten Enzyms (2,1 U/mg) entsprach 44,64 % des freien Enzyms (4,7 U/mg). Die Proteinkonzentration des freien Enzyms betrug 1,13 g/l und entsprach nicht exakt der Enzymmenge in den Gelen. Die Gegenkontrolle mit Gelen ohne Enzym wurde nicht durchgeführt.

4.4.5.2 Ungerichtete, trägerfixierte Bindung

Es wurden verschiedene Trägersysteme zur Immobilisierung der Formaldehyd-Dismutase getestet. Die drei wesentlichen Parameter sind der Bindungstyp, das Material des Trägers (Matrix) und die funktionelle Gruppe. Bindungstyp und funktionelle Gruppe sind entscheidend für die Bindungsstelle und die Stärke der Bindung des Enzyms an die Matrix. Die Matrix muss vor allem mit Rücksicht auf mögliche Wechselwirkungen mit Formaldehyd und Methanol gewählt werden. Beide Stoffe können von verschiedenen Kunststoffen adsorbiert und Formaldehyd auch kovalent gebunden werden. In dieser Arbeit wurden Polyacryl- und Polystyrolträger mit unterschiedlichen Bindungstypen getestet. Die Versuche wurden in 1 ml Säulen durchgeführt. Die Enzymaktivität wurde aus der Differenz der Formaldehyd-Konzentrationen zwischen beladener und nicht beladener Säule berechnet (vergl. Kapitel 3.7.2). In Tabelle 4-6 ist die berechnete Enzymaktivität bezogen auf die Oberflächen verschiedener Trägerpartikel dargestellt, um verschiedenen Träger trotz unterschiedlicher durchschnittlicher Partikeldurchmesser miteinander vergleichen zu können (Gleichungen (3.16) und (3.17)). Damit trotz unterschiedlicher Matrix die Epoxid-, Carboxyl- und Amoniumgruppen und die jeweiligen Bindungsarten miteinander verglichen werden können, wurden die Träger mit dem gleichen Rohextrakt behandelt. IB-150A unterscheidet sich von den anderen Trägern im verwendeten Rohextrakt und kann deshalb nicht direkt bezüglich der absoluten Aktivität verglichen werden. Wie zu erkennen ist, zeigten die Träger mit einer quartären Ammoniumverbindung als funktionelle Gruppe die höchste flächenspezifische Aktivität.

Tabelle 4-6 Aktivität der FDM auf unterschiedlichen Trägermaterialien mit unterschiedlichen Bindungstypen (Herstellerangaben).

Säule	Bindungstyp	Matrix	Funktionelle Gruppe	Rohextrakt	Enzymaktivität bezogen auf die Oberfläche	Anzahl der Messungen	Messzeitraum/ Halbwertszeit/ Restaktivität
					[U/mm²]		[Tage]/[Tage]/[%]
IB-150A	Kovalent	Polyacryl	Epoxid, apolar	A	53,312	29	440/291/38,79
IB-150P	Kovalent	Polyacryl	Epoxid, polar	B	29,535	16	145/129/19,29
IB-D152	Kationisch	Polyacryl	Carboxylgruppe	B	32,003	14	90/129/37,48
IB-C435	Kationisch	Polyacryl	Carboxylgruppe	B	25,724	16	348/329/32,04
IB-A161	Anionisch, stark	Polystyrol	Quartäre Ammonium-verbindung	C	51,76	9	302/96/34
IB-A171	Anionisch, stark	Polystyrol	Quartäre Ammonium-verbindung	C	62,45	9	96/28/33,49
IB-A369	Anionisch, schwach	Polystyrol	Quartäre Ammonium-verbindung	C	61,50	2	< 20 (keine Aktivität)
IB-EC1	Nicht-Ionische-Bindung	Polyacryl	Carboxylgruppe	C	18,62	2	< 20 (Aktivität 6,4 U/mm²)
IB-S861	Nicht-Ionische-Bindung	Polystyrol	Aromat	D	25,98	7	57/31/30,55
IB-S500	Nicht-Ionische-Bindung	Polypro-pylen	Alkylgruppe	D	226,13	7	57/8/15,07
IB-S60S	Nicht-Ionische-Bindung	Silika, porös	Hydroxylgruppe	D	67,21	7	57/8/21,99
IB-S60P	Nicht-Ionische-Bindung	Silika, porös	Hydroxylgruppe	D	160,87	10	136/> 136/62,83

Hinsichtlich der Langzeitstabilität wurden mit den Säulen IB-150A und IB-C435 die besten Ergebnisse erzielt. Nach 440 Tagen und 29 Messungen betrug die Restaktivität des Enzyms auf einem Polyacryl-Träger IB-150A mit einem Epoxid als funktionelle Gruppe noch 40 %. Der Träger IB-C435 mit einer Carboxylgruppen zeigte nach 348 Tagen und 16 Messungen eine Halbwertszeit von 329 Tagen. Der Träger IB-150A hatte eine, im Vergleich zum Träger IB-C435, schlechtere Halbwertszeit von 291 Tagen.

Der Polystyrolträger IB-A369 mit der schwachen anionischen Bindung zeigte trotz anfänglich guter Aktivität bereits nach der zweiten Messung keine Aktivität mehr. Polyacrylträger mit kovalenter Epoxidbindung und Silikaträger mit Carboxylgruppen als funktionelle Gruppen erwiesen sich bisher als beste Trägersysteme.

4.4.5.3 Verwendung immobilisierter Enzyme in einem 200 ml Festbettreaktor

Das Screening nach Trägern zur Immobilisierung der FDM wurde in 1 ml Säulen durchgeführt. Dabei wurde Formaldehyd aber nicht kontinuierlich umgesetzt, sondern die Säulen befüllt und nach Ablauf einer bestimmten Zeit wieder entleert. Nun sollte gezeigt werden, dass eine kontinuierliche Umsetzung von Formaldehyd möglich ist. Ein 200 ml Festbettreaktor wurde mit Polyacrylpartikeln IB-150A beladen, mit denen die immobilisierte FDM die höchste Langzeitstabilität aufgewiesen hatte.

Tabelle 4-7 Spezifikationen des Polyacryl-Trägers IB-150A.

Träger	IB-150A
Bindungstyp	Kovalent
Matrix	Polyacryl
Funktionelle Gruppe	Epoxid, apolar
mittlerer Partikeldurchmesser	225 µm
Sphärizität (Annahme)	1
Volumen	0,006 mm^3
Oberfläche	0,159 mm^2
Wasseranteil	5 %
Porenvolumen (soll)	3 ml/g

Die Eigenschaften des Trägers sind in Tabelle 4-7 dargestellt. Die Immobilisierung erfolgte wie in Kapitel 3.7.2 beschrieben. Die Träger wurden in der gepackten Säule mit der Formaldehyd-Dismutase mit einem Rohextrakt aus einer *E. coli* Fermentation mit einer Proteinkonzentration von 15,3 mg/ml und einer spezifischen Aktivität von 46 U/mg beladen. Nach der Immobilisierung konnte keine Aktivität im Rohextrakt festgestellt werden. Dies deutet auf eine weitgehend vollständige Immobilisierung der Dismutase auf dem Träger hin. Nach der Immobilisierung wurde die Säule mit 0,5 M PP bei pH 6,8 gewaschen und an den Membraneinlass des Massenspektrometers angeschlossen. Mittels einer HPLC-Pumpe wurde mit einem Durchfluss von 10 ml/min gepufferte (0,5 M PP bei pH 6,8) Formaldehyd-Reaktionslösung durch die Säule gepumpt. Die umgesetzte Reaktionslösung am Säulenausgang wurde direkt über das Einlasssystem des Massenspektrometers geführt und analysiert (vergl. Kapitel 3.9.4). In Abbildung 4-27 ist der Konzentrationsverlauf von Methanol und Methylformiat unter Einsatz unterschiedlicher Formaldehydkonzentrationen dargestellt.

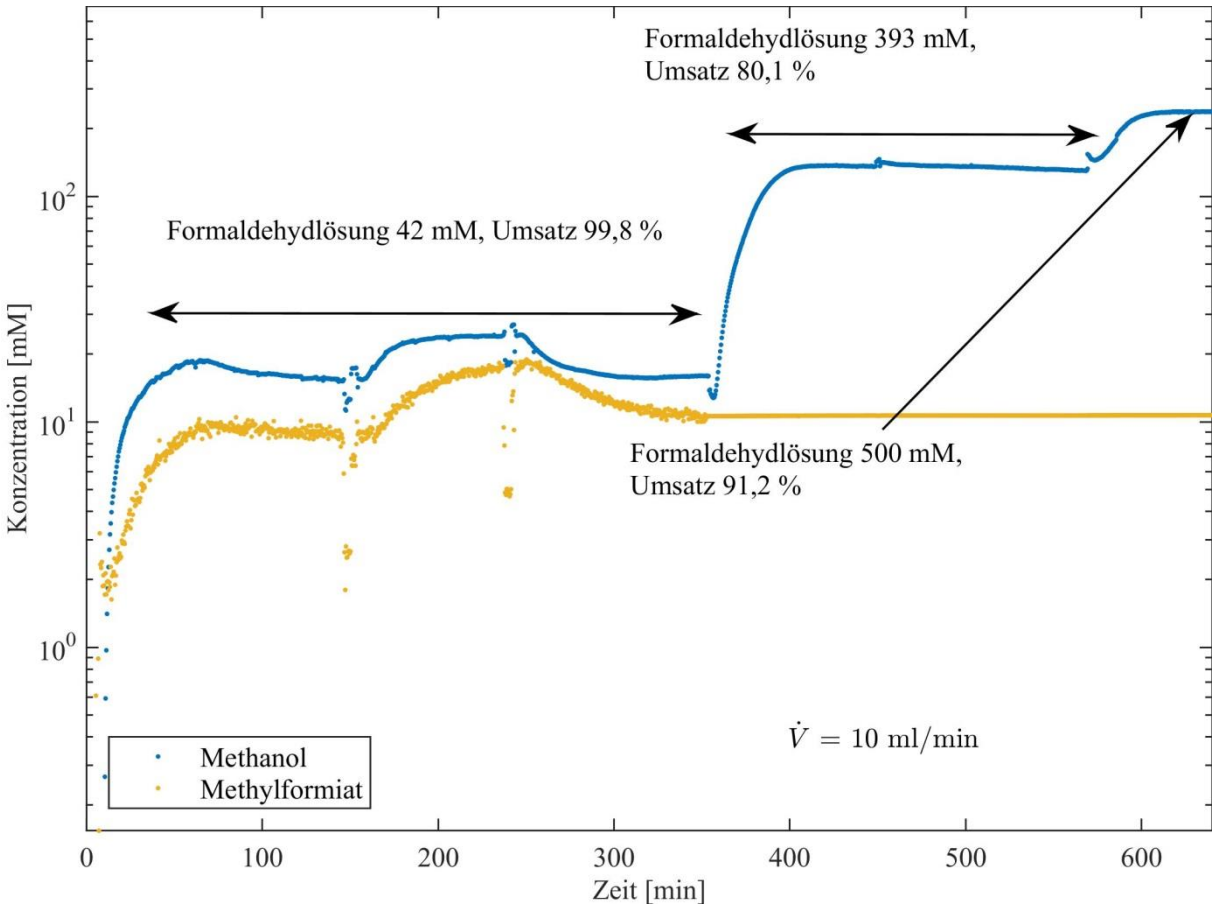


Abbildung 4-27 Formaldehydlösungen mit Konzentrationen von 42 mM, 393 mM und 500 mM wurden im 200 ml Festbettreaktor bei 25 °C und einem Volumenstrom von 10 ml/min zu Methanol, Ameisensäure und Methylformiat umgesetzt. Ameisensäure liegt vollständig dissoziiert vor und kann nicht gemessen werden.

Nach Zugabe einer 393 mM Formaldehydlösung nimmt das Messrauschen bezüglich der Methylformiatkonzentration ab. Das liegt an der Überlagerung der Ionenströme für die jeweiligen Massen im Massenspektrometer durch die erhöhte Methanolkonzentration und durch die Luftbestandteile.

Insgesamt wurde etwa das 32-fache Säulenvolumen Formaldehydlösung durch die Säule gepumpt. Geringe Schwankungen innerhalb der Messung sind auf Temperaturänderungen und den Wechsel der Substratvorlage zurückzuführen. Außerdem kann es innerhalb eines Festbetts zur Kapillarbildung kommen, was zu einer verminderten Aktivität führt. Der größte Umsatz (99,8 %) wurde mit der geringsten Formaldehydkonzentration von 42 mM erzielt. Eine 500 mM Formaldehydlösung konnte zu 91,2 % umgesetzt werden.

4.4.5.4 Berechnung der Aktivitätsverluste immobilisierter Enzyme im Rührkessel

Zur Bestimmung der Aktivitätsverluste immobilisierter Enzyme wurde zunächst eine definierte Menge Protein (176 mg) an 2 g Polyacryl Partikeln IB-150A immobilisiert (vergl. Kapitel 3.7.2). Im Druckreaktor wurden 500 ml gepufferte Formaldehydlösung (1 g/l Formaldehyd in 0,5 M Phosphatpuffer) vorgelegt und durch Rühren eine homogene Suspension der Trägerpartikel mit definierter Strömung (500 rpm) eingestellt (vergl. Kapitel 3.9.5). Die Reaktion wurde bei einer Temperatur von 37 °C durchgeführt. Die Konzentrationsveränderung wurde mittels Massenspektrometrie aufgezeichnet. Dazu wurde eine Probe kontinuierlich mit einer Schlauchpumpe aus dem Reaktor entnommen, durch einen Filter die Partikel zurückgehalten, durch den Membraneinlass des Massenspektrometers geleitet und wieder in den Reaktor zurückgeführt. Analog dazu wurde im Reaktor unter gleichen Bedingungen mit freier FDM (ebenfalls 176 mg) eine Reaktion durchgeführt. Über das mathematische Modell ist es möglich, das freie und immobilisierte Protein zu vergleichen (vergl. Kapitel 4.4.2). In Abbildung 4-28 sind beide Reaktionsverläufe und die jeweils berechneten Konstanten der Michaelis-Menten-Kinetik mit kompetitiver Hemmung dargestellt. Die Inhibitionskonstante K_I für die Reaktion mit immobilisiertem Enzym wurde im mathematischen Modell aus der Reaktion mit freiem Enzym übernommen. Die Reaktion mit freiem Enzym erfolgte etwa sieben- bis achtfach schneller und der v_{max}-Wert für das freie Enzym ist erheblich höher im Vergleich zum immobilisierten Enzym. Sowohl der externe Stofftransport des Formaldehyds zur äußeren Katalysatoroberfläche als auch die Porendiffusion im Inneren eines Katalysators (vergl. Kapi-

tel 2.8.2), können im Vergleich zur eigentlichen Enzymkatalyse langsamer sein und so die Gesamtgeschwindigkeit limitieren, d.h. den Wirkungsgrad herabsetzen. Zudem kann das Enzym durch die Immobilisierung geschädigt oder behindert und die Aktivität herabgesetzt werden. Anhand eines Wirkungsgrads können beide Reaktionsverläufe mathematisch miteinander verglichen werden.

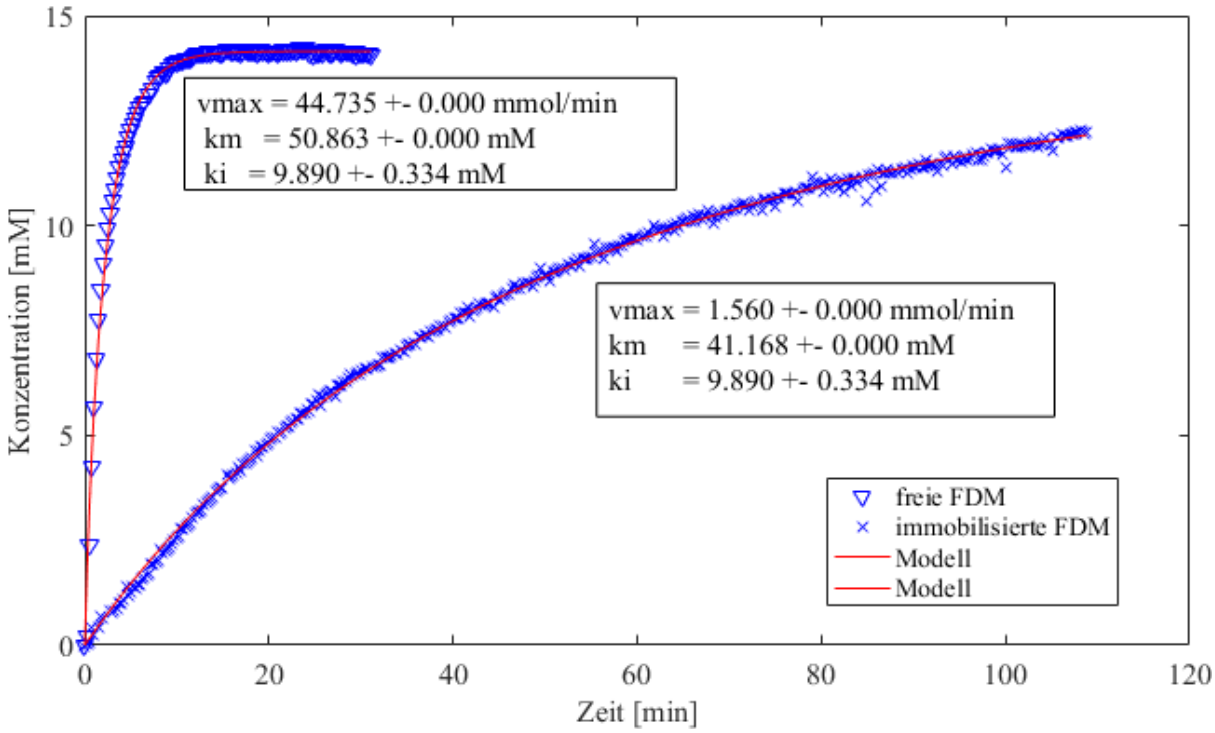


Abbildung 4-28 Vergleich der Reaktionsverläufe von 176 mg immobilisiertem Rohextrakt auf 2 g Trägerpartikel und der Reaktion des freien Enzyms mit der gleichen Proteinmenge im 500 ml Maßstab bei 37 °C. Dargestellt sind zudem die berechneten Konstanten der Michaelis-Menten-Kinetik mit kompetitiver Hemmung.

Herleitung des mathematischen Modells für die immobilisierte FDM

Experimentell kann der Wirkungsgrad, basierend auf gleichen Mengen aktiven Enzyms im heterogenen (imm) und nativen, homogenen (nat) System, bestimmt werden [119]:

$$\eta = \frac{v_{imm}}{v_{nat}} \tag{4.31}$$

Dabei ist der Wirkungsgrad abhängig von der Sherwood-Zahl (Sh), die den Stoffübergang durch Diffusion zur Oberfläche des Partikels (externer Stofftransport) beschreibt, von dem Thiele-Modul (ϕ) [120], das die Porendiffusion (interner Stofftransport) angibt, und von der Substratkonzentration (S).

$$\eta = f(Sh, \phi, S) \tag{4.32}$$

Buchholz [119] definiert die einfache Michaelis-Menten-Gleichung für immobilisierte Enzyme wie folgt:

$$v = \eta \cdot \frac{k_{kat} \cdot E_0 \cdot [\mathrm{S}]}{[\mathrm{S}] + K_m} \tag{4.33}$$

Dabei sind alle aktivitätseinschränkenden Parameter im Wirkungsgrad ausgedrückt. Anstelle der maximalen Umsatzgeschwindigkeit findet sich nun die Beschreibung der Aktivität durch die Wechselzahl (k_{kat}) wieder. Da in dieser Arbeit keine reine FDM hergestellt wurde, war bisher auch die Beschreibung der Aktivität mittels Wechselzahl nicht möglich. Dennoch kann auf Basis dieser Arbeit und nachfolgender Methode auch v_{max} zur Charakterisierung der immobilisierten Enzyme herangezogen werden. v_{max} kann aus dem Produkt der Wechselzahl (k_{kat}) und der Gesamtkonzentration der aktiven Zentren (E_0) berechnet werden:

$$v_{max} = k_{kat} \cdot E_0 \tag{4.34}$$

Für Formaldehydkonzentrationen kleiner als ein Gramm pro Liter kann die Gleichung (4.33) verwendet werden, indem Gleichung (4.34) eingesetzt wird. Für Konzentrationen im Bereich ab 1 g/l kann die um den Wirkungsgrad erweiterte Gleichung mit kompetitiver Hemmung, analog zu Kapitel 4.4.2 Gleichung (4.29), herangezogen werden:

$$v = \eta \cdot v_{max} \cdot \frac{c_{FA}}{c_{FA} + K_m \cdot \left(1 + \frac{c_{MeOH}}{K_I}\right)} \tag{4.35}$$

Dafür werden die Werte für v_{max}, K_m, und K_i aus der Reaktion des freien Enzyms übernommen und lediglich eine Anpassung des Modells über den Wirkungsgrad für den Reaktionsverlauf des immobilisierten Enzyms durchgeführt. Beachtet werden muss, dass die immobilisierte Proteinmenge jener für die Reaktion mit freiem Enzym entspricht. Wie in Abbildung 4-29 dargestellt, wird zunächst eine Kinetik mit freiem Enzym gemessen (linke Messreihe), mittels Gleichung (4.29) v_{max}, K_m, und K_i berechnet, die Werte in Gleichung (4.35) eingesetzt und schließlich anhand der rechten Datenreihe mittels nichtlinearer Regression ausschließlich der Wirkungsgrad η berechnet. In diesem Fall wird ein Wirkungsgrad von 0,041 erhalten. Wird η mittels Gleichung (4.31) aus den in Abbildung 4-29 dargestellten Modellen berechnet, so wird für η ein Wert von 0,0416 erhalten. Beide Herangehensweisen führen demnach zu einem vergleichbaren Ergebnis. Um die Ursache für die deutlich verminderte Aktivität zu bestimmen,

wird in der chemischen Makrokinetik häufig das Thiele-Modul herangezogen, um damit auf die Porendiffusion rückzuschließen. Obwohl das Thiele-Modul auch für auf porösen Trägermaterialien immobilisierte Enzyme herangezogen wird [120], ist in der Michaelis-Menten-Kinetik die Verfügbarkeit und die Affinität des Enzyms zum Substrat und die Produktfreisetzung über die Parameter K_m, v_{max} und K_i bereits beschrieben. Also müsste auch über die drei Parameter auf die Ursache der Aktivitätsverluste rückgeschlossen werden können, indem ein Wirkungsgrad vor jeden Parameter gesetzt wird:

$$v = \eta_{v_{max}} \cdot v_{max} \cdot \frac{c_{FA}}{c_{FA} + \eta_{K_m} \cdot K_m \cdot \left(1 + \frac{c_{MeOH}}{\eta_{K_I} \cdot K_I}\right)} \qquad (4.36)$$

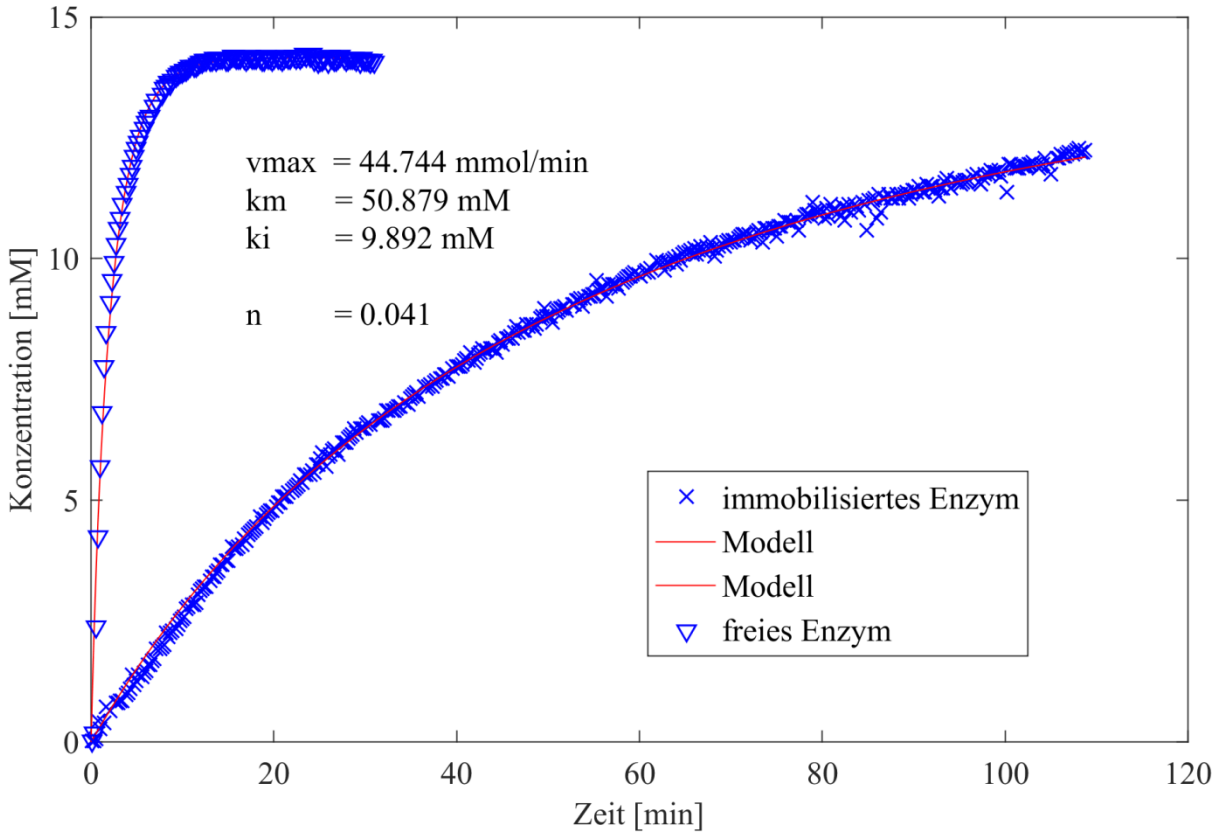


Abbildung 4-29 Berechnung des Wirkungsgrads für immobilisierte Enzyme anhand der Anpassung des Modells. Die Werte für v_{max}, K_m, und K_i sind in beiden Modellen identisch. Die Anpassung für das immobilisierte Enzym erfolgt lediglich über den Wirkungsgrad η.

Wie vorangegangen werden die Werte für v_{max}, K_m, und K_i aus der Reaktion des freien Enzyms übernommen. Die Startwerte für die Berechnung waren:

$$\eta_{v_{max}} = 0{,}1,\ \eta_{K_m} = 0{,}1 \text{ und } \eta_{K_I} = 1$$

Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-30 dargestellt. Der Wert für K_i bleibt durch die Immobilisierung unberührt. Die Werte für v_{max}, und K_m werden entsprechend der Wirkungsgrade deutlich verringert.

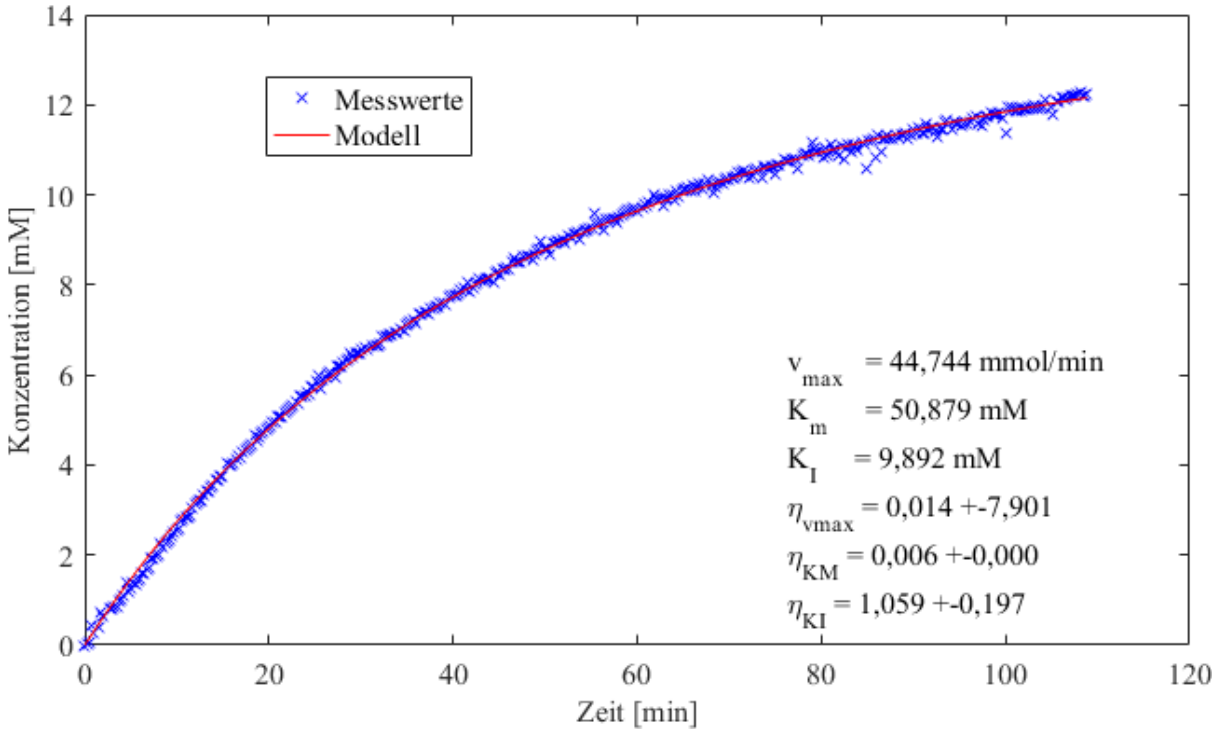


Abbildung 4-30 Berechnung der Wirkungsgrade der Michaelis-Menten-Parameter für immobilisierte Enzyme. Die Werte für v_{max}, K_m, und K_i wurden anhand der Reaktion des freien Enzyms berechnet.

Da der Fehler für den Wirkungsgrad von v_{max} verhältnismäßig groß war, wurden die Simulation wiederholt, die Startwerte angepasst und η_{K_I} auf den Wert 1 festgesetzt, da sich andeutete, dass K_i durch die Immobilisierung nicht beeinflusst wurde. Die Startwerte lauteten:

$$\eta_{v_{max}} = 0{,}014,\ \eta_{K_m} = 0{,}006 \text{ und } \eta_{K_I} = 1$$

In Abbildung 4-31 konnte der Fehler durch die Anpassung der Startwerte verringert werden. Die Werte für die Wirkungsgrade blieben identisch. Demnach wurden für $\eta_{v_{max}}$ ein Wert von 0,014 und für η_{K_m} ein Wert von 0,006 erhalten.

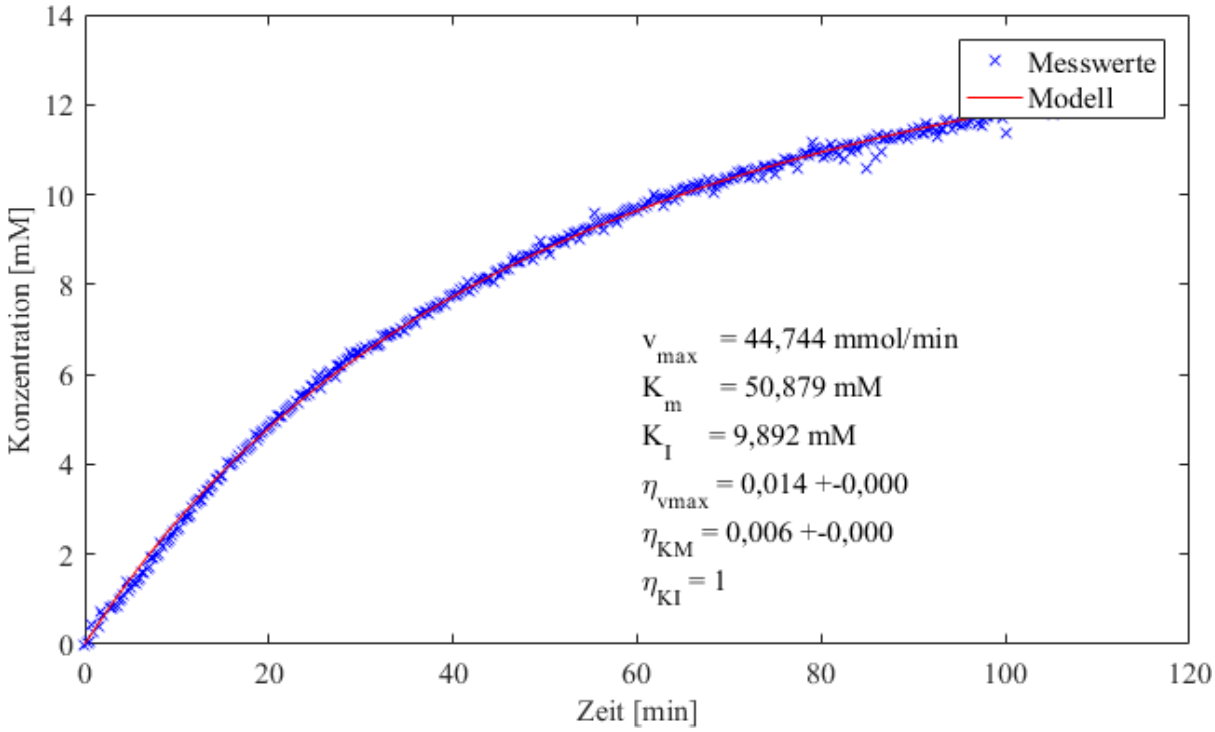


Abbildung 4-31 Berechnung der Wirkungsgrade der Michaelis-Menten-Parameter für immobilisierte Enzyme mit optimierten Startwerten. Die Werte für v_{max}, K_m, und K_i wurden anhand der Reaktion des freien Enzyms berechnet. η_{K_I} wurde auf den Wert 1 festgesetzt und nicht neu berechnet.

4.5 Produktabtrennung

Wie in Kapitel 4.4 gezeigt wurde, kommt es während der enzymatischen Umsetzung von Formaldehyd zu einer Produktinhibierung durch Methanol und Ameisensäure. Eine Möglichkeit der Vermeidung von inhibierenden Produktkonzentrationen ist die kontinuierliche Umsetzung des Formaldehyds durch z.B. die Immobilisierung des Enzyms (vergl. Kapitel 4.4.5). Eine andere besteht in der in-situ Produktabtrennung. Auch die Kombination aus kontinuierlicher Umsetzung und Produktabtrennung wäre denkbar. Die FDM zeigte bereits bei einer Methanolkonzentration von 0,5 M (16 g/l) eine verminderte Aktivität (vergl. Kapitel 4.4.4.1). Bei einer Methanolkonzentration von 1 M (3,2 %) zeigte gelöstes Enzym noch etwas Aktivität. Eine Möglichkeit zur Kombination von kontinuierlicher Umsetzung und Produktabtrennung bestünde in der Rektifikation des Methanols nach der Katalyse. In der fettchemischen Industrie werden beispielsweise 8 % bis 30 %ige Methanollösungen durch Destillations- und Rektifikationsanlagen zu 99 %igen Lösungen aufbereitet [121]. Dieses Konzentrationsniveau kann durch die reine Enzymreaktion nicht erreicht werden, weshalb computergestützt die Rektifika-

tion von geringeren Methanolkonzentrationen untersucht wurde (vergl. Kapitel 4.5.1). Außerdem ist die Rektifikation von Ameisensäure wegen ihres wasserähnlichen Siedepunkts ungünstig. Bei der großtechnischen Herstellung von Ameisensäure werden aus diesem Grund Ionenaustauscher verwendet (vergl. Kapitel 2.8) und sollten deshalb auch für diese Anwendung getestet werden (vergl. Kapitel 4.5.3). Allerdings muss dabei auf die Verwendung eines Puffers zur pH-Wert Stabilisierung verzichtet werden. Eine FDM-Reaktion wäre dennoch bei neutralem pH-Wert möglich, wenn die Ameisensäure direkt nach der Bildung an einen Ionenaustauscher adsorbiert werden könnte. Die örtlich nahe Abtrennung wäre wegen der Produktinhibierung ebenfalls für Methanol wünschenswert. Eine in-situ Produktabtrennung von Methanol kann durch Verwendung von Pervaporationsmembranen realisiert werden (vergl. Kapitel 4.5.2).

4.5.1 Methanolreinigung mittels Rektifikation

Im Rahmen einer Masterarbeit wurde mittels Prozesssimulation (Aspen HYSYS) die Möglichkeit der Verwendung einer Rektifikationskolonne untersucht [98]. In der Literatur sind keine Daten über die Rektifikation von Methanolkonzentrationen <8 % aufgeführt (vergl. Kapitel 2.9). Für den FDM-Prozess ist die Gewinnung von Methanol aus einer ein- oder dreiprozentigen Feedlösung interessant, da diese Konzentrationen durch die FDM-Reaktion direkt erzielt werden können (vergl. Kapitel 4.4.4.1). Die Methanolgewinnung mit einer der Enzymreaktion nachgeschalteten Rektifikation stellt aus anlagentechnischer Sicht den einfachsten Fall dar. Nachteilig ist, dass die Methanolabtrennung auf diese Weise wegen der hohen Temperaturen nicht in-situ möglich ist.

Zur Durchführung der Simulation wurde das in Abbildung 4-32 dargestellte Fließschema in Aspen erstellt. Die Wärme aus dem Sumpf-Flüssigkeitsstrom ($\dot{V}_{Sumpf}$) wird über einen Wärmetauscher geleitet und damit die Feedlösung ($\dot{V}_{Feed}$) auf 50 °C erwärmt. Die Auslegung der Kolonne erfolgte nach der sogenannten „shortcut“ Methode [122], um Stufenanzahl, Einlassstufe und Temperatur sowohl im Kondensator als auch im Verdampfer zu bestimmen. Dabei wurde ausschließlich die Kolonne ohne Wärmetauscher betrachtet und folgende Parameter definiert:

- Die Feedlösung wurde auf eine Konzentration von 10 Massen-% festgelegt.

- Der Volumenstrom wurde auf 128,6 l/h festgesetzt.
- Der Molanteil der leichten Phase (Methanol) im Sumpf wurde auf 0,01 und
- der Molanteil der schweren Phase im Destillat auf 0,005 (Wasser) festgesetzt.
- Der Betriebsdruck sowohl im Kondensator als auch im Verdampfer wurde auf Umgebungsdruck festgelegt.
- Die Temperatur der Feedlösung betrug 50 °C.

Mit diesen Parametern konnte ein Mindest-Rücklaufverhältnis (R_{min}) von 4,38 ermittelt werden. Für das Rücklaufverhältnis (R) verwendet man häufig das etwa 1,1 bis 1,3-fache des Mindest-Rücklaufverhältnisses [123]. Das 1,2-fache des ermittelten R_{min} ergibt ein R von 5,26. Damit lassen sich die Kolonneneigenschaften berechnen:

- Minimale Bodenzahl: 6,256 → 7 Böden
- Optimale Bodenanzahl: 13,95 → 14 Böden
- Optimaler Einlassboden: 11,33 → 11. Boden
- Verdampfer-Temperatur: 98,26 °C
- Kondensator-Temperatur: 64,55 °C
- Destillatstrom: 13,21 l/h

Die Kolonneneigenschaften wurden in einem nächsten Schritt zur Rigorosen Kolonnensimulation (SCDS) verwendet [124]. Dazu wurde zunächst die Effizienz jedes einzelnen Bodens auf 80 % festgesetzt.

Zunächst wurde für eine Methanolkonzentration von 10 % (w/w) im Feed die Verwendung eines Wärmetauschers untersucht und die Verdampferleistung (P_{Dampf}) einer Kolonne mit Wärmetauscher mit einer ohne Wärmetauscher verglichen. Mit einem Rücklaufverhältnis von 5,26, einem Methanolanteil im Destillat (c_{MeOH}^{Dest}) von 99,5 % (w/w). und einer Rückgewinnung von 98,24 % betrug die Leistung (P_{Dampf}) ohne Wärmetauscher 34,23 kW bei einer Feed-Temperatur von 25 °C und mit Wärmetauscher 30,5 kW bei einer Feed-Temperatur von 50 °C. Mit Wärmetauscher kann demnach die benötigte Leistung um 11 % gesenkt werden. Wird das Rücklaufverhältnis auf 8 gesetzt, erhöht sich die benötigte Leistung von 30,5 kW auf 41,52 kW und es können 99,5 % des Methanols aus dem Feedstrom gewonnen werden.

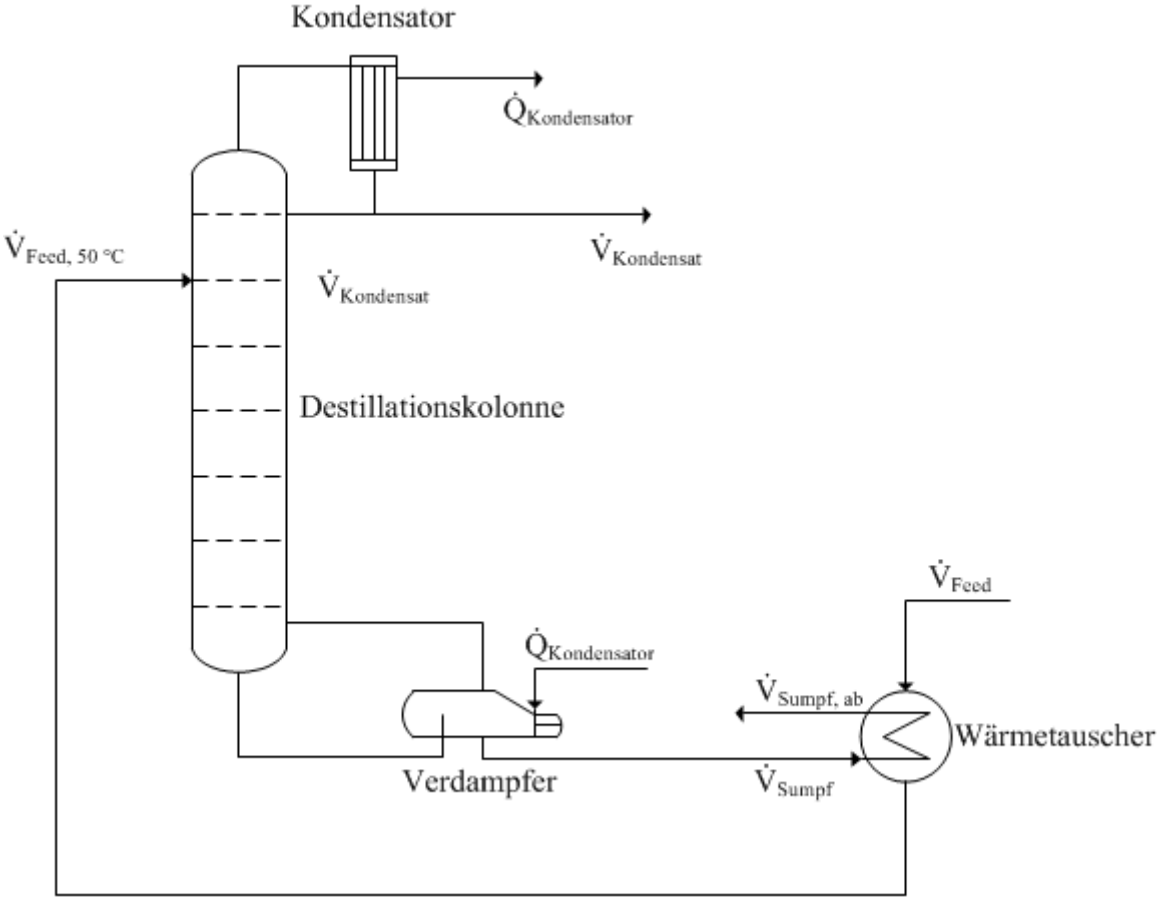


Abbildung 4-32 Fließschema zur Rektifikation von wässriger Methanollösung zur Simulation mittels Aspen HYSYS [98].

Tabelle 4-8 Betriebsparameter einer Rektifikationskolonne in Abhängigkeit der Methanol-Feedkonzentration. Die Leistung ist ohne und mit Wärmerückgewinnung durch einen Wärmetauscher dargestellt.

c_{MeOH}^{Feed}	R	c_{MeOH}^{Dest}	Ausbeute	P_{Dampf} o. Rückg. 25 °C	P_{Dampf} m. Rückg. 50 °C	$\dot{V}_{Feed}$
[Gew.-%]	[-]	[Gew.-%]	[%]	[kW]	[kW]	[l/h]
10	5,26	99,5	98,24	34,23	30,50	128,60
7	5,26	99,5	96,09	38,51	32,78	183,44
5	5,26	99,5	89,57	43,39	33,81	256,81

In einem nächsten Schritt wurde die Methanolkonzentration im Feed (c_{MeOH}^{Feed}) auf 7 % (w/w) bzw. auf 5 % (w/w) gesenkt. Damit die zugeführte Menge an Methanol konstant gehalten werden konnte, wurde der Feedstrom ($\dot{V}_{Feed}$) verhältnismäßig (183,44 l/h und 256,81 l/h) angepasst. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-8 zusammengefasst. Methanolkonzentrationen kleiner 5 % (w/v) (Molanteil 0,03) sind nicht mehr darstellbar, da der Stoffmengenanteil im

Dampf mit kleiner 0,1 zu gering ist, wie anhand des y-x-Diagramms in Abbildung 4-33 zu erkennen ist.

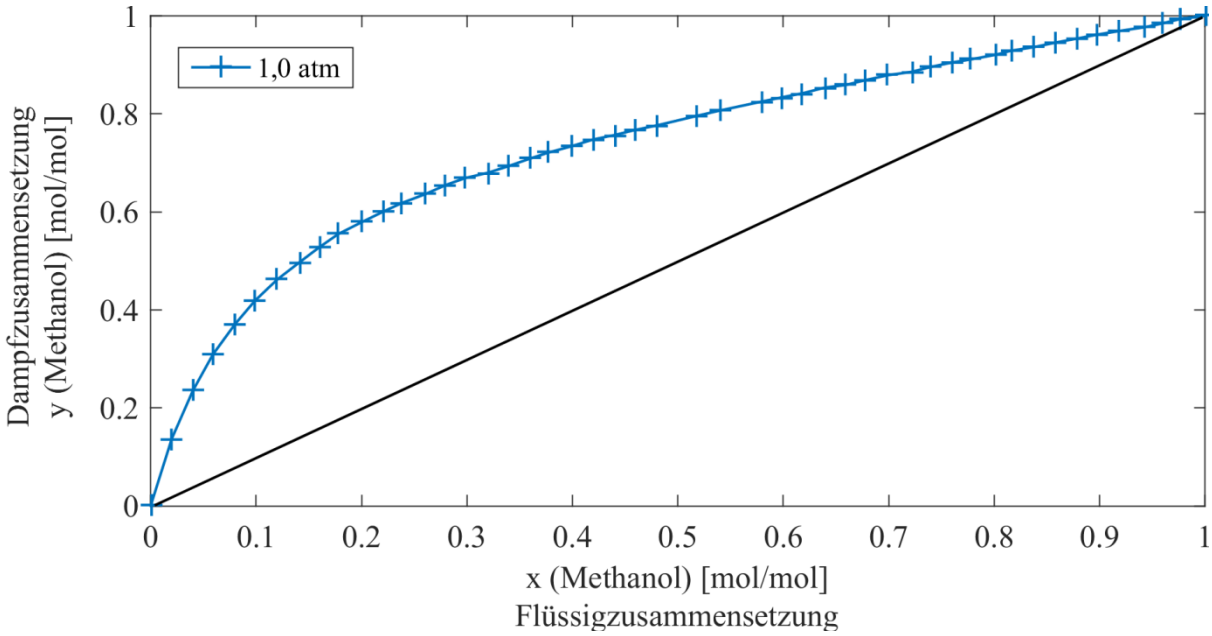


Abbildung 4-33 y-x-Diagramm für das Gemisch aus Methanol und Wasser (erstellt mit Aspen Plus [101]).

4.5.2 Methanolabtrennung mittels Pervaporation

Die Pervaporation von Methanol wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Heiko Stallhofer untersucht [125]. In dieser Arbeit wurden kommerziell erhältliche Polydimethylsiloxan-Membranen (PDMS) und eine noch nicht kommerziell erhältliche Polytrimethylsiloxanpropien-Membran (PTMSP) verwendet, die eine höhere Selektivität gegenüber Methanol aufweisen soll.

4.5.2.1 Verwendung eines Flachmembranmoduls

Mit Hilfe eines Pervaporationsmoduls mit Flachmembran lässt sich neben der Selektivität auch der Flux bestimmen (vergl. Kapitel 3.8.2). Verwendet wurde ein geschlossener und gerührter Edelstahlbehälter mit der Pervaporationsmembran als Flachboden (Abbildung 3-24). In Abbildung 4-34 sind die Selektivität und der Flux für verschiedene Methanol-Ausgangskonzentrationen dargestellt.

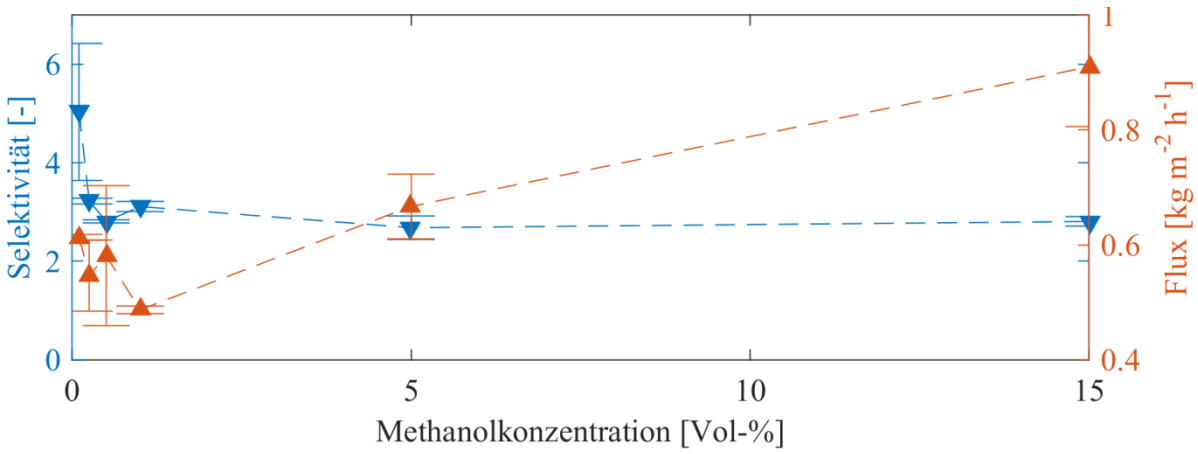


Abbildung 4-34 Selektivität der PDMS-M1_2-Membran für Methanol in Wasser und Transmembran-Flux für Methanol in Abhängigkeit von der Methanolkonzentration.

Die Pervaporation der unterschiedlichen Lösungen wurde so lange durchgeführt, bis ein Volumen von 50 ml erreicht wurde. Daraufhin wurde die Methanolkonzentration in der Permeat- und Retentatlösung bestimmt. Aus einer 0,25 % Methanollösung wurde auf diese Weise auf der Permeatseite eine fünffach höhere Methanollösung hergestellt. Ab einer Konzentration von 0,5 % bis 15 % wurde mittels Gleichung (2.9) eine Selektivität von drei berechnet. Allerdings ist der Fehler bei der Verwendung des Flachmembranmoduls groß (max. 80 %) und die Datendichte sehr gering. Die Werte aus den jeweiligen Konzentrationsstufen lassen sich dennoch zu einer Abreicherungskurve des Retentats zusammensetzen (Abbildung 4-35). Die Abreicherung des Methanols mittels Pervaporation muss in der Form von Gleichung (2.5) (vergl. Kapitel 3.8.1) exponentiell ablaufen. In Abbildung 4-35 erfolgte die Anpassung nicht mittels Fehlerquadrat-Minimierung, sondern beginnend mit der Ausgangskonzentration von 5 g/l.

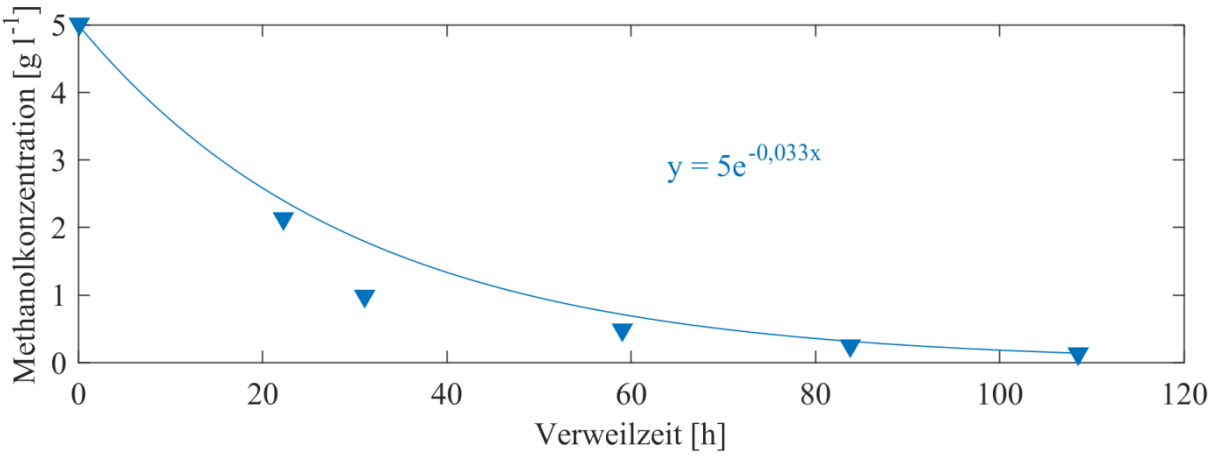


Abbildung 4-35 Abnahme der Methanolkonzentration im Retentat an der Pervaporationsmembran M1_2 bei einer Temperatur von 25 °C, einem Druck von 20 mbar bis 25 mbar und der Membranfläche von 0,005 m².

4.5.2.2 Verwendung eines Röhrenmoduls

Im Pervaporations-Röhrenmodul kann analog zum Flachmembranmodul ein Vakuum oder im Gegensatz zum Flachmembranmodul ein Spülgas zur Desorption des Methanols verwendet werden.

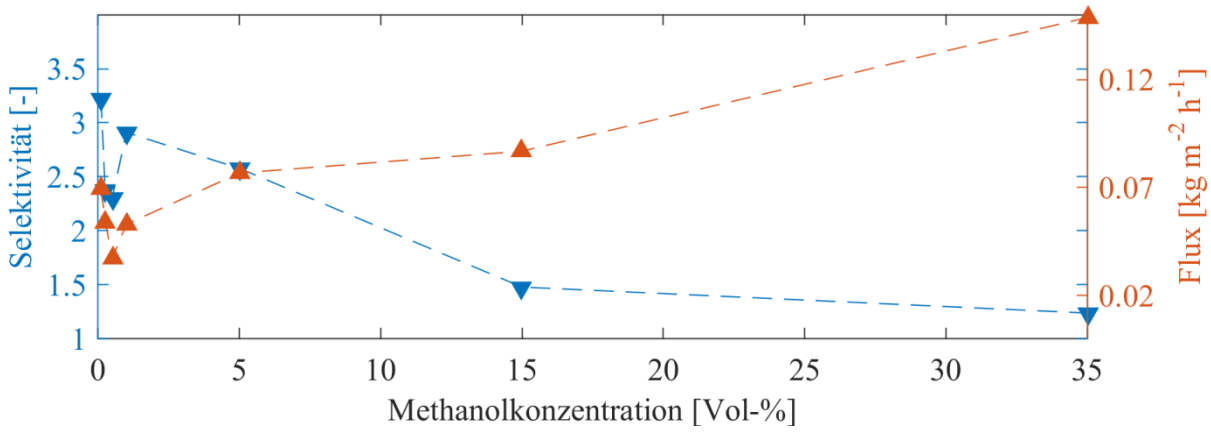


Abbildung 4-36 Verwendung eines Pervaporation-Röhrenmoduls für verschiedene Methanol-Ausgangskonzentrationen.

Das verwendete einen Meter lange PDMS-Röhrenmodul mit fünf Kanälen der Firma Pervatech hatte im Vergleich zur verwendeten Flachmembran mit 0,8 m² eine erheblich größere Membranfläche. Der Betriebsdruck betrug 20 mbar und die Betriebstemperatur 25 °C. Analog zur Flachmembran wurden auch hier 500 ml der jeweiligen Lösung verwendet und kontinuierlich mittels Schlauchpumpe für alle Versuche mit gleichem Volumenstrom im Kreis gepumpt (vergl. Kapitel 3.8.1). Die Probennahme erfolgte analog zur Flachmembran, indem mittels Kühlfalle 50 ml Permeat aufgefangen wurde. In Abbildung 4-36 ist zum einen der Flux und zum anderen die Selektivität dargestellt. Mit steigender Methanolkonzentration nehmen die Selektivität ab und der Flux zu.

4.5.2.3 Vergleich der Pervaporationsverfahren

Sowohl das Flachmembran- als auch das Röhrenmodul konnte zur Anreicherung von Methanol, insbesondere im Bereich zwischen 0,1 % v/v bis 5 % v/v, verwendet werden. Eine Anreicherung von Methanol aus einer Lösung kann aber auch lediglich durch das Anlegen eines Vakuums erfolgen, in dem das leichter flüchtige Methanol verdampft. Die mittels Verdampfung erzielte Anreicherung müsste geringer sein als bei der Verwendung einer PDMS-Pervaporationsmembran bei gleicher Methanolkonzentration.

Es musste überprüft werden, ob die PDMS-Schicht einen Einfluss auf die Anreicherung hatte. Aus diesem Grund wurden 500 ml mit jeweiliger Methanolkonzentration in einen Rotationsverdampfer gegeben und bei 25 °C sowie einem Druck von 20 mbar eingestellt. Da die Oberflächen der Flüssigkeit und die Oberflächen der Membranen in den Modulen nur schwer vergleichbar sind, wurde der Versuch so lange durchgeführt bis, wie bei den Pervaporationsversuchen, 50 ml der Flüssigkeit überführt wurden. Zudem wurde auch eine nicht selektive poröse PTFE-Membran als Pervaporationsmembran verwendet, da auch die PDMS-Schicht auf einer porösen Trägerschicht aufgebracht ist. In Abbildung 4-37 sind die Selektivitäten, d.h. das Verhältnis der Konzentration in der überführten Flüssigkeit zur Ausgangskonzentration für beide Pervaporationsverfahren, Rotationsverdampfung und PTFE-Membran dargestellt.

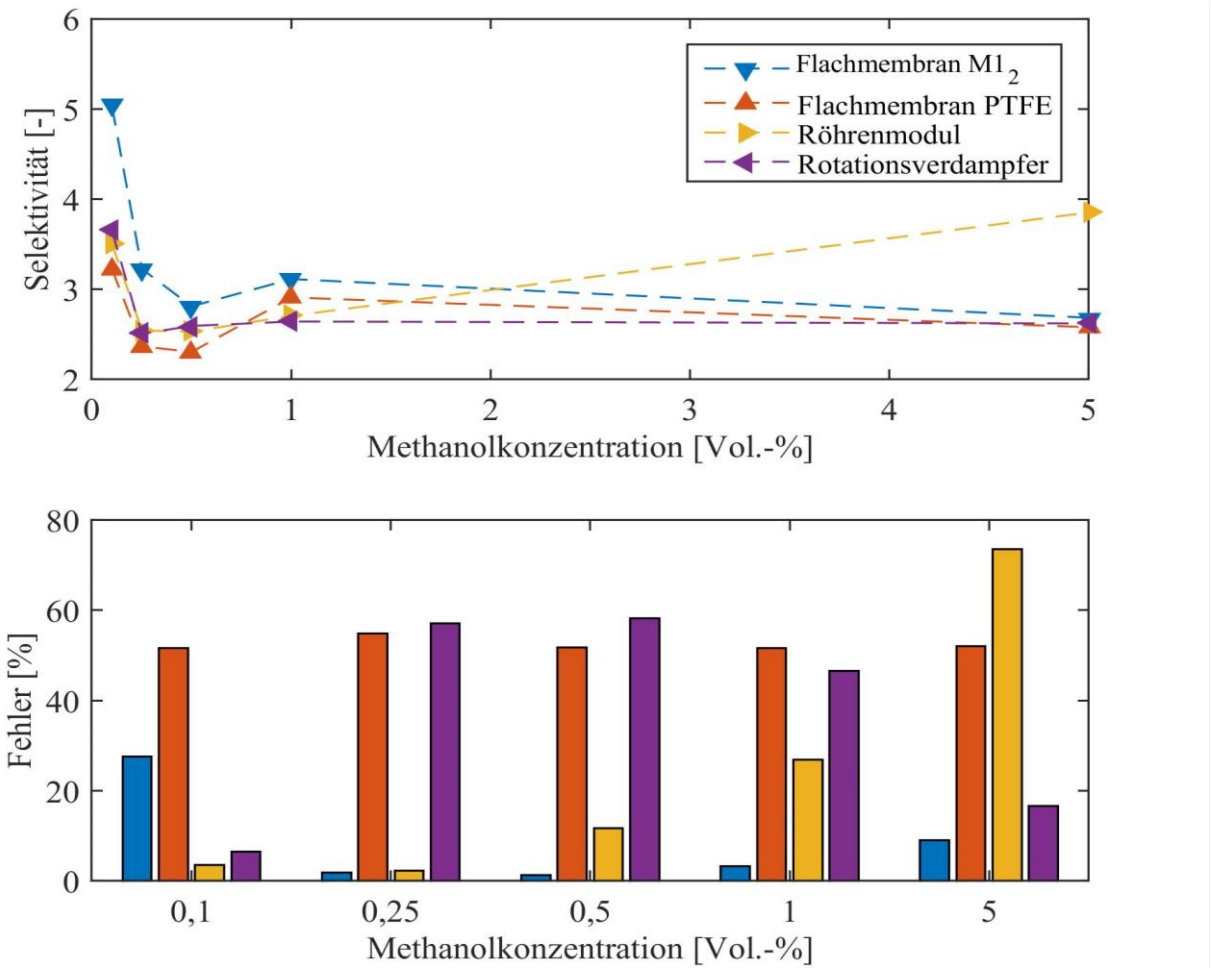


Abbildung 4-37 *Oben*: Vergleich der Selektivitäten der beiden Pervaporationsverfahren im Vergleich zur Anreicherung mittels Rotationsverdampfung und der Verwendung einer porösen PTFE-Membran als Grenzfläche. *Unten*: Darstellung des Fehlers der Selektivität.

Erwartungsgemäß hatten die Rotationsverdampfung und die PTFE-Membran, wegen des Fehlens einer aktiven Trennschicht, ähnliche Selektivitäten. Die Flachmembran M1_2 zeigte bei einer Konzentration von 0,1 % eine bessere Selektivität im Gegensatz zu dem Pervaporation-Röhrenmodul, zur PTFE-Membran und dem Rotationsverdamper. Aufgrund des großen Fehlers, vor allem durch das Kondensieren des Dampfstroms in der Kühlfalle, kann mit dieser Methode dennoch keine Aussage über den Einfluss der PDMS-Schicht getroffen werden. Eine andere Methode besteht darin, die Pervaporationsmembran direkt in das Membranmodul des Massenspektrometers einzubauen, die Methanolanreicherung direkt zu erfassen und mit der Verwendung einer PTFE-Membran zu vergleichen. Dazu müssen sowohl der Flux als auch das Vorvakuum des Messaufbaus für die Pervaporation- und die PTFE-Membran ähnlich sein.

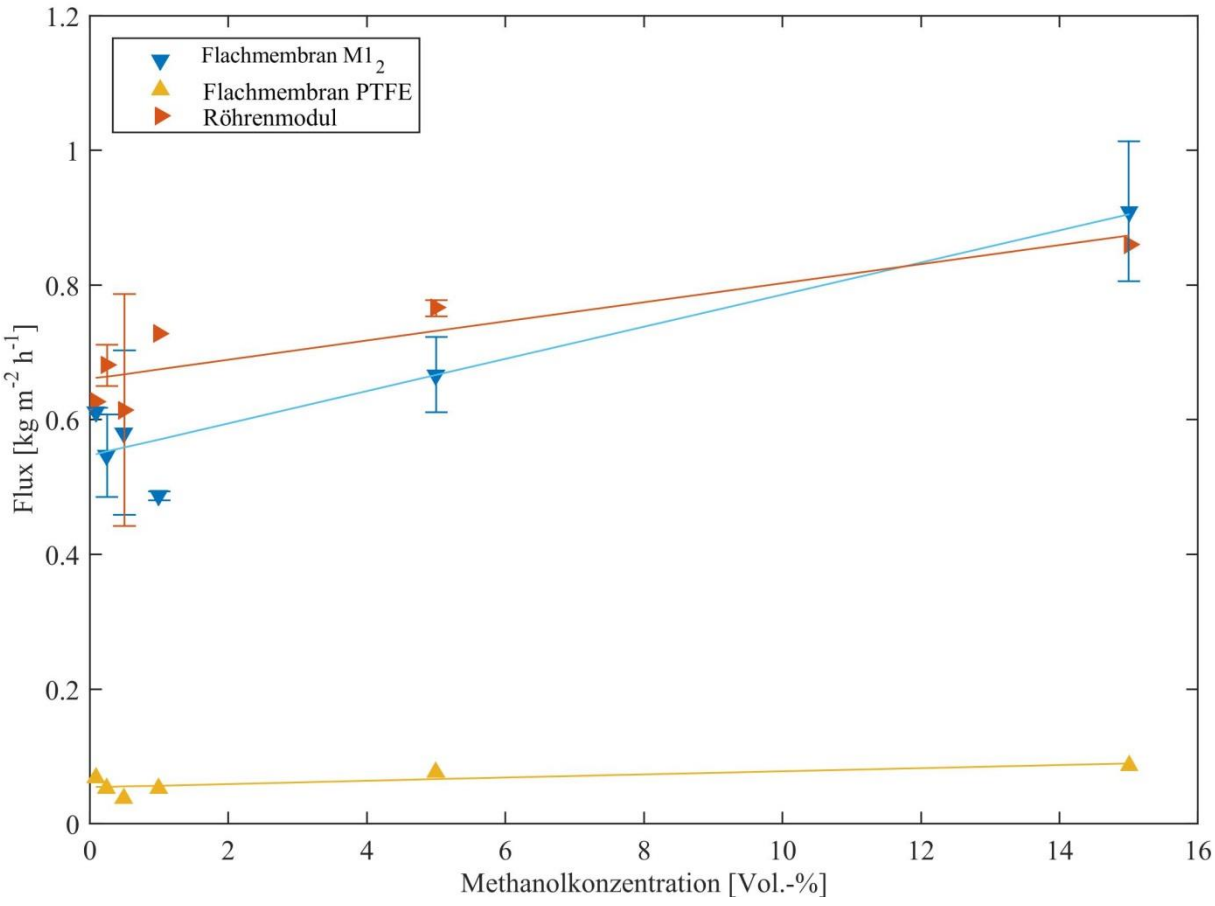


Abbildung 4-38 Vergleich des Transmembranfluxes der beiden Pervaporationsverfahren und der PTFE-Membran im Flachmembranmodul.

Die PTFE-Membran hat einen Porendurchmesser von 0,02 µm und eine Dicke von 50 µm. Die Membran ist stark hydrophob. Vergleicht man bei einem Druck von 20 mbar und einer

Temperatur von 25 °C die Pervaporationsmembran sowohl in Form des Röhrenmoduls wie auch in der Verwendung im Flachmembranmodul mit der PTFE-Membran im Flachmembranmodul, ist der Transmembranflux der PTFE-Membran bei den jeweiligen Methanolkonzentrationen wegen der hydrophoben Eigenschaften um den Faktor zehn schlechter (Abbildung 4-38). Dieses Ergebnis würde eigentlich erwarten lassen, dass der Druck im Vorvakuum des Messsystems unterschiedlich ist. Dies war jedoch nicht so. Sowohl die Pervaporations- als auch die PTFE-Membran zeigten den gleichen Druck von 0,16 mbar.

4.5.2.4 Verwendung des Massenspektrometers mit Membraneinlass

Da der Druck des Vorvakuums des Massenspektrometers die ausschlaggebende Größe für den Einsatz einer Membran im Modul des Massenspektrometers ist und sowohl mit der PTFE als auch mit der Pervaporation der gleiche Druck erzielt werden konnte, ist die Verwendung der Pervaporationsmembran anstelle der PTFE-Membran möglich. In der Literatur wurde diese Methode bisher noch nicht zur Charakterisierung einer Pervaporationsmembran angewendet.

Die Kalibrierung für diese Messung erfolgte mit der PTFE-Membran, indem der gemessene Ionenstrom als Bezugsgröße herangezogen wurde. In Abbildung 4-39 ist die Selektivität in Abhängigkeit von der Methanolkonzentration der Ausgangslösung (0,1 Gew.-%, 0,25 Gew.-%, 0,5 Gew.-%, 1 Gew.-%, 5 Gew.-%, 15 Gew.-% und 35 Gew.-%) für verschiedene PDMS-Membranen (POL_OR-M, PolyAn, Deutschland) und für eine PTMSP-Membran (Vito, Belgien) dargestellt.

Bei beiden Membranen M1 und M2 handelt es sich um Kompositmembranen, die mittels „Pore-Filling“-Technologie [126] hergestellt wurden. Als Trägermaterial wurden zwei unterschiedliche Ultrafiltrationsmembranen verwendet (M1 und M2). Die Membranen M1_2 und M2_2 sind für einen höheren Flux und die Membranen M1_1 und M2_1 für eine bessere Selektivität optimiert. Die in Abbildung 4-39 abgebildeten Messergebnisse ergaben für die PDMS-Membran M1_2 unter den PDMS-Membranen die beste Selektivität. Die PTMSP-Membran hebt sich durch eine bessere Selektivität in allen Konzentrationsbereichen deutlich von den PDMS-Membranen ab. Für eine Konzentration kleiner 0,5 % kann für alle Membranen eine größere Selektivität erzielt werden (Abbildung 4-39), was einem Einsatz von Pervaporationsmembranen in einem kontinuierlichen enzymtechnischen Prozess aufgrund der Pro-

dukthemmung entgegenkommt. Die Verwendung des on-line-Massenspektrometers mit Membraneinlass ermöglicht die genaueste Bestimmung der Selektivität, da keine Kühlfalle mit anschließender Messung der Kondensatmenge verwendet werden muss. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Löslichkeitsmembranen PDMS und PTMSP einen Einfluss auf die Methanolanreicherung haben. Allerdings konnte auf diese Weise der Transmembranflux nicht bestimmt werden.

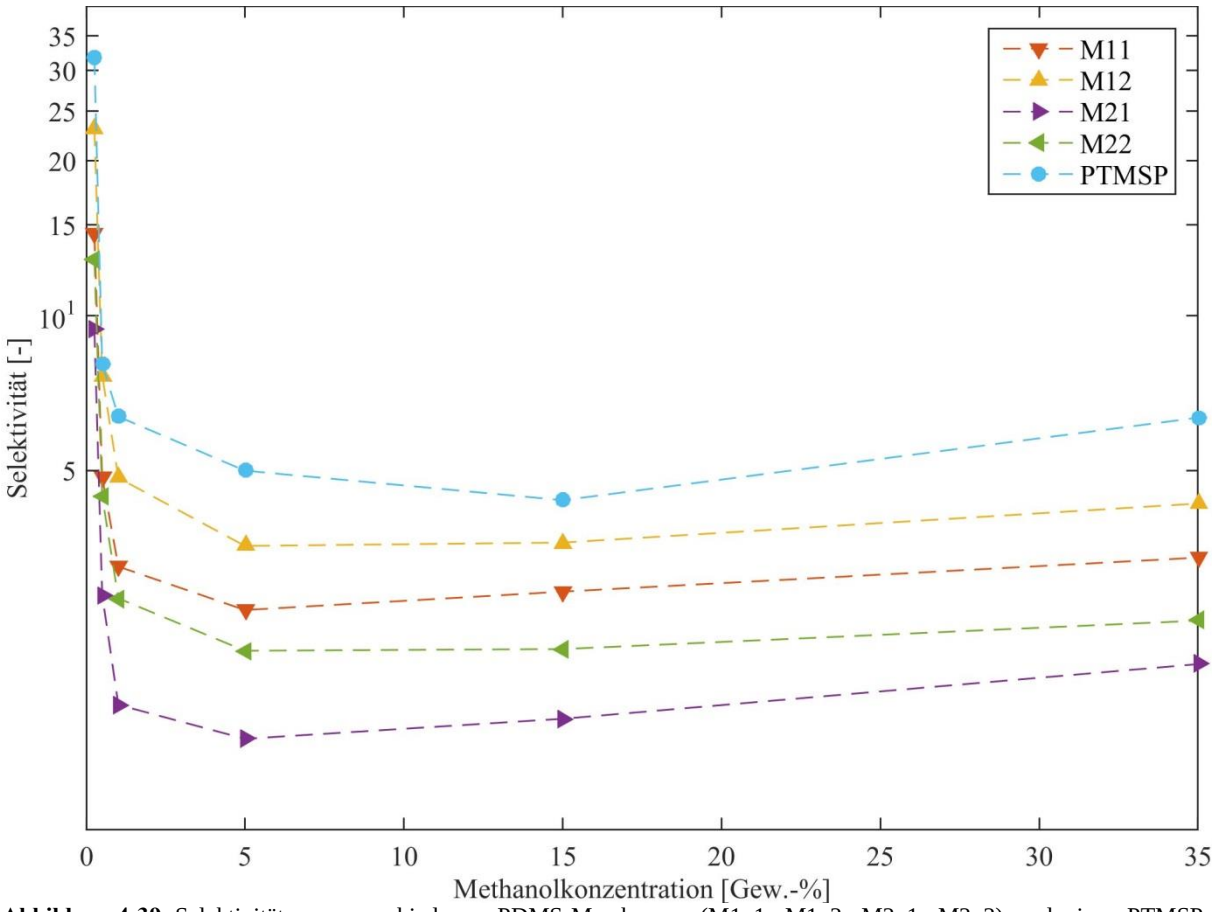


Abbildung 4-39 Selektivität von verschiedenen PDMS-Membranen (M1_1, M1_2, M2_1, M2_2) und einer PTMSP-Membran gemessen im Membranmodul des Massenspektrometers bei einem Vakuum von 0,16 mbar. Der Fehler liegt bei $<10^{-6}$.

4.5.3 Ameisensäureadsorption mittels Ionenaustausch

Die Reaktion der FDM muss zwingend im neutralen pH-Wert Bereich stattfinden, da das pH-Optimum des Enzyms bei pH 7 liegt und es im Sauren sowie im Basischen zu einer Inaktivierung des Enzyms kommt. Die Ameisensäure ist bei neutralem pH-Wert zum größten Teil dissoziiert und damit nicht flüchtig (Abbildung 4-40). Die Adsorption der Ameisensäure an ei-

nen Anionenaustauscher kann empirisch bestimmt werden. Ziel ist, die bei der Enzymreaktion gebildete Ameisensäure sofort abzufangen, damit keine pH-Wert-Änderung eintreten kann.

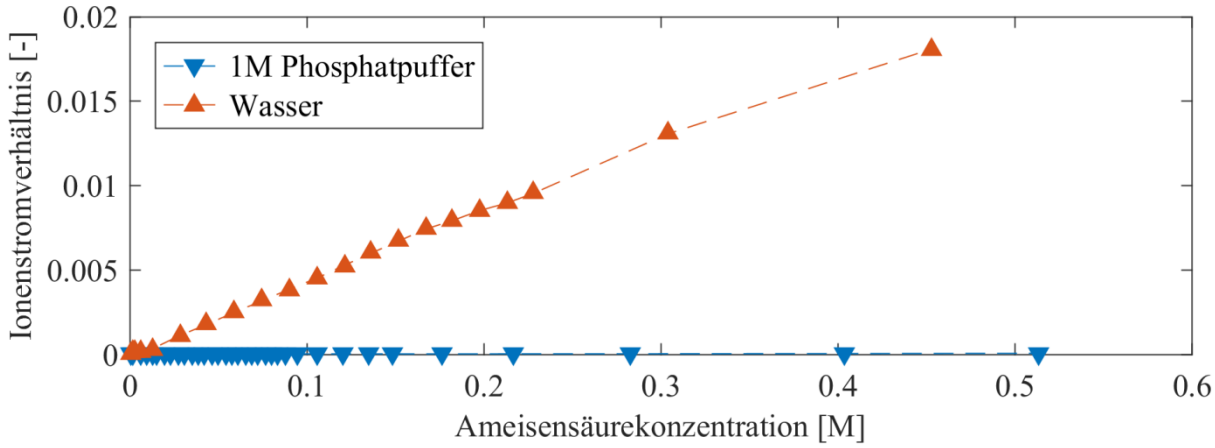


Abbildung 4-40 Messung der Flüchtigkeit von Ameisensäure bei unterschiedlichen Konzentrationen in Wasser und in einem 1 M Puffer pH 6,8 im Massenspektrometer. Dargestellt ist der Ionenstrom der Masse 46 für Ameisensäure im Verhältnis zur Masse 18 für Wasser

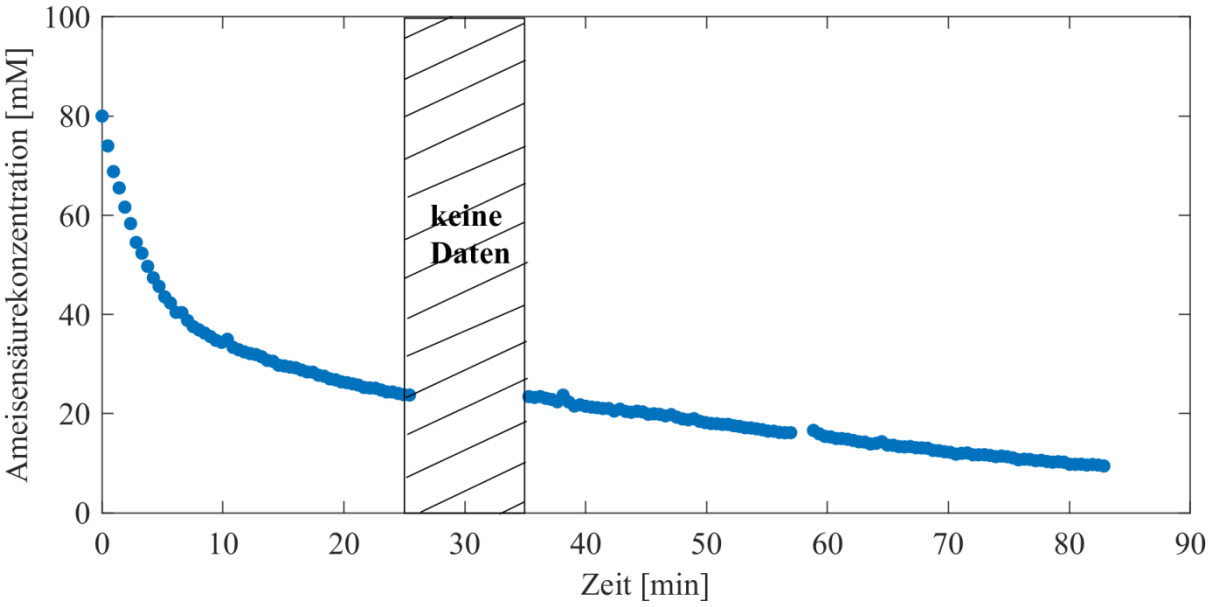


Abbildung 4-41 Darstellung der Adsorptionskinetik von Ameisensäure an einen Anionenaustauscher.

Die Adsorptionskinetik von Formiat wurde mit Hilfe des Massenspektrometers aufgezeichnet (Abbildung 4-41). Dazu wurden unter ständigem Rühren 51,5 g eines Anionenaustauschers (Purolite A111) in 0,2 Liter einer 80 mM Ameisensäurelösung gegeben und damit der Adsorptionsprozess gestartet. Auf Basis der aufgezeichneten Kinetik kann die Adsorptionsgeschwindigkeit des Ionenaustauschers in Abhängigkeit von der Beladung berechnet werden und bietet gleichzeitig einen Anhaltspunkt für die Beladungsgrenze bei der Verwendung zur in-situ-Abtrennung von Ameisensäure, wie nachfolgend erläutert wird (Abbildung 4-42). Es

muss mehr Ameisensäure vom Ionenaustauscher aufgenommen werden können als durch das Enzym gebildet wird.

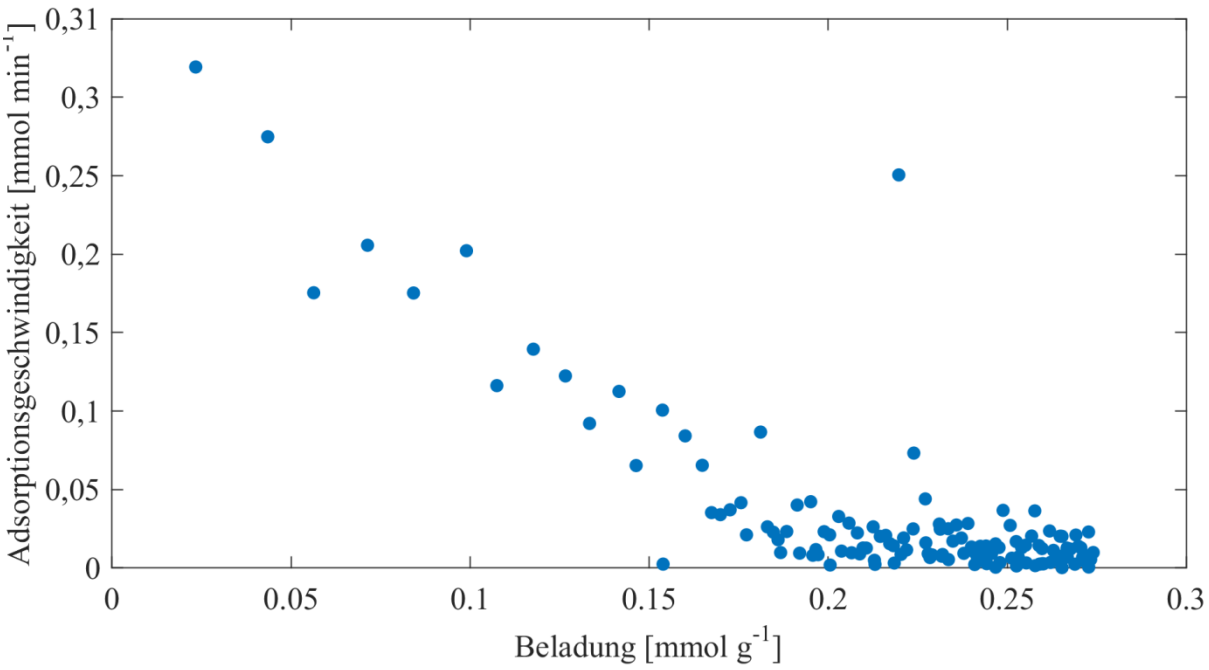


Abbildung 4-42 Abhängigkeit der berechneten Adsorptionsgeschwindigkeit von der Beladung des Ionenaustauschers zur Bestimmung einer Beladungsgrenze bei dem Einsatz zur In-situ Produktabtrennung.

Die maximale Beladung des Ionenaustauschers, mit der diese Randbedingung noch erfüllt ist, kann über folgende Gleichung berechnet werden:

$$q = \frac{\dot{V}}{m} \cdot \int_0^t (c_0 - c_i)dt = \frac{\dot{V}}{m}\left(c_0 \cdot t - \int_0^t c_i dt\right) \qquad (4.37)$$

q: Beladung [mmol/g]

$\dot{V}$: Durchlaufvolumen [l/h]

m: Ionenaustauschermasse [g]

t: Durchlaufzeit [h]

c_0: Formiat-Ausgangskonzentration der Lösung [mg/l]

c_i: Formiat-Ablaufkonzentration in der Zeit t [mg/l]

Die mittels Massenspektrometer aufgezeichnete Kinetik kann entsprechend Abbildung 4-43 auch in der Form $q = f(t)$ dargestellt werden.

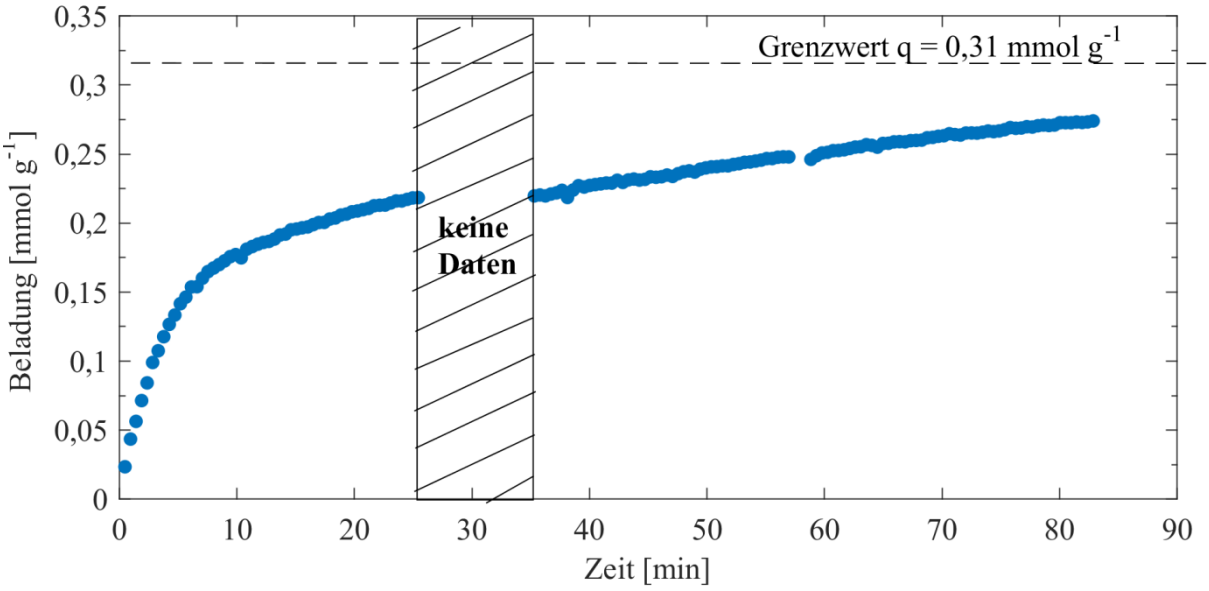


Abbildung 4-43 Beladungskinetik des Anionenaustauschers. Die maximale Beladung ist herstellerseitig mit 0,31 mmol/g angegeben.

Eine zum Enzym räumlich nahe Adsorption der Ameisensäure bedeutet gleichzeitig, dass das Enzym auch dem Regenerationsschritt durch Spülen mit Natronlauge ausgesetzt wird. Um die pH-Toleranz der FDM bei einer Regenration des Ionenaustauschers zu testen, wurden Proben mit gelöster und immobilisierter FDM ins Basische und ins Saure überführt. Das freie Enzym wurde für eine Minute auf einen jeweils vorgegebenen pH-Wert eingestellt und anschließend durch Gegentitration wieder in den neutralen Bereich überführt. Nach dieser Behandlung wurden im standardmäßig gepufferten System Reaktionskinetiken aufgezeichnet (Abbildung 4-44). Bei einem pH-Wert von 3,5 wurde das freie Enzym im Rohextrakt irreversibel geschädigt. Wurde die FDM im Rohextrakt für eine Minute einer 2 %igen Natronlauge (NaOH) ausgesetzt, die üblicherweise zur Regeneration von Anionenaustauschern eingesetzt wird, war nach einmaliger Behandlung keine Aktivität mehr nachzuweisen.

Der immobilisierte Rohextrakt zeigte eine etwas bessere Stabilität. Um das zu untersuchen, wurde eine 1 ml Säule mit dem Träger IB-150A gepackt und mit 2 %iger NaOH gespült. Nach Spülen der Säule mit fünffachem Säulenvolumen war die Enzymaktivität auf 47 % reduziert. Nach einem zweiten Spülvorgang konnte keine Aktivität mehr nachgewiesen werden.

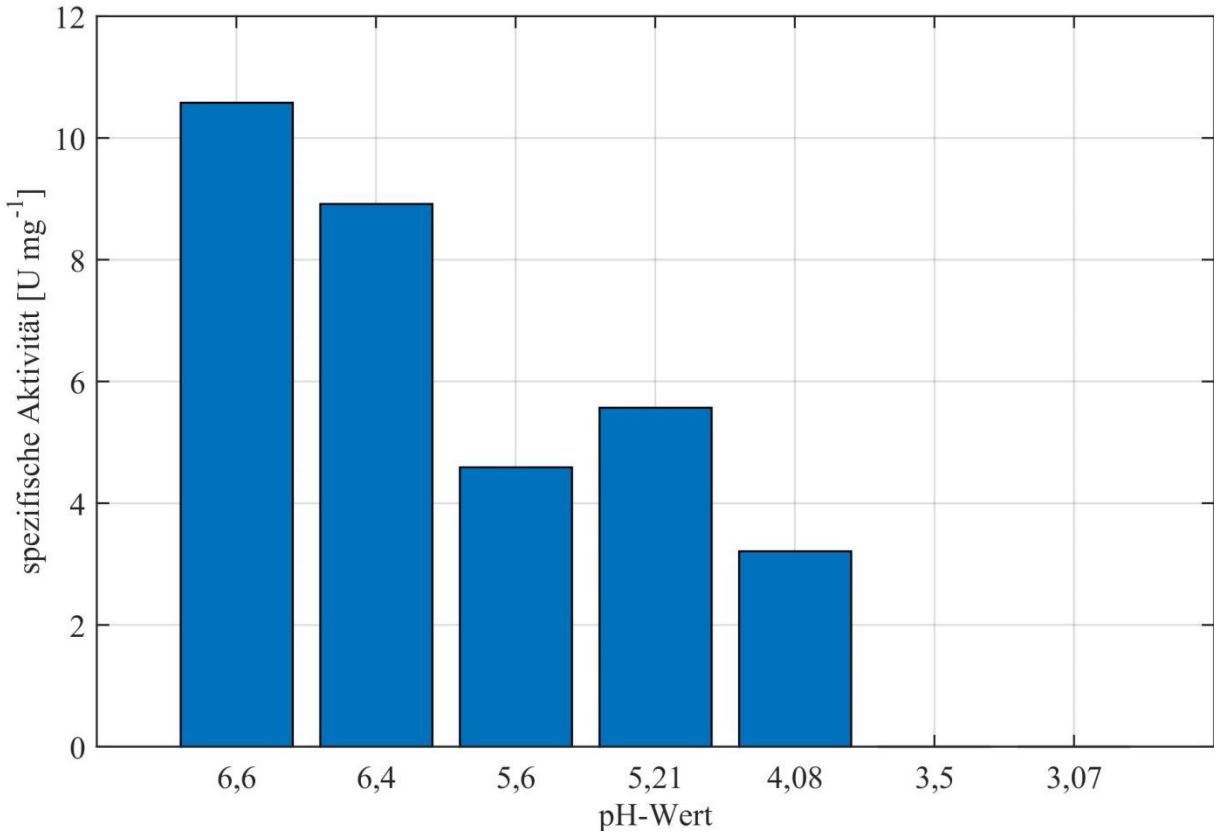


Abbildung 4-44 Spezifische Aktivität freier FDM nach einminütiger Säurebehandlung bei verschiedenen pH-Werten

4.5.4 Flüssig-Flüssig-Extraktion von Methanol und Ameisensäure

Bei der industriellen Herstellung von Ameisensäure werden Anionenaustauscher verwendet, um die Ameisensäure aus der wässrigen Phase zu gewinnen. Die Ameisensäure lässt sich dabei in einer sehr reinen Form gewinnen und der Prozess ist sehr einfach handhabbar (vergl. Kapitel 2.8). Da in dieser Arbeit eine in-situ Gewinnung der Ameisensäure angestrebt wurde, wird der Einsatz von Ionenaustauschern erschwert, da diese regeneriert werden müssen, was nicht durchführbar ist ohne das Enzym zu schädigen oder die Regeneration muss räumlich getrennt voneinander ablaufen. Alternativ zu den Ionenaustauschern wird im industriellen Maßstab auch die Flüssig-Flüssig-Extraktion verwendet. Ebenso wie die Ionenaustauscher musste auch das Extraktionsmittel auf eine mögliche Hemmung der Enzymaktivität untersucht werden. Zudem musste die Effektivität der Extraktion unter den Bedingungen der Enzymreaktion, also bei geringen Produktkonzentrationen, geprüft werden.

4.5.4.1 Inhibierung der FDM durch Extraktionsmittel

In Kapitel 2.8.1 wurden Extraktionsmittel genannt, die potentiell einen inhibitorischen Effekt auf die FDM haben können. Deshalb wurde im Rahmen einer Masterarbeit [98] die Hemmung durch Extraktionsmittel in einem Enzym-Assay (vergl. Kapitel 3.4) untersucht, indem unterschiedliche Konzentrationen des jeweiligen Extraktionsmittels zugegeben wurden. Es wurden Alkohole (1-Hexanol, 1-Octanol und 1-Decanol), Organo-Phosphorverbindungen (Tributylphosphat und Trioctylphosphinoxid), ein aliphatisches tertiäres Amin (TOA) und ein Ester (Diethylcarbonat) untersucht. In allen Experimenten wurden 0,3 g/L bis 0,5 g/L Protein im Rohextrakt und eine Formaldehyd Anfangskonzentration von 1 g/l verwendet. Die genaue Proteinkonzentration wurde mit dem Protein-Assay (vergl. Kapitel 3.1.1) bestimmt.

Hemmung der FDM durch Alkohole

Die Extraktion der Ameisensäure durch reine Lösungsmittel führt laut Literatur zu schlechten Verteilungskoeffizienten (K) und schlechteren Extraktionseffizienzen (D_E) aufgrund der besseren Löslichkeit der Ameisensäure in Wasser als in organischen Lösungsmitteln (vergl. Kapitel 2.8.1).

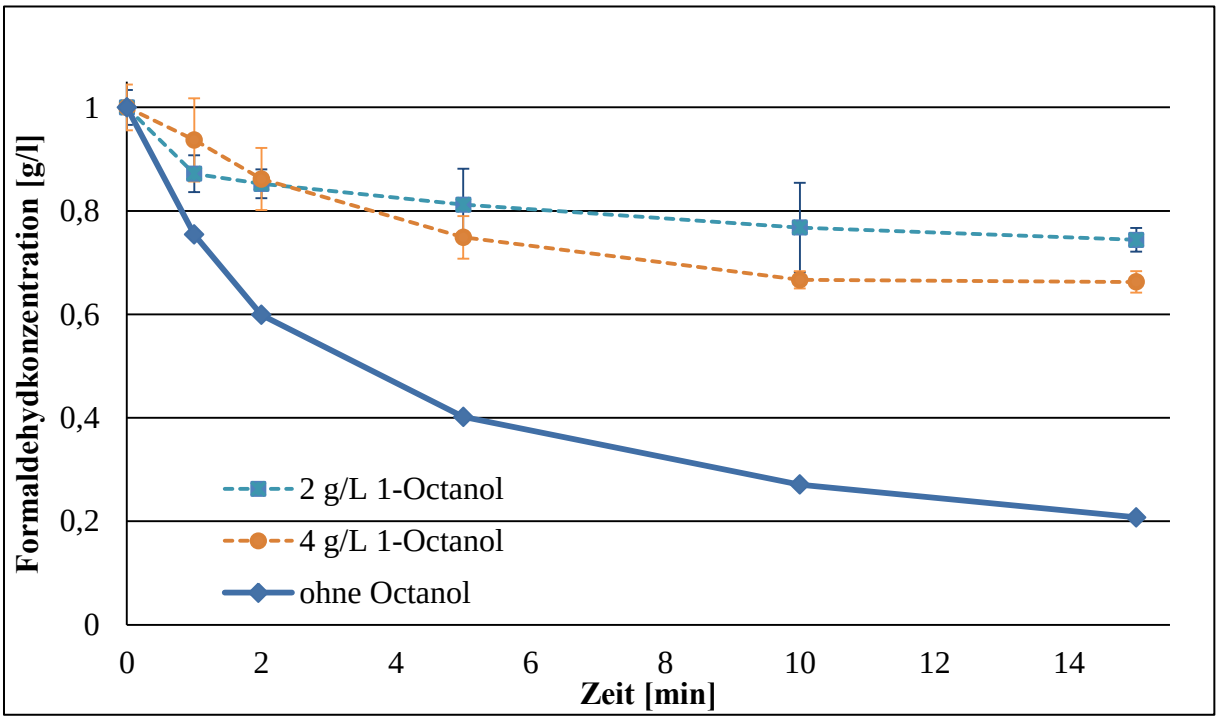


Abbildung 4-45 Einfluss von 1-Octanol auf die FDM-Reaktion.

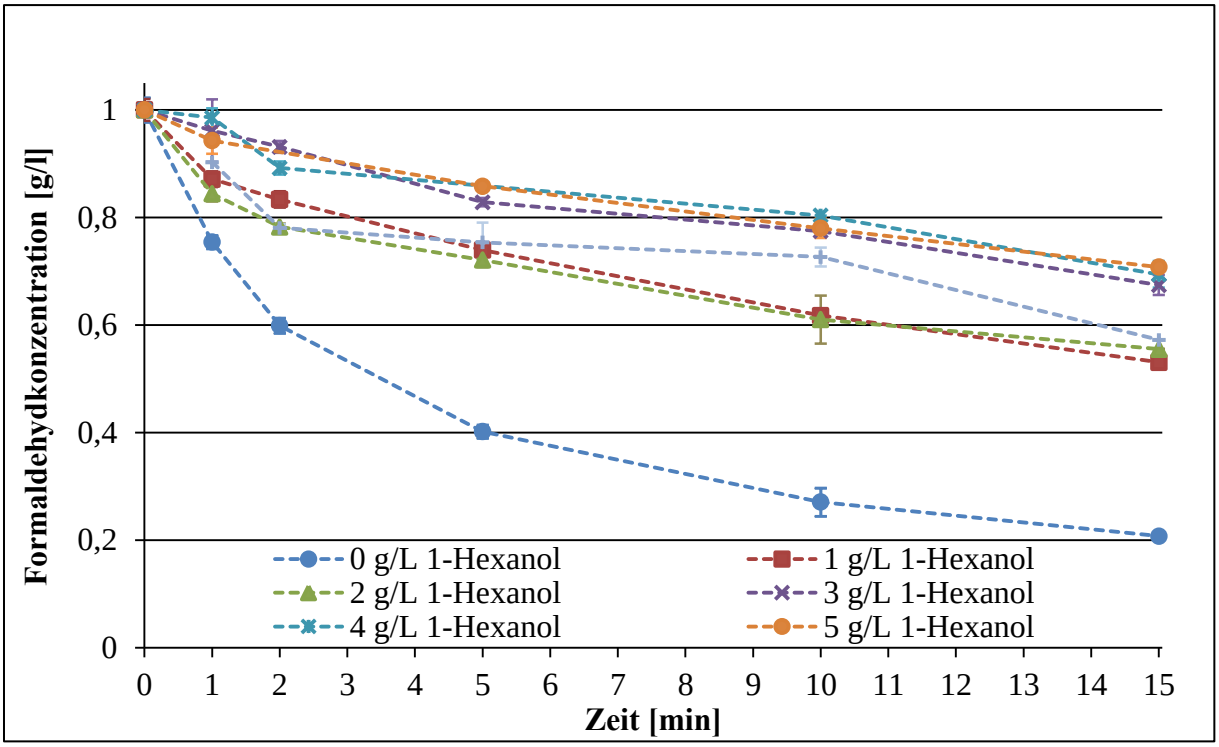


Abbildung 4-46 Einfluss von 1-Hexanol auf die FDM-Reaktion.

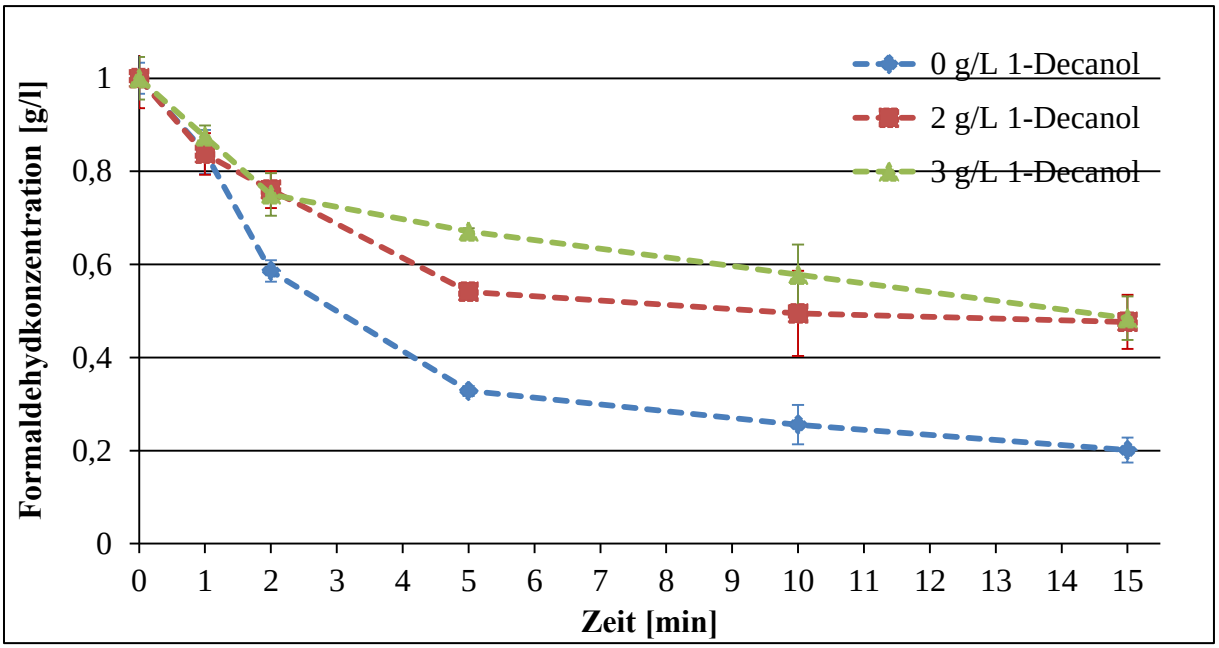


Abbildung 4-47 Einfluss von 1-Decanol auf die FDM-Reaktion.

Diese Verbindungen sind in Wasser teilweise löslich, so dass der jeweilige Alkohol mit der in der wässrigen Phase vorkommenden FDM-Aktivität in Kontakt kommt. Die Abnahme der Formaldehydkonzentration durch die FDM bei unterschiedlichen Alkoholkonzentrationen ist

in Abbildung 4-45 bis Abbildung 4-47 dargestellt. Für alle drei Alkohole wurde eine Hemmung festgestellt.

Hemmung der FDM durch Diethylcarbonat

Diethylcarbonat ist leicht polar und beispielsweise gut geeignet für die Reaktivextraktion mit Trioctylamin (TOA) [39]. Weitere Vorteile sind die geringe Ökotoxizität und gute biologische Abbaubarkeit. Es wurde Diethylcarbonat von Carl Roth (wasserfrei, ≥ 99,0 %, Dichte von 0,975 g/ml bei 25 ºC) verwendet. Da es in Wasser vollständig unlöslich ist, konnte auch keine Hemmung der FDM beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde hauptsächlich dieses Lösungsmittel zur Durchführung der Extraktionsversuche verwendet.

Hemmung der FDM durch Organophosphorverbindungen

Im Vergleich zu den untersuchten Alkoholen haben Organophosphorverbindungen eine stärkere Extraktionsfähigkeit. Zwei repräsentative Extraktionsmittel sind das Tributylphosphat (TBP) und das wasserunlösliche feste Trioctylphosphinoxid (TOPO). TBP (SigmaAldrich, Reinheit>99 %) hat bei 20 °C eine relativ hohe Viskosität von 3,56 mPa s, eine Dichte nahe 1 g/cm^3 und löst sich mit etwa 6 g/l in Wasser. Für den Einsatz als Extraktionsmittel muss es zur Verringerung der Viskosität mit einem geeigneten Lösungsmittel versetzt werden [51].

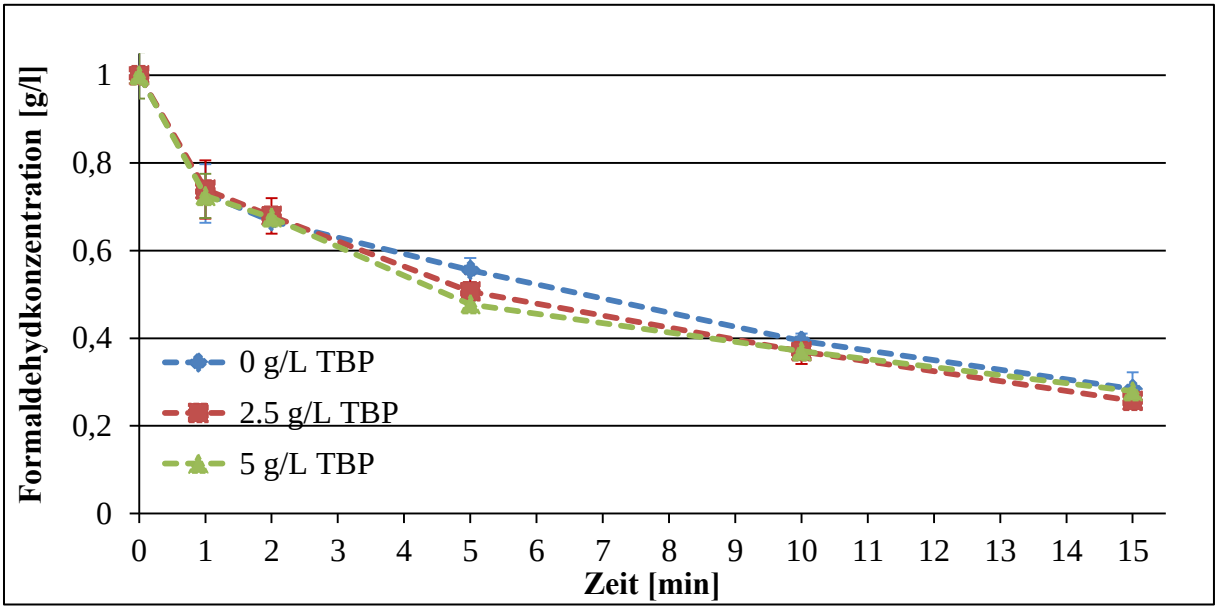


Abbildung 4-48 Einfluss von TBP unterschiedlicher Konzentrationen auf die FDM-Reaktion.

Die leichte Wasserlöslichkeit erschwert die Rückgewinnung nach der Extraktion. Dennoch wurde ein Enzym-Assay durchgeführt, der in Abbildung 4-48 dargestellt ist. Für TBP konnte keine Enzymhemmung festgestellt werden. Für TOPO wurde aufgrund der Unlöslichkeit kein Test durchgeführt.

Trioctylamin als Extraktionsmittel

Trioctylamin (TOA) ist ein langkettiges aliphatisches tertiäres Amin. Die Enzymhemmung dieser Verbindung wurde nicht untersucht, da TOA gänzlich unlöslich in Wasser ist und die FDM-Reaktion in der wässrigen Phase stattfindet. TOA und ähnliche tertiäre aliphatische Amine werden in der Reaktivextraktion von Carbonsäuren eingesetzt. Sie sind thermisch stabil, wodurch die Regeneration des Extraktionsmittels durch Destillation erfolgen kann [44]. Eine in-situ-Produktabtrennung während der FDM-Reaktion ist nicht durchführbar, da die Säure in nicht dissoziierter Form vorliegen muss, was einen niedrigen pH-Wert erfordert, der die FDM-Reaktion stark limitiert.

Hemmung durch eine Quartäre Ammoniumverbindung (Aliquat 336):

Aliquat 336 (Sigma-Aldrich) ist eine Mischung von quartären Ammoniumverbindungen mit einer Kettenlänge von C_8 und C_{10}. Die Verbindung kann zur Reaktivextraktion verwendet werden und stellt einen flüssigen Anionenaustauscher dar. Zur Untersuchung auf eine inhibitorische Wirkung auf das Enzym wurde die Verbindung sowohl in die Cl-als auch in die OH-Form gebracht. Dazu wurden 20 ml wässrige und organische Phase verwendet. Die organische Phase beinhaltete jeweils 10 % 1-Octanol und 1-Decanol. Da in diesem Fall auch eine ionische Bindung mit dem Enzym nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde der Enzym-Assay ebenfalls mit einer 1 g/l Formaldehydlösung gestartet und nach 25 Minuten Reaktionszeit die Formaldehydkonzentration gemessen. Nach dieser Zeit wurde für die Cl-Form eine Formaldehydkonzentration von 0,75 g/l und für die OH-Form 0,99 g/l gemessen. Das Enzym wurde demnach vollständig inhibiert.

4.5.4.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion von Methanol und Ameisensäure

Zur Ermittlung der optimalen Verteilungskoeffizienten (K_D) und Extraktionseffizienzen (D_E) wurden unterschiedliche Extraktionsmittel getestet (vergl. Kapitel 3.8.4.2). Zunächst wurde

eine wässrige 0,01 M Ameisensäurelösung hergestellt (pH 2,9) und mit dem Extraktionsmittel vermischt. Als Lösungsmittel wurde ausschließlich Diethylcarbonat verwendet und die jeweiligen Anteile Extraktionsmittel hinzugegeben. Die Ergebnisse der Extraktion sind in Tabelle 4-9 dargestellt. Die Verwendung von reinem Diethylcarbonat als organische Phase zeigte erwartungsgemäß geringe K_D- und D_E-Werte, da es sich um das Lösemittel handelt. Noch niedrigere Werte wurden mit dem reinen Extraktionsmittel TOA erzielt. Werden die K_D-Werte in Abhängigkeit der Extraktionsmittelzusammensetzung aufgetragen, so zeigen TOA und TBP gegenläufiges Verhalten (Abbildung 4-49). Je höher der TBP-Anteil im Extraktionsmittel, desto besser sind die K_D-Werte. Für TOA werden mit geringeren Konzentrationen bessere Werte erhalten. Der gleiche Extraktionstest wurde mit Methanol anstelle von Ameisensäure durchgeführt, um die Löslichkeit von Methanol in der organischen Phase (Tabelle 4-10) zu untersuchen. Es wurde die Methanolkonzentration vor und nach der Extraktion in der wässrigen Phase gemessen, da eine Analyse der Formiatkonzentration in der organischen Phase sehr aufwendig ist. Aufgrund des erwartungsgemäß geringen Extraktionserfolgs sind die Konzentrationen und nicht die K_D- und D_E-Werte angegeben. Die größte Menge an Methanol konnte mit einem Massenanteil von 5 % TOPO in Diethylcarbonat in die organische Phase überführt werden. Die stärkere Abnahme wird generell mit den Organophosphorverbindungen TBP und TOPO mit einer Reduktion des Methanolgehalts um 17 % erzielt.

Tabelle 4-9 Verteilungskoeffizienten und Extraktionseffizienzen für verschiedene Extraktionsmittelzusammensetzungen in ungepufferten und sauren Systemen. Es wurden TBP, TOPO und TOA als Extraktionsmittel und Diethylcarbonat als Lösungsmittel verwendet.

Extraktionsmittel [Gew.-%]	Verteilungskoeffizient (K_D)	Extraktionseffizienz (D_E) [%]
100 % Diethylcarbonat	0,231	18,754
5 % TBP	0,347	25,753
20 % TBP	0,664	39,906
50 % TBP	1,158	53,651
100 % TBP	1,750	63,634
5 % TOPO	0,858	46,189
5 % TOA	1,241	55,383
20 % TOA	1,064	51,557
50 % TOA	0,723	41,964
100 % TOA	0,134	11,809

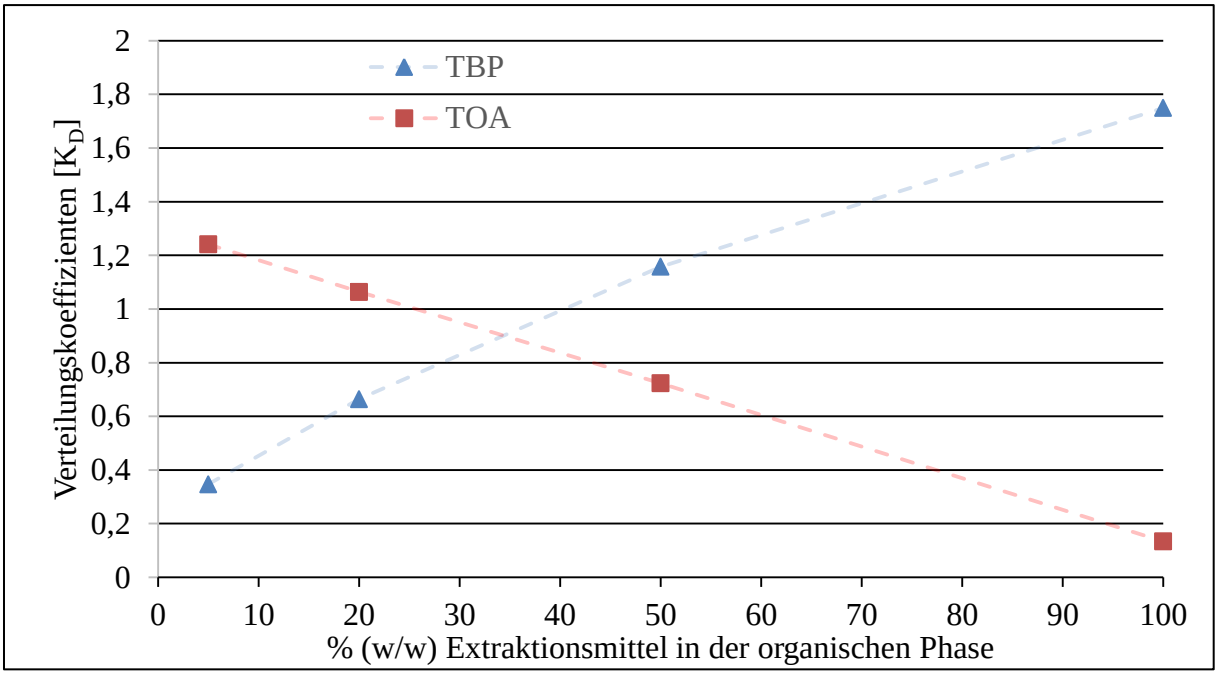


Abbildung 4-49 K_D-Werte in Abhängigkeit der Extraktionsmittelzusammensetzung für TBP und TOA.

Tabelle 4-10 Methanolkonzentrationen in der ungepufferten wässrigen Phase vor und nach der Extraktion für verschiedene Extraktionsmittelzusammensetzungen bei neutralem pH-Wert. Es wurden TBP, TOPO und TOA als Extraktionsmittel und Diethylcarbonat als Lösungsmittel verwendet.

Extraktionsmittel [% (w/w)]	Methanolkonzentration in der wässrigen Phase (mg/L)	Abnahme der Konzentration in der wässrigen Phase (mg/L)
100 % Diethylcarbonat	395	55
5 % TBP	408	42
20 % TBP	399	51
50 % TBP	413	37
100 % TBP	378	72
5 % TOPO	374	76
5 % TOA	413	37
20 % TOA	393	57
50 % TOA	446	4
100 % TOA	400	50

4.6 Kombination von Enzymreaktion mit der Produktabtrennung

In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, ab welcher Konzentration eine Rektifikation von Methanol (vergl. Kapitel 4.5.1) möglich ist, wie die Pervaporation verwendet werden kann um die für die Rektifikation nötigen Mindestkonzentrationen zu erhalten (vergl. Kapitel 4.5.2) und welche Ergebnisse die Verwendung der Flüssig-Flüssig-Extraktion zur Abtrennung der Ameisensäure erzielten. In diesem Kapitel werden diese einzelnen Methoden zur Produktabtrennung nun mit der Enzymreaktion kombiniert, um eine in-situ Produktabtrennung zu ermöglichen. Die Kombination der Produktgewinnung mit der Enzymreaktion erfolgte im Labormaßstab zum einen durch die Flüssig-Flüssig-Extraktion während der Enzymreaktion in einem Zweiphasensystem und zum anderen durch die Immobilisierung der Enzyme an eine Pervaporationsmembran. Die Arbeiten wurden im Rahmen der Masterarbeit von Narcis Borrat Company durchgeführt [98]. Auf die Kombination der Reaktion von freiem Enzym mit Ionenaustauscher wurde verzichtet, da bei der Verwendung des Rohextrakts Aminosäuren und Proteine an die Ionenaustauscher gebunden hätten. Nach jedem Versuch wäre die Zugabe neuen Enzyms fällig geworden und keine reproduzierbaren Ergebnisse hätten erzielt werden können. Alternativ und sehr vielversprechend hätte dann immobilisiertes Enzym in Kombination mit Anionenaustauschern in Form eines Mischbetts verwendet werden können. Allerdings fehlten dazu Gerätschaften, um die vermischten Anionenaustauscher und Trägerpartikel wieder voneinander zu trennen. Außerdem hätten Aniontauscher und Trägerpartikel gefunden werden müssen, die sich in ihrer Dichte deutlich unterscheiden, damit eine Trennung möglich würde.

4.6.1 Kombination der Flüssig-Flüssig-Extraktion mit der FDM-Reaktion

Basierend auf den Vorversuchen aus Kapitel 4.5.4.2 wurde der wässrigen Phase Formaldehyd und Enzyme hinzugegeben sowie die gebildeten Produkte Methanol und Ameisensäure direkt in die organische Phase überführt. Vor der Durchführung wurde überprüft, ob das Enzym aus der wässrigen Phase in die organische Phase überführt werden kann. Dazu wurde eine wässrige Enzymlösung angesetzt, die Proteinkonzentration gemessen und für 30 Minuten mit der organischen Phase vermischt. Nach der Trennung beider Phasen wurden die Proteinkonzentrationen vor und nach der Behandlung gemessen. Die Proteinkonzentration in der wässrigen Phase blieb unverändert, so dass kein Enzym in die organische Phase überführt wurde.

Es wurden standardmäßig 1 g/l Formaldehyd und eine Proteinkonzentration von 0,3 g/l eingesetzt und die Reaktion analog zu den Extraktionsversuchen über zwei Stunden durchgeführt (vergl. Kapitel 3.8.4.2). Der pH-Wert während der Reaktion blieb durch die Verwendung eines 0,05 M Phosphatpuffers bei einem pH-Wert von 6,8. Es wurde ausschließlich die Ameisensäure berücksichtigt und im Gegensatz zu den vorangegangenen Versuchen direkt aus der organischen Phase die Ameisensäurekonzentration ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-11 dargestellt. Die höchste Extraktionseffizienz wurde mit 20 % TOA in Diethylcarbonat erzielt. Vergleicht man allerdings die Extraktionseffizienz von 100 % Diethylcarbonat aus Tabelle 4-9 (18,75) mit Tabelle 4-11 (50,93), so wird ein deutlicher unterschied sichtbar. Außerdem liegen alle Werte der Extraktionseffizienz in Tabelle 4-11 im Bereich von 50 %, so dass hier von einem Messfehler ausgegangen werden muss.

Tabelle 4-11 Verteilungskoeffizienten und Extraktionseffizienzen für verschiedene Extraktionsmittelzusammensetzungen durch enzymatische Umsetzung einer 1 g/l Formaldehydlösung zu Methanol und Ameisensäure bei einem pH-Wert von 6,8. Es wurden TBP und TOA als Extraktionsmittel und Diethylcarbonat als Lösungsmittel verwendet.

Extraktionsmittel [Gew.-%]	Verteilungskoeffizient (K_D)	Extraktionseffizienz (D_E) [%]
100 % Diethylcarbonat	1,04	50,93
5 % TBP	1,06	51,34
20 % TBP	1,04	51,06
50 % TBP	1,07	51,67
100 % TBP	1,08	51,87
5 % TOA	1,10	52,27
20 % TOA	1,20	54,57
50 % TOA	1,05	51,14
100 % TOA	1,16	53,72

4.6.2 Kombination der Pervaporation mit der FDM-Reaktion

Zur Kombination der FDM-Reaktion mit der Pervaporation wurde versucht, die Enzyme auf der Oberfläche der Membran zu immobilisieren, um damit die Methanolkonzentration an der Grenzfläche der Membran zu erhöhen und durch die räumliche Nähe eine bessere Abtrennung von Methanol zu erzielen.

Dazu wurden rund ausgestanzte Membranen mit einem Durchmesser von 3 cm verwendet. Die Pervaporationsmembranen wurde zunächst mit Plasma aktiviert und anschließend mit einer Silanol-Lösung behandelt (vergl. Kapitel 3.7.3). Dazu wurde entweder Sauerstoff- oder Stickstoffplasma bei einer Leistung von 20 W, 50 W oder 80 W verwendet. Die Ausbildung von Silan-Linkern konnte mittels Karl-Fischer-Titration bestimmt werden. Nach dem Aufbringen der Linker wurden die Enzyme aufgebracht. Die Aktivität wurde durch einen angepassten Enzym-Assay durchgeführt (vergl. Kapitel 3.7.3.5).

4.6.2.1 Aufbringung von Silan-Linker auf Pervaporationsmembranen

Der Wassergehalt von den eingesetzten Silanol-Lösungen wurde vor und nach der Zugabe zu den mit Plasma behandelten Membranen gemessen. Zusätzlich wurden als Referenz nicht behandelte Membranen verwendet.

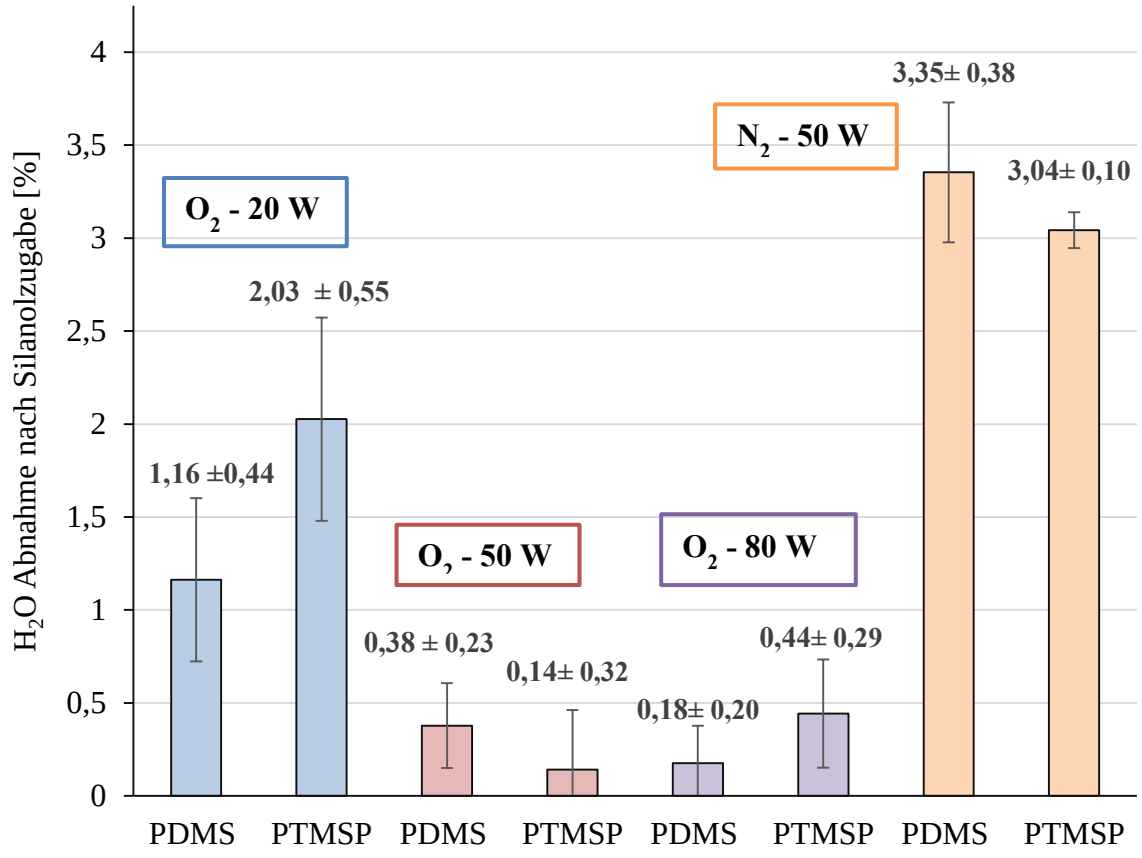


Abbildung 4-50 Abnahme des Wassergehalts in der Karl-Fischer-Titration nach der Silanol Behandlung von plasmaaktivierten Membranen.

Um jegliche Wassermoleküle abzuziehen, die nicht durch die Silanol-Reaktion entstanden sind, wurde der Wasseranteil der nicht behandelten Membran von denen aller anderen Membranen abgezogen.

Das Methanol der Karl-Fischer-Lösung und das Silanol reagieren unter Abspaltung von Wasser. Der Wassergehalt kann dann mit der Silanolkonzentration gleichgesetzt werden. In Abbildung 4-50 ist die Abnahme an Wasser nach der Behandlung der jeweiligen Membran dargestellt. Demzufolge konnte das Silanol an den mit Stickstoffplasma behandelten Membranen am besten reagieren und Linker ausbilden. Auf Membranen, die mit einem Sauerstoffplasma mit 50 W und 80 W behandelt wurden, konnten demnach nur wenige Silan-Linker ausgebildet werden.

4.6.2.2 Immobilisierung der FDM an die Silan-Linker auf den Pervaporationsmembranen

Die mit Plasma und mit Silanol behandelten Membranen wurden mit einer Enzymlösung behandelt. Dabei wurde die Proteinkonzentration vor und nach der Behandlung gemessen und damit die Menge an immobilisiertem Protein berechnet.

Tabelle 4-12 Immobilisierte Proteinmenge an plasmabehandelte PDMS und PTMSP Membranen.

Membran/Plasma	Immobilisiertes Protein [mg]	Protein pro m^2[mg/m^2]
PDMS/Sauerstoff 20 W	0,044 ± 0,005	61,90 ± 6,41
PTMSP/Sauerstoff 20 W	0,043 ± 0,006	60,87 ± 8,07
PDMS/Stickstoff 50 W	0,037 ± 0,009	52,43 ± 12,08
PTMSP/Stickstoff 50 W	0,035 ± 0,008	49,90 ± 11,94
PDMS/Sauerstoff 50 W	0,016 ± 0,008	22,28 ± 11,23
PTMSP/Sauerstoff 50 W	0,017 ± 0,002	23,79 ± 2,58
PDMS/Sauerstoff 80 W	0,013 ± 0,008	18,13 ± 11,02
PTMSP/Sauerstoff 80 W	0,009 ± 0,007	12,25 ± 9,41

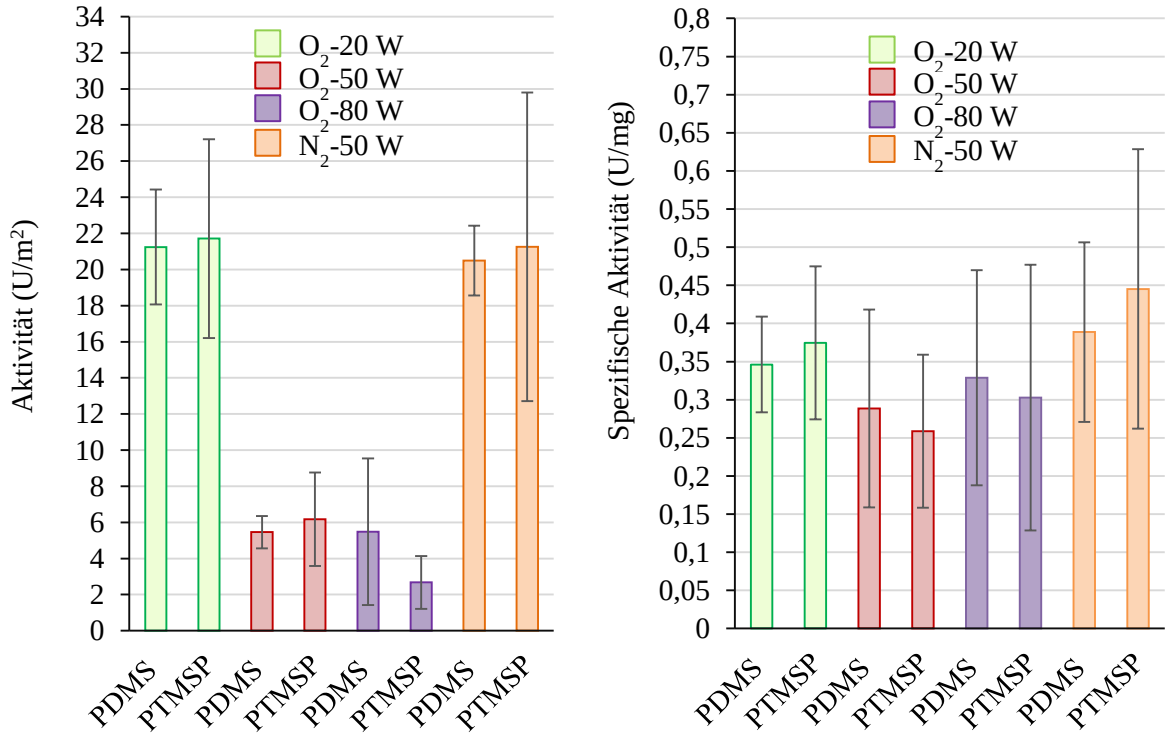


Abbildung 4-51 *Links*: flächenspezifische Aktivität der unterschiedlich behandelten Membranen. *Rechts*: spezifische Aktivität der Enzyme auf den Membranen.

Die Membranfläche war mit 7,1 cm² bekannt, so dass auch die flächenspezifische Menge berechnet werden konnte (vergl. Kapitel 3.7.2). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-12 zusammengefasst. Die mit der Proteinlösung behandelten Membranen wurden anschließend hinsichtlich ihrer Aktivität untersucht (vergl. Kapitel 3.7.3.5). Anhand der gemessenen immobilisierten Menge Protein konnten die flächenbezogene Aktivität und die spezifische Aktivität auf den Membranen bestimmt werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-51 dargestellt. Die mit 20 W Sauerstoffplasma und 80 W Stickstoffplasma behandelten Membranen zeigten die höchsten flächenspezifischen Aktivitäten. Die spezifische Aktivität, also nicht auf die Membranfläche bezogen, war erwartungsgemäß für alle Enzyme auf den jeweiligen Membranen näherungsweise gleich.

4.7 Herstellung von Methanol und Ameisensäure aus Biogas

Nachdem in Kapitel 4.3 der Rührkessel zur Durchführung der FDM Reaktion und in Kapitel 4.4 die Enzymreaktion charakterisiert worden sind, soll nun die Kopplung der Chemo- und

Biokatalyse erfolgen. Die Versuche zur Herstellung von Methanol und Ameisensäure aus Biogas erfolgten in der Pilotanlage bei 37 °C, wie in Kapitel 3.8.6 beschrieben. Es wurde sowohl freie als auch immobilisierte FDM verwendet. Der Formaldehyd aus der Chemokatalyse wurde durch Begasen in die optimierte Pufferlösung (vergl. Kapitel 3.3) eingetragen. Die freie FDM konnte deshalb nicht während der Begasung, sondern nur im Batch-Betrieb eingesetzt werden (Kapitel 4.7.1). Durch die Verwendung der immobilisierten FDM konnte auch kontinuierlich begast und Methanol umgesetzt werden (Kapitel 4.7.2).

4.7.1 Diskontinuierliche Herstellung durch Verwendung freier FDM

Zur Verwendung der freien FDM wurde zunächst Formaldehyd in Abwesenheit der FDM durch Begasen in die Pufferlösung (0,5 M) eingetragen. Der Volumenstrom zur Herstellung des Formaldehyds wurde auf 500 ml/min eingestellt. Nach 160 Minuten wurde die Begasung abgeschaltet, 225 mg Rohextrakt (*E.coli* ohne His-Tag) in 10 ml Puffer gelöst und in den Reaktor gegeben. Das Anreichern des Formaldehyds und die Bildung von Methanol nach Zugabe der FDM ist in Abbildung 4-52 dargestellt. Der pH-Wert nach der Reaktion betrug 6,3.

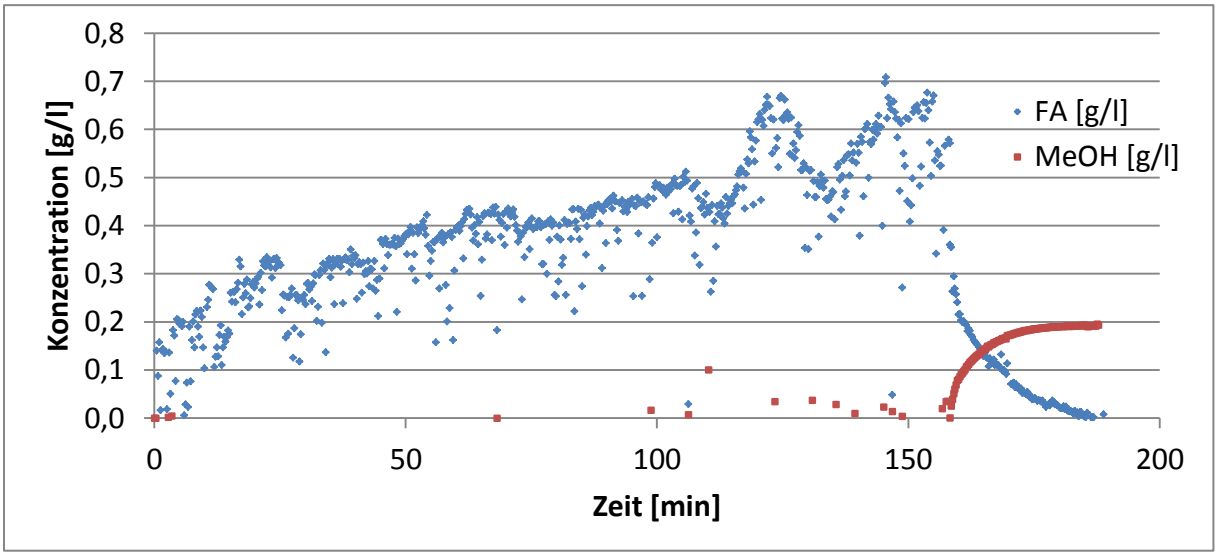


Abbildung 4-52 Bildung von Methanol aus Biogas durch die chemische Katalyse von Biogas zu Formaldehyd und gleichzeitiger Umsetzung von Formaldehyd mittels freier FDM zu Methanol im 500 ml Maßstab.

4.7.2 Kontinuierliche Herstellung durch Verwendung immobilisierter FDM

Es wurde ein Volumenstrom an Biogas von 300 ml/min eingestellt. Im Druckreaktor wurden 500 ml des 0,5 M Phosphatpuffers (vergl. Kapitel 3.3.2) und immobilisiertes Enzym vorgelegt.

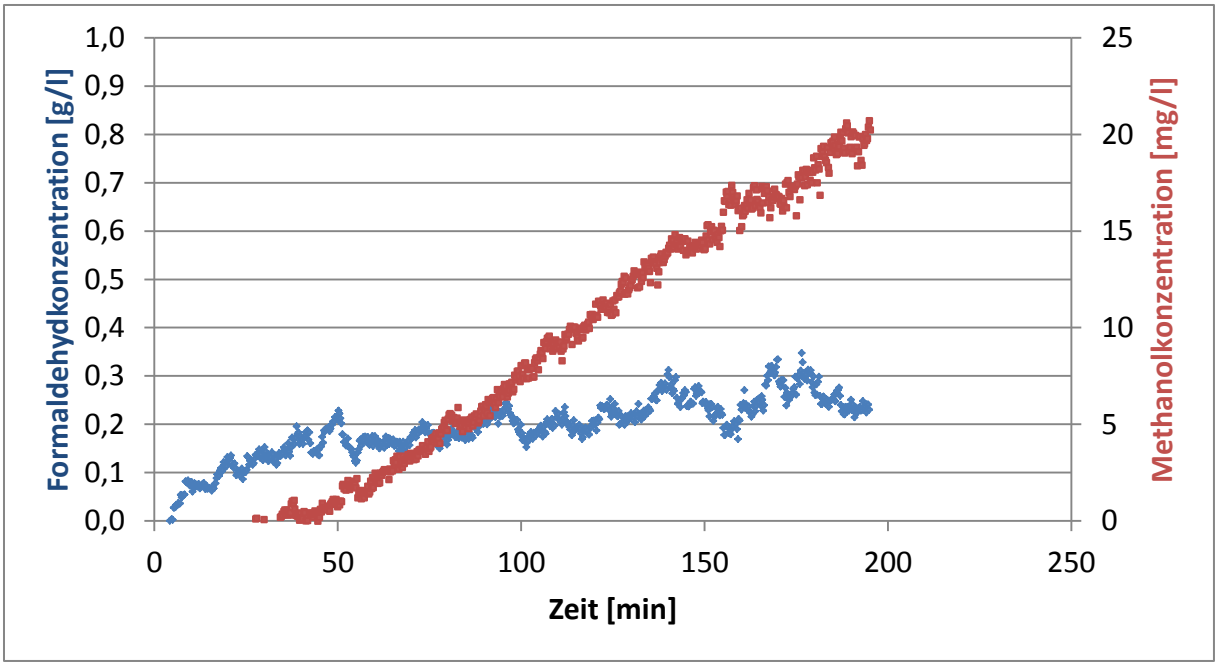


Abbildung 4-53 Bildung von Methanol aus Biogas durch die chemische Katalyse von Biogas zu Formaldehyd und gleichzeitige Umsetzung von Formaldehyd mittels immobilisierter FDM zu Methanol im 500 ml Maßstab.

In Abbildung 4-53 ist die Zunahme an Formaldehyd durch das Begasen in die Pufferlösung im Reaktor und die Zunahme an Methanol durch die Umsetzung des Formaldehyds durch das immobilisierte Enzym zu sehen. Die ständige Begasung führte zu einer Sättigung der Pufferlösung mit Kohlenstoffdioxid und Methan, so dass Blasen in den Membraneinlass des Massenspektrometers (vergl. Kapitel 3.2) gelangten und das Messsignal dadurch kurzeitig nach oben ausschlug. Diese immer wieder kurzzeitig auftretenden erhöhten Werte wurden durch die Berechnung des gleitenden Mittels über ein Intervall von fünf Minuten größtenteils beseitigt. Die Ameisensäurekonzentration konnte nicht erfasst werden, da der pH-Wert nach 200 Minuten bei 6,6 lag und die Ameisensäure dissoziiert vorlag (vergl. Kapitel 4.5.3).

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der zu diskutierenden Ergebnisse

Ziel der Doktorarbeit war es, das Zwischenprodukt Formaldehyd aus dem Blickwinkel einer technischen Nutzung enzymatisch mittels der Formaldehyd Dismutase (FDM) zu Methanol und Ameisensäure umzusetzen und die reinen Produkte Methanol und Ameisensäure zu erhalten. Zudem konnte gezeigt werden, wie die chemokatalytische Herstellung von Formaldehyd mit der biotechnologischen in einer Reaktorkaskade gekoppelt werden kann. Sowohl die dafür notwendige Charakterisierung der FDM Präparate als auch die aufgezeigten Methoden zur in-situ Produktabtrennung zeigten, dass ein Prozess zur Herstellung von Methanol und Ameisensäure aus Biogas möglich ist. Allerdings stellte sich heraus, dass die Gewinnung der reinen Produkte aufwendig ist und deshalb ein gekoppelter Prozess einschließlich der Produktabtrennung nicht im Rahmen dieses Projektes in die Reaktionskaskade mit aufgenommen werden konnte.

Die Charakterisierung der FDM wurde in den 80er und 90er Jahren in mehreren Publikationen untersucht, aber die Angaben zur Aktivität des Enzyms (im Rohextrakt und in reiner Form) unterschieden sich erheblich [10], [16], [19]. Deshalb bestand die Aufgabe die bestehenden Methoden zur Messung der Aktivität zu optimieren. Die Messung der enzymatischen Aktivität konnte für den Labormaßstab, ergänzend zu den aus der Literatur bekannten Methoden für die FDM (vergl. Kapitel 2.6.1), durch weitere nasschemische Verfahren ergänzt werden (vergl. Kapitel 5.2.1 und 5.5.1). Für den technischen Maßstab war die Messung in Echtzeit aus der flüssigen Phase anhand der gebildeten Produktkonzentrationen erforderlich. Bestehende Systeme auf dem Markt (vergl. Kapitel 2.6.2) boten dafür nicht die nötigen Voraussetzungen. Auf Basis eines am Fraunhofer ICT [30] entwickelten Massenspektrometers (vergl. Kapitel 2.6.2.3) konnte im Rahmen der Doktorarbeit ein neuer Einlass für die Massenspektrometrie entwickelt werden, mit dem Methanol, Ameisensäure und Formaldehyd simultan

und mit hoher stofflicher und zeitlicher Auflösung sowohl aus Gas- und Flüssigphase detektiert werden konnten (vergl. Kapitel 3.9.6 und 5.2.2).

Am Anfang galt es ausreichende Mengen der FDM herzustellen. Es hat sich, wie in der Literatur beschrieben (vergl. Kapitel 2.4.1), bestätigt, dass die Bildung der FDM im Wildtyp *P. putida* nur durch die Zugabe von Formaldehyd möglich ist (vergl. Kapitel 2.3). In der Doktorarbeit konnte eine automatisierte Zugabe von Formaldehyd auf Basis der Sauerstoffgelöstkonzentration realisiert (vergl. Kapitel 5.3) und damit eine reproduzierbare Fermentationsmethode entwickelt werden. Zudem bestand im Laufe der Doktorarbeit die Möglichkeit, auf eine in *E.coli* rekombinant hergestellte FDM zurückzugreifen, deren Aktivität im Rohextrakt im Vergleich zum Wildtyp-Rohextrakt länger stabil blieb (vergl. Kapitel 2.4.2). Sowohl aus dem Wildtyp als auch aus *E.coli* konnten flüssige und pulverförmige Enzympräparate durch verschiedene Aufschluss- und Trocknungsverfahren hergestellt werden (vergl. Kapitel 5.4).

Durch den Wechsel des in der Literatur beschriebenen Puffers auf ein anderes Puffersystem (vergl. Kapitel 3.3) konnten die Enzympräparate ohne gravierendes Absinken des pH-Werts durch die gebildete Ameisensäure eingesetzt werden. Dadurch wurde unter anderem die Untersuchung hinsichtlich einer stofflichen Hemmung von Ameisensäure und Methanol ermöglicht, eine Produkthemmung nachgewiesen (vergl. Kapitel 4.4.4 und 5.5.2) und es konnten hinsichtlich des pH-Werts konstante Reaktionsbedingungen eingestellt werden.

Konstante Reaktionsbedingungen hinsichtlich Temperatur und der Durchmischung (vergl. Kapitel 4.3) der Reaktionslösung konnten durch den Aufbau eines gerührten Doppelwand-Druckreaktors mit einem Gesamtvolumen von 1,5 Litern erzielt werden (vergl. Kapitel 3.9.3). Darin konnten unter exakten Reaktionsbedingungen freie und immobilisierte Enzyme eingesetzt werden. Durch die Verwendung des Massenspektrometers zur Detektion der Edukt- und Produktkonzentrationen konnten Reaktionsverläufe unter Normalbedingungen (vergl. Kapitel 4.4.1) und bis zu Drücken von 10 bar (vergl. Kapitel 4.4.3.2 und 5.5.2) aufgezeichnet werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass Methanol und Ameisensäure zu einem kleinen Teil im wässrigen zu Methylformiat reagieren (vergl. Kapitel 3.2.3). Auf dieser Basis konnte ein mathematisches Modell entwickelt (vergl. Kapitel 4.4.2 und 5.5.2), Reaktionskonstanten mit Inhibitionskonstanten berechnet (vergl. Kapitel 4.4.2.4 und 5.5.2), der Einfluss des Drucks bis 10 bar auf die Enzymaktivität untersucht (vergl. Kapitel 4.4.3.2) und freies Enzym mit immo-

bilisiertem Enzym verglichen werden. Für die Enzymimmobilisierung wurden unterschiedliche Systeme getestet, miteinander verglichen und ein geeignetes Immobilisierungssystem ausgearbeitet (vergl. Kapitel 4.4.5 und 5.5.3).

Der Nachweis über die Produktinhibierung der FDM durch Methanol und Ameisensäure machte eine in-situ-Produktabtrennung notwendig. Es wurden die Rektifikation (vergl. Kapitel 4.5.1 und 5.6.1), die Pervaporation (vergl. Kapitel 4.5.2 und 5.6.2), die Adsorption an Ionenaustauschern (vergl. Kapitel 4.5.3 und 5.6.4) und die Extraktion (vergl. Kapitel 4.5.4 und 5.6.5) getestet. Die Ameisensäure stellte dabei eine besondere Herausforderung dar. Um den pH-Wert in der Reaktionslösung im neutralen Bereich zu halten, kann ein Puffer verwendet werden. Bei der Verwendung eines Puffers können nur eingeschränkt Anionenaustauscher zur Adsorption der Ameisensäure verwendet werden, da die Anionen des Puffers bevorzugt gebunden werden. Zudem liegt die Ameisensäure im neutralen pH-Bereich vollständig dissoziiert vor und ist deshalb nicht mehr flüchtig (vergl. Abbildung 4-40), so dass keine Rektifikation verwendet werden kann. Wird der Puffer weggelassen, liegt für die Extraktion oder Rektifikation die freie Säure vor. Allerdings liegt der Siedepunkt der Ameisensäure sehr nahe an dem von Wasser, was eine Rektifikation zur Gewinnung der Ameisensäure generell erschwert. Bei Weglassen eines Puffers oder bei der Verwendung niedrig konzentrierter Puffer kann die Ameisenkonzentration in der Reaktionslösung nur sehr niedrig sein, da ansonsten die FDM durch den niedrigen pH-Wert geschädigt würde. Deshalb können auch bei der Verwendung einer der Reaktion nachgeschalteten Adsorption oder Extraktion der Ameisensäure keine höheren Ameisensäurekonzentrationen zugelassen werden. Aus der Perspektive der Ameisensäure ließe sich eine Adsorption und Extraktion auch für niedrige Ameisensäurekonzentrationen bewerkstelligen. Da aber äquimolar Methanol durch die FDM gebildet wird, würde diese Herangehensweise auch zu geringen Methanolkonzentrationen führen (vergl. Kapitel 2.2), was sich folglich negativ auf die Methanolgewinnung auswirkt. Hier konnte gezeigt werden, dass sowohl für die Pervaporation als auch für die Rektifikation möglichst hohe Konzentrationen an Methanol erzielt werden sollten (vergl. Kapitel 4.5). Aus diesem Grund mussten in-situ Verfahren entwickelt werden, die eine zu den Enzymen räumlich nahe Produktabtrennung ermöglichen. Das kann durch die Verwendung eines Mischbettfilters, bestehend aus immobilisierten Partikeln und Anionenaustauschern, die Kombination der enzymatischen Katalyse mit der Extraktion in einer Gegenstromextraktionskolonne oder durch die Immobilisie-

rung der FDM an einer Pervaporationsmembran bewerkstelligt werden (vergl. Kapitel 4.7 und 5.6).

Letztendlich war es sowohl anlagentechnisch als auch durch die Immobilisierung möglich, die Chemo- und Biokatalyse zu kombinieren um Methanol und Ameisensäure aus Biogas herzustellen (vergl. Kapitel 4.7 und 5.7). Allerdings wurde dabei die Produktaufbereitung wegen des kleinen Maßstabs weggelassen.

5.2 Analytik und Messtechnik

5.2.1 Nasschemische Analytik zur Bestimmung der Formaldehydkonzentration

Für die Anwendung der Formaldehyd-Dismutase im Labormaßstab sind der Nachweis der Protein- und Formaldehydkonzentration notwendig. Dies wurde sowohl im Maßstab von 1 ml als auch von 200 µl durchgeführt (vergl. Kapitel 3.1).

Die Proteinkonzentrationsmessung wurde nach Bradford durchgeführt und auf die Reaktionsbedingungen der FDM angepasst. Da Methanol Bestandteil der Bradfordlösung ist, hatte zusätzliches Methanol erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die Farbreaktion (Abbildung 3-2). Der Phosphatpuffer hatte einen Einfluss auf die Farbreaktion, der sich allerdings erst ab einer Pufferkonzentration von 0,5 M bemerkbar machte. Die Dismutase-Reaktion wurde mit gelöstem Enzym in einer Proteinkonzentration von 0,6 g/l durchgeführt. Der obere Messbereich des Bradfordtests liegt bei 80 mg/l, so dass die Reaktionslösung zur Bestimmung der Proteinkonzentration in jedem Fall verdünnt werden muss. Damit liegt die Pufferkonzentration deutlich unterhalb von 0,5 M und der Einfluss auf die Farbreaktion kann vernachlässigt werden und wird ohnehin durch ständiges Kalibrieren berücksichtigt.

Es wurden verschiedene Enzym-Assays getestet und ein Assay mittels Acetylaceton-Methode als optimaler Farbtest gewählt (vergl. 3.1.5.2). Die Pararosanilin-Methode (vergl. Kapitel 3.1.3), wie sie von Rodewyk [10] verwendet wurde, ist ebenfalls sehr gut für die Bestimmung der Formaldehydkonzentration geeignet. Allerdings ist die Lösung im Vergleich zur Acetylaceton-Methode giftig und erschwert die schnelle Messung von Formaldehydkonzentrationen. Alle Assays wurden an die Reaktionsbedingungen der FDM angepasst, indem beispielsweise

Mikrotiterplatten verwendet und die zeitliche Änderung der Formaldehyd-Konzentrationen im Tecan-Reader (vergl. Kapitel 3.1.5.2) für mehrere Ansätze parallel aufgezeichnet wurden (Abbildung 3-9). Bisherige Publikationen gingen nicht auf diese Wechselwirkungen bei den verwendeten nasschemischen Verfahren ein [10], [19], [21]. Rodewyk [21] verwendete beispielsweise als Formaldehyd Quelle eine Paraformaldehyd Suspension. In dieser Arbeit wurde zugunsten der nasschemischen Methode darauf verzichtet, da Paraformaldehyd diese Methoden verfälscht. Auch die begrenzte Haltbarkeit der Lösungen hat einen starken Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Messung. Deshalb wurde ein Küvettentest der Firma Hach Lange zur Durchführung der Acetylaceton-Methode verwendet. Der Hersteller garantiert eine konstante Qualität und die Lösungen sind portioniert.

5.2.2 Analytik aller Komponenten mittels Massenspektrometrie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals ein nicht kommerziell erhältliches Massenspektrometer mit Membraneinlasssystem für biotechnologische Zwecke eingesetzt, um die Konzentrationen von Formaldehyd, Ameisensäure, Methanol und Methylformiat on-line in der Gasphase und der Flüssigphase messen zu können (vergl. Kapitel 3.2). Das Messgerät erwies sich als entscheidendes Werkzeug für die Forschungsarbeit, da die flüchtigen Komponenten, sowohl in der Reaktion als auch in der Produktgewinnung (vergl. Kapitel 4.5.1), on-line messbar wurden. Sowohl die Ansprechzeiten im Sekundenbereich als auch die Empfindlichkeit im Mikrogramm pro Liter Konzentrationsbereich ermöglichen das Aufzeichnen von Reaktionsverläufen mit vielen Datenpunkten und sehr geringem Messrauschen. Auf dem Markt sind Membraneinlass Massenspektometer (MIMS) lediglich mit dichten Pervaporationsmembranen erhältlich [127]. Die dort verwendeten Pervaporationsmembranen sind selektiv und beruhen auf der Adsorption und Desorption von Stoffen, die sich in der aktiven Schicht der Membran lösen können. Auf diese Weise wird zwar eine höhere Selektivität für bestimmte Substanzen erhalten, allerdings sind die Ansprechzeiten geringer und es wird nicht die gesamte Zusammensetzung flüchtiger Komponenten in einer Flüssigkeit detektiert. Es kommt bei der Verwendung von Pervaporationsmembranen zu Verzugszeiten des Messsignals, ähnlich wie bei der Messung von adsorptiven Stoffen mit dem in dieser Arbeit verwendeten MIMS (vergl. Kapitel 3.2.3). Die Verwendung einer porösen PTFE Membran hat den Vorteil, dass durch organophobe und hydrophobe Eigenschaften die flüchtigen Komponenten an der Oberfläche der Membran in die Gasphase überführt werden, der Dampf durch die Membran ge-

saugt wird, die Membran inert, d.h. nicht selektiv, ist und es deshalb zu keinen Verzugszeiten des Messsignals kommt. Zudem können die Membranporen durch kleine Partikel nicht verstopft werden.

Die Flüssigkeit wurde mit einer HPLC-Pumpe von Knauer in das Membranmodul geleitet, die, wie sich erst im Laufe der Versuchsreihe herausstellte, einen fehlerhaften Pumpenkopf hatte und daher pulsierte. Ausschlaggebend ist das Ansaugverhalten von HPLC-Pumpen, die für größere Höhenunterschiede und weite Förderstrecken nicht ausgelegt sind. Schwankungen der Fördergeschwindigkeit oder gar Pulsationen haben starke Auswirkungen auf das Messsignal. Das Membranmodul wurde seitens Fraunhofer ICT [30] strömungsdynamisch für eine Fördergeschwindigkeit von fünf bis zehn Milliliter pro Minute optimiert. Je nach Fördergeschwindigkeit verändert sich die Nernst'sche Schicht [128] an der Membranoberfläche. Eine solche Veränderung wirkt sich direkt auf das Messsignal im Massenspektrometer aus, wie in Abbildung 4-17 anhand der aus dem eigentlichen Kurvenverlauf kurzzeitig auftauchenden Bögen (Reaktionszeit 20 bis 50 Minuten) zu erkennen ist. Nachdem ein neuer Pumpenkopf mit konstanter Fördergeschwindigkeit verwendet wurde, trat dieses Verhalten nicht mehr auf.

Eine nachteilige Eigenschaft des Messsystems wird durch Formaldehyd als Analyt verursacht. Durch das Überführen des gelösten Formaldehydhydrats an der porösen Membran in die Gasphase kommt es durch die Bildung von Paraformaldehyd zum irreversiblen Verstopfen der Membranporen. Es wurde nicht untersucht, ob es sich dabei tatsächlich um Paraformaldehyd handelt. Allerdings ist bekannt, dass Formaldehyd zur spontanen Selbstaddition neigt, wie auch in den selbst hergestellten Lösungen (vergl. Kapitel 3.5.1) durch das Ausfallen des weißen Paraformaldehyds beobachtet wurde. Eine Formaldehydlösung wurde mit einer Konzentration von 15 g/l für acht Stunden mit dem Messsystem gemessen (vergl. 3.2.2). Dabei fiel der Druck des Vorvakuums kontinuierlich ab, d.h. der Dampfstrom durch die Membran nahm ab (kleiner 14 µbar). Anschließend wurde die Membran aus dem Modul ausgebaut. Im Regelfall ist die Membran weiß. Nach der Behandlung mit einer Formaldehydlösung wurde die Membran an mehreren Stellen durchsichtig. Dies trat nur bei Formaldehyd auf.

Ameisensäure konnte bei saurem pH-Wert ebenfalls mittels Massenspektrometrie detektiert werden. Allerdings wurde beobachtet, dass die in Gasphase überführte Ameisensäure an den Wandungen der Kapillaren und innerhalb des Massenspektrometers adsorbiert (vergl. 3.2.3).

Das wird insbesondere aus Abbildung 3-17 deutlich. Bei diesem Versuch wurde zunächst kalibriert und anschließend das System durch Lufteintrag wieder gespült, bis alle Ionenströme dem standardmäßigen Grundrauschen entsprachen. Anschließend wurden definierte Lösungen der drei Komponenten Formaldehyd, Methanol und Ameisensäure hergestellt und gemessen. Auf diese Weise wird ein Soll-Ist-Vergleich ermöglicht. Im Verlauf der mehrfach nacheinander durchgeführten Messungen näherte sich der Istwert für Ameisensäure erst stufenweise an den Sollwert an. Der Adsorption von Stoffen innerhalb des Messsystems wurde durch Erhitzen der Wandungen der Vakuumkammern entgegengewirkt

5.3 Fermentative Herstellung der Formaldehyd-Dismutase

Um die FDM herzustellen, wurden sowohl der Wildstamm *P. putida J3* (eigene Arbeit) als auch unterschiedliche genetisch modifizierte *E. coli* Stämme (Lisa Blaschke, Abt. MBT, Fraunhofer IGB [109]) in Maßstäben bis zu zehn Litern fermentiert. Um eine stabile FDM zu erhalten, wurden zwei Strategien verfolgt. Aus dem Rohextrakt des Wildtyps sollte durch verschiedene Aufreinigungsschritte ein stabiles Enzympräparat hergestellt werden (vergl. Kapitel 2.5). Diese Versuche lieferten kein befriedigendes Ergebnis, vor allem hinsichtlich der Stabilität der FDM im Rohextrakt. Zweite Strategie war die Expression der aktiven Dismutase in *E. coli*, durch die ein im Vergleich zum Wildtyp stabilerer Rohextrakt hergestellt wurde. Weitere Aufreinigungsversuche aus dem *E. coli*-Rohextrakt waren nicht nötig. Die Konservierung des Enzyms durch Gefriertrocknung war mit vertretbaren Verlusten problemlos möglich (vergl. Kapitel 4.2.2). So konnte das aktive Enzym auf Vorrat produziert werden. Zur Immobilisierung auf Trägern wurde die FDM aus *E. coli* verwendet, für Versuche mit gelöstem Enzym kamen Wildtyp und *E. coli* FDM zum Einsatz (Tabelle 4-1 und Tabelle 4-2).

Das Ziel war, eine möglichst große Menge an homogenem Enzympräparat herzustellen, so dass im gesamten Versuchszeitraum reproduzierbare Ergebnisse generiert werden konnten. Aus diesem Grund wurden verschiedene Fermentationsstrategien im Multireaktorsystem getestet (Abbildung 4-1). Aus der Literatur war bekannt, dass die Expression der FDM nur bei Anwesenheit von Formaldehyd erfolgt [10], [21]. Von den Wildstämmen *P. putida J3* und *P. putida F61* wird bevorzugt Glukose als C-Quelle verwertet. Erst nach fast vollständigem Verbrauch von Glukose (Abbildung 2-3) wird Formaldehyd als C-Quelle verwendet. Die

Formaldehydkonzentration wurde für die Fermentationen auf 1 g/l eingestellt. Höhere Konzentrationen können auf die Organismen wachstumshemmend wirken. Es wird vermutet, dass bei toxischen Konzentrationen von Formaldehyd ein Entgiftungsmechanismus einsetzt und damit auch bei Anwesenheit von Glukose die FDM gebildet wird. Diese These konnte in dieser Arbeit nicht verifiziert werden. Es wurde aber beobachtet, dass die Fed-Batch-Fermentation mit gleichzeitiger Zugabe von Formaldehyd und Glukose eine deutlich geringere Aktivität bezogen auf das Fermentationsvolumen aufwies als bei Zugabe von Formaldehyd als ausschließliche C-Quelle. Das bestätigt die Ergebnisse von Kato et al. [16].

Der Stamm *P. putida* ist zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung im Jahre 2012 in der Risikobewertung mit L2 eingestuft worden, so dass geplante Versuche zur Fermentation von *Pseudomonas putida* J3 nicht weiter fortgeführt wurden und FDM nur noch mit dem rekombinanten *E. coli* Stamm produziert wurde.

Da zunächst kein on-line-Monitoring der Formaldehydkonzentration möglich war, wurde eine Fermentationsmethode entwickelt, mit der die Zugabe von Formaldehyd über die Sauerstoffgelöstkonzentration (pO_2) automatisch geregelt wurde (Abbildung 4-3). Die Regelung der Formaldehydzugabe anhand des pO_2-Signals wurde bisher noch nicht für die Fermentation von *P. putida* publiziert. Dabei wurde zunächst mit einer 20 g/l Glukoselösung bis zu einer Zelldichte von fünfzehn Gramm Trockenmasse pro Liter fermentiert und anhand des pO_2-Signals der Verbrauch der Glukose verfolgt. Nachdem die Glukose vollständig verbraucht war, erfolgte die automatisierte Zugabe von Formaldehyd. Sobald Formaldehyd in den Reaktor gegeben wurde, reagierten die Bakterien durch Zehrung des gelösten Sauerstoffs und der pO_2-Wert im Medium sank. Bei Fermentationen wird normalerweise der Sauerstoffübergang in die Fermentationsbrühe durch intensiveres Rühren automatisch erhöht. In diesem Fall wurde die Drehzahl auf 500 rpm eingestellt. Zudem konnte dadurch ein Austreiben des Formaldehyds aus dem Medium über die Gasphase minimiert werden..

Die Zugabe des Formaldehyds über das pO_2-Signal verhinderte ein Akkumulieren des Formaldehyds und eine damit verbundene Wachstumsinhibierung der Mikroorganismen (vergl. [10]). Da der Formaldehyd im Idealfall die alleinige C-Quelle darstellt, werden die Mikroorganismen zur Ausbildung der FDM gezwungen.

Aus Tabelle 4-1 wird deutlich, dass die Proteinkonzentration mit jeder Fermentation des Wildstammes steigt, aber die spezifische Aktivität um etwa um 25 % abnimmt. Als Inokulum wurde jeweils eine Probe aus der vorangegangenen Fermentation verwendet. Die steigende Proteinkonzentration ist darauf zurückzuführen, dass sich die Mikroorganismen an die Fermentationsbedingungen adaptierten.

Zusätzlich zur geregelten Formaldehyddosierung wurde der pH-Wert über die Zugabe von Säure und Lauge konstant gehalten. Bei der Verwertung des Formaldehyds wurde auch Ameisensäure gebildet, durch die der pH-Wert absank. Daraufhin wurde automatisch eine entsprechende Menge Lauge zugesetzt. War der Formaldehyd zum größten Teil aufgebraucht, stieg der pH-Wert an. In dieser Phase der Fermentation verwendeten die Mikroorganismen die Ameisensäure als C-Quelle. Das geschieht über das Enzym Formiat-THF-Ligase (EC 6.3.4.3) und wird an Tetrahydrofolsäure (THF) gebunden. Dadurch entsteht 10-Formyl-Tetrahydrofolsäure und wird weiter verstoffwechselt. Dass *P. putida* Ameisensäure verstoffwechselt konnte Rodewyk [10] zeigen. In der ersten Fermentation mit Regelung über die Sauerstoffgelöstkonzentration wurden große Mengen von zunächst Base und dann Säure durch die pH-Regelung hinzugegeben. In den darauffolgenden Fermentationen nahm dieses Regelverhalten ab. Steigende Proteinkonzentration und verminderte Freisetzung von Ameisensäure lassen darauf schließen, dass durch dieses Fermentationsverfahren der Stoffwechsel mit Ameisensäure als C-Quelle durch die Mikroorganismen intensiviert wurde.

Während der Fermentation muss darauf geachtet werden, dass bei dem Erreichen eines alkalischen pH-Werts nicht mit zu viel Säure gegengesteuert wird, da das Medium sonst stark aufgesalzen wird. Die pH-Änderung ist abhängig von dem Zeitpunkt der Formaldehydzugabe. Eine Möglichkeit, den Säureverbrauch zu limitieren, besteht in einer Optimierung der pH-Regelung beispielweise durch Eingabe eines pH-Schwellenwerts für die Formaldehyddosierung.

5.4 Herstellung der Enzympräparate

Das Downstream Processing dieser Arbeit bestand in der Herstellung eines für die Verfahrensentwicklung geeigneten Rohextrakts. Zu Beginn der Arbeit wurden die in Tabelle 2-5 bis

Tabelle 2-8 aufgeführten Reinigungsschritte zur Gewinnung einer reinen FDM durchgeführt, allerdings ohne Erhalt aktiver FDM. Grund dafür war die geringe Stabilität der gereinigten FDM aus dem Wildtyp. Rodewyk [10] verwendete aus diesem Grund Proteasehemmer und konnte auf diese Weise die Stabilität der FDM erhöhen. Bei weiteren Versuchen zur Aufreinigung der FDM sollten daher ebenfalls Proteasehemmer verwendet werden. Durch die Einstufung von *P. putida* in die Gefährdungskategorie L2 konnte nicht die ausreichend Menge an Biomasse zur Entwicklung einer Aufbereitungsstrategie hergestellt werden. Allerdings zeigte die FDM aus rekombinanter Quelle die gewünschte Stabilität und die Gewinnung der reinen FDM stand nicht im Vordergrund.

Zur Herstellung eines Rohextraktes aus dem Wildtyp oder aus der rekombinanten Quelle, wurde der Zellaufschluss abhängig vom Ausgangsvolumen entweder mittels Ultraschall (US) oder mit einem Hochdruckhomogenisator (HDH) durchgeführt. Vor dem Aufschluss wurden die Zellen mit einer Pufferlösung gewaschen und in einer Pufferlösung aufgenommen. Sollte der Rohextrakt lyophilisiert werden, wurden die Zellen in VE-Wasser aufgeschlossen.

Zellsuspensionen mit weniger als 50 ml wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen. Die Betriebsparameter für den Ultraschallaufschluss wurden für den Wildstamm optimiert (vergl. Kapitel 4.2.1.2). Der Aufschluss der Zellen erforderte eine Amplitude von 60 % (vergl. Tabelle 4-3). Das Volumen wurde nicht variiert und der Aufschluss in 10 ml Reagenzgläsern durchgeführt.

Der spezifische Energieeintrag E_{spz} bei Verwendung eines Hochdruckhomogenisators für den Zellaufschluss ist abhängig von der eingestellten Druckdifferenz Δp, der Zellkonzentration c_{BTM} und der Anzahl der durchgeführten Wiederholungen des Aufschlusses (Passagenzahl) N [129]:

$$E_{spz} = \frac{\Delta p}{c_{BTM}} \cdot N \qquad (5.1)$$

Der HDH-Aufschluss wurde sowohl für den Wildtyp als auch für den rekombinanten Stamm durchgeführt. Unabhängig von der Zelldichte wurden bei einer Druckdifferenz von 1500 bar bereits nach dem ersten Aufschluss (N=1) nahezu die maximale Proteinkonzentration und Aktivität erreicht. Eine Optimierung des HDH-Aufschlusses bezüglich Homogenisierungsdruck und Zellkonzentration wurde aufgrund zu geringer Biomasseverfügbarkeit nicht durch-

geführt. Interessant wäre die Optimierung insbesondere für den rekombinanten Stamm, da dieser in Zukunft die bevorzugte Quelle für die FDM sein wird.

Nach dem Zellaufschluss wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert und der Überstand lyophilisiert, im Sprühtrockner getrocknet oder bei -20 °C eingefroren. In allen Fällen kam es zu einem Aktivitätsverlust (vergl. Abbildung 4-6). Die Lyophilisation wurde in maximal 500 ml Rundkolben durchgeführt, die maximal zur Hälfte mit Rohextrakt befüllt wurden. Um eine größere Menge zur gleichen Zeit in einem Schritt zu gefriertrocknen, wurde das gesamte Volumen auf mehrere Rundkolben aufgeteilt und hintereinander an den Lyophilisator angeschlossen. Das Lyophilisat und der Rohextrakt aus der Sprühtrocknung wurden bei 4 °C gelagert; beide zeigten noch nach mehreren Monaten eine unveränderte Aktivität.

Rodewyk [10] verwendete zur Charakterisierung der FDM für alle Reaktionen einen KH_2PO_4-Na_2HPO_4-Puffer, der aber wegen seiner Löslichkeitsgrenze für höhere Ameisensäurekonzentrationen den pH-Wert nicht ausreichend stabil hielt. Anhand einer Titrationskurve konnte gezeigt werden, dass ein Dikaliumhydrogenphosphat-Natriumdihydrogenphosphat-Puffer aufgrund der besseren Löslichkeit größere Pufferkapazitäten erzielt. Eine negative Auswirkung der erhöhten Salzkonzentration auf die enzymatische Aktivität konnten nicht beobachtet werden, wurde aber auch nicht vergleichend untersucht.

5.5 Enzymatische Umsetzung von Formaldehyd

Die FDM wurde durch Rodewyk [10] in der damaligen Arbeit ausgiebig auf äußere Einflussfaktoren getestet. Bisher ist es aber nicht gelungen, die Enzymkinetik der FDM hinreichend genau zu ermitteln, wie es beispielsweise durch die Bestimmung der Michaelis-Menten-Parameter möglich ist. Dabei ist die alleinige Bestimmung des K_m-Werts und von v_{max} wegen der auftretenden Produktinhibierung (vergl. Kapitel 4.4.3.2) nicht ausreichend. Kato et al. [11] führte die FDM Reaktion aus *P. putida F61* im 10 ml Maßstab durch und bestimmte die Aktivität durch die Ameisensäurebildung, indem er mit einer 10 mM Natronlauge gegentitrierte. Die Proteinkonzentration wurde nicht angegeben. Der damit bestimmte K_m-Wert betrug 350 mM und wurde nach der Lineweaver-Burk-Methode ermittelt. Dabei wurden Formaldehydkonzentrationen von bis zu 30 g/l vorgelegt. Damit konnte die maximale Umsatzge-

schwindigkeit nicht erreicht werden. Auf eine Produktinhibierung wurde nicht eingegangen. Die Auswirkung auf die Aktivität durch die Verdünnung der Reaktionslösung wurde nicht berücksichtigt. Rodewyk führte eine Simulation durch, konnte aber die Enzymkinetik der FDM nicht korrekt abbilden.

Zusammenfassend aus den eigenen Ergebnissen und den Ergebnissen von Rodewyk [10], Kato [18], [21] und Yanase [19] besteht die Herausforderung bei der Aktivitätsmessung in den folgenden Punkten:

- Spontanaddition des gelösten Formaldehyds zu unlöslichem Paraformaldehyd.
- Cross-Linking der Proteine durch den Formaldehyd.
- Absenken des pH-Werts durch die gebildete Ameisensäure.
- Einfluss der Produkte und des Puffers auf die nasschemischen Messmethoden.
- Geringe Datendichte mittels nasschemischer Konzentrationsanalyse.
- Spontanreaktion von Methanol und Ameisensäure zu Methylformiat.
- Verwendung des Rohextrakts mit nicht bekanntem Anteil der FDM am Gesamtprotein.
- Die Formaldehydkonzentration bei der v_{max} erreicht wird ist nicht bekannt.
- Inhibierung der FDM durch Methanol, Ameisensäure und Methylformiat.
- Begrenzter Langzeitstabilität der FDM.

5.5.1 Aktivitätsmessung der Formaldehyd-Dismutase

Es wurde beobachtet, dass eine Formaldehydlösung von 15 g/l nach Lagerung von etwa einem Monat bei Raumtemperatur nur noch eine Konzentration von ca. 12 g/l aufwies. Ursache ist die Bildung von Paraformaldehyd, der als unlösliches weißes Pulver zu erkennen war. Mit Lösungen in diesem Konzentrationsbereich als Substratstammlösung konnte dennoch gut gearbeitet werden. Es war lediglich notwendig, vor der Entnahme die Formaldehydkonzentration mittels Küvettentest (Hach Lange) zu messen und die jeweilige Verdünnung der Stammlösung anzupassen.

Die Verwendung einer 1 g/l Formaldehydlösung für den Enzymassay hat sich aufgrund einer einfacheren Handhabung durch nur zwei Verdünnungsschritte bewährt (vergl. Kapitel 3.3).

Da weder bei Kato et al., noch Rodewyk, noch in den eigenen Versuchen ohne Zugabe eines Stabilisators wie beispielsweise Methanol zur Formaldehydlösung eine ausreichend hohe Formaldehydkonzentration zur Erreichung maximaler Substratumsatzgeschwindigkeit eingestellt werden konnte, ist die Festlegung einer bestimmten Konzentration, bei der die Aktivitätsmessungen stattfinden, notwendig. Die Geschwindigkeit der Paraformaldehydbildung während der Aktivitätsmessung ist für den Konzentrationsbereich bis 15 g/l vernachlässigbar. Die Assays wurden zudem so ausgelegt, dass der verwendete Phosphatpuffer und die Produkte Methanol und Ameisensäure keinen Einfluss auf das Messergebnis hatten (vergl. Kapitel 3.1).

Formaldehyd hat die Eigenschaft, Proteine, also auch Enzyme, miteinander zu vernetzen. Diese Form der Vernetzung wird in der Biotechnologie auch zur Immobilisierung von Enzymen über das sogenannte Cross-Linking genutzt. Es werden Konzentrationen von 4 mM eingesetzt [130]. Dabei reagiert zuerst eine Amino-Gruppe einer Aminosäure mit Formaldehyd zu einem Halbaminal, welches unter Abspaltung von Wasser zu einem Immonium-Salz reagiert. Das Immonium-Salz reagiert mit einer nucleophilen Gruppe eines Seitenrestes mit einer weiteren Aminosäure. Dies könnte beispielsweise eine phenolische OH-Gruppe oder NH-Gruppe des Histidins, aliphatische Amino-Gruppen (Alanin, Valin, Leucin und Isoleucin) oder eine Thiol-Gruppe (Cystein) sein. In den Versuchen zur Produktion von Methanol und Ameisensäure mittels FDM wurden Konzentrationen bis 0,5 M verwendet, also in einem Konzentrationsbereich, in dem die Gefahr der Quervernetzung bestand.

In Abbildung 5-1 ist die 3-D-Struktur der FDM dargestellt. Gelb hervorgehoben sind alle Aminosäuren, mit denen ein Cross-Linking möglich ist. Wäre es in den durchgeführten Versuchen zu einem Cross-Linking gekommen, wären Proteinkonglomerate durch Ausfallen sichtbar geworden. Selbst bei 0,5 M Lösungen konnte ein Ausfallen nicht beobachtet werden, obwohl auch andere Proteine im Rohextrakt vorhanden waren. Die 3-D-Struktur bestätigt die gemachten Beobachtungen, da sich die für ein Cross-Linking relevanten Aminosäuren überwiegend nicht an der direkten Oberfläche des Enzyms befinden.

Auch andere Parameter führen zu einer Hemmung und Inaktivierung der enzymatischen Aktivität. So wurden auch die Temperatur und der pH-Wert im Enzymreaktor konstant gehalten. Eine Temperatur von über 40 °C führt bereits zu einer irreversiblen Schädigung des Enzyms.

Ein pH- Wert unter sechs reduziert die Aktivität der FDM um 20 %. Wird ein pH-Wert unter 3,5 erreicht, kommt es zu einer irreversiblen Schädigung des Enzyms (vergl. Abbildung 4-44). Eine Erklärung dafür ist mit hoher Wahrscheinlichkeit die Abnahme der Komplexstabilität des Zn^{2+} (vergl. Kapitel 2.2) bei sinkendem pH-Wert [131]. Das Vorkommen von Zink nach einer Behandlung mit Säure im Überstand wurde nicht untersucht.

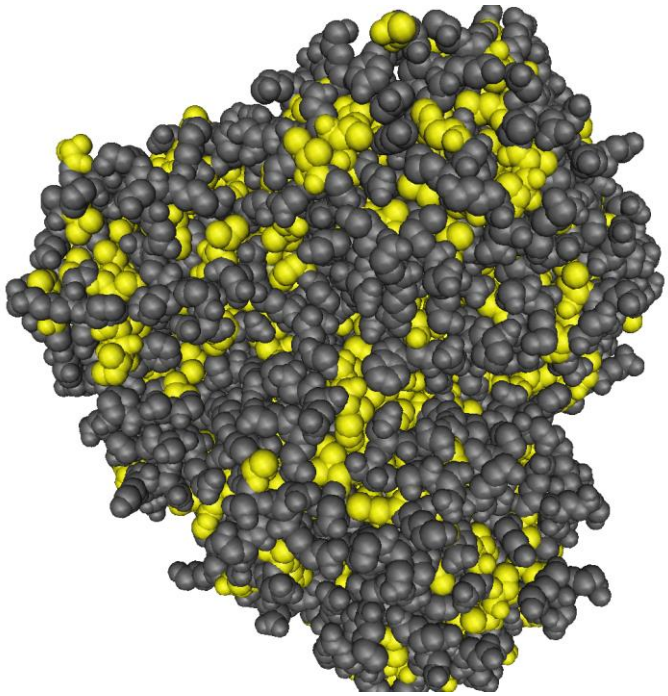


Abbildung 5-1 3D-Struktur der FDM aus *P. putida F61* mit allen Untereinheiten. Gelb hervorgehoben sind die Aminosäuren Histidin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin und Cystein, die als Bindungsstellen für das Cross-Linking mit Formaldehyd fungieren können.

5.5.2 Modellierung der FDM-Reaktion

Mittels Acetylaceton-Aktivitätsassay aufgezeichnete Reaktionsverläufe der FDM konnten aufgrund der geringen Datendichte nicht zur exakten Bestimmung der Michaelis-Menten-Parameter durchgeführt werden, wie aus der Literatur deutlich wurde (vergl. [10]). Dies war erst durch die Verwendung des Massenspektrometers zur Bestimmung der Substrat- und Produktkonzentrationen möglich. Damit konnte unter anderem gezeigt werden, dass neben den Produkten Methanol und Ameisensäure auch Methylformiat in geringen Konzentrationen entsteht (vergl. Abbildung 3-17).

Sowohl die Verwendung des Massenspektrometers als auch der konstante pH-Wert, der eine pH-Hemmung der FDM verhindert, ermöglichte die Bestimmung der Michaelis-Menten-

Parameter (vergl. Kapitel 4.4.1). Problematisch ist aber der Umgang mit der undefinierten Menge an FDM im Gesamtprotein und das Verwenden von Substratkonzentrationen, die unterhalb der nach der Michaelis-Menten-Theorie geforderten Substratkonzentration (Sättigungskonzentration) liegen, bei der eine maximale Umsatzgeschwindigkeit (v_{max}) erreicht wird. Letzteres ist selbst bei der Verwendung der nichtlinearen Regression zur Bestimmung der Konstanten problematisch. Unterhalb der Sättigungskonzentration ist die maximale Umsatzgeschwindigkeit abhängig von dem Verhältnis FDM zu Formaldehyd (vergl. Abbildung 3-22).

Die Verwendung von lyophilisiertem Rohextrakt birgt wegen schwankender FDM-Anteile eine Fehlerquelle, da der aus der Fermentation lyophilisierte Rohextrakt auf mehrere Chargen aufgeteilt und nach der Lyophilisierung wieder als Pulver zusammengeführt wurde (vergl. Kapitel 3.6). Dadurch kann bei Verwendung des gleichen Pulvers zur Herstellung von mehreren Enzymlösungen die Proteinkonzentration variieren.

Die maximale Umsatzgeschwindigkeit ist ein Maß für die Arbeitskapazität des Enzyms. Die Michaeliskonstante ist ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat. Bei einer kompetitiven Hemmung konkurrieren Inhibitor und Substrat um den Platz im aktiven Zentrum des Enzyms. In diesem Fall bleibt aber der maximale Substratumsatz des Enzyms (v_{max}) im Vergleich zu der Reaktion ohne Hemmung gleich, wohingegen die Affinität des Enzyms zum Substrat verringert wird, so dass der K_m-Wert sinkt. Bei der nichtkompetitiven Hemmung ist es umgekehrt, da nun der Inhibitor Einfluss auf die Struktur des aktiven Zentrums hat und damit die Reaktionsgeschwindigkeit beeinträchtigt. Der K_m-Wert bleibt gleich und v_{max} sinkt im Vergleich zur ungehemmten Reaktion.

Im Fall der FDM-Reaktion gibt es den Fall der ungehemmten Reaktion nicht, da das Enzym durch beide Produkte inhibiert wird (vergl. Kapitel 4.4.4). Damit ist strenggenommen eine Bestimmung der Inhibitionskonstanten für jedes einzelne Produkt nicht möglich und die Inhibierung wurde deshalb wie in der Abbildung 4-23 und Abbildung 4-24 dargestellt. Zudem wird das Enzym durch Ameisensäure stärker gehemmt als durch Methanol. Aus diesem Grund wurde eine Methode entwickelt, bei der trotz der Hindernisse die Konstanten bestimmt werden können. Anfänglich wurde bereits bei einer geringen Konzentration von 1,5 g/l eine Hemmung deutlich, da es zu einer Abweichung der Messwerte vom Modell der einfachen

Michaelis-Menten-Gleichung ohne Hemmung kommt (vergl. Abbildung 4-14). Daraufhin wurden die Gleichungen sowohl für kompetitive als auch nichtkompetitive Hemmung verwendet (vergl. Abbildung 4-15 und Abbildung 4-16). Sowohl die Herleitung der Michaelis-Menten-Gleichung unter Berücksichtigung der Eigenschaften der FDM als auch das Konfidenzintervall der Modellierung wiesen darauf hin, dass es sich bei dieser Konzentration um eine kompetitive Hemmung handelt. Das Konfidenzintervall unterscheidet sich lediglich um 0,01 mM.

Die Struktur des Enzyms wird also bei einer Konzentration von 1,5 g/l von den Produkten nicht beeinträchtigt. Lediglich die Affinität zum Substrat ist eingeschränkt. Also wäre es an dieser Stelle eigentlich sinnvoll, K_m variabel zu behandeln und die Werte für v_{max} und die Inhibitionskonstante K_I festzusetzen.

Mittels einer hyperbolischen Geschwindigkeitsgleichung können alle Hemmungstypen in einer Gleichung beschrieben werden (vergl. Kapitel 4.4.2.4). Die zusätzlichen Konstanten a und b gewichten die Teile der Gleichung, die für einen bestimmten Hemmungstyp stehen. Dabei werden die Quotienten von a oder b mit K_m und K_I verändert. Die Konstante v_{max} dient dabei als Multiplikator für den Rest der Gleichung, bzw. kommt v_{max} in jedem Teil der Gleichung vor. Würde alternativ K_m als Variable in der nichtlinearen Regression gehandhabt werden, würden sich K_m, K_I, a und b gegenseitig beeinflussen.

Die Simulationen mit der hyperbolischen Geschwindigkeitsgleichung zeigten (vergl. Kapitel 4.4.2.4), dass die nichtkompetitive Hemmung für höhere Konzentrationen (größer als 1,5 g/l) überwiegt. Damit die Vergleichbarkeit gewahrt bleibt und die spätere Simulation vereinheitlicht werden konnte, wurde auch bei geringen Konzentrationen v_{max} als Variable festgelegt. So dient v_{max} auch als ausgleichende Größe für die verwendete Proteinmenge (bzw. das Verhältnis FDM zu Formaldehyd).

Es konnte ein linearer Zusammenhang zwischen v_{max} und der Gesamtproteinmenge des Rohextrakts aus unterschiedlichen Fermentationen festgestellt werden, was zur Abschätzung der Aktivität während der Versuchsdurchführung eingesetzt wurde (vergl. Abbildung 4-21). Als Grundlage dafür dienten die Reaktionen zur Optimierung des Ultraschallaufschlusses des Wildtyps (vergl. Kapitel 4.2.1.1). Für diese Versuchsreihe wurde die gleiche Biomasse verwendet und die Reaktionen zur gleichen Zeit in parallel gerührten Bechergläsern mit einer

Formaldehydkonzentration von 1,5 g/l durchgeführt. Durch die unterschiedlichen Aufschlusszeiten variieren die Proteinkonzentration und die Aktivität über eine breite Spanne sehr gleichmäßig (vergl. Abbildung 4-4). Für jede Reaktion wurde v_{max} bestimmt und dabei die Werte von K_m und K_I aus der kompetitiven Hemmung übernommen. Es konnte also durch die Bestimmung von v_{max} ein Weg gefunden werden, um trotz unbekannter Menge an FDM im Rohextrakt dennoch eine Simulation der Reaktion durchzuführen.

Dieses Vorgehen bei der Modellierung ist in der Literatur nicht beschrieben. Auf diese Weise konnte beispielsweise die Enzymmenge aus dem Wildtyp-Rohextrakt abgeschätzt werden, um die Reaktionsdauer bei unterschiedlichen Formaldehydkonzentrationen auf eine bestimmte Länge festzusetzen. Dies ist zur Entwicklung einer Pilotanlage mit gekoppelter anorganischer Katalyse wichtig. So kann die Gesamtaktivität des Enzymreaktors an die Partialoxidation von Methan zu Formaldehyd angepasst werden. Diese Methode ist auch auf immobilisierte Enzyme übertragbar. Zudem war es möglich, die Druckabhängigkeit des Enzyms zu untersuchen, indem mehrere Versuche bei unterschiedlichen Drücken durchgeführt wurden und anhand der Messwerte die Michaelis-Menten Konstanten ermittelt wurden. Trotz leicht unterschiedlicher Verläufe (vergl. Kapitel 4.4.3.2) konnte kein Einfluss des Druckes ermittelt werden.

5.5.3 Verwendung immobilisierter Enzyme

Für die Widerverwendung der Enzyme, für eine kontinuierliche Umsetzung von Formaldehyd und für die in-situ Produktabtrennung ist eine Immobilisierung der Enzyme notwendig. Hierbei können Enzyme entweder in eine Matrix eingeschlossen, an Oberflächen gebunden oder mit sich selbst quervernetzt werden (vergl. Kapitel 2.6.4).

So wurde der Rohextrakt aus *Pseudomonas putida J3* zunächst in einer Polyethylenglykol-Matrix eingeschlossen (vergl. 4.4.5.1), da bisher nur der Matrixeinschluss der FDM in Polyurethan von Kato et al. publiziert wurde. Die FDM war auch nach der Immobilisierung in PEG aktiv, allerdings kam es zur Inaktivierung des Enzyms im Rohextrakt. Die Verwendung eines Hydrogels ist für eine technische Anwendung wegen des Quellverhaltens, der Diffusionsabhängigkeit der Stoffe durch das Polymer und der geringen Formstabilität nicht interessant. Deshalb wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt. Wesentlich interessanter ist die Verwendung von trägerfixierten Enzymen. Hierbei werden die Enzyme direkt an die Oberfläche

von porösen Partikeln unterschiedlicher Materialien gebunden (vergl. 4.4.5.2). Diese Materialien lassen sich je nach Bindungstyp auf die Enzymeigenschaften anpassen und wiederverwenden. Die Trägerfixierte Bindung der FDM wurde bisher nicht publiziert. Es wurden unterschiedliche Materialien und Bindungstypen auf ihre Tauglichkeit getestet. Nach 440 Tagen und 29 Messungen betrug die Restaktivität des Enzyms auf einem Polyacryl-Träger noch 40 % (vergl. 4.4.5.2). Die Aktivität nahm linear ab. Im Dauerversuch zeigte sich die desinfizierende Wirkung des Formaldehyds, da über einen großen Zeitraum in den 1 ml Versuchssäulen kein Fouling auftrat. Durch eine langzeitstabile Bindung des Enzympräparats an Trägerpartikel, wie auch durch das Vermeiden eines bakteriellen Abbaus der Proteine konnte ein prozesstauglicher Katalysator entwickelt werden.

Es bestand das Ziel mit diesem Katalysator einen 200 ml Festbettreaktor zu betrieben, in dem Formaldehydlösungen bis zu 15 g/l kontinuierlich mit einem Volumenstrom von 10 ml pro Minute möglichst vollständig zu Methanol und Ameisensäure umgesetzt werden (vergl. Kapitel 4.4.5.3). Der Volumenstrom im Festbettreaktor war auf die nachgeschaltete Analytik mittels Massenspektrometrie ausgerichtet. Der Auslassstrom aus dem Reaktor wurde direkt in den Membraneinlass des Massenspektrometers geleitet.

Aus dem Grund musste der Katalysator an diese Rahmenbedingungen angepasst werden. Zur genaueren Beschreibung der immobilisierten Enzyme auf den porösen Trägerpartikeln wurden zusätzliche Versuche gemacht, ähnlich denen mit freier FDM im Rohextrakt. Dazu wurden die mit Enzym beladenen Trägerpartikel in den Rührreaktor gegeben und konstante Bedingungen bezüglich Temperatur und Flüssigkeitsströmung eingestellt (vergl. Kapitel 4.4.5.4).

Immobilisierte Enzyme auf der Oberfläche poröser Membranen werden oftmals durch die Porendiffusion der Substrate in ihrer Aktivität gehemmt. Zur Beschreibung des Einflusses der Porendiffusion wird das Thiele-Modul verwendet. Obwohl das Thiele-Modul auch für auf porösen Trägermaterialien immobilisierte Enzyme herangezogen wird [120], ist in der Michaelis-Menten-Kinetik die Verfügbarkeit und die Affinität des Enzyms zum Substrat und die Produktfreisetzung über die Parameter K_m, v_{max} und K_I bereits beschrieben. Deshalb werden in der Biokatalyse die Paramterer zur Diffusion der Substrate oder der Produkte in einem Wirkungsgrad zusammengefasst [119]. In der Michaelis-Menten-Kinetik entspricht das der

anteiligen Reaktionsgeschwindigkeit der immobilisierten Enzyme im Vergleich zu den frei gelösten Enzymen (vergl. Gleichung (4.31) und (3.28)) unter gleichen Reaktionsbedingungen, wie Temperatur, Gesamtproteinkonzentration und Substratkonzentration. Allerdings liefert diese Herangehensweise keine Aussage über die Ursache der limitierten Aktivität. In dieser Arbeit bestand die These, dass durch die Einführung von Wirkungsgraden für jeden Parameter der Michaelis-Menten-Kinetik bessere Aussagen über die Ursache der Limitierung gemacht werden können (vergl. Gleichung (4.36)).

Die Werte der Wirkungsgrade müssten zwischen > 0 und ≤ 1 (> 0 % und 100 %) liegen. Bei einem Wert von 1 (100 %) ist die jeweilige Konstante unabhängig von der Immobilisierung. Es wurde davon ausgegangen, dass der Wirkungsgrad für den K_M-Wert in jedem Fall < 1 sein musste, da die Substratverfügbarkeit des immobilsierten Enzyms nicht besser oder gleich der Substratverfügbarkeit des freien Enzyms sein kann. In der Literatur ist diese Herangehensweise nicht publiziert. Tatsächlich konnte auf diese Weise gezeigt werden, dass der K_m-Wert des immobilisierten Enzyms nur 0,6 % des freien Enzyms betrug und die Substratverfügbarkeit limitiert war. Der v_{max}-Wert betrug 1,4 % bezogen auf den Wert des freien Enzyms. v_{max} kann durch Verlust an Protein auf den Trägern absinken. Allerdings konnten nach zweimaligen Spülschritten keine Proteine mehr detektiert werden und die immobilisierte Proteinmenge diente als Ausgangspunkt zur Herstellung der freigelösten Proteinmenge. Es ist also davon auszugehen, dass die Proteinmenge auf den verwendeten Trägerpartikeln und der frei gelösten Proteinlösung identisch waren. Die Proteine auf den Trägerpartikeln waren ungerichtet immobilisiert, so dass dadurch aktive Zentren der Enzyme blockiert waren oder es auch zu strukturellen Änderungen des Enzyms kam [132]. Kato et al. [18] haben reine FDM in eine Polyurethan-Matrix eingeschlossen und eine Verzögerung der Reaktion um das sechs- bis siebenfache erhalten (vergl. Kapitel 2.6.4). Obwohl in dieser Arbeit eine andere Immobilisierungsform verwendet wurde, konnte eine ähnliche Verzögerung beobachtet werden (vergl. Abbildung 4-28).

Die Produktinhibierung, ausgedrückt durch den Parameter K_I, wurde durch den Immobilisierungsschritt nicht beeinflusst. Der Wirkungsgrad lag erwartungsgemäß weiterhin bei 100 %. Die Dissoziation zwischen Enzym-Produkt-Komplex zu Produkt und Enzym ist insoweit unabhängig von der Immobilisierung, als dass es nicht zu Konformationsänderungen des Enzyms, bzw. des aktiven Zentrums kommt. Weiterführende Aussagen diesbezüglich können

ohne zusätzliche Versuchsdurchführungen nicht getätigt werden. Das hergeleitete Modell (Gleichung (4.36)) könnte validiert werden, indem die Substratverfügbarkeit durch höhere Substratkonzentration im Medium für immobilisierte Enzyme eingestellt würden. Hier müsste ein Weg gefunden werden, Formaldehydlösungen ohne Zugabe von stabilisierenden Stoffen wie z.B. Methanol, herzustellen. Der Wirkungsgrad für K_M müsste in diesem Fall steigen. Versuche anhand gerichtet immobilisierter und reiner FDM wären für weitere Aussagen hilfreich. Eine Aktivitätssteigerung der immobilisierten FDM bestünde in der gerichteten Immobilisierung. Ein exprimierter His-Tag am C-terminalen Ende der FDM-Untereinheit kann sowohl zur Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie als auch für eine gerichtete Immobilisierung an einen Träger genutzt werden. Dabei bindet der His-Tag an die Ni-NTA-Gruppe des Trägerpartikels. Ein wesentlicher Punkt dabei ist der Abstand zwischen dem aktiven Zentrum und C-terminalen Ende der Untereinheit. Zur Erstellung eines Strukturmodells wurde das 3D- Strukturprogramm von NCBI Cn3D 4.3 genutzt. Die Bilder in Abbildung 5-2 zeigen einen großen Abstand zwischen aktivem Zentrum und C-terminalem Ende und lassen den Schluss zu, dass die aktiven Zentren für das Substrat trotz Tag gut zugänglich bleiben. Außerdem liegen die C-terminalen Enden der Untereinheiten sehr nahe beieinander. Fortführende Untersuchungen zur Charakterisierung der FDM und Gewinnung der FDM mittels Ni-NTA-Agarose-Träger sollten durchgeführt werden.

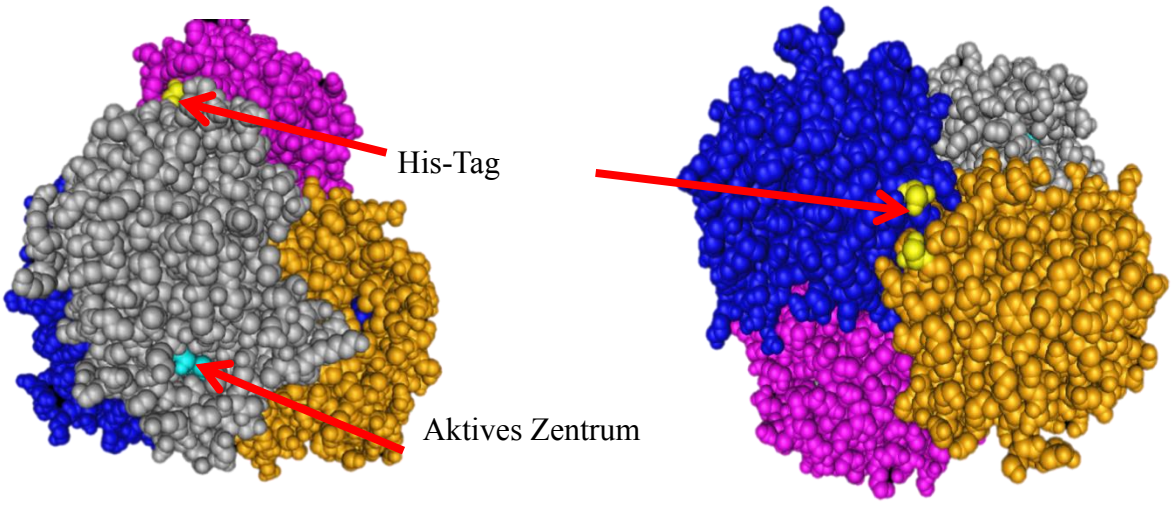


Abbildung 5-2 3D-Struktur der Formaldehyd-Dismutase aus *P. putida F61* und ihre homologen Untereinheiten aus unterschiedlichen Perspektiven: *links:* Darstellung des Abstands vom C-terminalen Ende zum aktiven Zentrum; *rechts:* Darstellung des Abstands des C-terminalen Endes zwischen den Untereinheiten.

5.6 Produktabtrennung von Methanol und Ameisensäure

Die FDM unterliegt einer Produkthemmung durch Methanol und Ameisensäure bereits bei niedrigen Konzentrationen von 0,05 M. Um eine hohe Enzymaktivität aufrecht zu erhalten, sollte versucht werden, die Produkte in situ abzutrennen.

5.6.1 Rektifikation zur Reinigung von Methanol

In Kapitel 4.5.1 konnte gezeigt werden, dass die Rektifikation einer 5-% (w/v) Methanollösung theoretisch möglich ist. Die jährlichen Betriebskosten zur Destillation eines 5 %igen Ethanol-Wassergemischs in einer Rektifikationskolonne mit 19 Stufen betragen ca. 35.000 € bis 45.000 € [133], [134]. Ein großer Vorteil der Rektifikation ist, dass die dafür benötigte thermische Energie aus der Oxidation von Methan zu Formaldehyd gedeckt werden könnte. Ausgehend von einer durchschnittlichen Biogasanlage (160 kW el.) werden etwa 16.000 kmol Methan pro Jahr hergestellt. Durch die Oxidation des Methans zu Formaldehyd und weiteren Oxidationsprodukte wird Wärme frei. Aus der chemischen Katalyse stehen nach Deckung des Wärmebedarfs der Biogasanlage im Schnitt noch 270 kW zur Verfügung. Für die Rektifikation einer 5 %igen Methanollösung auf Basis des in der Prozessbilanz (vergl. Kapitel 5.8) aufgeführten Volumenstroms (1,96 m³/h) zur Herstellung von etwa 110 t/a Methanol und 150 t/a Ameisensäure sind 34 kW (vergleiche Tabelle 4-8) nötig. Die Investitionskosten für den Betrieb einer Rektifikation in landwirtschaftlichen Betrieben können anhand der Bioethanolproduktion abgeschätzt werden. In einer Studie zur Maischedestillation mit einer Kapazität von 20.000 Hektoliter im Jahr werden Investitionskosten von 324.500 € angegeben [134].

5.6.2 Pervaporation zur Abtrennung von Methanol

Im Gegensatz zur Rektifikation kann Methanol beispielsweise durch Pervaporation in-situ entfernt werden. Die Eigenschaften der Pervaporationsmembranen kommen der Verwendung in diesem Prozess entgegen, da durch sie gerade für geringe Konzentrationen größere Selektivitäten als bei höheren Konzentrationen erzielt werden können. Allerdings ist der Flux mit durchschnittlich 0,7 l/m²h bei einem Vakuum von 20 mbar bis 30 mbar für Flachmembranen gering (vergl. 4.5.2.1) und wird so auch in der Literatur beschrieben (vergl. Tabelle 2-12).

Die Charakterisierung der Membranen für den geringen Konzentrationsbereich ist schwierig. Üblicherweise wird das dampfförmige Permeat in einer Stickstoffkühlfalle aufgefangen. Wegen des geringen Fluxes und der damit verbundenen langen Versuchszeit ist dies experimentell nur schwierig umzusetzen und führt zu den in Abbildung 4-37 erhaltenen Abweichungen. Zur Analyse der Proben mittels Massenspektrometer sind mindestens 50 ml notwendig. Die Verwendung des on-line-Massenspektrometer-Membraneinlasses ermöglicht die direkte Bestimmung der Zusammensetzung des Permeats (vergl. 4.5.2.3) durch den Einbau der Pervaporationsmembran in das Modul (vergl. 4.5.2.1). Allerdings lässt sich nur mittels Kühlfalle der genaue Flux bestimmen. Eine weitere Anwendung des Massenspektrometers lag in der Verwendung des Gaseinlasses, mit dem beispielsweise die Zusammensetzung des Permeats in Abhängigkeit des Quellungszustands erfasst und der Startpunkt der Pervaporation bestimmt werden konnte.

5.6.2.1 Selektivität der Pervaporationsmembranen

Mit der PTMS-Sheetmembran M1_2 (Polyan) konnte im Flachmembranmodul für eine Methanol-Feedkonzentration von 0,08 Gew.-% eine Selektivität von 5,07 und bei 27,7 Gew.-% ein Wert von 2,15 erhalten werden. Die Betriebstemperatur lag dabei bei 25 °C. T. Mohammadi et al. [135] verwendete eine PDMS-Membran als Trennschicht und eine Trägerschicht aus Zelluloseacetat, um Methanol aus einer wässrigen Lösung abzutrennen. Im Vergleich zu vielen anderen Publikationen (vergl. Tabelle 2-12 und Tabelle 2-13) wurden in dieser Studie auch Methanolkonzentrationen ab 0,3 Gew.-% bis 3 Gew.-% untersucht und Selektivitäten von 1,8 bis 7,8 erhalten. Die höchste Selektivität wurde dabei bei geringster Konzentration und bei 50 °C erhalten. Damit stimmen die Werte tendenziell mit den eigenen Werten der M1_2-Sheetmembran überein. Bei niedrigen Konzentrationen kann eine hohe Selektivität beobachtet werden, die jedoch bei steigender Konzentration erst stark, dann etwas schwächer abnahm. Nach T. Mohammadi et al werden durch die Erhöhung der Methanol-Feedkonzentration das freie Volumen und gleichzeitig die Mobilität der Polymerketten in der Membran erhöht [135], [136]. Kleine Wassercluster können leicht in die Freiräume permeieren. Es kommt zur verstärkten Diffusion von Wasser in die Membran, was in einer Absenkung der Selektivität resultiert [135]. T. Mohammadis gemessene, höhere Selektivität bei sehr niedrigen Feedkonzentrationen gegenüber der M1_2 Membran kann dadurch erklärt werden, dass die Prozesstemperaturen bei bis zu 50°C lagen. J.M. Molina et al. [137] und Li et al.

[138] beschreiben jeweils den Einfluss der Temperatur auf die Selektivität. Durch ein Erhöhen der Temperatur wird die Diffusion und Löslichkeit der permeierenden Komponente erhöht. Außerdem beeinflusst sie den Permeabilitätskoeffizienten der Membran und die Triebkraft des transmembranen Stofftransports [63]. Interessant ist bei T. Mohammadi et al. der sehr rasante Abfall der Selektivität auf 1,8 bei 3 Gew.-% MeOH. Bei der M1_2 Membran kann bei 4,0 Gew.-% MeOH-Feedkonzentration immerhin noch eine Selektivität von 2,88 verzeichnet werden. Li et al. hat ebenfalls mit einer PDMS- Membran auf einer Zelluloseacetat Trägerschicht Versuche für 5,0 Gew.-% Methanol-Feedkonzentration durchgeführt. Wie bei T. Mohammadi et al. lagen die Prozesstemperaturen bei 50 °C. Auch die Dicke der PDMS- Trennschicht war mit 8 µm identisch. Nur die effektive Trennfläche war statt 0,024 m² nur 0,0024 m². Li et al. erreichte Selektivitäten von 5,2 bis 6,5. Nach der Verdopplung der aktiven Membrandicke auf 16 µm erhöhten sich diese noch einmal auf 6,2 bis 7,0 [138]. Bei einer Prozesstemperatur von T= 30°C beschreibt Kujawski [62] mit der PDMS-Membran PERVAP- 1060 von Sulzer bei einer Feedkonzentration von 5 Gew.-% Methanol eine ähnliche Selektivität von 6 und mit der PDMS-Membran PERVAP- 1070 von Sulzer mit ZSM-5 Füllung eine Selektivität von 3,6. Hier sind die Prozesstemperaturen bei 30 °C und dennoch wird mit einer Selektivität von 6 eine sehr gute Abtrennung erreicht, die in etwa der doppelten Selektivität der M1_2 Membran entspricht. Die PERVAP- 1070 ist dagegen mit ihr vergleichbar. Allerdings wird bei dieser Membran keine Aussage über die effektive Trennfläche gemacht [62].

5.6.2.2 Flux der Pervaporationsmembranen

Ein weiteres Kriterium neben der Selektivität ist der Flux. Dieser beschreibt den Durchfluss im Verhältnis zur Membranfläche und Zeit. Damit wird die Zeit beschrieben, die benötigt wird, um ein bestimmtes Abtrennungsergebnis zu erreichen. Im Umkehrschluss kann damit die benötigte Membranfläche berechnet werden, um ein gewünschtes Ergebnis in einer angestrebten Zeitspanne zu erlangen.

Die M1_2 Sheetmembran weist einen Flux von 0,49 kg/m²h bis 0,91 kg/m²h für Methanol-Feedkonzentrationen von 0,08 Gew.-% bis 4 Gew.-% auf. Der Flux bewegt sich dabei um einen Mittelwert von 0,579 kg/m²h, bevor er bei einer Anfangsfeedkonzentration von 12 Gew.-% auf 0,91 kg/m²h steigt (vergl. Kapitel 4.5.2.3). Der Flux bei der PTFE-Membran

nimmt dabei nur leicht höhere Werte von 0,611 kg/m²h bis 0,778 kg/m²h für Methanol-Feedkonzentrationen von 0,08 Gew.-% bis 4 Gew.-% an, bevor auch dieser bei 12 Gew.-% auf 0,98 kg/m²h steigt. Da die Werte für die effektive Trennfläche und den Druck gleich sind, ist der Flux direkt vergleichbar. Für Anfangsfeedkonzentrationen bis 4 Gew.-% ist der Flux bei PDMS-Membranen mit der Literatur vergleichbar. T. Mohammadi et al. erhielt für Anfangsfeedkonzentrationen von 0,3 Gew.-% bis 3,0 Gew.-% einen Flux von 0,37 kg/m²h bis 0,56 kg/m²h [135]. Li et al. [138] erzielten bei derselben PDMS- Membran einen Flux von 0,53 kg/m²h bis 1,2 kg/m²h für eine Anfangsfeedkonzentration von 5 Gew.-%. Der Flux erhöht sich komplementär zur Selektivität ebenfalls mit steigender Methanolkonzentration aufgrund des vorangegangen beschriebenen Verhaltens der Polymermatrix.

Der Flux beim Röhrenmodul liegt deutlich unter dem von Sheetmembranen. Er erstreckt sich von 0,052 kg/m²h bis 0,0961 kg/m²h für Anfangsfeedkonzentrationen von 0,08 Gew.-% bis 12 Gew.-%. Ursache dafür war, dass das Röhrenmodul nicht vollständig gegenüber der Umgebung abgedichtet werden konnte. Damit wurden die Messungen verfälscht und die Ergebnisse waren nur eingeschränkt verwendbar.

5.6.3 In-situ Methanolabtrennung durch Kombination von Pervaporation mit der FDM-Reaktion

Wie in den oberen Kapiteln beschrieben, muss die FDM sowohl immobilisiert als auch die Produkte wegen ihrer inhibitorischen Wirkung, auch schon bei sehr geringen Konzentrationen aus dem Reaktionsmedium entfernt werden. Je geringer jedoch die Konzentration der Produkte im Medium ist, desto schwieriger ist eine Produktabtrennung zu bewerkstelligen. Das trifft vor allem auf das Methanol zu. Es bestand die Hypothese, dass die FDM durch geeignete Aktivierungsverfahren der Pervaporationsmembranen auf deren Oberfläche immobilisiert werden kann. Durch die räumliche Nähe zur Oberfläche und dem Lösungsverhalten der aktiven Schicht der Membranen sollte eine verbesserte Selektivität der Pervaporationsverfahren erzielt werden. Die Immobilisierung an der Oberfläche ist durch die Aktivierung der Membran in unterschiedlichen Plasmen und die Verwendung geeigneter Linker gelungen (vergl. Kapitel 4.6.2). Allerdings konnte eine verbesserte Pervaporation nicht nachgewiesen werden.

Die Menge an Protein, die in den aktivierten PDMS oder PTMSP Membranen pro Quadratmeter immobilisiert werden kann, kann über die Anzahl der reaktiven Stellen (Si-OH), das Molekulargewicht des FDM von 216 kDa und über die Oberfläche der Membran von 7,1 cm² abgeschätzt werden.

Die Anzahl der reaktiven Stellen pro Quadratmeter beträgt typischerweise etwa vier bis acht µmol Silanol pro Quadratmeter für eine vollständig hydroxylierte Oberfläche, d.h. 2,4-4,8 Silanole pro nm² [139], [140]. Obwohl mittels Sauerstoffplasmabehandlung andere sauerstoffreiche funktionelle Gruppen auf der PDMS-Oberfläche aufgebracht werden, dominieren in der Regel die Si-OH-Gruppen [141]–[143]. Auf den Membranen waren dementsprechend 4 µmol/m² reaktive Stellen verfügbar. Theoretisch können daher 0,6 mg FDM immobilisiert werden, wobei 0,3 mg Gesamtprotein zur Immobilisierung eingesetzt wurden.

Vergleicht man die Proteinmenge von 0,3 mg mit der tatsächlich immobilisierten Proteinmenge in Milligramm aus Tabelle 4-12 für die 20 W Sauerstoffplasma- und 50 W Stickstoffplasmabehandlungen, so wurden 7,5-mal niedrigere Werte erhalten. Das lässt sich auf die Aktivierung der Membranen durch das Plasma, auf die Handhabung der aktivierten Membranen und auf die Qualität der Enzymlösung zurückführen. Im Umkehrschluss könnte bei einer optimierten Immobilisierung auch eine dementsprechend größere Aktivität erzielt werden. Eine gerichtete Immobilisierung über einen His-Tag, wie in Kapitel 5.5.3 beschrieben, würde noch zu einer Steigerung der flächenspezifischen Aktivität führen.

Die hydrophile Oberfläche nach der Plasmabehandlung reagiert mit dem Luftsauerstoff innerhalb weniger Minuten, so dass die PDMS- und PTMSP-Membranen am besten direkt nach der Plasmabehandlung mit der Silanol-Lösung benetzt werden sollten. Außerdem besteht eine weitere Schwierigkeit darin, die Silan-Funktionalisierungsdichte der Membran zu steuern. Ein weiterer Faktor ist die Qualität der verwendeten Enzymlösung. Dabei wäre die Verwendung einer reinen FDM-Lösung ohne andere Proteine vorteilhafter. Die Immobilisierung kleinerer Proteine verfälscht das Ergebnis.

5.6.4 Adsorption von Ameisensäure durch Verwendung eines Ionenaustauschers

Die Adsorption von Formiat kann durch Einsatz von Ionenaustauschern ermöglicht werden. Um eine weitere Hemmung durch eine Absenkung des pH-Werts zu vermeiden, musste eine

Möglichkeit zur Entfernung der Ameisensäure bereits während der Reaktion gefunden werden.

5.6.4.1 Kombination der Enzymreaktion mit Ionenaustauscher und Pervaporation

Die Pervaporation zur in-situ-Produktgewinnung ist für Methanol aber nicht für Ameisensäure geeignet, weil diese dissoziiert vorliegt und auch als freie Säure zu wenig flüchtig ist. Es besteht die Möglichkeit, ein Keramik-Pervaporations-Rohrbündelmodul zu verwenden. In diesem Fall könnte das Modul gleichzeitig als Festbettreaktor dienen.

Problematisch ist dabei, dass auf diese Weise die Membran in Kontakt mit Formaldehyd kommt und durch das Anlegen eines Vakuums auf der Permeatseite Formaldehyd in den Poren der Membran zu Paraformaldehyd polymerisiert. Damit werden die Poren unwiderruflich verstopft. Durch das Ausfüllen der Poren mit Paraformaldehyd werden die Membranen transparent, wie anhand der Verwendung einer PTFE-Membran beobachtet wurde. Das Verstopfen der Membran würde auch in der Trägerschicht der Pervaporationsmembran stattfinden. Aus diesem Grund kann die Pervaporation mit Desorption an eine Gasphase nicht in Anwesenheit von Formaldehyd in hoher Konzentration durchgeführt werden. Das lässt sich vermeiden, wenn der Formaldehyd vollständig umgesetzt wird, bevor die Substratlösung die Pervaporationsmembran erreicht.

5.6.4.2 Kombination aus freiem Enzym und Ionenaustauscher im Festbettreaktor

Eine andere Möglichkeit, die in-situ-Abtrennung von Formiat durch Ionenaustauscher zu ermöglichen, ist die Verwendung von gelöster FDM in einem Ionenaustauscher-Festbett. Allerdings werden alle Proteine der Reaktionslösung einschließlich der Enzyme an den Ionenaustauscher binden. Damit stehen die Proteine und die gebildete Ameisensäure in Konkurrenz zueinander. Ein Lösungsansatz besteht darin, die Beladung mit Enzymen am Ionenaustauscher zu berücksichtigen und beispielsweise die Kapazität des Ionenaustauschers dementsprechend größer zu dimensionieren. Dass die Immobilisierung von Enzymen an Ionenaustauschern möglich ist, konnte in dieser Arbeit in vielen Varianten gezeigt werden (vergl. Kapitel 4.4.5.2). Würde die Kapazitätsgrenze durch das gebildete Formiat erreicht werden, müsste zur Regeneration des Ionenaustauschers eine Elutionsmethode entwickelt werden, mit der ausschließlich das Formiat ausgewaschen wird, so dass das Enzym auf dem Ionenaustauscher

verbleibt und ein nicht enzymschädigendes Elutionsmittel, wie beispielsweise eine NaCl-Lösung, verwendet werden. Die größte Oberfläche von Ionenaustauschern befindet sich bei porösen Materialien im Inneren der Partikel. Eine besonders große „innere“ Oberfläche haben Zeolith-Ionenaustauscher aufgrund ihres sehr eng verteilten Porendurchmessers. Mit der Wahl des geeigneten Porendurchmessers könnte die Bindung der Enzyme im Inneren der Zeolith-Partikel verhindert werden.

5.6.4.3 Verwendung eines Mischbettfilters als Festbettreaktor

Ein Lösungsansatz, die Ameisensäure abzutrennen, besteht in der Verwendung eines Partikelgemischs bestehend aus Trägerpartikeln und Anionenaustauschern zur in-situ-Adsorption von dem durch die immobilisierte FDM gebildeten Formiat, wobei dabei gänzlich auf einen anionischen Puffer verzichtet werden müsste. Dies ist nur bei räumlicher Nähe von Enzym und Ionenaustauscher möglich, da ansonsten der pH-Wert im Reaktionsmedium schnell absinken würde. Umzusetzen ist das durch die Verwendung eines Mischgutes aus Trägermaterial und Ionenaustauscher in einem Festbettreaktor. Zur Regenerierung des Ionenaustauschers wird bei einem H^+-Austauscher mit Säure und bei einem OH^--Austauscher mit Lauge gespült. Die Behandlung von freiem und immobilisiertem Enzym mit Säure und Base führte allerdings zu einer vollständigen Inhibierung (vergl. Kapitel 4.5.3).

Eine andere Möglichkeit wäre, die Elution über mehrere Schritte durchzuführen. Zunächst könnte beispielsweise Kochsalz verwendet werden um Formiat zu eluieren. Anschließend müsste dann in Anwesenheit der Enzyme dennoch mit Natronlauge gespült werden, um die ursprüngliche Affinität herzustellen. Die Verwendung eines Mischbetts ist demzufolge nicht ohne weiteres möglich. Die Elution des Formiats vom Ionenaustauscher müsste separat vom Trägermaterial des Enzyms durchgeführt werden. Technisch wäre das durch eine Entmischung über unterschiedliche Dichten der Träger- und Ionenaustauscherpartikel in einem sogenannten Mischbettfilter möglich.

In der Wasseraufbereitungstechnologie werden für die gleichzeitige Verwendung von Anionen- und Kationenaustauschern Mischbettfilter verwendet [144], [145]. Für bestimmte Anwendungen werden mittels externer Regeneration die Ionenaustauscher voneinander getrennt und separat regeneriert. Kompakte Systeme sind auf dem Markt in unterschiedlichen Varian-

ten erhältlich. In einem Mischbett aus Ionenaustauscher und Enzymträger ist die Bilanzierung der Durchbruchs- und Sättigungskapazität zur Modellierung der Sorptionsdynamik von wesentlichem Interesse, weil damit die Reaktionsdauer des Mischbetts berechnet werden kann [131]. Im klassischen Fall der Verwendung eines Mischbetts wird das Sorptiv am Eingang des Mischbetts aufgegeben und es entsteht ein Beladungsgefälle in Richtung Ausgang des Mischbetts. Wird die Beladungsgrenze erreicht, tritt das Sorptiv am Ausgang des Mischbetts aus. Damit können die Durchbruchskapazität

$$Q_{Db} = \frac{\dot{V}}{m} \cdot \int_0^{t_{Db}} (c_0 - c_i) dt \qquad (5.2)$$

Q_{Db}: Durchbruchskapazität [mmol/g]

t_{Db}: Durchbruchszeit [min]

c_0: Sorptivkonzentration am Eingang [mmol/g]

c_i: Sorptivkonzentration am Ausgang zum Zeitpunkt t [min]

und die Sättigungskapazität

$$Q_{S\ddot{a}} = \frac{\dot{V}}{m} \cdot \int_0^{t_{S\ddot{a}}} (c_0 - c_i) dt = Q_{Db} \cdot \int_0^{t_{S\ddot{a}}} (c_0 - c_i) dt \qquad (5.3)$$

$Q_{S\ddot{a}}$: Sättigungskapazität [mmol/g]

$t_{S\ddot{a}}$: Sättigungszeit [min]

berechnet werden [131].

Die FDM-Reaktion in räumlicher Nähe zu einem Anionenaustauscher in einem Mischbettfilter durchzuführen, ist ein neuer Ansatz. Die Verwendung eines Puffers ist in diesem Fall nicht mehr möglich. Die Anionen des Puffers würden bevorzugt an den Anionenaustauscher binden. Durch das Aufzeichnen der Adsorptionskinetik eines schwach basischen Anionenaustauschers konnte gezeigt werden, dass die durch die Reaktion gebildete Ameisensäure mit mindestens gleicher Geschwindigkeit aufgenommen werden kann, wie sie auch enzymatisch hergestellt wird (vergl. 4.5.3). Wie schon in Abschnitt 5.5.3 beschrieben, war es schwierig die Messung mittels Massenspektrometrie durchzuführen, da hier ebenfalls ein Filter zum Zu-

rückhalten der Partikel verwendet werden musste. So kam es teilweise zu Ausfällen der HPLC-Pumpe, wie es beispielsweise in Abbildung 4-41 zu sehen ist.

Auf dem Markt sind viele unterschiedliche Ionenaustauscher erhältlich. Schwach basische Ionenaustauscher haben eine erheblich größere Kapazität als stark basische Tauscher. Die in dieser Arbeit verwendeten Enzymträger hatten eine FDM-Aktivität von 0,94 mmol g^{-1} min^{-1} beim Einsatz einer 15 g/l Formaldehydlösung und sind damit für die Verwendung in einem Mischbettfilter schon am oberen Aktivitätslimit, da sonst das laut Herstellerangaben [145] nötige Verhältnis von Ionenaustauscher zu Trägerpartikeln (3:1) zu ungünstig wird. Die Optimierung der Enzymimmobilisierung mit Blick auf die Steigerungsfähigkeit der Aktivität, wie sie beispielsweise mit der „side-direct“ Immobilisierung (vergl. Kapitel 5.5.3) der Enzyme möglich wäre, nimmt damit für die Prozessentwicklung eines Mischbettfilters eine nachrangige Position ein.

Im Medium soll sich die Konzentration an Ameisensäure während der Enzymreaktion nicht ändern, so dass aus der Massenbilanz (Gleichungen (4.8) bis (4.14)) folgt (Anionenaustauscher wird mit AT abgekürzt):

$$\frac{dc_{AS,Enzym}}{dt} = k_2 \cdot c_{FDFA} - k_{-2} \cdot c_{AS} - k_3 \cdot c_{AS} = \frac{dc_{AS,AT}}{dt} \tag{5.4}$$

$$\frac{dc_{AS,Enzym}}{dt} - \frac{dc_{AS,AT}}{dt} = 0 \tag{5.5}$$

Um diese Randbedingung zu erfüllen muss gelten:

$$v_{max,Enzym} < \frac{dc_{AS,AT}}{dt} \tag{5.6}$$

Für den Fall der Mischbett-Enzymreaktion ist ideal betrachtet die Bildung von Ameisensäure im Mischbett homogen, so dass für den Ionenaustauscher kein Beladungsgefälle von Säuleneingang zu Säulenausgang entsteht. Sobald eine bestimmte Beladung eingetreten ist, kann die enzymatisch gebildete Ameisensäure nicht mehr vollständig aufgenommen werden. Damit gilt strenggenommen $t_{Db} = t_{Sä}$ und Durchbruchskapazität gleich Sättigungskapazität.

5.6.5 Abtrennung von Ameisensäure durch Flüssig-Flüssig-Extraktion

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion kann zwar für die Gewinnung von Ameisensäure verwendet werden, allerding nur im sauren pH-Bereich (vergl. Kapitel 4.5.4). Die einzige Möglichkeit

eine Extraktion im neutralen bis basischen pH-Bereich darzustellen, besteht in der Reaktivextraktion mit quartären Ammoniumverbindungen. Nachfolgend werden dennoch alle Extraktionsmittel diskutiert.

Die physikalische Extraktion mit reinem Diethylcarbonat als organisches Lösungsmittel ergibt erwartungsgemäß einen niedrigen Verteilungskoeffizienten und eine niedrige Extraktionseffizienz, was charakteristisch für Verbindungen aus Kohlenstoff und Sauerstoff als Extraktionsmittel ist (vergl. Kapitel 2.8.1.1). Uslu et al. [42] berichteten über ähnliche Ergebnisse mit einer Extraktionseffizienz von 26,9 % und einen Verteilungskoeffizienten von 0,369 für reines Diethylcarbonat als organische Phase. Allerdings wurde eine höhere anfängliche Ameisensäurekonzentration von 2,17 mol/l in der wässrigen Phase verwendet. In dieser Arbeit wurden absichtlich geringere Konzentrationen verwendet, um das FDM-Reaktionssystem nachzuahmen und die Ameisensäurekonzentration so niedrig wie möglich zu halten.

Die Organophosphorverbindungen TBP und TOPO erreichen die höheren K_D- und D_E-Werte. Mit steigendem Massenanteil von 5 % bis 100 % an TBP konnte die Extraktionseffizienz um das 2,5-fache auf 64 % gesteigert werden. Diese Ergebnisse stimmen mit den Werten von Wardell und König [52] überein, die mit reinem TBP eine Extraktionseffizienz von 73 % und mit einem Masseanteil von 44 % eine Extraktionseffizienz von 43 % erhalten haben. Außerdem wird in der Publikation beschrieben, dass mit Phosphinoxiden, wie TOPO, höhere K_D- und D_E-Werte erzielt werden können als mit Phosphaten und Phosphonaten, wie z.B. TBP. Diese Beobachtung wurde auch in den eigenen Extraktionsversuchen durch den Vergleich der K_D- und D_E-Werte von TOPO und TBP mit jeweils 5 Gew.-% gemacht.

Für Organophosphorverbindungen wie TBP und TOPO findet die Übertragung der gelösten Moleküle an der Grenzfläche zwischen der wässrigen und organischen Phase durch Diffusions- und Löslichkeitsmechanismen statt: je unterschiedlicher die Löslichkeit der beiden Lösungsmittel ist, desto leichter erfolgt die Extraktion. Für die Verwendung von TBP führt deshalb, nach Wardell und König [52], die Erhöhung des Extraktionsmittelanteils in der organischen Phase zu einer Steigerung der Verteilungskoeffizienten und der Extraktionseffizienz. Die Verwendung von Phosphorverbindungen als Extraktionsmittel sind wegen ihrer geringen Toxizität interessant [146].

Aliphatische Amine wie TOA fallen in der Kategorie der reaktiven Extraktionsmittel, da sie mit der Ameisensäure zu Säure-Amin-Komplexen reagieren. Das führt zu einer signifikanten Zunahme des Verteilungskoeffizienten der Säure [41] im Gegensatz zu den Organophosphorverbindungen. Uslu et al. [41], [42] zeigten, dass die Löslichkeit des Säure-Amin-Komplexes im Lösungsmittel einen wichtigen Parameter der Ameisensäure-Extraktion mit TOA darstellt. Der Mechanismus der Grenzflächenreaktion zwischen Säure (Ameisensäure) und Extraktionsmittel (TOA) wird von der Polarität der organischen Phase gesteuert: polare Lösungsmittel erhöhen die Extraktionseffizient, stabilisieren die Ionenpaare in der Extraktionsphase und verbessern das Gleichgewicht durch die Löslichkeit der Komplexe [147]. Dies wurde in der Studie von Sahin et al bestätigt [148], der die Ameisensäuregewinnung mit Tridodecylamin (TDA) als Extraktionsmittel anhand von fünf verschiedenen Zusammensetzungen untersuchte. Die besten K_D- und D_E-Werte wurden mit dem polarsten dibasischen Ester (Diethyladipat) erreicht.

Beispiele für derartige polare Verdünnungsmittel sind Alkohole, wie 1-Octanol und Isoamylalkohol. Unabhängig von ihrer Polarität stellen ihre Löslichkeit in Wasser und ihre Hemmung der enzymatischen Aktivität wesentliche Nachteile für ihre Verwendung dar (vergl. Kapitel 4.5.4.1). Diethylcarbonat, das als Lösungsmittel für die Extraktionstests ausgewählt wurde, ist zwar im Vergleich zu den genannten Alkoholen weniger polar, aber dafür vollständig unlöslich in Wasser und kann damit auch keinen Einfluss auf die FDM-Aktivität nehmen. Dieser Mangel an Polarität erklärt die niedrigen Verteilungskoeffizienten und Extraktionseffizienzen in Tabelle 4-9 für TOA. Allerdings sollten die K_D- und D_E-Werte mit zunehmendem Massenanteil steigen. Das Maximum der K_D- und D_E-Werte muss demnach zwischen einem und zwanzig Prozent Massenanteil an TOA liegen, wie aus Abbildung 4-49 ersichtlich wird. Aus diesem Grund sollten Extraktionsversuche mit geringeren Konzentrationssprüngen in diesem Bereich durchgeführt werden. Ein tatsächliches Maximum der K_D- und D_E-Werte zur Extraktion von Ameisensäure konnte in dieser Arbeit demnach nicht ermittelt werden.

Die in-situ-Extraktion der Ameisensäure während der enzymatischen Umsetzung konnte durchgeführt werden. Auch das Ziel, den pH-Wert im neutralen Bereich (6,8) zu halten, wurde erreicht. Mit einem pKs-Wert für Ameisensäure von 3,75 ist davon auszugehen, dass die Säure unter diesen Bedingungen in der dissoziierten Form vorliegt. Obwohl die Ameisensäure

in der organischen und wässrigen Phasen löslich ist, ist ihre konjugierte Base (Formiat) nur in der wässrigen Phase löslich, so dass für die Verteilungskoeffizienten und Extraktionseffizienzen der Phosphorverbindungen sehr geringe Werte erwartet wurden. Die relative Häufigkeit der freien Säure in der wässrigen Phase wird über die Dissoziationskonstante und damit auch der Verteilungskoeffizienten beeinflusst.

In vielen Publikationen wird von einer Verschlechterung der Ameisensäure-Extraktion durch einen ansteigenden pH-Wert berichtet. Dieser Effekt tritt nicht nur im Fall von Organophosphorverbindungen, wie TBP und TOPO auf, sondern auch bei tertiären Aminen mit hohem Molekulargewicht, wie beispielsweise TOA [43], [51], [146], [149]. Wenn die freie Säure die Hauptspezies darstellt, also der pH < pKs ist, wurde beobachtet, dass ein komplizierte Interaktion zwischen den Molekülen entsteht, bei der in der Regel mehr als nur ein Mechanismus gleichzeitig auftritt [150]–[152]. In einigen Fällen kommt es zu starken elektrostatischen Wechselwirkungen einhergehend mit der Ausbildung von Wasserstoffbrücken. In anderen Fällen kommt es nur zur Ausbildung von schwachen Wasserstoffbrücken. Im speziellen Fall von tertiären Aminen können bei pH > pKs nur hydrophobe Wechselwirkungen stattfinden.

Diese überlagernden Effekte führten zu den Werten in Tabelle 4-11, bei denen die K_D- und D_E-Werte unabhängig von der Extraktionsmittelzusammensetzung näherungsweise die gleichen Werte (K_D 1 bis 1,2 und D_E 50 bis 55) einnehmen. Allerdings kann nicht erklärt werden, weshalb für Ethylcarbonat ein höherer Wert erzielt wurde, als bei der Extraktion bei saurem pH-Wert. Dies weist deutlich auf ein analytisches Problem hin und die Daten können nur eingeschränkt verwendet werden.

Auf Basis der getesteten Lösemittel muss zukünftig ein weiteres quartäres Ammonium als Extraktionsmittel gefunden werden, das beispielsweise auch mit Diethylcarbonat als Lösemittel verwendet werden kann.

Reaktion mit in-situ Ameisensäure Extraktion

Wie oben beschrieben, ist die Flüssig-Flüssig-Extraktion theoretisch möglich, allerdings konnte bisher noch kein Extraktionsmittel gefunden werden, das zur in-situ Extraktion von Ameisensäure während der enzymatischen Umsetzung von Formaldehyd eingesetzt werden könnte.

Dennoch soll nachfolgend ein Verfahren aufgezeigt werden, wie Extraktion und Enzymreaktion kombiniert werden könnten. Auch hier bestehen die großen Herausforderungen in der geringen Produktkonzentration und der Notwendigkeit eines neutralen pH-Werts für die FDM-Reaktion. Die in der Literatur als sehr effektiv beschriebene Extraktion von Ameisensäure durch langkettige, tertiäre aliphatische Amine ist im Gegensatz zu anderen Extraktionsmitteln auch bei neutralen pH-Werten möglich.

Der Versäuerung des Reaktionsmediums durch die gebildete Ameisensäure kann nur mit einer kontinuierlichen Extraktion begegnet werden. Bei Verwendung eines quaternären Ammoniumhydroxid-Ionenaustauschmechanismus wird durch die Freisetzung von OH-Anionen während der Ameisensäuregewinnung zusätzlich einer Versäuerung des Mediums entgegengewirkt. In Abbildung 5-3 ist ein mögliches Extraktionsverfahren dargestellt. Eine schwere Phase, vorzugsweise das wässrige Reaktionsmedium, wird im oberen Teil der Kolonne eingebracht. Auf den Kolonnenböden befindet sich jeweils eine Packung aus Enzymträgern. Über das Reaktionsmedium wird das Formaldehyd in die Kolonne eingebracht und in der Packung zu Methanol und Ameisensäure umgesetzt. Die aufsteigende organische Phase durchströmt die gesamte Kolonne von unten nach oben durch die Packungen aus Trägerpartikeln hindurch. Auf diese Weise werden zum einen die organischen Tropfen zu Gunsten einer größeren spezifischen Oberfläche weiterhin zerschert und zum anderen die einzelnen Enzymträger mit der organischen Phase kontinuierlich und räumlich sehr nah umströmt, so dass die Ameisensäure sehr schnell entfernt werden kann.

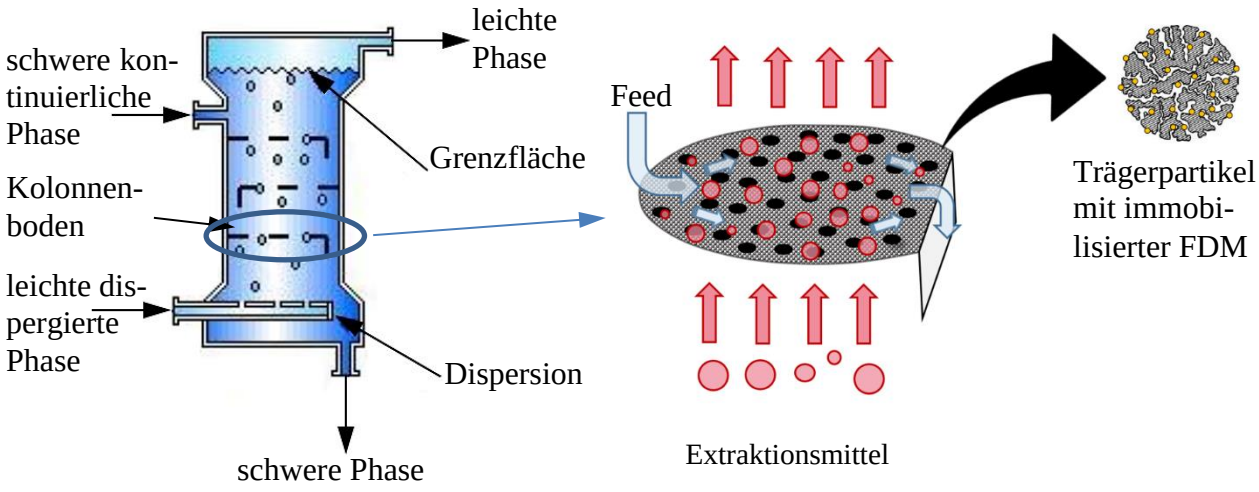


Abbildung 5-3 Schematische Darstellung einer kontinuierlichen Gegenstromextraktion zur in-situ-Produktabtrennung von Ameisensäure (links) und gleichzeitiger enzymatischer Reaktion an porösen Trägerpartikeln (rechts) [98].

5.7 Kopplung der Chemo- und Biokatalyse zur Herstellung von Methanol und Ameisensäure aus Biogas

Der Flaschenhals der Kopplung von Chemo- und Biokatalyse stellt die Chemokatalyse dar. Zum einen können nicht die notwendigen Umsätze erzielt werden, zum anderen sind auch die Selektivitäten verhältnismäßig schlecht. Der Verlust an Methan durch Totaloxidation zu Kohlenstoffmonoxid bzw. Kohlenstoffdioxid ist zu groß. Um das gesamte Methan in einem Chemokatalysator umzusetzen, wurde bereits die Kreislaufführung zur Gewinnung von Formaldehyd aus Methan publiziert [153]. Bafas et al. erzielten dabei einen Gesamtumsatz von 50 % indem nach jedem Durchlauf des Gases durch den Reaktor der Formaldehyd aus der Gasphase über eine Flüssigkeitsfalle abgetrennt wurde. Die Schwierigkeit besteht zudem in der Einleitung des formaldehydhaltigen Gases in eine Flüssigkeit. Im Versuchsaufbau (vergl. Kapitel 3.9.6) wurden die Rohrleitungen nach der Chemokatalyse auf 120 °C beheizt, damit sich der Formaldehyd nicht in Form von Paraformaldehyd an den Wandungen absetzt. Beim Einleiten des Gases in eine Flüssigkeit kann der letzte Teil der Rohre nicht mehr beheizt werden. Bei einer längeren Anwendung käme es dort zu Ablagerungen.

Sowohl in Abbildung 4-52 als auch in Abbildung 4-53 wurde eine vergleichsweise hohe Streuung der Messwerte erhalten. Durch das ständige Begasen wurde die Flüssigkeit im Reaktor mit den einzelnen Bestandteilen der Gasphase angereichert und übersättigt. Vor allem durch die Bildung von Kohlensäure kam es verstärkt zur Blasenbildung. Zusätzlich kam es dann auf der Saugseite der Pumpe für das Massenspektrometer zu Kavitation in den Pumpschläuchen. Diese Gasblasen wurden dann in den Membraneinlass des Massenspektrometers geleitet, was zu dem beschriebenen Rauschen des Messsignals führte. Befindet sich eine Gasblase auf der Membran, werden erheblich mehr Bestandteile in das Vakuum überführt und die Ionenströme steigen kurzeitig drastisch an. Diese Ausschläge können aber größtenteils durch die Verwendung des gleitenden Mittels mathematisch eliminiert werden.

Dennoch kann anhand des Messverlaufs das Anreichern des Formaldehyds sowohl im Batchbetrieb als auch in der kontinuierlichen Umsetzung des Formaldehyds durch die FDM beobachtet werden. Das freie Enzym konnte nur im Batchbetrieb verwendet werden, da es ansonsten durch die Begasung zum Aufschäumen des Proteins gekommen wäre. Durch die Immobilisierung der Enzyme (vergl. Kapitel 4.4.5) wurde das gleichzeitige Begasen und Umset-

zen des Formaldehyds ermöglicht. Die dafür benötigte Rohextraktmenge konnte anhand des mathematischen Modells abgeschätzt werden (vergl. Kapitel 4.4.3).

Letztendlich konnte erstmals gezeigt werden, dass die Kopplung der Chemo- und Biokatalyse zur Herstellung von Methanol und Ameisensäure aus Biogas möglich ist.

5.8 Massen- und Energiebilanz des Gesamtprozesses

Die Inhibierung der FDM durch die Produkte Methanol und Ameisensäure wurde nachgewiesen. Die eingesetzte Formaldehydkonzentration sollte 0,5 M nicht überschreiten und der pH-Wert des Reaktionsmediums musste im neutralen Bereich bleiben. Dies stellt eine Herausforderung für die Prozessentwicklung dar.

Das Screening nach unterschiedlichen Trägermaterialien für die Enzyme hat gezeigt, dass eine Langzeitstabilität der immobilisierten Enzyme auf verschiedenen Trägern gegeben ist. Ein weiterer Faktor ist die physikalische Beanspruchung der Enzyme durch das Spülen mit der Reaktionslösung. Beim Dauerversuch im 200 ml Festbettreaktor (vergl. Kapitel 4.4.5.3) konnte unter anderem die Stabilität gegen Konzentrationssfluktuationen des Substrats während des Betriebs gezeigt werden (vergl. Kapitel 4.4.5.2). Außerdem wurde nachgewiesen, dass ein Druck von bis zu 10 bar keinen Einfluss auf die Enzymreaktion hat (vergl. 4.4.1.2). Der größere Maßstab bis 1,5 L erlaubt eine vergleichsweise bessere Untersuchung der Vorgänge im Reaktor als bei den bis dato durchgeführten Experimenten im Labormaßstab. Auf dieser Basis ist der Einfluss höherer Drücke und Ströme auf das Enzym, bedingt durch größerer Produktionsanlagen, nicht zu erwarten.

Ameisensäure hat einen Dampfdruck von 44,6 hPa, liegt aber im neutralen Bereich dissoziiert vor und das Anion ist nicht flüchtig. Es bietet sich deshalb ein Anionenaustauscher zur Adsorption der Ameisensäure in einem Mischbettfilter an (vergl. Kapitel 5.6.4.3), da zudem kein geeignetes Extraktionsmittel gefunden werden konnte. Nachteilig ist, dass der Ionenaustauscher nach einer bestimmten Beladung mit Formiat durch Natronlauge regeneriert werden muss. Diese Prozedur schädigt aber die immobilisierten Enzyme (vergl. Kapitel 4.5.3) und macht eine vom Enzymträger getrennte Regeneration notwendig, was technisch gelöst werden muss. Bei der Verwendung von Ionenaustauschern muss auf einen Puffer verzichtet werden,

was aber andererseits von großem Vorteil ist, da der Umgang mit Salzen in einem Prozess zusätzliche Anforderungen an das zu verwendende Material stellt. Weiterhin vorteilhaft ist die direkte Trennung von Methanol und Ameisensäure, da Methanol und Formaldehyd nicht an den Anionenaustauscher binden. Im Vergleich dazu würde bei der Extraktion ein geringer Anteil an Methanol in die organische Phase übergehen (vergl. Kapitel 4.5.4.2). Der größte Vorteil der Extraktion liegt darin, dass Extraktionsmittel erheblich günstiger als Ionenaustauscher sind, die Handhabung einfacher ist und eine deutlich bessere Kapazität durch die uneingeschränkte Auswahl der Größe der Extraktionskolonne erzielt werden kann.

Auch die Aufbereitung von Methanol ist durch die geringen Konzentrationen von maximal 1,5 % in wässriger Lösung schwierig. Aus einer 1 %igen Methanollösung könnte mit einer dreistufigen Pervaporation eine 38 %ige Methanollösung erhalten werden. Zur nachgeschalteten Gewinnung von Methanol, also nicht in-situ, ist die Destillation in einer Rektifikationskolonne auch auf Basis einer 5 %igen Methanollösung möglich (vergl. Kapitel 4.5.1). Demzufolge bietet sich die Kombination aus Pervaporation bis zu einer fünfprozentigen Methanollösung und einer Rektifikation zur Gewinnung von reinem Methanol an. Die Verwendung der Pervaporation in Kombination mit der FDM-Reaktion als potentielle in-situ Produktaufbereitungsmethode ist möglich, lieferte allerdings nur geringe flächenspezifische Aktivitäten (vergl. Kapitel 4.6.2).

Nachfolgend wird die Herstellung, beginnend mit der Biogasherstellung, über die anorganische und enzymatische Katalyse bis hin zur in-situ-Produktgewinnung genauer betrachtet. Grundlage dafür bieten eine Massen- und Energiebilanz unter Berücksichtigung aller zugänglichen Daten. Es muss aber bedacht werden, dass in Rahmen dieser Arbeit keine Optimierung der einzelnen Verfahrensschritte durchgeführt wurde und die Bilanz einen ersten Anhaltspunkt des Gesamtprozesses darstellt.

5.8.1 Betrachtung der Biogas-Herstellung

Die maximal umsetzbare Biogasmenge wird durch die in-situ-Produktgewinnung von Ameisensäure mittels Mischbettfiltration begrenzt. Mischbettfilter haben ein maximales Volumen von 4 m³ [145], wie in Kapitel 5.6.4.3 näher erläutert wird. Daraus ergibt sich ein maximal möglicher Produktstrom (Methanol und Ameisensäure) von rund 1 kmol/h. Zur besseren Ver-

gleichbarkeit wurde auch das dargestellte Extraktionsverfahren auf den gleichen Durchsatz ausgelegt (vergl. Kapitel 4.5.4), wobei durch das Fehlen eines geeigneten Extraktionsmittels nicht auf die Dimensionierung und die Kosten eingegangen werden konnte.

Ausgehend davon kann auf die benötigte Rohgaserzeugung rückgerechnet werden, wobei man aus diesem Grund einen Wert von 671000 Nm³, je nach Methangehalt, nicht überschreiten sollte. Auf dieser Basis können die Investitions- und Betriebskosten einer Biogasanlage unter Zuhilfenahme des frei zugänglichen Wirtschaftlichkeitsrechners Biogas des Kuratoriums für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e. V. (KTBL) [154] ermittelt werden. Im nachfolgenden Beispiel werden Gülle und Maissilage als Substrate verwendet. Im Jahre 2012 betrug die durchschnittliche Anzahl der Rinder pro Haltung in Deutschland 77 Tiere [155]. Pro Tierplatz fallen etwa 20 m³/a Gülle mit durchschnittlich 11 % Trockenmassegehalt (TS) an [156]. Für eine Biogasanlage wird dementsprechend exemplarisch mit 1540 m³ Gülle und mit 2.867 Tonnen Maissilage (35 % TS) gerechnet (Anhang Tabelle A 1), um auf die gewünschte Rohgasmenge zu kommen.

Der flächenbezogene Ertrag an Maissilage beträgt im Durchschnitt 43,55 Tonnen pro Hektar [157]. Für dieses Beispiel wäre somit eine Anbaufläche von 65,8 Hektar notwendig. Die Anbaukosten für den Mais betragen 100.345 € pro Jahr. Obwohl für die Herstellung von Methanol aus Biogas kein BHKW notwendig ist, wird es dennoch zum Vergleich mitbetrachtet. Die Investitions- und Betriebskosten der gesamten Biogasanlage sind in Tabelle A 4 aufgeführt. Für eine Biogasanlage mit einem Substrateinsatz von 4.407 Tonnen pro Jahr (t/a) ist ein Faulraum von 994 m³ notwendig. Damit kann Biogas mit einem Heizwert von insgesamt 3.494.799 kWh/a hergestellt werden. Das entspricht einer Menge an Methan von 15.656,88 kmol/a. Mit einer Biogasanlage, die im Jahre 2016 in Betrieb genommen wurde, ist auf Basis von Maissilage und Gülle bei dieser Größe (162 kW_{el}) kein wirtschaftlicher Betrieb möglich. Die Gesamtkapitalrentabilität beträgt -29,33 % (vergl. Tabelle A 1 bis Tabelle A 5). Eine durchschnittliche Biogasanlage in Deutschland hat eine Leistung von 441 kWel [158]. Die Investitionskosten mit BHKW betragen 814.699 € und ohne 598.031 €

5.8.2 Chemokatalytische Umsetzung von Methan zu Formaldehyd

Die chemokatalytische Oxidation von Methan an einem Vanadiumoxid-Katalisator zu Methanol ist mit einer Selektivität von 10,7 % und zu Formaldehyd mit einer Selektivität von 93,3 % möglich [7]. Aus diesem Grund wird in diesem Projekt Formaldehyd als Zwischenprodukt und der Einsatz der FDM gewählt. Die besten Ergebnisse zur Herstellung von Formaldehyd aus Methan wurden mit einem Gasgemisch von 40 % N_2, 13 % O_2, 38 % CH_4 und 9 % H_2O bei einer Temperatur von 600 °C und einer Raumgeschwindigkeit (GHSV) von 740.000 L $kg_{cat}^{-1}\,h^{-1}$ erzielt [7]. Die Prozessparameter sind in Tabelle 5-1 dargestellt.

Tabelle 5-1 Prozessparameter der Chemokatalyse zur Herstellung von Formaldehyd aus synthetischem Biogas.

Vanadiumoxidhaltiges, mesoporöses Material			
	Umsatz	89	%
	Selektivität	56	%
	Ausbeute	50	%
	n_{FA} =	7828,44	kmol/a
Jahresbetriebsstunden =		8000	h
	n_{FA}=	0,98	kmol/h
Rückstrom	Q_R =	1000	cm³/min
	m_{Kat} =	1,90	G
	$Produktivität_{Kat}$ =	1408,89	$kmol_{Gasgemisch}/kg_{Kat}$*h
	$m_{V2O5,soll}$ =	0,69	G
	$m_{V2O5\text{-}SiO2,soll}$ =	187,17	G

Damit war ein Methanumsatz von 1,9 % nach einmaligem Durchlauf durch den Katalysator möglich. Die Formaldehyd-Produktivität beträgt 6458 g $kg_{cat}^{-1}\,h^{-1}$ [7]. Diese Daten sind das Ergebnis einer Katalysator-Charakterisierung und sind nicht ohne weiteres auf die technische Anwendung übertragbar. Als Datenbasis für eine Abschätzung der Wirtschaftlichkeit ist der Einsatz des Vanadiumoxid-Katalysators in einem zyklischen Prozess notwendig, bei dem das Reaktionsgemisch im Kreislauf gefahren und nach jeder Passage durch den Reaktionsraum mittels geeigneter Absorber das gebildete Formaldehyd abgefangen wird. Damit lässt sich der Umsatz des Methan-Gasgemischs deutlich steigern. Auf diese Weise konnte mittels eines vergleichbaren Vanadiumoxid-Katalysators ein Umsatz von 89 % mit einer Ausbeute an Formaldehyd von 50 % erzielt werden [153]. Im einmaligen Durchlauf wurden mit dem Kataly-

sator 2 % umgesetzt. Die in Tabelle 5-1 aufgelisteten Prozessparameter wurden auf die Produktströme der Biogasanlage übertragen (Tabelle 5-2).

Tabelle 5-2 Energiebilanz der Chemo- Katalyse bezogen auf die Daten der Gesamtbilanz.

$G_{CH4->CH2O}$ =	-289,1	kJ/mol
$G_{CH4->CO2}$ =	-818	kJ/mol
T_{Kat} =	890	K
$Q_{Zu,\ 310\ ->\ 890\ K}$ =	110106,47	kJ/h
$Q_{Ab,\ CH4->CH2O}$ =	-282900,17	kJ/h
$Q_{Ab,\ CH4->CO2}$ =	-800457,78	kJ/h
Q_{Ab}	-973251,48	kJ/h
	-270,35	kW_{th}
	-2162781,06	kWh_{th}/a
$Q_{Überschuss}$ =	1914448,06	kWh_{th}/a
Vergütung Wärme	0,02	€/kWh_{th}
	38288,96	€/a

Auf diese Weise können kontinuierlich 0,98 kmol/h Formaldehyd hergestellt und Wärme freigesetzt werden. Die Wärme deckt im Jahresmittel den Wärmebedarf der Fermentation vollständig und kann darüber hinaus noch für andere Zwecke eingesetzt werden. Da der Katalysator bei Temperaturen von über 600 °C betrieben wird, stünde, im Gegensatz zu BHKWs, die Abwärme für Prozesse mit hoher Temperatur zur Verfügung. Für die Bilanzierung wird die direkte monetäre Vergütung der Wärme herangezogen. Die Kosten für den Prozess lassen sich aufgrund des Rezyklierungsprozesses nicht berechnen, da die Kühlfalle zum Abfangen des Formaldehyds den Anforderungen der enzymatischen Reaktion entsprechen muss und der Laboraufbau der Publikation nicht ohne weiteres auf den Pilotmaßstab übertragbar ist.

5.8.3 Enzymatische Reaktion mit in-situ Produktabtrennung

Wie in Kapitel 4.5.3 beschrieben, können die mit Enzymen beladenen Trägerpartikel mit Anionenaustauschern in einem Mischbett kombiniert werden. Damit lässt sich die durch die Enzyme hergestellte Ameisensäure direkt abfangen und separat gewinnen. Funktionsprinzip und Aufbau entsprechen konventionell verwendeten Mischbettfiltern. Deshalb ist eine Kostenabschätzung für solche Anlagen möglich, auch wenn eine enzymatische Reaktion in solchen Anlagen bisher noch nicht durchgeführt wurde.

Um die Kosten der Methanolgewinnung niedrig zu halten, sollte die Formaldehydkonzentration, und damit letztendlich die Methanolkonzentration, möglichst hoch eingestellt werden. Die Absorption des Formaldehyds in Wasser während der chemischen Katalyse kann genutzt werden, um die Konzentration der Formaldehydlösung einzustellen. Für die Prozessbilanz sollte die aus dem Versuch in Kapitel 4.4.5.3 verwendete Konzentration von 0,5 M verwendet werden (Tabelle 5-3). Aufgrund der vorgegebenen GHSV beträgt der Durchfluss von Wasser in der Kühlfalle in der anorganischen Katalyse 1,96 m³/h (vergl. Kapitel 5.8.2), um kontinuierlich eine Formaldehydlösung von 0,5 M herzustellen. Um diese Menge an Formaldehyd kontinuierlich mit einem Umsatz von 91,2 % umzusetzen, ist ein Festbett, bestehend aus Enzymträgern mit einer Aktivität von 0,94 mmol min^{-1} g^{-1} und, für den Durchfluss von 1,96 m³/h Formaldehydlösung, einem Schüttungsvolumen von 0,65 m³ notwendig.

Der untere Grenzwert für das Mischungsverhältnis von zwei unterschiedlichen Partikeln liegt erfahrungsgemäß bei einem Drittel, variiert aber für das jeweilige System und muss experimentell im Anwendungsmaßstab bestimmt werden [145]. Die gebildete Ameisensäure wird mit schwach basischen Anionenaustauschern abgefangen, die eine vom Hersteller angegebene Kapazität von 1,5 eq/l haben (Tabelle 5-4). Diese Grenze wird im Prozess aber nicht ausgenutzt, sondern zu Gunsten der Adsorptionsgeschwindigkeit wird der Austauscher nur zu 0,8 eq/l beladen. Damit adsorbiert ein Volumen von 3,35 m³ des Anionenaustauscherfestbetts 123,57 kg Ameisensäure. Das Mischbett muss in einem Intervall von sechs Stunden regeneriert werden.

Tabelle 5-3 Parameter der Enzymreaktion im Mischbettfilter

Katalysator		
$c_{FA, soll}$ =	0,5	M
$V_{FA\text{-}Lsg.}$ =	1957,11	l/h
	1,96	m³/h
Upscale		
$V_{Festbett, KAT}$=	0,65	m³
Umsatz	91,2	%
Aktivität	0,94	mmol/min*g

Tabelle 5-4 Parameter der Adsorption der Ameisensäure mittels Anionenaustauscher im Mischbettfilter

Anionenaustauscher		
$t_{Regeneration}$ =	6	h
n_{MeOH} =	0,45	kmol/h
n_{AS} =	0,45	kmol/h
$Kapazität_{soll}$	123,22	kg
$Kapazität_{nutzbar}$	0,80	eq/l
$V_{Festbett, Ionent.}$ =	3,35	m³
$Kapazität_{ist}$	123,57	kg

Das gesamte Mischbett hat ein Volumen von insgesamt 4 m³ (Tabelle 5-5). Das Mischungsverhältnis von Trägerpartikeln zu Anionenaustauschern beträgt 0,19 und ist damit nicht optimal, da es bei zu geringen Verhältnissen zu Problemen bei der Entmischung der Partikel kommen kann. Für ein Mischbettvolumen von insgesamt 4 m³ ist zudem der Durchflussstrom von 1,96 m³ sehr gering. Ziel in einem Mischbett ist das Erreichen einer homogenen Strömung. Ist der Volumenstrom zu gering, kann es je nach Partikelform und Festbetteigenschaften zur Gassenbildung kommen, was die Funktion des Mischbettfilters stark beeinträchtigt. Die Investitionskosten für eine Anlage mit externer Regeneration des Mischbetts aus gummiertem Edelstahl belaufen sich nach Herstellerangaben auf 1.500.000 € (Annuität 4 %: 60.000 €/a) [145]. Die Betriebskosten, einschließlich der Erneuerung des Anionenaustauschers und der Trägerpartikel, schlagen mit 105.000 € pro Jahr zu Buche [145].

Tabelle 5-5 Parameter des Mischbettfilters und Kosten.

Mischungsverhältnis Träger/Ionent.	0,19	
$V_{Mischbett}$ =	4,00	m³
$m_{NaOH\ 50\%}$ =	120,00	kg/m³
Preis	0,30	€/kg
Investkosten	1500000,00	€
Betriebskosten	105.000	€/a

5.8.4 Pervaporation von Methanol

Um Methanol selektiv zu gewinnen, können hydrophobe Pervaporationsmembranen verwendet werden, wie in Kapitel 4.5.2 gezeigt wurde. Dafür wurden die in Tabelle 5-6 aufgelisteten Parameter ermittelt. In Kapitel 4.5.2.1 konnten der Flux durch die Membran und die Verweilzeit zur Erreichung einer bestimmten Konzentration im Retentat für verschiedene Feedkonzentrationen bestimmt werden. Diese Werte sind deckungsgleich mit den in der Literatur angegebenen Werten. Daraus lassen sich Verweilzeiten für einzelne Konzentrationsstufen berechnen (Abbildung 4-35). Wird eine exponentielle Trendlinie durch die Konzentrationsstufen gelegt, kann die Verweilzeit unabhängig von den Messpunkten berechnet werden. Auf dieser Basis kann ein mehrstufiges Pervaporationsverfahren grob abgeschätzt werden (Tabelle 5-7). Ausgangspunkt der Simulation ist eine 1 %ige Methanollösung mit einem Durchsatz von 1,96 m³/h. Je geringer die Methanolkonzentration, desto geringer ist auch der Flux. Um den Methanolgehalt der Feedlösung von 1 % auf 0,2 % zu reduzieren, ist eine Membranfläche von 899,76 m² nötig. In der nächsten Stufe wird das Kondensat aus der ersten Stufe einem weiteren Pervaporationsschritt unterzogen und die Verweilzeit so eingestellt, dass die Retentatkonzentration der Feedkonzentration der ersten Pervaporationsstufe entspricht, damit das Retentat der zweiten Pervaporationsstufe in die erste Pervaporationsstufe zurückgeführt werden kann. In einer dritten Pervaporationsstufe kann eine Methanollösung von 38 % hergestellt werden. Allerdings können Methanollösung ab 5 % mittels Rektifikation wesentlich günstiger zu reinem Methanol umgesetzt werden (jährliche Betriebskosten 35.000 €) als es mittels Pervaporation möglich ist. Für eine nachgeschaltete Rektifikation ist deshalb lediglich eine zweistufige Pervaporation notwendig, da auf diese Weise bereits eine 11 %ige Methanollösung hergestellt werden kann. Die Kosten pro Quadratmeter Pervaporationsmembran belaufen sich nach Her-

stellerangaben auf 1500 € [159]. Für zwei Stufen mit einer Gesamtfläche von 1348 m² betragen die Investitionskosten 2.022.187 € (Annuität 4 %: 80.888 €/a). Die Betriebskosten und die Erneuerung der Membran und der Vakuumpumpe werden auf 60.000 €/a geschätzt.

Tabelle 5-6 Parameter und Kosten der Pervaporation von Methanol

Flux	0,7	l/m²h
p =	25	mbar
Kosten	1500	€/m²

Tabelle 5-7 Simulation der dreistufigen Pervaporation einer wässrigen Methanollösung.

Stufe	von	bis	Verweilzeit	Q_{Feed}	$A_{Membran}$	Modulkosten	$m_{Permeat}$	$c_{MeOH,Retentat}$	$c_{MeOH,Permeat}$
	%	%	h	l/m²h	m²	Mio. €	T	kg/m³	kg/m³
1.	1,00	0,20	48,09	2,18	899,76	1,35	19,68	1,58	3,03
2.	3,03	1,00	23,96	4,37	448,36	0,67	6,75	7,92	11,16
3.	11,2	3,03	23,96	4,37	448,36	0,67	7,94	23,99	38,00

5.8.5 Wirtschaftlichkeitsbetrachtung des Gesamtprozesses

Die Kostenaufstellung (Tabelle 5-8) dient lediglich einer ersten groben Abschätzung der Wirtschaftlichkeit des Prozesses. Exaktere Aussagen könnten erst mit dem Betreiben einer Pilotanlage getroffen werden, in der die einzelnen Prozessschritte gekoppelt werden. Die Summe der Investitionskosten für Biogasanlage, Mischbettfilter, Pervaporation und Rektifikation beträgt 4.505.143 €. Die Betriebskosten belaufen sich in Summe auf 316.876 €/a. Zur Vereinfachung der Rechnung werden eine Annuität von 4 % für die Investitionssummen berechnet und damit die Jahreskosten abgeschätzt. Wird die Summe der Jahreskosten mit der produzierten Menge an Ameisensäure und Methanol ins Verhältnis gesetzt, wird ein Preis von 1783 €/t Produkt ermittelt. Nicht enthalten in den Kosten sind die Investitions- und Betriebskosten für die chemische Katalyse. Nach einer zweistufigen Pervaporation wird eine 11 %ige Methanollösung erhalten, die mittels Destillation zu reinem Methanol (99,5 %) aufbereitet werden kann (vergl. Kapitel 4.5.1).

Tabelle 5-8 Kostenaufstellung für die Herstellung von Ameisensäure und Methanol

Kosten		
Summe Investkosten	4.505.142,63	€
Betriebskosten	316.875,81	€/a
Annuität	4	%
Fixe Kosten	180205,71	€/a
	497.082	€/a
Einnahmen		
Ausbeute	80	%
	€/t	€/a
Methanol	320	29280,09
Ameisensäure	600	78863,96
		108144,05
Wärme	€/kWh$_{th}$	€/a
	0,02	38288,96
		146433,01
Kosten	-497.082	€/a
Einnahmen	146.433	€/a
	-350.649	€/a
Produktionskosten	**1783,73**	**€/t**

In Tabelle 5-1 ist die aus der anorganischen Katalyse zur Verfügung stehende Wärmemenge dargestellt. Diese könnte für die Destillation eingesetzt werden. Die Konzentration der über den Ionenaustauscher entfernten Ameisensäurelösung ist nicht bekannt und abhängig vom Regenerationsverfahren des Mischbettfilters. In der Rechnung sind allerdings auch Einsparpotentiale enthalten. So wurden die Investitionskosten für einen Mischbettfilter aus gummiertem Edelstahl herangezogen. Alternativ wäre auch die Verwendung von Kunststoffbehältern möglich. Selbst wenn die Investition für den Mischbettfilter entfielen und lediglich die Rektifikation eingesetzt würde, betrügen die Produktionskosten dennoch ca. 1280 €/t. Würde eine bestehende Biogasanlage um den dargestellten Prozess erweitert, reduzieren sich die Kosten pro Tonne Produkt um rund 100 €.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Mit einem neu entwickelten Verfahren, das die chemische und enzymatische Katalyse miteinander verbindet, lassen sich Methanol und Ameisensäure aus Biogas gewinnen. Dieser Herstellungsprozess basiert auf einer bisher noch nicht technisch eingesetzten enzymatischen Reaktion. Im Gegensatz zu gängigen Verfahren der Methanolproduktion kommt die Enzymreaktion mit deutlich weniger Energie aus, da der Prozess bei Raumtemperatur und Umgebungsdruck abläuft.

Der Methananteil des Biogases wird derzeit in BHKWs der Biogasanlagen nur etwa zur Hälfte in Elektrizität umgewandelt, der Rest in Wärmeenergie. Das Problem der ineffizienten Nutzung des Biogases liegt in der zu geringen Wärmenutzung und wird dadurch verschärft, dass die 2014 in Kraft getretene Novellierung des Erneuerbare-Energien-Gesetzes (EEG) neben einem geänderten Umlagesystem auch eine Wärmequote bei Blockheizkraftwerken von mindestens 60 Prozent fordert. Diese lässt sich bei herkömmlichen Biogasanlagen ohne zusätzlichen Wärmeverbraucher kaum erreichen. Alternative Möglichkeiten zur ökonomisch sinnvollen Nutzung der Abwärme oder von Teilströmen des Biogases sind daher dringend gesucht. Zudem bleibt der Kohlenstoffdioxidanteil völlig ungenutzt.

Das neue, enzymbasierte Verfahren zur Methanol- und Ameisensäureherstellung könnte den Betreibern einen Ausweg aus dieser wirtschaftlichen Bredouille bieten, indem Biogasanlagen zu Biogas-Bioraffinerien erweitert würden. Neben der ausschließlichen Stromgewinnung könnte in einer Biogas-Bioraffinerie nun auch Methanol und Ameisensäure hergestellt und so neue Einnahmequellen erschlossen werden. Beide Stoffe können als Treibstoffe, z.B. in Brennstoffzellen, genutzt werden und sind hervorragende, weil transportable Energieträger. Zudem dienen sie der chemischen Industrie als Plattformchemikalien beziehungsweise als Kohlenstoffquellen für die Herstellung zahlreicher Produkte. So können beide Stoffe beispielsweise auch für das sogenannte Organosolv-Verfahren für den Holzaufschluss verwendet und damit eine weitere dezentral in großen Mengen anfallende Ressource im Sinne der Bioökonomie erschlossen werden. Methanol wird außerdem anderen Treibstoffen als Klopfschutzmittel beigemischt, um Motorschäden vorzubeugen. Das so produzierte „grüne Metha-

nol“ ist ein Schritt in Richtung Ressourcenunabhängigkeit. Anstelle von Erdgas als stoffliche Grundlage nutzt das Verfahren mit Biogas einen erneuerbaren Energieträger, der aus nachwachsenden Rohstoffen und sogar aus Abfällen hergestellt werden kann.

Die chemokatalytische Partialoxidation von Methan zu Methanol ist derzeit aber wenig effizient, da die Oxidation zu weiteren Oxidationsprodukten des Methans nur schwer verhindert werden können. Wesentlich bessere Ausbeuten werden erreicht, wenn Formaldehyd als Oxidationsprodukt angestrebt wird. Im Rahmen des vom BMBF geförderten Forschungsverbunds „Enzymatisch-chemokatalytische Oxidationskaskaden in der Gasphase“ (ECOX) wurde seitens des Leibniz-Institut für Katalyse e.V. ein Katalysator entwickelt, der bei der Zugabe von Kohlenstoffdioxid verbesserte Oxidationseigenschaften aufwies. Die alleinige Oxidation mit Kohlenstoffdioxid ist in dem Forschungsprojekt nicht gelungen.

Die Herausforderung dieser Arbeit bestand in der Entwicklung der Schnittstellen der verschiedenen Prozessschritte. Bei der Schnittstelle zwischen Chemo- und Biokatalyse standen sich beispielsweise der Umgang mit den hohen Prozesstemperaturen der chemischen Reaktion und die Temperaturempfindlichkeit der Enzyme gegenüber. Zudem bestand die Problematik der Bildung von Paraformaldehyd bei Temperaturen von kleiner 120 °C, das Leitungen verstopfen kann und für die Biokatalyse nicht zugänglich ist. Die Lösung bestand darin, das heiße, formaldehydhaltige Gas in eine Flüssigkeit zu leiten und somit den Übergang des Formaldehyds zu gelöstem Formaldehydhydrat zu gewährleisten.

Die Schnittstelle zwischen enzymatischer Reaktion und Produktgewinnung war gekennzeichnet durch die Produktinhibierung des Enzyms. Zum einen führte die gebildete Ameisensäure zu einem Absinken des pH-Werts, zum anderen kommt es aber auch zu einer stofflichen Inhibierung durch Methanol und Ameisensäure. Die Herausforderung bei der Produktgewinnung bestand darin, das Methanol und die Ameisensäure in-situ, also während der Reaktion und räumlich nah, aus dem Prozess zu gewinnen. Das ist durch die Verfahren Pervaporation, Adsorption an Ionenaustauschern und Extraktion möglich. Eine Destillation ist wegen der hohen Temperaturen beispielsweise nur der Enzymreaktion nachgeschaltet möglich.

Die Pervaporation ist ein Membranverfahren, das auf der Adsorption einer organischen Verbindung aus einer wässrigen Lösung und der Desorption in eine Gasphase beruht. Damit ist auch die in-situ-Produktgewinnung von Methanol und Formiat möglich. Dazu wurden Enzy-

me direkt an die Oberfläche von Membranen immobilisiert, um ein räumlich nahes Abführen des Methanols zu ermöglichen. Eine ungerichtete, d.h. unspezifische, Immobilisierung der Enzyme an die Oberfläche von Pervaporationsmembranen ist gelungen, allerdings waren die Aktivitäten im Verhältnis zur benötigten Membranfläche gering (vergl. Kapitel 4.6.2). Das Potential dieser Methode ist dennoch nicht außer Acht zu lassen, da sowohl durch theoretisch freie Immobilisierungsstellen als auch durch die gerichtete Immobilisierung der Enzyme die flächenspezifische Aktivität deutlich gesteigert werden kann.

Die Extraktion zur Gewinnung von Ameisensäure aus wässrigen Lösungen wird im industriellen Maßstab bei der Herstellung von Ameisensäure verwendet. Allerdings funktionieren die etablierten Verfahren nur im sauren pH-Bereich. Das Enzym wird bei sauren pH-Werten irreversibel geschädigt, so dass gängige Extraktionsmittel in Anwesenheit des Enzyms nicht verwendet werden können. Es wurde dennoch der Einfluss verschiedener Lösemittel auf das Enzym untersucht. Eine Möglichkeit besteht in der Verwendung der Reaktivextraktion, allerdings konnte bisher noch kein geeignetes Extraktionsmittel gefunden werden. Die untersuchte quartäre Ammoniumverbindung zur Reaktivextraktion war nur in Verbindung mit einem Lösemittel möglich, durch welches das Enzym in seiner Aktivität gehemmt wird. Sollte ein geeignetes Extraktionsmittel gefunden werden, so ist dazu in dieser Arbeit ein Verfahren, beruhend auf der Gegenstromextraktion und Verwendung immobilisierter Enzyme, beschrieben. Alternativ können Ionenaustauscher in Form eines Mischbettfilters mit externer Regeneration eingesetzt werden, wie sie in Kohlekraftwerken zur Reinigung des Kondensats verwendet werden. Allerdings ist der Durchsatz wegen der maximalen Größe solcher Anlagen beschränkt und der Betrieb sehr teuer.

Die Kosten des Gesamtprozesses konnten durch eine erste Prozessbilanz abgeschätzt werden, wobei für die Chemokatalyse nicht ausreichend Daten zur Verfügung standen und deshalb dieser Schritt nicht in die Kostenbilanz aufgenommen wurde. Die Pervaporation konnte nur eingeschränkt berücksichtigt werden, da dieses Verfahren nicht hinsichtlich optimaler Betriebsbedingungen untersucht wurde, wobei vergleichbare Ergebnisse in der Literatur zu finden sind. Die Herstellungskosten des Methanols und der Ameisensäure belaufen sich für die beschriebenen Verfahrensmöglichkeiten auf etwa 1800 € pro Tonne, die aber nur als Richtwert dienen sollten. Die Kostenaufstellung macht aber deutlich, dass sowohl die Chemokatalyse als auch die Produktaufbereitung wegen schlechter Selektivität und zu teurer Prozesse

den Flaschenhals des gesamten Prozesses ausmachen und daher verfahrenstechnisch optimiert bzw. andere Prozesswege gefunden werden müssen.

Unabhängig von der Herstellung von Methanol und Ameisensäure aus Biogas hat die Kopplung der Chemo- und Biokatalyse großes Potential. Eine Schwäche des in dieser Arbeit beschriebenen Verfahrens ist, dass die Vorteile der jeweiligen Katalyseschritte nicht optimal genutzt werden. So sind die chemische Partialoxidation wegen ihrer schlechten Selektivität und die enzymatische Reaktion wegen der Disproportionierung zu zwei Stoffen nicht optimal. Eine enzymatische Selektivoxidation, gekoppelt mit einem nur chemisch herzustellenden Zwischenprodukt, könnte für die stoffliche Nutzung von Methan interessanter sein. So wird der Aufbau der Versuchsanlage bereits für weitere Reaktionen mit gasförmigen Substraten oder Produkten eingesetzt. Der Forschungsverbund „Nachhaltige und flexible Wertschöpfungsketten für Biogas in Baden-Württemberg“ arbeitet bereits an weiteren Anwendungsmöglichkeiten. Gefördert vom Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst in Baden-Württemberg, wird an der Pilotanlage das Potenzial von Methan als preiswerte Kohlenstoffquelle für technisch einsetzbare Mikroorganismen untersucht, mit denen höherwertige Produkte hergestellt werden können. Dabei steht das Enzym Methanmonoxigenase (MMO) im Vordergrund, das in einer primären Reaktion Sauerstoff und Methan zu Methanol umsetzt. In Abhängigkeit davon, ob es sich um die membrangebundene pMMO oder lösliche sMMO handelt, ist das Enzym in der Lage auch andere Moleküle zu oxidieren, epoxidieren oder zu hydroxylieren. Sehr vielversprechend sind dabei Ausgangsstoffe, die aus der nichtoxidativen Kupplung von Methan stammen [160]. Dieser Ansatz wird in dem vom BMBF geförderten Projekt „Enzymatisch-chemokatalytische Oxidationskaskaden in der Gasphase 2“ (ECOX2, Laufzeit Juli 2017 bis Juni 2020) weiter verfolgt.

Anhang

Tabelle A 1 Ausgewählte Substrate zur Biogaserzeugung [154].

Substrat	**Trockenmasse (TM)**		**Richtwert Biogasertrag (Normgas)**		**Methangehalt**	**Jahresmenge**		**Substratpreis**	**Substratkosten**
	% i.d.FM	oTM % i.d. TM	ln/kg oTM	mn³/t FM	Vol.-%	t FM/a	Gew.-%	€/t FM	€/a
Rindergülle mit Futterresten, 10% TM	11	88	380	33,4	55	1540	34,9	0	0
Maissilage, 35% TM	35	95	650	216,1	52	2867	65,1	35	100345
Summe	-	-	-	-	-	4407	100	-	100345
Gewogenes Mittel	26,6	92,8	616,4	-	52,2	-	-	-	-

Tabelle A 2 Kennzahlen der Biogasanlage [154].

Fermentation und Erträge		
Substrate	4.407	t/a
Substratzufuhr Trockenmasse (TM)	26,6	% der FM
Subtratzufuhr organische Masse (oTM)	93	% der TM
Mittlere Verweilzeit im Fermenter	74	d
Erforderlicher Fermenterraum (Nettovolumen)	994	m^3
Faulraumbelastung	3	kg oTM/(m3 d)
Rohgaserzeugung	671.128	mn^3/a
	76,6	mn^3/h
davon Methan	350.531	mn^3/a
Energiegehalt		
Rohgas (Hi,n)	3.494.799	kWh/a
BHKW		
Motorart des BHKW		Gas-Otto-Motor
Energie aus Zündöl	0	kWh/a
Vollbenutzungsstunden	8.000	h/a
Elektrische Leistung	162	kW_{el}
Elektrischer Wirkungsgrad	37	%
BHKW- und Trafoverluste	1	%
Thermische Leistung	212	kW_{th}
Thermischer Wirkungsgrad	48,6	%
Bemessungsleistung	146	kW_{el}
Eingespeiste Strommenge	1.280.522	kWh_{el}/a
Erzeugte Wärmemenge	1.699.152	kWh_{th}/a
Gärreste und Gärrestlager		
Gärreste	3.517	t/a
Abbaurate der Gesamtmasse	20,2	% der FM
Abbaurate der organischen Masse	81,7	%
Angestrebte Lagerzeit	6	Monate
Gärrestlager (Nettovolumen)	1.758	m^3

Tabelle A 3 Energiebilanz des BHKWs [154]

Wärmeangebot		Thermische Leistung	Wärmemenge	
		kW_{th}	kWh_{th}/a	
BHKW		212	1.699.152	
Wärmenutzung	Maximale Heizlast	Wärmebedarf inkl. Wärmeübertragungsverlusten	Wärmebedarf bezogen auf BHKW-Wärmeangebot	Wärmebedarf bezogen auf Wärmeangebot aus BHKW und Spitzenlastabdeckung
	kW_{th}	kWh_{th}/a	%	%
Eigenbedarf der Biogasanlage	36	248.333	14,6	14,6
Summe	–	248.333	14,6	14,6

Maximale Heizlast insgesamt	Wärmeübertragungsverluste	Nutzung des BHKW-Wärmeangebots	
		extern	Insgesamt
kW_{th}	%	%	
36	15	0	14,6

Tabelle A 4 Investition und Jahreskosten der Biogasanlage

Kennwert	Investition	Abschreibung	Zinskosten	Reparatur und Wartung	Betriebsstoffe
	€	€/a	€/a	€/a	€/a
Feststoffeintrag, 15 m³ Vorlagebehälter	53.552	7.605,20	1.071,04	2.034,80	1.514,40
Mobiltechnik für Feststoffe	21.322	2.546,52	426,44	1.025,35	1.004,24
Vorgrube, 30 m³ Bruttovolumen	13.888	1.226,40	277,76	178,6	124,8
Fermenter, 1100 m³ Bruttovolumen	172.527	12.029,68	3.450,54	1.473,98	8.736,00
Gärrestlager, 2000 m³ Bruttovolumen	182.419	11.532,25	3.648,38	1.315,96	1.476,00
BHKW inkl. Peripherie; Gas-Otto-Motor, 175 kW	216.668	21.235,74	4.333,36	21.885,93	11.637,36
Mess-, Steuer-, Regeltechnik für 200 kW Biogasanlage mit Gasfackel (45-100 m3/h)	50.000	4.750,00	1.000,00	2.602,80	0
Zentrale Pumpstation, 20 m³/h Förderleistung	15.260	1.907,50	305,2	1.151,00	776,07
Einhausung 10-Fuß-Container für Pumpen	15.000	1.500,00	300	75,34	0
Summe, ohne Grundstück und Nebenkosten	740.636	64.333,29	14.812,72	31.743,75	25.268,88
Zuschlag für Planung, Genehmigung, Sonstiges	10 %	3.703,18	1.481,27		
Summe, ohne Grundstück	814.699	68.036,47	16.293,99	31.743,75	25.268,88
davon Fördermittel	0	0	0	-	-
Zinsverbilligter Betrag	0	-	-	-	-
Zinsverbilligung [Prozentpunkte]	2 %	-	0	-	-
Investition und Jahreskosten	814.699	68.036,47	16.293,99	31.743,75	25.268,88

Tabelle A 5 Leistungen und Kosten Biogas

Leistungen / Kosten	**Einheit**	**Menge** Einheit/a	**Preis** €/Einheit	**Betrag** €/a	**in % der Leistung**
Leistungen					
Stromeinspeisung (EEG-Einspeisevergütung)	kWh_{el}	708.167	0,173	122.506,00	100
Gärrestverkauf	T	3.517	0	0	0
Summe Leistungen	-	-	-	122.506,00	
Variable Kosten					
Substrate	-	-	-	-	-
Rindergülle mit Futterresten, 10% TM	T	1.540	0	0	0
Maissilage, 35% TM	T	2.867	35	100.345,00	81,91
Reparatur und Wartung	-	-	-	31.743,75	25,91
Betriebsstoffe	-	-	-	25.268,88	20,63
Laboranalysen	Anzahl	2	200	400	0,33
Zinskosten Umlaufvermögen	€	157.757,63	4,0 %, 6 Monate	3.155,15	2,58
Summe variable Kosten	-	-	-	160.912,78	131,35
Deckungsbeitrag	-	-	-	-38.406,78	-31,35
Fixe Kosten					
Abschreibung	-	-	-	68.036,47	55,54
Zinskosten	-	-	-	16.293,99	13,3
Versicherung (in % vom Investitionsbedarf)	0,50%	-	-	3.703,18	3,02
Lohnkosten	AKh	621	17,5	10.867,50	8,87
Summe fixe Kosten	-	-	-	98.901,14	80,73
Einzelkostenfreie Leistung	-	-	-	-137.307,92	-112,08
Gemeinkosten					
Gemeinkosten, pauschal	-	-	-	1.616,82	1,32
Kalkulatorischer Gewinnbeitrag	-	-	-	-138.924,74	-113,4
Gesamtkapitalrentabilität	-	-	-	-29,33%	-

Literaturverzeichnis

[1] „Fachverband BIOGAS - Branchenzahlen“. [Online]. Verfügbar unter: http://www.biogas.org/edcom/webfvb.nsf/id/DE_Branchenzahlen. [Zugegriffen: 22-Nov-2014].

[2] BMELV, „Das Erneuerbare- Energien-Gesetz Daten und Fakten zur Biomasse – Die Novelle 2012“. BMELV, Juni-2012.

[3] F. Asinger, *Methanol — Chemie- und Eneigierohstoff: Die Mobilisation der Kohle*. Springer-Verlag, 2013.

[4] H. Hiller *u. a.*, „Gas Production“, in *Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000.

[5] R. Malhotra, *Fossil Energy: Selected Entries from the Encyclopedia of Sustainability Science and Technology*. Springer Science & Business Media, 2012.

[6] M. Mittelbach, „Methanolgewinnung aus Biogas“. Apr-2005.

[7] L. Nguyen, S. Loridant, H. Launay, A. Pigamo, J. Dubois, und J. Millet, „Study of new catalysts based on vanadium oxide supported on mesoporous silica for the partial oxidation of methane to formaldehyde: Catalytic properties and reaction mechanism“, *J. Catal.*, Bd. 237, Nr. 1, S. 38–48, Jan. 2006.

[8] A. Indarto, „Partial oxidation of methane to methanol with nitrogen dioxide in dielectric barrier discharge plasma: experimental and molecular modeling“, *Plasma Sources Sci. Technol.*, Bd. 25, Nr. 2, S. 025002, Apr. 2016.

[9] „IfAU-Infoseite Formaldehyd im Innenraum“. [Online]. Verfügbar unter: http://www.ifau.org/bibo/formaldehydinfoifau.htm. [Zugegriffen: 08-März-2016].

[10] B. Rodewyk, *Formaldehyd-Dismutase aus Pseudomonas putida J3: Charakterisierung und Anwendungspotential in der Biotechnologie*. Fraunhofer-IRB-Verlag, 1998.

[11] N. KATO, K. SHIRAKAWA, H. KOBAYASHI, und C. SAKAZAWA, „The dismutation of aldehydes by a bacterial enzyme.“, *Agric. Biol. Chem.*, Bd. 47, Nr. 1, S. 39–46, 1983.

[2] „BRENDA - Information on EC 1.2.99.4 - formaldehyde dismutase“. [Online]. Verfügbar unter: http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.2.99.4. [Zugegriffen: 23-Nov-2014].

[13] N. KATO, T. YAMAGAMI, M. SHIMAO, und C. SAKAZAWA, „Formaldehyde dismutase, a novel NAD-binding oxidoreductase from Pseudomonas putida F61“, *Eur. J. Biochem.*, Bd. 156, Nr. 1, S. 59–64, 1986.

[14] R. P. Mason und J. K. Sanders, „In vivo enzymology: a deuterium NMR study of formaldehyde dismutase in Pseudomonas putida F61a and Staphylococcus aureus“, *Biochemistry (Mosc.)*, Bd. 28, Nr. 5, S. 2160–2168, 1989.

[15] L. V. Bystrykh, N. I. Govorukhina, P. W. van Ophem, H. J. Hektor, L. Dijkhuizen, und J. A. Duine, „Formaldehyde dismutase activities in Gram-positive bacteria oxidizing methanol“, *J. Gen. Microbiol.*, Bd. 139, Nr. 9, S. 1979–1985, 1993.

[16] N. Kato, T. Yamagami, Y. Kitayama, M. Shimao, und C. Sakazawa, „Dismutation and cross-dismutation of aldehydes, and alcohol: aldehyde oxidoreduction by resting-cells of Pseudomonas putida F61-a“, *J. Biotechnol.*, Bd. 1, Nr. 5–6, S. 295–306, Dez. 1984.

[17] S. Mizuno und Y. Imada, „Conversion of methanol to formic acid through the coupling of the enzyme reactions of alcohol oxidase, catalase and formaldehyde dismutase“, *Biotechnol. Lett.*, Bd. 8, Nr. 2, S. 79–84, 1986.

[18] N. Kato, S. Mizuno, Y. Imada, M. Shimao, und C. Sakazawa, „Formate production from methanol by formaldehyde dismutase coupled with a methanol oxidation system“, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Bd. 27, Nr. 5–6, S. 567–571, 1988.

[19] H. Yanase, H. Noda, K. Aoki, K. Kita, und N. Kato, „Cloning, Sequence Analysis, and Expression of the Gene Encoding Formaldehyde Dismutase from *Pseudomonas putida* F61“, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Bd. 59, Nr. 2, S. 197–202, Jan. 1995.

[20] H. Yanase, K. Moriya, N. Mukai, Y. Kawata, K. Okamoto, und N. Kato, „Effects of GroESL coexpression on the folding of nicotinoprotein formaldehyde dismutase from Pseudomonas putida F61“, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Bd. 66, Nr. 1, S. 85–91, Jan. 2002.

[21] N. KATO, H. KOBAYASHI, M. SHIMAO, und C. SAKAZAWA, „Properties of formaldehyde dismutation catalyzing enzyme of Pseudomonas putida F61.“, *Agric. Biol. Chem.*, Bd. 48, Nr. 8, S. 2017–2023, 1984.

[22] „RavenBiotech - Methanol Sensor System“. [Online]. Verfügbar unter: http://www.ravenbiotech.com/products.html. [Zugegriffen: 24-Nov-2014].

[23] „NIR-Online® | buchi.com“. [Online]. Verfügbar unter: http://www.buchi.com/de-de/products/nirsolutions/nir-online. [Zugegriffen: 15-Juli-2015].

[24] „MATRIX-MF, FT-IR-Messgerät, FT-IR-Spektrometer, Prozessmessgerät, Echtzeit-Proessreaktionsüberwachung | Bruker Corporation“. [Online]. Verfügbar unter: http://www.bruker.com/de/products/infrared-near-infrared-and-raman-spectroscopy/ft-irnir-for-process/matrix-mf/technical-details.html. [Zugegriffen: 24-Nov-2014].

[25] „ReactIR 45P für In-Situ-FTIR-Prozesse - Übersicht - METTLER TOLEDO“. [Online]. Verfügbar unter: http://de.mt.com/de/de/home/products/L1_AutochemProducts/ReactIR/reactir-45p.html. [Zugegriffen: 15-Juli-2015].

[26] „soli::lyser - s::can“. [Online]. Verfügbar unter: http://www.s-can.at/text.php?kat=5&id=42&langcode=2. [Zugegriffen: 15-Juli-2015].

[27] J. H. Block, „Peter H. Dawson: Quadrupole Mass Spectrometry and its Application, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam-Oxford-New York 1976. 349 Seiten, Preis: Dfl 129,-,US $ 49.75.“, *Berichte Bunsenges. Für Phys. Chem.*, Bd. 81, Nr. 8, S. 777–777, Aug. 1977.

[28] J. H. Gross, *Massenspektrometrie: Ein Lehrbuch*. Springer-Verlag, 2012.

[29] „Quadrupolmassenspektrometer QMS“, *Pfeiffer Vacuum*. [Online]. Verfügbar unter: http://www.pfeiffer-vacuum.de/know-how/massenspektrometer-und-restgasanalyse/einleitung-funktionsprinzip/quadrupolmassenspektrometer-qms/technology.action?chapter=tec4.1.2. [Zugegriffen: 17-Feb-2015].

[30] „Ausstattung - Fraunhofer ICT“, *Fraunhofer-Institut für Chemische Technologie*. [Online]. Verfügbar unter: http://www.ict.fraunhofer.de/de/komp/ae/aus.html. [Zugegriffen: 24-Nov-2014].

[31] „World Formaldehyde Production to Exceed 52 Mln Tonnes in 2017 | Merchant Research & Consulting, Ltd.“ [Online]. Verfügbar unter: http://mcgroup.co.uk/news/20140627/formaldehyde-production-exceed-52-mln-tonnes.html. [Zugegriffen: 15-Juli-2015].

[32] H. Sperber, „Herstellung von Formaldehyd aus Methanol in der BASF“, *Chem. Ing. Tech.*, Bd. 41, Nr. 17, S. 962–966, Sep. 1969.

[33] DOW, „DOWEX Ion Exchange Resins“. [Online]. Verfügbar unter: http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDOWCOM/dh_0041/0901b80380041d4e.pdf?filepath=liquidseps/pdfs/noreg/177-01395.pdf&fromPage=GetDoc. [Zugegriffen: 15-Juli-2015].

[34] „Tradition der Ideen: Ameisensäure - BASF Zwischenprodukte“. [Online]. Verfügbar unter: http://www.intermediates.basf.com/chemicals/kundenreportage/ideen_tradition. [Zugegriffen: 15-Juli-2015].

[35] *Chimie organique fondee sur la synthese par Marcellin Berthelot*. Mallet-Bachelier, 1860.

[36] E. P. Office, „Verfahren zur Gewinnung von wasserfreier oder weitgehend wasserfreier Ameisensäure durch Hydrolyse von Methylformiat“. [Online]. Verfügbar unter: https://data.epo.org/publication-server/document?iDocId=6798044&iFormat=3. [Zugegriffen: 15-Juli-2015].

[37] G. P. Towler und R. K. Sinnott, *Chemical Engineering Design: Principles, Practice, and Economics of Plant and Process Design*. Elsevier, 2013.

[38] A. S. Kertes, C. J. King, und I. by Harvey W. Blanch, „Extraction chemistry of fermentation product carboxylic acids“, *Biotechnol. Bioeng.*, Bd. 103, Nr. 3, S. 431–445, Juni 2009.

[39] D. Datta, S. Kumar, und H. Uslu, „Status of the Reactive Extraction as a Method of Separation“, *J. Chem.*, Bd. 2015, S. e853789, März 2015.

[40] D. G. Denecker, D. W. Verhoeven, D. J. Leuridan, und D. Sluyts, „Process for the preparation of high value titanium dioxide with sulfuric acid leaching“, EP0207403, 07-Okt-1991.

[41] H. Uslu, „Reactive Extraction of Formic Acid by using Tri Octyl Amine (TOA)“, *Sep. Sci. Technol.*, Bd. 44, Nr. 8, S. 1784–1798, Juni 2009.

[42] H. Uslu, C. Bayat, S. Gökmen, und Y. Yorulmaz, „Reactive Extraction of Formic Acid by Amberlite LA-2 Extractant“, *J. Chem. Eng. Data*, Bd. 54, Nr. 1, S. 48–53, Jan. 2009.

[43] A.-I. Galaction, L. Kloetzer, und D. Cascaval, „Influence of Solvent Polarity on the Mechanism and Efficiency of Formic Acid Reactive Extraction with Tri-n-Octylamine from Aqueous Solutions“, *Chem. Eng. Technol.*, Bd. 34, Nr. 8, S. 1341–1346, Aug. 2011.

[44] Ç. Demirel und S. Çehreli, „Phase equilibrium of (water + formic or acetic acid + ethyl heptanoate) ternary liquid systems at different temperatures“, *Fluid Phase Equilibria*, Bd. 356, S. 71–77, Okt. 2013.

[45] E. İnce, M. Lalikoglu, und D. Constantinescu, „Liquid Phase Equilibria of Water + Formic Acid + Dimethyl Carbonate Ternary System at Several Temperatures“, *J. Chem. Eng. Data*, Bd. 59, Nr. 9, S. 2781–2787, Sep. 2014.

[46] M. Bilgin und İ. Birman, „Liquid phase equilibria of (water + formic acid + diethyl carbonate or diethyl malonate or diethyl fumarate) ternary systems at 298.15 K and atmospheric pressure“, *Fluid Phase Equilibria*, Bd. 302, Nr. 1–2, S. 249–253, März 2011.

[47] E. İnce, Ş. İ. Kırbaşlar, und S. Şahin, „Liquid−Liquid Equilibria for Ternary Systems of Water + Formic Acid + Dibasic Esters“, *J. Chem. Eng. Data*, Bd. 52, Nr. 5, S. 1889–1893, Sep. 2007.

[48] K. Sattler und T. Adrian, *Thermische Trennverfahren: Aufgaben und Auslegungsbeispiele*. John Wiley & Sons, 2016.

[49] H. Ghanadzadeh Gilani und S. Asan, „Liquid–liquid equilibrium data for systems containing of formic acid, water, and primary normal alcohols at T = 298.2 K“, *Fluid Phase Equilibria*, Bd. 354, S. 24–28, Sep. 2013.

[50] B. C. Roy, M. J. Alam, und M. Goto, „Extraction Equilibrium of Monocarboxylic Acids in Aqueous Solution by Using Tributyl Phosphate in Dodecane“, *J. Appl. Sci.*, Bd. 6, Nr. 1, S. 138–143, 2006.

[51] G. Malmary, M. Faizal, J. Albet, und J. Molinier, „Liquid−Liquid Equilibria of Acetic, Formic, and Oxalic Acids between Water and Tributyl Phosphate + Dodecane“, *J. Chem. Eng. Data*, Bd. 42, Nr. 5, S. 985–987, Sep. 1997.

[52] J. M. Wardell und C. J. King, „Solvent equilibriums for extraction of carboxylic acids from water“, *J. Chem. Eng. Data*, Bd. 23, Nr. 2, S. 144–148, Apr. 1978.

[53] R.-S. Juang und R.-H. Huang, „Equilibrium studies on reactive extraction of lactic acid with an amine extractant“, *Chem. Eng. J. Biochem. Eng. J.*, Bd. 65, Nr. 1, S. 47–53, Jan. 1997.

[54] H. Martens und D. Goldmann, *Recyclingtechnik: Fachbuch für Lehre und Praxis*. Springer-Verlag, 2016.

[55] L. Genov und I. Dukov, „Extraktion von starken einwertigen Säuren mit Trioctylamin“, *Monatshefte Für Chem. Chem. Mon.*, Bd. 103, Nr. 6, S. 1552–1559.

[56] „The Methanol Industry - Methanol Institute“. [Online]. Verfügbar unter: http://www.methanol.org/Methanol-Basics/The-Methanol-Industry.aspx. [Zugegriffen: 15-Juli-2015].

[57] „Methanol Recovery Technologies - Give us your waste water and we’ll give you reusable methanol.“ [Online]. Verfügbar unter: http://methanol-recovery.com/. [Zugegriffen: 19-Jan-2016].

[58] A. K. Pabby, S. S. H. Rizvi, und A. M. S. Requena, *Handbook of Membrane Separations: Chemical, Pharmaceutical, Food, and Biotechnological Applications, Second Edition*. CRC Press, 2015.

[59] X. Pang, X. Deng, und Y. Sun, „Studies on the PVA/P (AA-Co-AN/SiO2)/PVA Composite Membranes for Pervaporation Dehydration of Methanol“, *Mod. Appl. Sci.*, Bd. 4, Nr. 11, S. 28, 2010.

[60] E. Drioli und L. Giorno, *Comprehensive Membrane Science and Engineering*. Newnes, 2010.

[61] A. J. Toth und P. Mizsey, „Methanol removal from aqueous mixture with organophilic pervaporation: Experiments and modelling“, *Chem. Eng. Res. Des.*, Bd. 98, S. 123–135, Juni 2015.

[62] W. Kujawski, „Pervaporative Removal of Organics from Water Using Hydrophobic Membranes. Binary Mixtures“, *Sep. Sci. Technol.*, Bd. 35, Nr. 1, S. 89–108, Jan. 2000.

[63] G. V. Jesus Mora Molina, „Comparison of pervaporation of different alcohols from water on CMG-OM-010 and 1060-SULZER membranes“, *Desalination*, Bd. 149, Nr. 1, S. 89–94, 2002.

[64] Z. Guo und C. Hu, „Pervaporation of organic liquid/ water mixtures through a novel silicone copolymer membrane“, *Chin. Sci. Bull.*, Bd. 43, Nr. 6, S. 487–490, März 1998.

[65] M. J. Morin und E. V. Thompson, „Pervaporation of alcohol/water solutions through block copolymer membranes“, in *Proceedings of the Third International Conference on Pervaporation Processes in the Chemical Industry, Nancy, France: Bakish Materials Corporation*, 1988, S. 349–54.

[66] K. M. Devaine, A. J. Meier, und C. S. Slater, „Pervaporation for the recovery of MEK and other solvents using organophilic membranes“, in *Proceedings of International Conference on Pervaporation Processes in the Chemical Industry, 7th, Reno, Nev., Feb*, 1995.

[67] M. Yoshikawa, T. Wano, und T. Kitao, „Specialty polymeric membranes 2. Pervaporation separation of aqueous lower alcohol solutions throuh modified polybutadiene membranes“, *J. Membr. Sci.*, Bd. 89, Nr. 1, S. 23–36, 1994.

[68] H. J. C. te Hennepe, D. Bargeman, M. H. V. Mulder, und C. A. Smolders, „Zeolite-filled silicone rubber membranes“, *J. Membr. Sci.*, Bd. 35, Nr. 1, S. 39–55, Dez. 1987.

[69] T. C. Bowen, H. Kalipcilar, J. L. Falconer, und R. D. Noble, „Pervaporation of organic/water mixtures through B-ZSM-5 zeolite membranes on monolith supports“, *J. Membr. Sci.*, Bd. 215, Nr. 1, S. 235–247, 2003.

[70] Q. Liu, R. D. Noble, J. L. Falconer, und H. H. Funke, „Organics/water separation by pervaporation with a zeolite membrane“, *J. Membr. Sci.*, Bd. 117, Nr. 1, S. 163–174, 1996.

[71] V. A. Tuan, S. Li, J. L. Falconer, und R. D. Noble, „Separating organics from water by pervaporation with isomorphously-substituted MFI zeolite membranes“, *J. Membr. Sci.*, Bd. 196, Nr. 1, S. 111–123, Feb. 2002.

[72] T. Sano *u. a.*, „Potentials of silicalite membranes for the separation of alcohol/water mixtures“, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, Bd. 84, S. 1175–1182, 1994.

[73] H. Chen, Y. Li, G. Zhu, J. Liu, und W. Yang, „Synthesis and pervaporation performance of high-reproducibility silicalite-1 membranes“, *Chin. Sci. Bull.*, Bd. 53, Nr. 22, S. 3505–3510, 2008.

[74] S. Li, V. A. Tuan, J. L. Falconer, und R. D. Noble, „Properties and separation performance of Ge-ZSM-5 membranes“, *Microporous Mesoporous Mater.*, Bd. 58, Nr. 2, S. 137–154, März 2003.

[75] „Separation of Organic Compounds from Surfactant Solutions by Pervaporation. The Influence of a Micellar Phase on Mass Transfer : Zeitschrift für Physikalische Chemie“. [Online]. Verfügbar unter: http://www.degruyter.com/dg/viewarticle/j$002fzpch.2005.219.issue-9$002fzpch.2005.219.9.1243$002fzpch.2005.219.9.1243.xml. [Zugegriffen: 27-Feb-2015].

[76] J.-L. Philippe, *Lösungsmittelrückgewinnung aus Abluftströmen durch Absorption und Pervaporation*. VDI-Verlag, 1997.

[77] I. K. Schaber und D.-I. T. Hartwig, „Organophile Pervaporation mit unbehandelten und funktionalisierten PDMS-Membranen“.

[78] D. Paul, „Polymermembranen für die Stofftrennung“, *Chem. Unserer Zeit*, Bd. 32, Nr. 4, S. 197–205, Aug. 1998.

[79] B. Bruggen, „Pervaporation Separation Factor“, in *Encyclopedia of Membranes*, E. Drioli und L. Giorno, Hrsg. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015, S. 1–3.

[80] R. Rautenbach, *Membranverfahren: Grundlagen der Modul- und Anlagenauslegung*. Springer-Verlag, 2013.

[81] B. Ibarlucea, C. Fernández-Sánchez, S. Demming, S. Büttgenbach, und A. Llobera, *Biofunctionalization of PDMS-based microfluidic systems*. IMB-CNM, 2011.

[82] L. Cao, *Carrier-bound immobilized enzymes: principles, application and design*. John Wiley & Sons, 2006.

[83] A. Kreider *u. a.*, „Functionalization of PDMS modified and plasma activated two-component polyurethane coatings by surface attachment of enzymes“, *Appl. Surf. Sci.*, Bd. 273, S. 562–569, Mai 2013.

[84] Michael BÜSCHEL *u. a.*, „Use of enzymes to reduce formaldehyde from formaldehyde-containing products“.

[85] Y. Imada und S. Mizuno, „Production of Formic Acid“, JPS61128891 (A), 16-Juni-1986.

[86] M. Kuehn, B. Rodewyk, und D. Bryniok, „Bio-sensor system for quantitative determination of formaldehyde“, DE19728663 (C1), 01-Okt-1998.

[87] N. Kato, E. Yanase, und K. Kita, „Nad(h) Bonding Type Oxidation and Reduction Disproportionation Enzyme and Its Gene“, JPH0779775 (A), 28-März-1995.

[88] A. Spieth, „Untersuchung zur biologischen Reinigung formaldehydbelasteter Abluft durch Pseudomonas putida J3 in einem Rieselbettreaktor“. Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, 1999.

[89] J. M. Walker, *The Protein Protocols Handbook*. Springer Science & Business Media, 2002.

[90] „Bio-Rad Protein Assay | Life Science Research | Bio-Rad“. [Online]. Verfügbar unter: http://www.bio-rad.com/de-de/product/bio-rad-protein-assay?pcp_loc=catprod. [Zugegriffen: 18-Feb-2015].

[91] „Bradford - Lösung für die Proteinbestimmung: AppliChem - BioChemica.Chemica.Synthesis.Service“. [Online]. Verfügbar unter: https://www.applichem.com/shop/produktdetail/as/bradford-loesung-fuer-die-proteinbestimmung/. [Zugegriffen: 18-Feb-2015].

[92] „Infinite® 200 PRO - Tecan“. [Online]. Verfügbar unter: http://www.tecan.com/platform/apps/product/index.asp?MenuID=1812&ID=1916&Menu=1&Item=21.2.10.1. [Zugegriffen: 18-Feb-2015].

[93] J. Steinhoff, *Entwicklung und Aufbau eines Flugzeitmassenspektrometers mit optimierter Akzeptanz und Transmission für den hocheffizienten Nachweis durch Ionenebeschuss zerstäubter Neutralteilchen nach resonanter Lasernachionisierung*. BoD – Books on Demand, 2004.

[94] „DASGIP - Parallele Bioreaktorsysteme für Unvergleichliche Ergebnisse“. [Online]. Verfügbar unter: http://www.dasgip.de/. [Zugegriffen: 24-Nov-2014].

[95] „INFORS HT - Bioreaktoren“. [Online]. Verfügbar unter: http://www.infors-ht.com/index.php/de/produkte/bioreaktoren. [Zugegriffen: 24-Nov-2014].

[96] Horst Chmiel, *Bioprozesstechnik: Einführung in die Bioverfahrenstechnik*. Springer, 2006.

[97] „Enzyme carriers from Lab to Commercial Scale « Align Chemical“. .

[98] Narcis Borrat Company, „In-situ product recovery of methanol and formic acid from the enzymatic conversion of formaldehyde“, Masterarbeit, Universität Stuttgart, Stuttgart, 2016.

[99] Eugen Scholz, *Karl-Fischer-Titration - Methoden zur Wasserbestimmung*. Springer.

[100] H.-J. Muhr und R. Rohner, „Good Titration Practice in Karl Fischer Titration“, *Scribd*. [Online]. Verfügbar unter: https://de.scribd.com/document/183948051/51725145a-v04-11gtpkftitrhbcomplet-pdf. [Zugegriffen: 11-Aug-2016].

[101] K. I. M. Al-Malah, *Aspen Plus: Chemical Engineering Applications*. John Wiley & Sons, 2016.

[102] R. Rautenbach und J. Vier, „Aufbereitung von Methanol/Dimethylcarbonat-Strömen durch Kombination von Pervaporation und Rektifikation“, *Chem. Ing. Tech.*, Bd. 67, Nr. 11, S. 1498–1501, 1995.

[103] K. Hertwig und L. Martens, *Chemische Verfahrenstechnik: Berechnung, Auslegung und Betrieb chemischer Reaktoren*. Oldenbourg Verlag, 2011.

[104] W. Müller, *Mechanische Verfahrenstechnik und ihre Gesetzmäßigkeiten*. Walter de Gruyter, 2014.

[105] P. Wallis, E. Schönborn, V. N. Kalevaru, A. Martin, und S. Wohlrab, „Enhanced formaldehyde selectivity in catalytic methane oxidation by vanadia on Ti-doped SBA-15“, *RSC Adv.*, Bd. 5, Nr. 85, S. 69509–69513, 2015.

[106] L. Blaschke, „Neue Enzyme für eine Methanol-basierte grüne Chemie“, Aachen, Sep-2014.

[107] C. M. Werkmeister, *Klonierung und heterologe Expression unterschiedlicher Dismutasen in Escherichia coli*. Stuttgart, 2013.

[108] „Neue technische Enzyme für eine grüne Chemie - Fraunhofer IGB“, *Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB*. [Online]. Verfügbar unter: http://www.igb.fraunhofer.de/de/kompetenzen/molekulare-biotechnologie/industrielle-biotechnologie/neue-technische-enzyme-fuer-eine-gruene-chemie.html. [Zugegriffen: 27-Nov-2014].

[109] Lisa Blaschke, „Herstellung und Charakterisierung einer Formaldehyd-Dismutase zur Herstellung von Methanol aus Methan“, Universität Stuttgart, Stuttgart, Manuskript in Bearbeitung.

[110] O. Leman, *Rühren - Rührer - Rührbehälterkonstruktionen: Grundlagen und Anwendungshilfen für Verfahrenstechniker*. expert verlag, 1998.

[111] J. Hartung, B. Elpelt, und K.-H. Klösener, *Statistik: Lehr- und Handbuch der angewandten Statistik ; mit zahlreichen, vollständig durchgerechneten Beispielen*. Oldenbourg Verlag, 2005.

[112] „Output and state covariance of system driven by white noise - MATLAB covar - MathWorks Deutschland“. [Online]. Verfügbar unter: http://de.mathworks.com/help/control/ref/covar.html. [Zugegriffen: 03-Dez-2014].

[113] *Enzyme*. Springer-Verlag, 2013.

[114] J. Buddrus, *Grundlagen der Organischen Chemie*. Walter de Gruyter, 2003.

[115] M. Baerns, *Technische Chemie*. John Wiley & Sons, 2014.

[116] A. G. Marangoni, *Enzyme kinetics a modern approach*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2003.

[117] „Lectures --Group Prof. Amedeo Caflisch“. [Online]. Verfügbar unter: http://www.biochem-caflisch.uzh.ch/public/25/lectures.html. [Zugegriffen: 05-Dez-2014].

[118] L. Acker *u. a.*, *Analytik der Lebensmittel Nachweis und Bestimmung von Lebensmittel-Inhaltsstoffen*. Springer-Verlag, 2013.

[119] K. Buchholz, „Immobilisierte Enzyme – Kinetik, Wirkungsgrad und Anwendung“, *Chem. Ing. Tech.*, Bd. 61, Nr. 8, S. 611–620, Aug. 1989.

[120] R. Lortie und G. André, „On the use of apparent kinetic parameters for immobilized enzyme with noncompetitive substrate inhibition“, *Enzyme Microb. Technol.*, Bd. 13, Nr. 12, S. 960–963, Dez. 1991.

[121] J. Sun, F. Wang, T. Ma, H. Gao, P. Wu, und L. Liu, „Energy and exergy analysis of a five-column methanol distillation scheme“, *Energy*, Bd. 45, Nr. 1, S. 696–703, Sep. 2012.

[122] A. Jafarey, J. M. Douglas, und T. J. McAvoy, „Short-Cut Techniques for Distillation Column Design and Control. 1. Column Design“, *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.*, Bd. 18, Nr. 2, S. 197–202, Apr. 1979.

[123] A. Behr, D. W. Agar, und J. Jörissen, *Einführung in die Technische Chemie*. Springer-Verlag, 2009.

[124] Chemstations Europe GmbH, „Rigorose Kolonnensimulation - SCDS“. [Online]. Verfügbar unter: http://www.chemstations.eu/fileadmin/user_upload/Tutorial/CSE-T-SCDS_Kolonne-DE.pdf. [Zugegriffen: 29-Sep-2016].

[125] Heiko Stallhofer, „Entwicklung einer in-situ Produktabtrennung für biotechnologische Verfahren“, Stuttgart, 29-Feb-2016.

[126] S. Tanaka, Y. Chao, S. Araki, und Y. Miyake, „Pervaporation characteristics of pore-filling PDMS/PMHS membranes for recovery of ethylacetate from aqueous solution“, *J. Membr. Sci.*, Bd. 348, Nr. 1–2, S. 383–388, Feb. 2010.

[127] „Membrane Inlet Mass Spectrometer | Gas Monitoring“, *Hiden Analytical*. .

[128] W. J. Moore und D. O. Hummel, *Physikalische Chemie*. Walter de Gruyter, 1986.

[129] K. Köhler und P. D.-I. H. P. Schuchmann, *Emulgiertechnik: Grundlagen, Verfahren und Anwendungen*. Behr’s Verlag DE, 2012.

[130] Z. Bayramoglu, U. Akbulut, und S. Sungur, „Immobilization of α-amylase into photographic gelatin by chemical cross-linking“, *Biomaterials*, Bd. 13, Nr. 10, S. 704–708, 1992.

[131] P. D. D. K. Pilchowski und L. Luckner, „Zur Sorption von Zink-Ionen an natürliche und technische Sorbentien unter Berücksichtigung des Feststoff: Lösung-Verhältnisses“.

[132] D. A. Butterfield, D. Bhattacharyya, S. Daunert, und L. Bachas, „Catalytic biofunctional membranes containing site-specifically immobilized enzyme arrays: a review“, *J. Membr. Sci.*, Bd. 181, Nr. 1, S. 29–37, Jan. 2001.

[133] Wolfgang Schmidt, „Wirtschaftliche Optimierung einer Rektifikation“, Bd. Chemie Technik, Nr. 05/2012.

[134] Christof Wetter, Elmar Brügging, Frauke Doetkotte, „Machbarkeitsstudie zur Absolutierung von Bioethanol aus landwirtschaftlichen Brennereien“, Fachhochschule Münster, Münster, Machbarkeitsstudie, Dez. 2005.

[135] T. Mohammadi, A. Aroujalian, und A. Bakhshi, „Pervaporation of dilute alcoholic mixtures using PDMS membrane“, *Chem. Eng. Sci.*, Bd. 60, Nr. 7, S. 1875–1880, 2005.

[136] T. Melin und R. Rautenbach, *Membranverfahren: Grundlagen der Modul-und Anlagenauslegung*. Springer-Verlag, 2007.

[137] J. M. Molina, G. Vatai, und E. Bekassy-Molnar, „Comparison of pervaporation of different alcohols from water on CMG-OM-010 and 1060-SULZER membranes“, *Desalination*, Bd. 149, Nr. 1, S. 89–94, 2002.

[138] L. Li, Z. Xiao, S. Tan, L. Pu, und Z. Zhang, „Composite PDMS membrane with high flux for the separation of organics from water by pervaporation“, *J. Membr. Sci.*, Bd. 243, Nr. 1, S. 177–187, 2004.

[139] C. F. Poole, *The Essence of Chromatography*. Elsevier, 2003.

[140] J.-P. Gallas *u. a.*, „Quantification of water and silanol species on various silicas by coupling IR spectroscopy and in-situ thermogravimetry“, *Langmuir*, Bd. 25, Nr. 10, S. 5825–5834, 2009.

[141] S. H. Tan, N.-T. Nguyen, Y. C. Chua, und T. G. Kang, „Oxygen plasma treatment for reducing hydrophobicity of a sealed polydimethylsiloxane microchannel“, *Biomicrofluidics*, Bd. 4, Nr. 3, S. 032204, 2010.

[142] H. Hillborg, J. F. Ankner, U. W. Gedde, G. D. Smith, H. K. Yasuda, und K. Wikström, „Crosslinked polydimethylsiloxane exposed to oxygen plasma studied by neutron reflectometry and other surface specific techniques“, *Polymer*, Bd. 41, Nr. 18, S. 6851–6863, 2000.

[143] M. Morra, E. Occhiello, R. Marola, F. Garbassi, P. Humphrey, und D. Johnson, „On the aging of oxygen plasma-treated polydimethylsiloxane surfaces“, *J. Colloid Interface Sci.*, Bd. 137, Nr. 1, S. 11–24, 1990.

[144] S. Lohmeyer, *Wassernutzung und Abwasserreinigung in Betrieb und Kommune: Grundlagen für betriebliche und kommunale Entscheidungen*. expert verlag, 1993.

[145] „WBG Kulmbach: Das Unternehmen“. [Online]. Verfügbar unter: http://www.wbg-kulmbach.de/das-unternehmen/. [Zugegriffen: 23-Dez-2015].

[146] Y. K. Hong, W. H. Hong, und D. H. Han, „Application of reactive extraction to recovery of carboxylic acids“, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, Bd. 6, Nr. 6, S. 386.

[147] W. Qin, Z. Li, und Y. Dai, „Extraction of Monocarboxylic Acids with Trioctylamine: Equilibria and Correlation of Apparent Reactive Equilibrium Constant“, *Ind. Eng. Chem. Res.*, Bd. 42, Nr. 24, S. 6196–6204, Nov. 2003.

[148] S. Şahin, Ş. S. Bayazit, M. Bilgin, und İ. İnci, „Investigation of Formic Acid Separation from Aqueous Solution by Reactive Extraction: Effects of Extractant and Diluent“, *J. Chem. Eng. Data*, Bd. 55, Nr. 4, S. 1519–1522, Apr. 2010.

[149] K. L. Wasewar, „Reactive extraction: an intensifying approach for carboxylic acid separation“, *Int. J. Chem. Eng. Appl.*, Bd. 3, Nr. 4, S. 249, 2012.

[150] C. S. López-Garzón und A. J. Straathof, „Recovery of carboxylic acids produced by fermentation“, *Biotechnol. Adv.*, Bd. 32, Nr. 5, S. 873–904, 2014.

[151] A. M. Eyal und R. Canari, „pH dependence of carboxylic and mineral acid extraction by amine-based extractants: effects of pKa, amine basicity, and diluent properties“, *Ind. Eng. Chem. Res.*, Bd. 34, Nr. 5, S. 1789–1798, 1995.

[152] R. Canari und A. M. Eyal, „Effect of pH on dicarboxylic acids extraction by amine-based extractants“, *Ind. Eng. Chem. Res.*, Bd. 42, Nr. 7, S. 1293–1300, 2003.

[153] I. C. Bafas, I. E. Constantinou, und C. G. Vayenas, „Partial oxidation of methane to formaldehyde with 50% yield in a continuous recycle reactor separator (CRRS)“, *Chem. Eng. J.*, Bd. 82, Nr. 1–3, S. 109–115, März 2001.

[154] „KTBL-Biogasrechner“. [Online]. Verfügbar unter: http://daten.ktbl.de/biogas/navigation.do?selectedAction=Startseite#start. [Zugegriffen: 20-Jan-2015].

[155] „BLE - Milch und Milcherzeugnisse - Durchschnittliche Anzahl der Rinder und Kühe pro Haltung in Deutschland“. [Online]. Verfügbar unter: http://www.ble.de/SharedDocs/ Downloads/01_Markt/09_Marktbeobachtung/02_MilchUndMilcherzeugnisse/ JaehrlicheErgebnisse/01_Deutschland/RegDt_Grundlagen/090826_406003100_04.html. [Zugegriffen: 21-Jan-2015].

[156] „Güllelagerraumbedarf - JGS-Anlagenverordnung und Beratungsempfehlungen - Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen“. [Online]. Verfügbar unter: https://www.landwirtschaftskammer.de/landwirtschaft/technik/bauberatung/guellelagerraumbedarf.htm. [Zugegriffen: 21-Jan-2015].

[157] „Fakten - Statistik - Bedeutung des Maisanbaues in Deutschland - Flächenerträge von Körnermais und Silomais in Deutschland - Deutsches Maiskomitee e.V. (DMK)“. [Online]. Verfügbar unter: http://www.maiskomitee.de/web/public/Fakten.aspx/Statistik/Deutschland/Fl%C3%A4chenertr%C3%A4ge. [Zugegriffen: 21-Jan-2015].

[158] „DBFZ veröffentlicht Monitoring-Zwischenbericht zur Stromerzeugung aus Biomasse - Deutsches Biomasseforschungszentrum (DBFZ)“. [Online]. Verfügbar unter:

https://www.dbfz.de/web/presse/pressemitteilungen-2014/dbfz-veroeffentlicht-monitoring-zwischenbericht-zur-stromerzeugung-aus-biomasse.html. [Zugegriffen: 22-Jan-2015].

[159] „PolyAn: Home“. [Online]. Verfügbar unter: http://www.poly-an.de/. [Zugegriffen: 18-März-2015].

[160] X. Guo *u. a.*, „Direct, nonoxidative conversion of methane to ethylene, aromatics, and hydrogen“, *Science*, Bd. 344, Nr. 6184, S. 616–619, 2014.

Mit einem neu entwickelten Verfahren, das die chemische und enzymatische Katalyse miteinander verbindet, lassen sich Methanol und Ameisensäure aus Biogas gewinnen. Dieser Herstellungsprozess basiert auf einer bisher noch nicht technisch eingesetzten enzymatischen Reaktion. Im Gegensatz zu gängigen Verfahren der Methanolproduktion kommt die Enzymreaktion mit deutlich weniger Energie aus, da der Prozess bei Raumtemperatur und Umgebungsdruck abläuft. Der Methananteil des Biogases wird derzeit in BHKWs der Biogasanlagen nur etwa zur Hälfte in Elektrizität umgewandelt, der Rest in Wärmeenergie. Der Kohlenstoffdioxidanteil bleibt ungenutzt. Das Problem der ineffizienten Nutzung des Biogases liegt zudem in der zu geringen Wärmenutzung und wird dadurch verschärft, dass die 2014 in Kraft getretene Novellierung des Erneuerbare-Energien-Gesetzes (EEG) neben einem geänderten Umlagesystem auch eine Wärmequote bei Blockheizkraftwerken von mindestens 60 Prozent fordert. Diese lässt sich bei herkömmlichen Biogasanlagen ohne zusätzlichen Wärmeverbraucher kaum erreichen. Alternative könnte das Biogas, einschließlich des Kohlenstoffdioxidanteils stofflich genutzt werden.

ISBN 978-3-8396-1407-5