

# Schlussbericht vom 04.02.2026

zum IGF-Vorhaben **01IF22612N**

## Thema

In-situ-Direktsynthese von  $H_2O_2$  zur Intensivierung von peroxidabhängigen Enzymreaktionen  
(PeroxyDirekt)

## Berichtszeitraum

01.10.2022 bis 31.12.2025

## Forschungsvereinigung

DECHEMA e.V.  
Theodor-Heuss-Allee 25  
60486 Frankfurt am Main

## Forschungseinrichtung(en)

Forschungseinrichtung 1: DECHEMA-Forschungsinstitut SbR (DFI)  
Theodor-Heuss-Allee 25  
60486 Frankfurt am Main

Forschungseinrichtung 2: Technische Hochschule Mittelhessen (THM)  
Wiesenstr. 14  
35390 Gießen

Forschungseinrichtung 3: Karlsruher Institut für Technologie (KIT)  
Hermann-von-Helmholtz-Platz 1  
76344 Eggenstein-Leopoldshafen

Platz für ein Logo

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse .....</b>	<b>3</b>
1.1	Arbeitspaket 1: Definition des Prozessfensters für die Tandem-Katalyse. Bearbeitet durch DECHEMA-Forschungsinstitut (DFI) .....	3
1.2	Arbeitspaket 2: Katalysator-Formulierung für die H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Direktsynthese und Aktivitätsvergleich im Enzym-Prozessfenster. Bearbeitet durch Karlsruher Institut für Technologie (KIT) .....	6
1.3	Arbeitspaket 3: Immobilisierung der Enzyme hinsichtlich einer kontinuierlichen Prozessführung. Bearbeitet durch Technische Hochschule Mittelhessen (THM).....	9
1.4	Arbeitspaket 4: Herstellung und kinetische Charakterisierung von Enzymvarianten der <i>AaeUPO</i> . Bearbeitet durch Technische Hochschule Mittelhessen (THM).....	14
1.5	Arbeitspaket 5: Bestimmung der Gesamtkinetik der Tandemkatalyse. Bearbeitet durch DECHEMA-Forschungsinstitut (DFI) .....	18
1.6	Arbeitspaket 6: Identifikation geeigneter Reaktordesigns durch detaillierte Reaktorsimulationen. Bearbeitet durch Karlsruher Institut für Technologie (KIT).....	23
1.7	Arbeitspaket 7: Weitere Optimierung der immobilisierten Enzyme hinsichtlich Stabilität und Selektivität unter den identifizierten Reaktionsbedingungen. Bearbeitet durch Technische Hochschule Mittelhessen (THM) .....	38
1.8	Arbeitspaket 8: Reaktorkonstruktion, Reaktorfertigung und maßgeschneiderte Katalysatorintegration. Bearbeitet durch Karlsruher Institut für Technologie (KIT) .....	39
1.9	Arbeitspaket 9: Systemintegration zur Realisierung der Tandem-Katalyse im kontinuierlichen Betrieb und Evaluierung der Langzeitstabilität. Bearbeitet durch DECHEMA-Forschungsinstitut (DFI) und Karlsruher Institut für Technologie (KIT) .....	45
<b>2</b>	<b>Verwendung der Zuwendung .....</b>	<b>52</b>
<b>3</b>	<b>Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit.....</b>	<b>53</b>
<b>4</b>	<b>Darstellung des wissenschaftlich-technischen und wirtschaftlichen Nutzens der erzielten Ergebnisse insbesondere für KMU sowie ihres innovativen Beitrags und ihrer industriellen Anwendungsmöglichkeiten .....</b>	<b>53</b>
<b>5</b>	<b>Wissenstransfer in die Wirtschaft.....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft .....</b>	<b>55</b>
6.1	Durchgeführte Transfermaßnahmen (vom Projektstart bis zum Projektende).....	55
6.2	Geplante Transfermaßnahmen (nach Projektende) .....	56
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>57</b>

# 1 Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

## 1.1 Arbeitspaket 1: Definition des Prozessfensters für die Tandem-Katalyse. Bearbeitet durch DECHEMA-Forschungsinstitut (DFI)

- Durchgeführte Arbeiten:

In diesem Arbeitspaket wurde als erstes die Analytik für die Tandem-Katalyse etabliert.

*AaeUPO* aus *AgrocybeAgerita* wurde für uns über eine Kooperation aus der AG Frank Hollmann (TU Delft) bereitgestellt. Das aufkonzentrierte und gereinigte Enzym wurde bei -20 °C im Tiefkühlschrank langfristig gelagert. Die Aktivität des Enzyms (*AaeUPO*) wird mit dem ABTS-Assay bestimmt. Dabei wird spektrophotometrisch die Oxidation von 2,2'-Azino-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS, farblos) durch UPO zum ABTS-Radikalkation (grün) ermittelt. Für die Messung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen stehen zwei weitere Assays zu Verfügung. Für den Bereich niedriger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen (0.2-10 µM) wird der HRP-Assay verwendet. Dabei wird die Dimerisierung von p-Hydroxyphenylessigsäure durch Meerrettich-Peroxidase (HRP) in Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mittels Fluoreszenzspektroskopie verfolgt. Für den Bereich höherer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen (1 – 500 µM) wird die schnelle Oxidation von überschüssigem Kaliumiodid durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Gegenwart von Ammoniummolybdat (VI) zur Bildung von gelb gefärbten Triiodid-Ionen (I<sub>3</sub><sup>-</sup>) genutzt, die quantitativ ebenfalls spektrophotometrisch verfolgt werden kann. Die Konzentrationen der Reaktanden (Ethylbenzoesäure - EBA, Hydroxyethylbenzoesäure - HEBA, Acetylbenzoesäure -ABA) werden mittels HPLC gemessen. Es wurde zusätzlich eine chirale Analytik mittels GC(FID) für das Produkt R/S-HEBA etabliert.

Der Fokus der Arbeiten in diesem Arbeitspaket lag jedoch hauptsächlich auf der Bewertung der Stabilität von *AaeUPO* in einem breiten experimentellen Bereich, der auch für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Direktsynthese relevant ist. Ziel war es, das Prozessfenster der Tandem-Katalyse zu ermitteln. Dafür wurde in separaten Experimenten im 0.1 M Kaliumphosphatpuffer (KPi) die Aktivität von *AaeUPO* über einen Zeitraum von etwa 30 Stunden verfolgt, während sieben relevante Systemparameter im breiten experimentellen Bereich variiert wurden: Rührgeschwindigkeit, pH-Wert des Mediums, Gehalt an Methanol (MeOH) im Medium, Anwesenheit von Natriumbromid (NaBr) im Medium, Druck, Temperatur und Kontaktzeit des Enzyms mit dem heterogenen Katalysator. In allen Experimenten wurde eine Anfangskonzentration von 100 nM *AaeUPO* eingesetzt, und das Gesamtvolumen betrug 10 mL.

- Erzielte Ergebnisse:

Es ist bekannt, dass die beiden zu vereinigenden Prozessen in unterschiedlichen Arbeitsbereichen optimal verlaufen. Die Enzymkatalyse wird meistens bei Raumtemperatur und Atmosphärendruck durchgeführt. Als Medium werden wässrige Puffer-Systeme verwendet, um einen optimalen neutralen pH-Bereich einzustellen. Weil die Enzyme instabil gegenüber dem eigenen Cosubstrat sind, sind sehr niedrige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen im mikromolaren Bereich notwendig. Optimal für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Direktsynthese sind dagegen saure Medien mit Halogenid-Ionen (Cl<sup>-</sup> or Br<sup>-</sup>) als Promotoren. Es wird unter Druck und in alkoholischen Lösungsmitteln gearbeitet, um die Konzentration der gelösten gasförmigen Edukte im flüssigen Reaktionsmedium zu erhöhen und Stofftransportwiderstände in der Flüssigphase zu verringern. Da Biokatalysatoren höhere Kosten im Vergleich zu herkömmlichen heterogenen Katalysatoren verursachen, haben wir uns darauf konzentriert, den erweiterten Arbeitsbereich des Enzyms experimentell zu bestimmen, mit dem Hinblick auf optimale Bedingungen für die in-situ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Direktsynthese.

Zuerst wurde die Stabilität von *AaeUPO* beim Lagern untersucht. Das Enzym wird langfristig bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Nach dem Auftauen wurde es im Kühlschrank bei  $4\text{--}7\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Anschließend wurde die Aktivität von UPO für mehrere aufgetaute Chargen im Laufe von etwa zwei Wochen mithilfe des ABTS-Assays überwacht. Es wurde eine leichte Aktivitätssteigerung innerhalb von 24 Stunden beobachtet, gefolgt von einer langsamen Abnahme der Aktivität im Laufe der Zeit: ca.  $0.8\%$  pro Tag.

Als zweiter wichtiger Faktor bei der Anwesenheit des heterogenen Katalysators im System wurde die Rührgeschwindigkeit untersucht und von  $300\text{--}1000\text{ rpm}$  variiert. Höhere Rührgeschwindigkeiten sind in Anwesenheit des heterogenen Katalysators zur optimalen Dispergierung des Pulvers erwünscht. Im Bereich von  $300\text{--}900\text{ rpm}$  wurde kein signifikanter Effekt auf die Aktivität von *AaeUPO* beobachtet. Erst ab  $1000\text{ rpm}$  wurde eine deutliche Abnahme festgestellt.

Ein weiterer wichtiger Faktor ist der pH-Wert des Mediums. Optimal für die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Direktsynthese sind leicht saure Medien (ca. pH 4). Für unsere Experimente wurde der pH-Wert des Kaliumphosphatpuffers ( $0.1\text{ M}$ ) zwischen 1.6 und 8 variiert (Abbildung 1). Bei einem pH-Wert von 1.6 und 2 fand eine sehr schnelle Deaktivierung des Enzyms innerhalb von zwei Minuten statt. Im Bereich von pH 3 bis pH 8 konnte die Aktivität zuverlässig gemessen werden. Grundsätzlich wurde eine schnellere Deaktivierung von *AaeUPO* bei  $\text{pH} < 6$  beobachtet und eine gute Stabilität im Bereich von pH 6 bis 8 festgestellt.

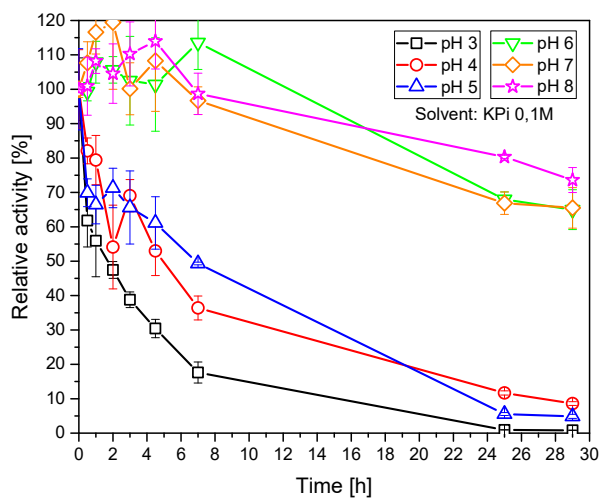


Abbildung 1: UPO-Stabilität mit Variation der pH des Mediums. Weitere Bedingungen:  $100\text{ nM}$  ( $2.81\text{ U/ml}$ ) UPO-Startkonzentration,  $10\text{ ml}$  Medium =  $\text{KPi}$ ,  $0.1\text{M}$  im pH Bereich 3 bis 8,  $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $500\text{ rpm}$

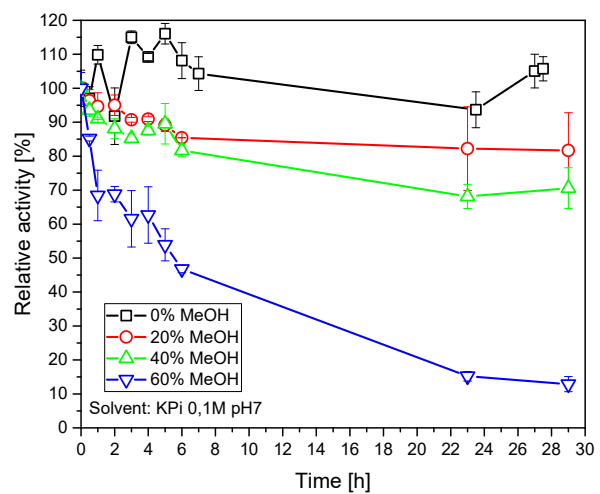


Abbildung 2: UPO-Stabilität mit Variation des Methanol-Gehalts. Weitere Bedingungen:  $100\text{ nM}$  ( $2.81\text{ U/ml}$ ) UPO-Startkonzentration,  $10\text{ ml}$  Medium =  $\text{KPi}$ ,  $0.1\text{M}$  pH 7,  $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $500\text{ rpm}$

Der Einfluss des Alkoholgehalts des Mediums wurde ebenfalls untersucht (Abbildung 2). Höhere Alkoholgehalte führen zu höheren Löslichkeiten der Edukte  $\text{H}_2$  und  $\text{O}_2$  und begünstigen so die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Direktsynthese. Deshalb wurde die Stabilität von *AaeUPO* im Bereich von  $0\text{--}70\%$  MeOH-Gehalt in dem  $\text{KPi}$ -Puffer ( $0.1\text{M}$ , pH 7) untersucht. Überraschenderweise sind bis ca.  $40\%$  MeOH keine signifikanten Einbußen der UPO-Aktivität zu beobachten.

Ein weiterer wichtiger Faktor für die in-situ  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Direktsynthese ist die Anwesenheit von Halogenionen in geringer Konzentration im System (Abbildung 3). Natriumbromid ( $\text{NaBr}$ ) als wesentlicher Selektivitäts-

Promoter (Additiv), der die unerwünschte Weiterreaktion des Wasserstoffperoxids verhindert (Hydrierung und/oder Zersetzung am heterogenen Katalysator) und die Ausbeute signifikant steigert. Konkret wurden Experimente mit 4 mM NaBr im  $KP_i$ -Puffer (0.1 M, pH7) durchgeführt. Es zeigte sich kein Effekt des Salzes auf die Stabilität des Enzyms innerhalb des normalen Schwankungsbereichs.

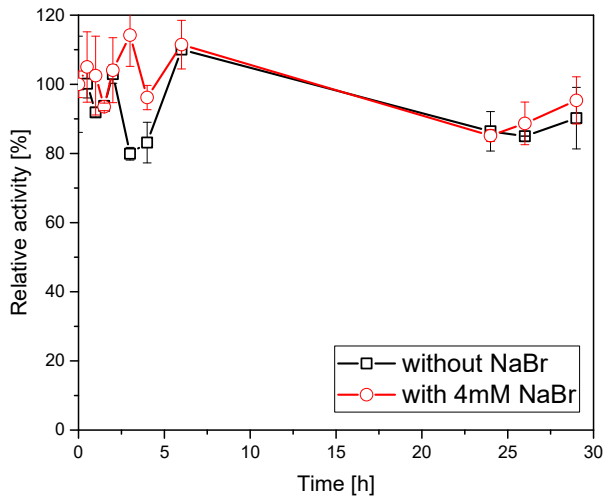


Abbildung 3: UPO-Stabilität mit NaBr als Additiv. Weitere Bedingungen: 100 nM (2.81 U/ml) UPO-Startkonzentration, 10 ml Medium =  $KP_i$  0.1M pH 7,  $T = 22^\circ\text{C}$ , 500 rpm

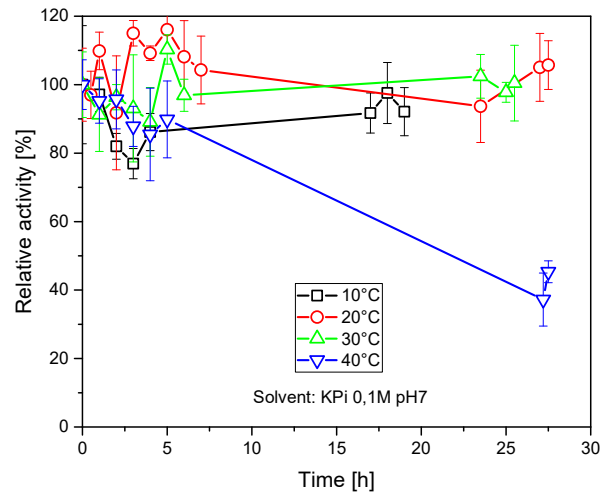


Abbildung 4: UPO-Stabilität mit Variation der Temperatur. Weitere Bedingungen: 100 nM (2.81 U/ml) UPO-Startkonzentration, 10 ml Medium =  $KP_i$  0.1M pH 7,  $T = 22^\circ\text{C}$ , 500 rpm

Variationen der Temperatur im Bereich von 10-40 °C (Abbildung 4) und Druck im Bereich von 1-6 bar abs., (Abbildung 5) wurden ebenfalls untersucht. Höhere Temperaturen führen zur einer schnelleren Reaktionskinetik, und höhere Drücke begünstigen die  $H_2O_2$ -Direktsynthese. Bis etwa 30 °C wurde kein signifikanter Effekt der Temperatur auf die Stabilität von UPO beobachtet. Erst ab 40 °C wurde eine verstärkte Deaktivierung des Enzyms beobachtet. Der Druck hatte in dem getesteten kleinen Bereich keinen signifikanten Effekt auf die Stabilität von UPO.

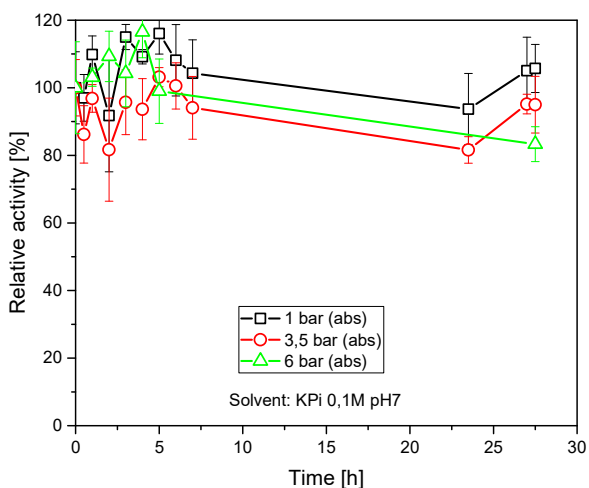


Abbildung 5: UPO-Stabilität mit Variation des Druckes (Synthetische Luft). Weitere Bedingungen: 100 nM (2.81 U/ml) UPO-Startkonzentration, 10 ml Medium =  $KP_i$  0.1M pH 7,  $T = 22^\circ\text{C}$ , 500 rpm

Zuletzt wurde der Einfluss der Kontaktzeit von UPO mit dem heterogenen Katalysator unter nichtreaktiven Bedingungen (500 rpm, 25 °C, 1 bar, synthetische Luft, ohne Substrat EBA) untersucht. Bei diesen Experimenten war es leider nicht möglich, zwischen tatsächlichem Aktivitätsverlust und Adsorptionseffekten auf der Katalysatoroberfläche zu unterscheiden. Für letzteres sprechen stark exponentiell verlaufende Deaktivierungskurven innerhalb von 1 bis 2 Stunden für Katalysatoren auf Kohlenstoffbasis mit einer höheren inneren Oberfläche des Trägers, während in den entsprechenden Tandem-Experimenten Enzymaktivität bzw. Produktbildung über mehrere Tage beobachtet wurde.

Fazit: In diesem Arbeitspaket könnte das Prozessfenster der Tandemkatalyse stark eingegrenzt werden.

Als wichtigster Faktor für das Zusammenspiel der beiden Katalysatoren (chemo- und bio-) hat sich der

pH-Wert und Zusammensetzung des Mediums erwiesen. Für die Tandem-Katalyse Experimente wurde eine Zusammensetzung des Solvents von 10%-MeOH in 100 mM  $KP_i$  bei pH = 7 fixiert.

## 1.2 Arbeitspaket 2: Katalysator-Formulierung für die $H_2O_2$ Direktsynthese und Aktivitätsvergleich im Enzym-Prozessfenster. Bearbeitet durch Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

### ▪ Durchgeführte Arbeiten:

In diesem Arbeitspaket wurden heterogene Katalysatoren für die Direktsynthese von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) aus Wasserstoff und Sauerstoff entwickelt und unter verschiedenen Reaktionsbedingungen untersucht und ebenfalls für weitere Untersuchungen an den Projektpartner DFI geliefert. Ziel war es, Katalysatorsysteme zu identifizieren, die sowohl unter etablierten Bedingungen der  $H_2O_2$ -Direktsynthese als auch unter den für enzymatische Reaktionen relevanten Prozessbedingungen aktiv sind. Zu Beginn der Arbeiten wurden verschiedene palladiumbasierte Katalysatoren synthetisiert. Hierzu wurden Pd-, PdAu-, PdSn- und PdNi-Katalysatoren mittels Feuchtigkeitsimprägnierung auf geeigneten Trägermaterialien hergestellt. Durch die Variation der zweiten Metallkomponente sollte die Aktivität und Selektivität der  $H_2O_2$ -Bildung beeinflusst sowie unerwünschte Nebenreaktionen wie die Zersetzung oder weitere Hydrierung von  $H_2O_2$  zu Wasser reduziert werden. Nach der Imprägnierung wurden die Katalysatoren getrocknet und thermisch behandelt, um die aktiven Metallphasen auszubilden. Die hergestellten Materialien wurden anschließend umfassend physikalisch-chemisch charakterisiert. Zur Untersuchung der Morphologie und der Elementverteilung wurden Rasterelektronenmikroskopie (REM) sowie energiedispersive und wellenlängendispersive Röntgenspektroskopie (EDX bzw. WDX) eingesetzt. Die Bestimmung der Metallbeladung erfolgte mittels ICP-OES. Zusätzlich wurden Partikelgrößenanalysen durchgeführt. Für ausgewählte Katalysatoren wurden ergänzende Untersuchungen mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM bzw. STEM) sowie Röntgendiffraktometrie (XRD) durchgeführt. Darüber hinaus wurden Physisorptionsmessungen zur Bestimmung von Eigenschaften sowie Chemisorptionsmessungen zur Abschätzung der zugänglichen Metalloberfläche eingesetzt. Die katalytische Aktivität der hergestellten Katalysatoren wurde in einer Festbettreaktorzelle untersucht. Zunächst erfolgten Experimente unter etablierten Bedingungen der  $H_2O_2$ -Direktsynthese. Hierzu wurde ein rein wässriges Reaktionsmedium mit 0.1 mM  $H_2SO_4$  und 4 mM NaBr verwendet, da diese Bedingungen als günstig für eine hohe Selektivität der  $H_2O_2$ -Bildung bekannt sind. Anschließend wurden die Katalysatoren unter Bedingungen untersucht, die für die im Projekt betrachteten enzymatischen Reaktionen relevant sind. Für die Modellreaktion der ABTS-Oxidation wurden Experimente in einem Citrat-Phosphat-Puffer bei pH 4.4 durchgeführt. Zusätzlich wurden Untersuchungen unter Bedingungen durchgeführt, die für enzymatische Hydroxylierungsreaktionen relevant sind. Hierzu wurde ein 0.1 M Kaliumphosphatpuffer ( $KP_i$ ,  $KH_2PO_4/K_2HPO_4$ ) verwendet. Der Einfluss organischer Cosolventien wurde ebenfalls untersucht, da diese häufig zur Verbesserung der Substratlöslichkeit eingesetzt werden. Hierzu wurden Acetonitril sowie Methanol in Konzentrationen von 5 bis 15 Vol.-% dem Reaktionsmedium zugesetzt.

### ▪ Erzielte Ergebnisse:

Die hergestellten Katalysatoren wurden im Projekt sowohl in Batch-Experimenten am DFI als auch in kontinuierlichen Versuchen in einem Mikrofestbettreaktor am KIT untersucht.

Die Morphologie des hergestellten 1 % Pd/ $TiO_2$ -Katalysators wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) untersucht. Die Aufnahmen zeigen eine poröse Partikelstruktur des  $TiO_2$ -Trägermaterials mit einer unregelmäßigen Partikelform und einer breiten Partikelgrößenverteilung (Abbildung 6). In den

Querschnittsaufnahmen sind helle Kontraste erkennbar, die auf palladiumreiche Bereiche innerhalb der Partikel hinweisen. Diese Pd-Agglomerate sind über die Trägerstruktur verteilt und bestätigen die erfolgreiche Imprägnierung des Trägermaterials mit der aktiven Metallphase.

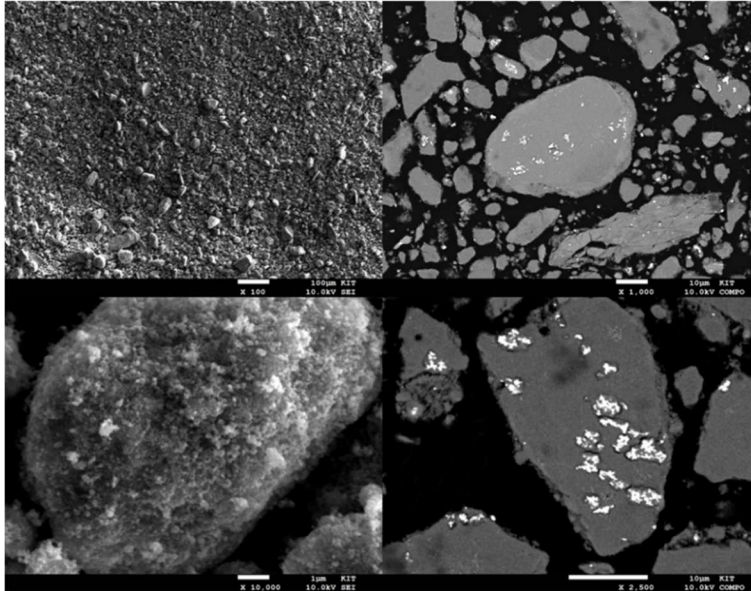


Abbildung 6: REM-Aufnahmen des 1 % Pd/TiO<sub>2</sub>-Katalysators in unterschiedlichen Vergrößerungen. Links sind Oberflächenaufnahmen der Katalysatorpartikel dargestellt, rechts Querschnittsaufnahmen. Die hellen Bereiche im Querschnitt entsprechen palladiumhaltigen Agglomeraten innerhalb der TiO<sub>2</sub>-Partikel.

Die REM-Aufnahmen geben somit einen ersten Einblick in die Morphologie und die Verteilung der palladiumhaltigen Bereiche innerhalb der TiO<sub>2</sub>-Partikel. Zur weitergehenden Untersuchung der Elementverteilung wurden zusätzlich WDX-Mapping-Aufnahmen durchgeführt. In Abbildung 7 sind entsprechende WDX-Elementverteilungskarten für verschiedene PdAu/TiO<sub>2</sub>-Katalysatoren dargestellt.

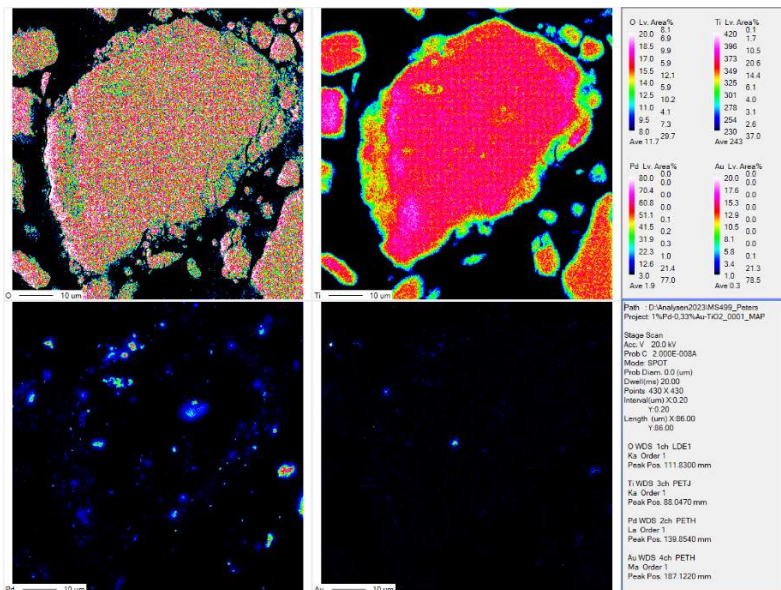


Abbildung 7: Exemplarische WDX-Elementverteilungskarten eines 0-7% Pd 0.3 % Au/TiO<sub>2</sub>-Katalysators. Dargestellt sind die Verteilungen von Sauerstoff (oben links), Titan (oben rechts), Palladium (unten links) und Gold (unten rechts).

Die dargestellten WDX-Elementverteilungskarten sind exemplarisch für die untersuchten Katalysatoren. Entsprechende Analysen wurden auch für weitere Katalysatorsysteme durchgeführt, darunter Pd/TiO<sub>2</sub>, PdAu/TiO<sub>2</sub>, PdNi/TiO<sub>2</sub> und PdSn/TiO<sub>2</sub>.

Die physikochemischen Eigenschaften der untersuchten Katalysatoren sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die BET-Oberflächen der TiO<sub>2</sub>-basierten Katalysatoren liegen im Bereich von etwa 50m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>.

Tabelle 1: Physikochemische Eigenschaften einiger untersuchter Pd-basierter TiO<sub>2</sub>-Katalysatoren

	1% Pd/TiO <sub>2</sub>	5%Pd/TiO <sub>2</sub>
BET surface area [m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> ]	55.31	52.36
Cumulative pore surface area [m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> ]	79.00	54.92
Cumulative pore volume [cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> ]	1.05	0.31
Palladium dispersion[%]	41.75	11.32
$d_{mod,3}$ [μm]	41.72	161.16

Die katalytische Aktivität verschiedener Pd/TiO<sub>2</sub>-Katalysatoren wurde zunächst hinsichtlich der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Direktsynthese untersucht. Aufgrund der reproduzierbaren katalytischen Leistung und der gut definierten physikochemischen Eigenschaften wurde ein 1 Gew.-% Pd/TiO<sub>2</sub>-Katalysator für weiterführende Untersuchungen ausgewählt. Der Katalysator weist eine BET-Oberfläche von 55 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> sowie eine Palladiumdispersion von 41.8 % auf.

Zusätzlich wurden die Katalysatoren unter variierenden WHSVs und Verweilzeiten auch im kontinuierlichen Betrieb auf katalytischen statischen Mischern (CSMs, siehe AP8) untersucht. Dabei kamen verschiedene Katalysatorsysteme zum Einsatz, die ebenfalls als Schüttung im Festbettreaktor charakterisiert wurden. Ziel dieser Untersuchungen war es, das Verhalten der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Direktsynthese unter durchströmten Bedingungen sowie den Einfluss von Stofftransport und Verweilzeit auf die katalytische Leistung zu bewerten.

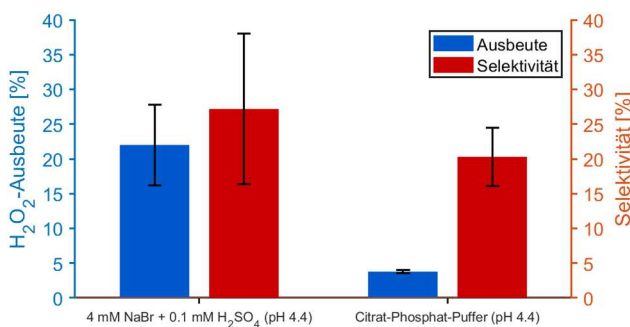


Abbildung 8: Vergleich der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ausbeute und Selektivität bei der Direktsynthese über 1 % Pd/TiO<sub>2</sub> in wässrigem Medium mit Promotoren (4 mM NaBr + 0.1 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 4.4) und im Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4.4).

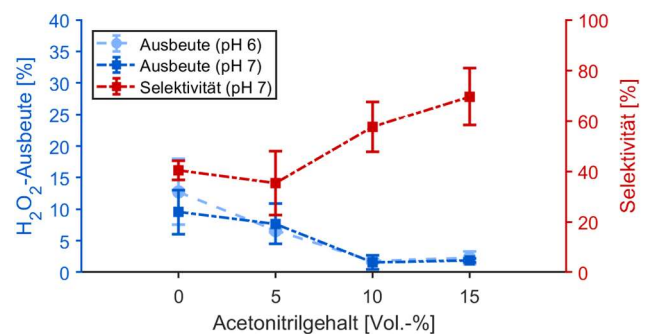


Abbildung 9: Einfluss des Acetonitrilgehalts im Reaktionsmedium auf H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ausbeute und Selektivität bei der Direktsynthese über 1 % Pd/TiO<sub>2</sub> bei unterschiedlichen pH-Werten.

Wie in Abbildung 8 dargestellt, führt die Durchführung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Direktsynthese unter enzymkompatiblen Reaktionsbedingungen zu deutlich geringeren Ausbeuten und Selektivitäten im Vergleich zu den chemisch

optimierten Referenzbedingungen mit NaBr und H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Im Citrat-Phosphat-Puffer, der für die enzymatische Katalyse erforderlich ist, bleibt die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung daher deutlich eingeschränkt.

Der Einfluss organischer Lösungsmittel auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung ist in Abbildung 9 dargestellt. Mit zunehmendem Acetonitrilgehalt im Reaktionsmedium nimmt die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ausbeute deutlich ab. Die höchste Ausbeute wurde im rein wässrigen Puffersystem bei pH 6 erreicht. Gleichzeitig zeigt sich, dass die Selektivität zur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung mit steigendem Acetonitrilgehalt zunimmt. Dies deutet darauf hin, dass Acetonitril aktive Zentren auf der Katalysatoroberfläche teilweise blockiert und dadurch sowohl die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung als auch konkurrierende Nebenreaktionen beeinflusst.

Die Ergebnisse zeigen, dass die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Direktsynthese im Tandemsystem unter für die Katalyse nicht optimalen, jedoch enzymkompatiblen Bedingungen durchgeführt werden muss. Daher wurde ein Kompromiss zwischen ausreichender H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung und geeigneten Bedingungen für die enzymatische Reaktion gewählt.

### 1.3 Arbeitspaket 3: Immobilisierung der Enzyme hinsichtlich einer kontinuierlichen Prozessführung. Bearbeitet durch Technische Hochschule Mittelhessen (THM)

Ziel von AP3 war es, die Vanadium-Chloroperoxidase sowie unspezifische Peroxygenase mittels verschiedener Strategien zu immobilisieren und anschließend in einem kontinuierlichen Reaktionssystem einzusetzen. Darüber hinaus wurden eine kombinierte Aufreinigung und Immobilisierung der Enzyme angestrebt.

- Durchgeführte Arbeiten für Vanadium-Chloroperoxidase aus *Curvularia inaequalis*:

Zur Immobilisierung des Enzyms wurde die Metallaffinitätsimmobilisierung verwendet. Diese Methode basiert auf der spezifischen Wechselwirkung zwischen Metallionen auf dem Trägermaterial und dem His-Tag markiertem Enzym. Hierfür wurde *CIVCPO* mit einem Hexahistidin-Tag in *E. coli* exprimiert und anschließend aufgereinigt. Als Trägermaterial wurden Methacrylat-basierte Partikel mit Iminodiessigsäure (IDA) als Chelatligand (Puro-lite) verwendet. Die Träger unterscheiden sich hinsichtlich der gebundenen Metallionen (Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> und Cu<sup>2+</sup>). Zur Optimierung des Immobilisierungsprozesses wurden zunächst die eingesetzte Gesamtaktivität des Enzyms, Flüssigkeit/Träger-Verhältnis sowie Temperatur variiert. Zur Beurteilung der Immobilisierung wurden Kerngrößen wie Aktivitäts- und Immobilisierungsausbeute sowie Immobilisierungseffizienz ermittelt.

Um den Zusammenhang zwischen Proteinbeladung des Trägers und der Immobilisierungseffizienz zu untersuchen, wurde eine Verdünnungsreihe der Enzymlösung gemäß Tabelle 2 hergestellt, wobei Trägermasse und Gesamtvolumen konstant gehalten wurde. Die Immobilisierung erfolgte 2 h bei Raumtemperatur auf einem Roller-Schüttler. Nach der Inkubation wurde das immobilisierte Enzym dreimal mit dem Puffer gewaschen und anschließend filtriert. Als Puffer wurde 50 mM Tris/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pH 8.0 verwendet. Nach der Immobilisierung wurde sowohl der Überstand als auch das immobilisierte Enzym mittels Aktivitätsassay sowie mittels Bradford-Assay zur Proteinbestimmung analysiert, um die Kerngrößen des Prozesses zu bestimmen. Im nächsten Schritt wurde das Flüssigkeitsvolumen (0.125 – 0.5 mL) während der Immobilisierung variiert, wobei alle übrigen Parameter konstant gehalten wurden. Um die Temperatureffekt auf die Immobilisierung zu untersuchen wurde als letztes in diesem Abschnitt die Immobilisierung bei 4°C durchgeführt und die Ergebnisse mit der Raumtemperatur verglichen. Die Wiederverwendbarkeit des immobilisierten Enzyms wurde

untersucht, in dem das Immobilisat nach Durchführung des Aktivitätsassays filtriert und anschließend erneut einem Aktivitätsassay unterzogen wurde.

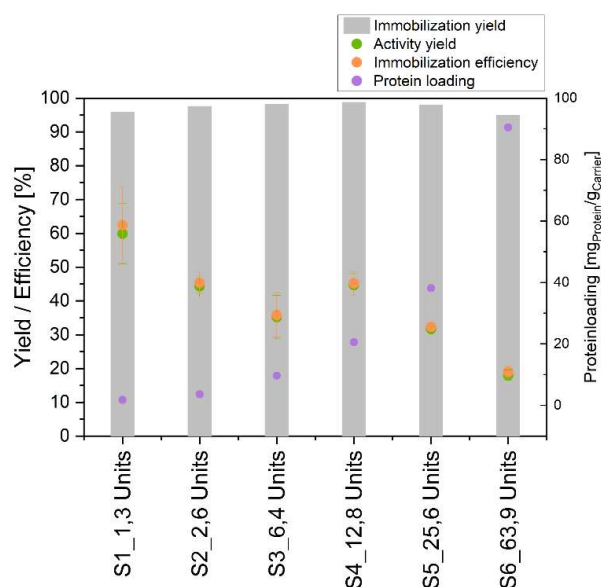
▪ Erzielte Ergebnisse von CiVCPO:

Zur Untersuchung des Einflusses der eingesetzten Enzymaktivität auf die Immobilisierung wurde eine Verdünnungsreihe im Bereich von 1,3 bis 63,9 U durchgeführt (Tabelle 2). Die Trägermasse sowie das Gesamtvolumen wurden dabei konstant gehalten.

*Tabelle 2: Verdünnungsreihe der Enzymlösung zur Untersuchung des Einflusses der eingesetzten Gesamtaktivität auf die Proteinbeladung und Immobilisierungseffizienz. Die Trägermasse wurde konstant bei 50 mg gehalten.*

Probe-Nr.	Gesamt Units	Träger [mg] / Protein [mg]
1 (1:100)	1.3	500
2 (1:50)	2.6	250
3 (1:20)	6.4	100
4 (1:10)	12.8	50
5 (1:5)	25.6	25
6 (1:2)	63.9	10

Die Abbildung 10 zeigt, ein deutlicher Zusammenhang zwischen Proteinbeladung und Aktivitätsausbeute: Bei hoher Proteinbeladung von 90.5 mg<sub>Protein</sub>/g<sub>Carrier</sub> lag die Aktivitätsausbeute lediglich bei 18.0 %, während bei niedriger Beladung von 1.8 mg<sub>Protein</sub>/g<sub>Carrier</sub> eine Ausbeute von 59.9 % erzielt wurde. Die Immobilisierungsausbeute blieb über 90 % bei allen untersuchten Proben. Als geeigneter Kompromiss wurde eine Proteinbeladung von 20.6 mg<sub>Protein</sub>/g<sub>Carrier</sub> gewählt, bei der eine Aktivitätsausbeute von 44.7 % erreicht werden konnte. Im nächsten Schritt wurde das Flüssigkeitsvolumen variiert. Durch die Erhöhung des Gesamtvolumen während der Immobilisierung, konnte die Aktivitätsausbeute verbessert werden. Die Immobilisierung bei 4°C führte zu keiner Erhöhung der Aktivitätsausbeute oder Proteinbeladung. Daher wurde die Immobilisierung im Folgenden bei Raumtemperatur durchgeführt.



*Abbildung 10: Vergleich unterschiedlicher eingesetzter Enzymaktivitäten für die Immobilisierung bei konstantem Probenvolumen. Dargestellt sind Immobilisierungsausbeute, Aktivitätsausbeute, Immobilisierungseffizienz sowie Proteinbeladung des Trägers. Die Fehlerbalken repräsentieren technische Triplikate.*

In der Abbildung 11 sind die Ergebnisse der unterschiedlichen getesteten Träger dargestellt. Bei allen Trägern eine ähnliche Proteinbeladung von etwa 20 mg<sub>Protein</sub>/g<sub>Carrier</sub> erzielt. Bei allen untersuchten Trägern war die Immobilisierungsausbeute insgesamt hoch (>85 %). Während Co-, Zn- und Fe-Träger vergleichbare Aktivitätsausbeuten zeigten, lagen diese bei Ni- und Cu-Trägern deutlich niedriger.

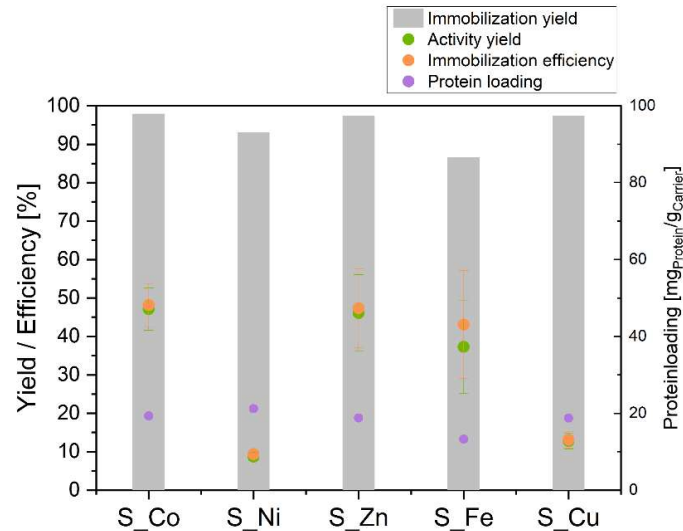


Abbildung 11: Vergleich verschiedener metallionenbeladener Träger hinsichtlich Immobilisierungsausbeute, Aktivitätsausbeute, Immobilisierungseffizienz und Proteinbeladung. Immobilisierung erfolgte unter optimierten Bedingungen bei konstanter initialer Gesamtaktivität

Eine Wiederverwendbarkeit des immobilisierten Enzyms konnte nicht nachgewiesen werden. Zudem wurde im Überstand nach Durchführung des Enzymassays eine Restaktivität detektiert, was auf ein Leaching des Enzyms vom Träger hindeutet. Der Aktivitätsassay wurde in 100 mM Natriumcitrat-Puffer bei pH 5.0 durchgeführt. Das beobachtete Leaching könnte sowohl durch den pH-Wert des Assays als auch durch die Zusammensetzung bzw. die Ionenstärke des Puffers beeinflusst worden sein.

- Durchgeführte Arbeiten für die Immobilisierung der unspezifischen Peroxygenase (UPO) aus *Agrocybe aegerita* (Südlicher Ackerling):

Die Forschungsarbeiten in dem Teilprojekt konzentrierten sich auf die Entwicklung einer effizienten und kostengünstigen Immobilisierungsstrategie für die unspezifische Peroxygenase (UPO). Aufgrund ihrer Fähigkeit zur selektiven Oxyfunktionalisierung gilt dieses Enzym als „Traumkatalysator“. Der herkömmliche Einsatz von UPOs wird jedoch oft durch hohe Kosten für die Enzymproduktion und komplexe Aufreinigungsschritte limitiert. Um diese Hürden zu überwinden, kam die Yeast Surface Display (YSD)-Technologie zum Einsatz, die die Produktion und Immobilisierung des Enzyms in einem einzigen Schritt vereint. Als Modellenzym wurde die rekombinante Variante PaDa-I der UPO aus *Agrocybe aegerita* gewählt. Die kodierende Sequenz dieses Enzyms wurde mit Genen für verschiedene Zellwandproteine aus *Saccharomyces cerevisiae* kombiniert, die als Ankersysteme fungieren. Insgesamt wurden acht verschiedene Plasmide konstruiert, die auf unterschiedlichen Verankerungsmechanismen basieren.

- GPI-Anker-Systeme: Hierbei wurden Teile der Proteine SAG1, AGA2 und vier verschiedene Fragmente von FLO1 verwendet, die kovalent an die Zellwand gebunden werden.
- Pir-Protein-Systeme: Hierbei wurden Fusionen mit dem Protein PIR1 erstellt, welches über eine andere Bindungsart (Bindung an β-1,3-Glucan) in die Zellwand integriert wird.

Die Fusionsgene wurden mittels Integrationsvektoren in den heterologen Produktionswirt *Komagataella phaffii* (früher *Pichia pastoris*) transformiert. Die transformierten Stämme wurden zunächst in Schüttelkolben für 48 Stunden auf Glycerol kultiviert, um Biomasse aufzubauen. Anschließend wurde der Kohlenstoffquellwechsel auf Methanol vollzogen, um die Produktion der UPO-Fusionsproteine über einen Zeitraum von weiteren 53 Stunden zu induzieren. Um die Immobilisierungsparameter präzise bestimmen zu können, wurden zusätzliche Varianten des vielversprechendsten Systems (SAG1) entwickelt. Diese enthielten zwischen dem Anker und dem Enzym zusätzliche Strep-Tag® II- oder GFP-Tags, die durch spezifische Protease-Schnittstellen (TEV-Protease oder Faktor Xa) flankiert waren. Dies ermöglichte es, das Enzym gezielt von der Zelloberfläche abzuspalten, um die spezifische Beladung der Zellen zu quantifizieren (Abbildung 12). Zur Charakterisierung wurde die Fluoreszenzmikroskopie bei der GFP-Variante eingesetzt, um die Enzymverteilung auf der Zelloberfläche zu visualisieren. Die Bestimmung der Enzymmenge pro Gramm Biomasse erfolgte durch Abspaltung mittels TEV-Protease, anschließende Proteinbestimmung nach Bradford sowie Aktivitätsmessungen im Überstand. Die Stabilität des immobilisierten Biokatalysators wurde unter verschiedenen Stressbedingungen (Temperatur, pH-Wert sowie organische Lösungsmittel wie Aceton, Acetonitril und DMSO) systematisch untersucht.

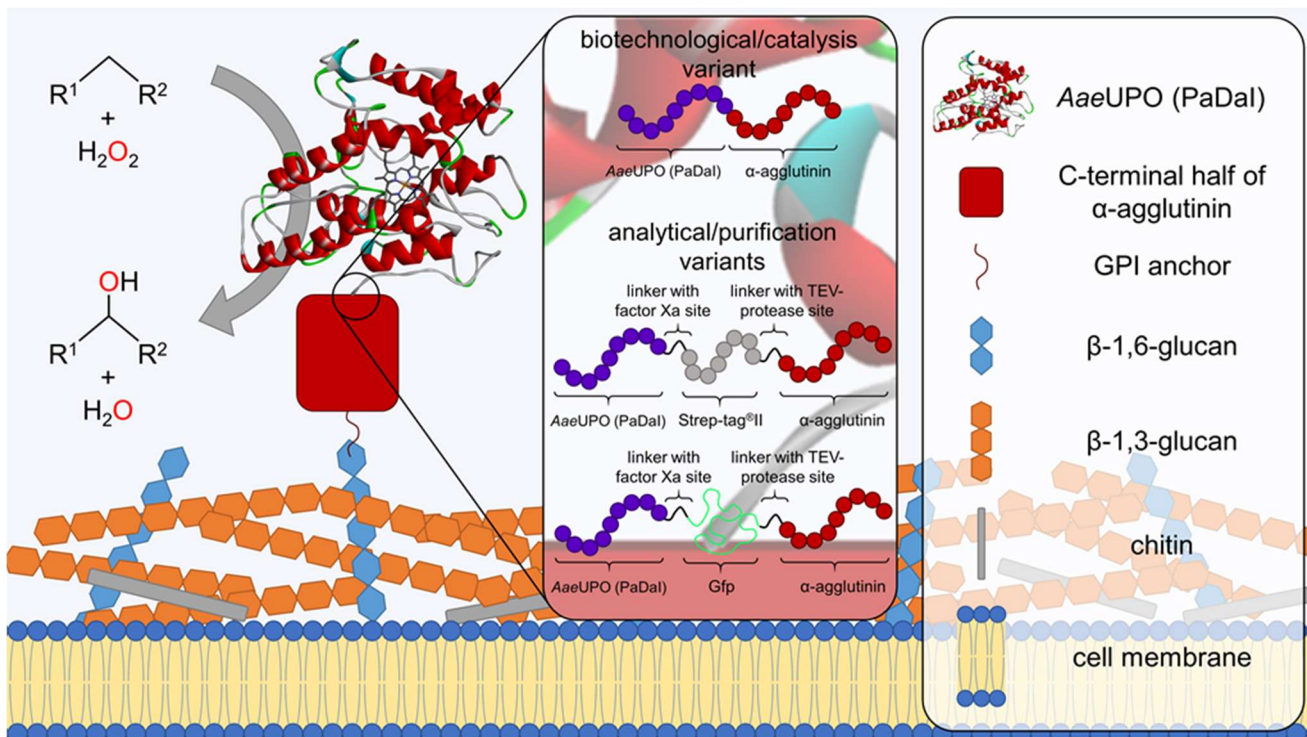


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Zelloberfläche von *Komagataella phaffii*, auf der AaeUPO-PaDa-I über das  $\alpha$ -Agglutinin-System präsentiert wird. Der Bereich der Fusion von PaDa-I mit der C-terminalen Hälfte von  $\alpha$ -Agglutinin ist hervorgehoben, um die Unterschiede zwischen den Varianten für Katalyse und Analyse/Reinigung zu verdeutlichen.

▪ Erzielte Ergebnisse zur Immobilisierung der UPO:

Die durchgeführten Untersuchungen lieferten wegweisende Ergebnisse für die praktische Anwendung von immobilisierten Peroxygenasen, insbesondere im Hinblick auf die Effizienz des YSD-Verfahrens im Vergleich zu herkömmlichen Methoden. Ein Aktivitäts-Screening der verschiedenen YSD-Systeme ergab deutliche Unterschiede. Während Systeme wie FLO1 oder AGA2 nur geringe Aktivitäten aufwiesen, erwies sich das SAG1-System als besonders effektiv. Es erreichte eine volumetrische Aktivität von 770 U/L, was etwa 80 % der Aktivität von frei sekretiertem PaDa-I unter identischen Bedingungen entspricht (Abbildung 13 b).

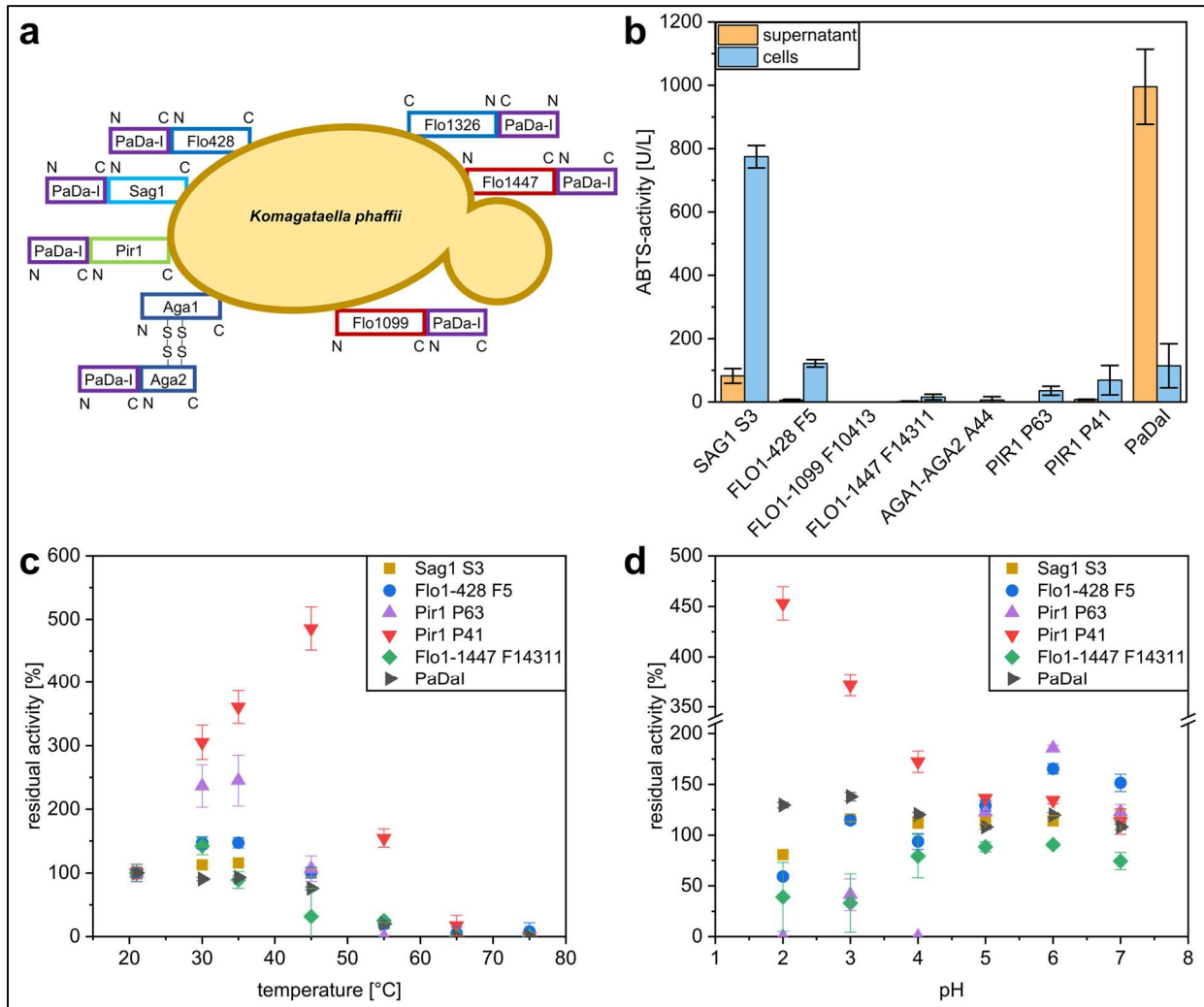


Abbildung 13: a) Übersicht über die entwickelten Oberflächen-Display-Systeme. GPI-verankerte Systeme sind blau, Pir-Protein-Systeme grün und nichtkovalent gebundene Systeme rot dargestellt. b: Aktivitätsscreening von Oberflächen-Display-Systemen und sekretiertem PaDa-I. Die ABTS-Aktivität des Überstands (orange) und der Zellen (blau) wurde nach Zentrifugation der Kulturbrühe bei 30 °C separat gemessen und auf das Volumen der verwendeten Kultur normiert. Die Daten sind mit dem Namen des Oberflächen-Display-Systems gekennzeichnet, gefolgt von einer eindeutigen Klonnummer oder „PaDa-I“ für sekretiertes PaDa-I. Für alle Systeme werden die Daten des Klon mit der besten Leistung gezeigt ( $\geq 12$  Klone). Die Standardabweichung ( $n = 3$ , technische Replikate) ist angegeben. c: Thermostabilität der Oberflächen-Display-Systeme. Die Restaktivität bei 30 °C nach einstündiger Inkubation bei verschiedenen Temperaturen in 20 mM KPi, pH 7, wird dargestellt. 100 % Aktivität sind definiert als die Aktivität bei Raumtemperatur ohne Inkubation (Datenpunkte bei 21 °C). Die Standardabweichung ( $n = 3$ , technische Replikate) ist angegeben. d: pH-Stabilität der Oberflächen-Display-Systeme. Restaktivität bei 30 °C nach einstündiger Inkubation in McIlvaine-Puffer (100 mM) mit unterschiedlichem pH-Wert. 100 % Aktivität ist definiert als die Aktivität nach einer einstündigen Inkubation in 20 mM KPi, pH 7, bei Raumtemperatur. Die Standardabweichung ( $n = 3$ , technische Wiederholungen) ist angegeben.

Besonders beeindruckend war die Immobilisierungseffizienz von 90 %, da nur ein minimaler Teil der Aktivität im Kulturüberstand verblieb. Aus der biochemischen Charakterisierung (Abbildung 13 c- d) der Konstrukte können die folgenden Aussagen abgeleitet werden:

- Temperatur: Das immobilisierte Enzym zeigte eine hohe Stabilität bei Temperaturen bis zu 45 °C. Ein interessantes Phänomen wurde bei den PIR1-Systemen beobachtet: Diese zeigten eine Aktivierung um bis zu 500 % nach einer Inkubation bei moderat erhöhten Temperaturen. Dies deutet auf strukturelle Veränderungen der Enzymen oder eine bessere Zugänglichkeit im Zellwandgefüge hin.
- pH-Wert: Das SAG1-System bewies eine bemerkenswerte Robustheit über einen weiten pH-Bereich (pH 2 bis 7).

- Organische Lösungsmittel: In Gegenwart von Aceton und DMSO zeigte das SAG1-System eine höhere Toleranz als das freie Enzym. Es blieb in 50-prozentiger Aceton-Lösung hochstabil, was für die Umsetzung wasserunlöslicher Substrate essenziell ist.

Für das SAG1-System wurden präzise Beladungswerte ermittelt.

- Aktivität pro Biomasse: 29.5 U pro Gramm Biomassetrockengewicht (CDW).
- Enzymmenge: 85 µg PaDa-I pro Gramm CDW.
- Spezifische Aktivität: 346 U/mg (berechnet in Bradford-Äquivalenten). Dies zeigt, dass die katalytische Integrität des Enzyms durch die Bindung an die Zellwand weitgehend erhalten bleibt.

#### 1.4 Arbeitspaket 4: Herstellung und kinetische Charakterisierung von Enzymvarianten der *AaeUPO*. Bearbeitet durch Technische Hochschule Mittelhessen (THM)

Die Arbeiten des AP 4 wurden wiederum am Beispiel der Modellenzyme *CiVCPO* und *UPO* (siehe oben) durchgeführt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Arbeiten sowie erste Charakterisierungen hinsichtlich der *UPO* unter Arbeitspaket 3 beschrieben.

- Durchgeführte Arbeiten für *CiVCPO*:

Zur Produktion von *CiVCPO* mit His-Tag wurde zunächst das Expressionsplasmid pBADgIIIb in *E. coli* TOP10 Zellen transformiert. Nach Bestätigung der erfolgreichen Transformation mittels PCR erfolgte die Kultivierung der Zellen in TB-Medium über 24 h bei 30 °C und 180 rpm. Der Zellaufschluss wurde mit einem Ultraschallhomogenisator durchgeführt. Anschließend wurde das Enzym durch immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC) aufgereinigt. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte mittels Monochlorodimedon (MCD)-Assay, während die Proteinkonzentration über den Bradford-Assay quantifiziert wurde. Im Rahmen der von mir betreuten Masterarbeit von Andreas Schmitt wurden verschiedene Parameter des Zellaufschlusses sowie der IMAC variiert, um die Effizienz und Gesamtausbeute der Enzymproduktion zu steigern.

Ein alternatives Expressionssystem basierend auf dem Plasmid pET28b mit His-Tag markiertem *CiVCPO* wurde ebenfalls eingesetzt<sup>1</sup>. Nach Transformation in *E. coli* BL21-Zellen wurden verschiedene Expressionsparameter untersucht. Hierbei wurden das verwendete Medium, der Zeitpunkt der Induktion, Inkubationsdauer nach der Induktion sowie die Kultivierungstemperatur variiert. Die entsprechenden Versuchsbedingungen sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Das Enzym wurde diesmal nach dem Zellaufschluss mittels Hitzefällung aufgereinigt. Hierzu wurde der Rohextrakt für 1.5 h bei 70 °C inkubiert und anschließend mithilfe eines Amicon-Membranfilters aufkonzentriert. Ein F3-Praktikum von Timon Bareiß wurde betreut. Im Rahmen dieses Praktikums wurde das pET28b Plasmid zusätzlich in *E. coli* BL21-CodonPlus-Zellen transformiert. Diese Stämme enthalten zusätzliche Gene für seltene tRNAs, wodurch die Expression heterologer rekombinanter Proteine verbessert werden kann. Ziel des Praktikums war der Vergleich der Enzymausbeute zwischen BL21- und BL21-CodonPlus-Zellen, um eine mögliche Steigerung der Enzymausbeute als volumetrische Aktivität (U/L Kulturvolumen) zu evaluieren.

Tabelle 3: Übersicht der variierten Expressionsparameter zur Optimierung der CiVCPO-Produktion in *E. coli* BL21.

Versuchs-Nr.	Induktion – OD <sub>600</sub>	IPTG-konzentration [mM]	Inkubationsdauer nach der Induktion [h]
1	0.5	0.1	10 und 24
2	0.5	0.5	10 und 24
3	0.5	1.0	10 und 24
4	0.8	0.1	10 und 24
5	0.8	0.5	10 und 24
6	0.8	1.0	10 und 24
7	1.0	0.1	10 und 24
8	1.0	0.5	10 und 24
9	1.0	1.0	10 und 24

▪ Erzielte Ergebnisse von CiVCPO:

Im Rahmen der Masterarbeit konnte eine deutliche Steigerung der Enzymeinheiten in der finalen Probe um 73 %, von 13 U auf 22 U pro Liter Kulturvolumen erzielt werden. Insgesamt blieb die Enzymausbeute jedoch relativ gering. Daher wurde das andere Expressionssystem basierend auf dem Plasmid pET28b für die Enzymproduktion verwendet.

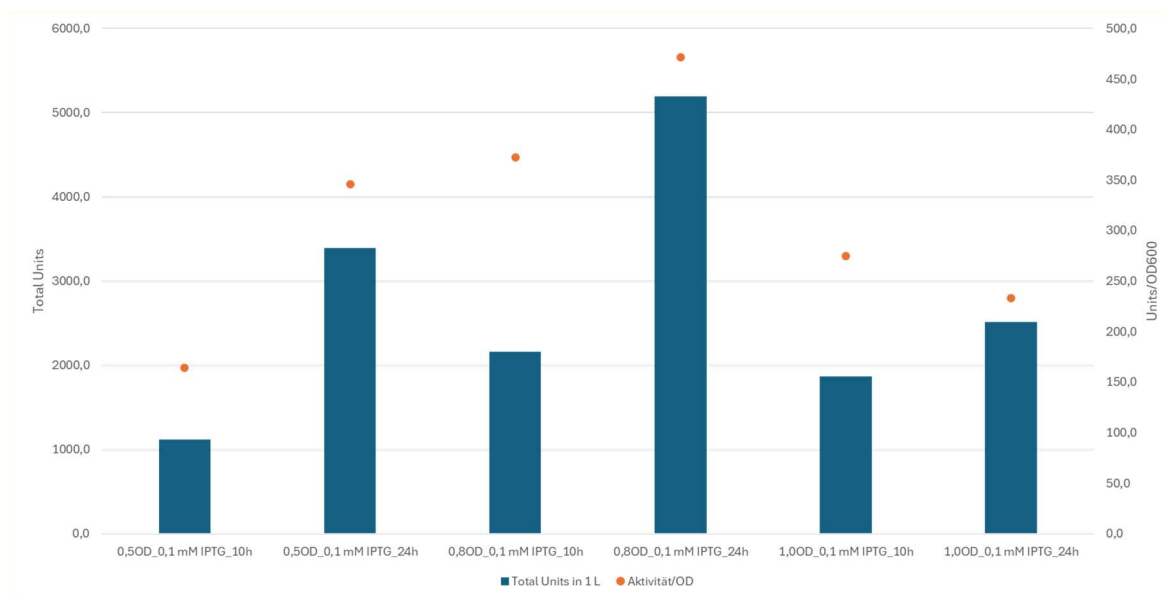


Abbildung 14: Vergleich der CiVCPO-Produktion bei unterschiedlichen Induktions-OD<sub>600</sub>-Werten und Inkubationszeiten bei 25 °C (0.1 mM IPTG).

Bei der Optimierung der Produktion zeigte die Kultivierung in TB-Medium eine höhere Enzymaktivität als in LB-Medium. Daher wurden weitere Optimierungen in TB-Medium durchgeführt. Die Kultivierung bei 30 °C wurde die höchste Enzymaktivität mit 0.1 mM IPTG bei einer Induktion von 0.5 OD<sub>600</sub> nach 10 h Inkubation erreicht. Es konnte 285.7 Units/L Kultur ermittelt werden. Die Induktion bei 0.8 OD<sub>600</sub> mit der gleichen IPTG-Konzentration zeigte ähnliche Aktivitäten wie bei der Induktion von 0.5 OD<sub>600</sub>. Jedoch war die Aktivität bei der Induktion von 1.0 OD<sub>600</sub> niedriger. Außerdem wurde beobachtet, dass die Erhöhung der IPTG-

konzentration zu geringerer Enzymaktivität führte. Es könnte auf einen toxischen Effekt oder eine Überlastung der Zellen hindeuten. Für die optimale Enzymproduktion wurde 0.1 mM IPTG für die Induktion der Zellen ausgewählt. Die Änderung der Wachstumstemperatur von 30 °C auf 25 °C zeigte einen großen Effekt für die Enzymproduktion. Bei dem Versuch mit 0,1 mM IPTG bei einer Induktion von 0.8 OD<sub>600</sub> und bei 25 °C wurde nach 24 h ca. 5000 Units/L Enzym produziert werden. Frühere oder spätere Induktion zeigte niedrigere Aktivität bei 25 °C.

Für den Vergleich beider Stämme wurde der Überstand nach dem Zellaufschluss analysiert. In *E. coli* BL21-CodonPlus-Zellen konnte unter den getesteten Bedingungen eine höhere Produktion von C<sub>IV</sub>CPO erzielt werden als in *E. coli* BL21-Zellen. Die höchsten Aktivitäten wurden bei einer Induktion von 0.8 OD<sub>600</sub> mit 0.05 mM IPTG und einer Kultivierungstemperatur von 22 °C erreicht. Anschließend wurde das Enzym in 1 L-Kultur von *E. coli* BL21-CodonPlus-Zellen produziert und mit der Hitze-Methode aufgereinigt. Es konnte ca. 11800 U/L Kultur Enzym erzielt werden.

- Durchgeführte Arbeiten für UPO

Im Zentrum der durchgeführten Arbeiten stand die Optimierung der Produktion und Handhabung von auf der Zelloberfläche immobilisierten, unspezifischen Peroxygenasen (UPOs) im Labormaßstab. Als Modellorganismus diente wiederum der Hefestamm *Komagataella phaffii* (X33), auf dessen Oberfläche die UPO-Variante PaDa-I mittels des Yeast Surface Display-(YSD)-Verfahrens unter Verwendung des SAG1-Ankers immobilisiert wurde. Die methodische Entwicklung umfasste die Optimierung von Protokollen für verschiedene Kultivierungssysteme vom Mikroliter- bis zum Litermaßstab. In Schüttelkolben-Experimenten wurden drei wesentliche Parameter untersucht: die Temperatur während der Proteinexpression (Vergleich von 30 °C und 25 °C), die optische Dichte (OD<sub>600</sub>) zum Zeitpunkt des Mediumwechsels und der Einfluss einer Volumenreduktion nach der Resuspension in einem methanolfreisigen Medium. Für die Skalierung in den 5-Liter-Bioreaktor wurde ein Vergleich zwischen einem mineralischen Basalsalzmedium (Industriestandard) und dem komplexen BMGY-Medium durchgeführt. Zur effizienten Überprüfung der Varianten (Screening) wurde ein Protokoll für das parallelisierte Mikrobioreaktorsystem BioLector XT<sup>®</sup> entwickelt. Hierbei wurde mittels Design of Experiments (DoE) der Einfluss von Glycerolgehalt, Inokulations-OD, Methanol-Fütterungsrate und Temperatur systematisch analysiert. Ergänzend wurden Verfahren zur Aufarbeitung des Biokatalysators etabliert. Dies beinhaltete die Entwicklung einer Sterilisationsmethode unter Verwendung verschiedener organischer Lösungsmittel sowie umfangreiche Langzeitlagerungsstudien über 87 Tage bei verschiedenen Temperaturen (RT, 4 °C, -20 °C und -80 °C). Dabei wurden auch die Effekte von Gefriertrocknung und Gefrier-Tau-Zyklen untersucht.

- Erzielte Ergebnisse zur Produktion und Immobilisierung der UPO:

Die Optimierung der Kultivierungsbedingungen führte zu einer signifikanten Steigerung der enzymatischen Aktivität sowie zu verbesserten Prozesskennzahlen. In Schüttelkolben konnte die volumetrische Aktivität um 42 Prozent gesteigert werden, indem die Temperatur nach der Methanol-Induktion von 30 °C auf 25 °C gesenkt wurde. Weitere Steigerungen wurden erzielt, wenn die Induktion bei einer niedrigen Zellkonzentration (OD<sub>600</sub> = 14) gestartet wurde. Eine Halbierung des Kulturvolumens bei der Resuspension führte zudem zu einer Verdoppelung der volumetrischen Aktivität, ohne die produzierte Gesamtaktivität negativ zu beeinflussen. Im Bioreaktor-Maßstab erwies sich das komplexe BMGY-Medium gegenüber dem mineralischen Standardmedium als deutlich überlegen. Es konnte eine finale Aktivität von 51 U/ml erreicht werden, was einer Verdoppelung der Ausbeute im Vergleich zum Basalsalzmedium entspricht. Für das Screening im BioLector

XT®-System wurde ein optimiertes Protokoll identifiziert, das einen direkten Start in einem Methanol-haltigen Medium (0 % Glycerol) bei einer Temperatur von 29 °C empfiehlt.

Hinsichtlich der Handhabung und Stabilität wurden weiterhin folgende Ergebnisse erzielt:

- Sterilisation: Eine vierstündige Behandlung der Zellen mit Isopropanol führte zu einer vollständigen Sterilisation, wobei die UPO-Aktivität nicht nur erhalten blieb, sondern sogar auf 136 % des Ausgangswerts gesteigert wurde.
- Lagerung: Die immobilisierten Enzyme zeigten über 87 Tage eine exzellente Stabilität bei Temperaturen von 4 °C bis –80 °C. Überraschenderweise führte die Lagerung bei niedrigen Temperaturen sowie wiederholtes Einfrieren und Auftauen zu einem Aktivierungseffekt, der möglicherweise auf eine verbesserte Diffusion durch mechanische Veränderungen der Zellstruktur zurückzuführen ist.
- Wirtschaftlichkeit: Das YSD-Verfahren wurde als derzeit kostengünstigste Immobilisierungsmethode für UPOs identifiziert, da es hohe Aktivitätsausbeuten liefert und keine externen Trägermaterialien oder aufwendige Reinigungsschritte erfordert.

Die Praxistauglichkeit des oben beschriebenen YSD-Systems als Katalyse-System wurde durch die Hydroxylierung von Cyclohexan zu Cyclohexanol unter Einsatz von 30 % Aceton als Ko-Solvent unter Beweis gestellt. Der immobilisierte Katalysator konnte über 13 Batches hinweg erfolgreich wiedergewonnen und erneut eingesetzt werden (Gesamtlaufzeit: Über 200 Stunden aktive Katalyse, die Selektivität für Cyclohexanol lag bei exzellenten 97 % und es wurde ein TTN von  $3.57 \cdot 10^5$  erreicht. Obwohl die Produktivität im Versuchsaufbau noch nicht industriell optimiert war, belegen diese Daten die außerordentliche Robustheit und Wiederverwendbarkeit des durch YSD immobilisierten Enzyms. Die Studie zeigt, dass YSD den kostspieligen Flaschenhals der Enzymaufreinigung und nachträglichen Immobilisierung eliminieren kann. Dadurch werden UPO-basierte Prozesse für die Produktion von Fein- und Bulk-Chemikalien ökonomisch attraktiver.

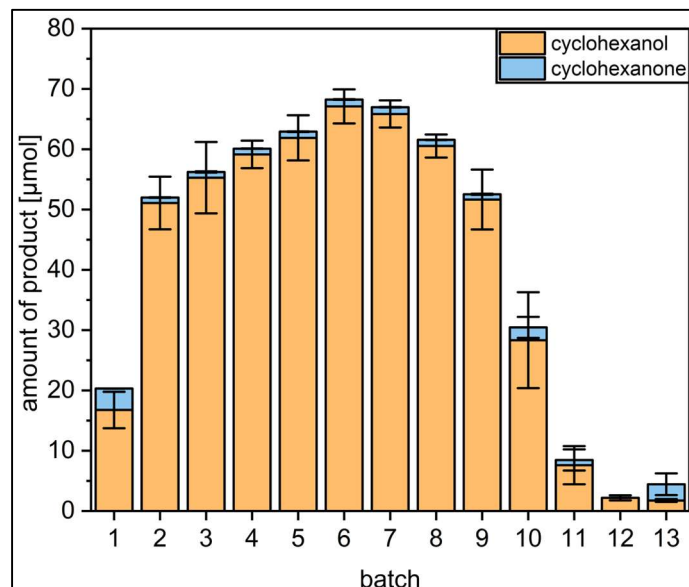


Abbildung 15: Analyse der wiederholten Batch-Katalyse der Cyclohexan-Hydroxylierung. Die Mengen der Hydroxylierungs- und Überoxidationsprodukte Cyclohexanol und Cyclohexanon wurden vor und nach jedem Durchgang bestimmt. Die erzeugten Stoffmengen sind in Form von blauen und orangefarbenen Säulen dargestellt. Die Standardabweichung ( $n = 4$ , unabhängige Versuche) ist angegeben.

## 1.5 Arbeitspaket 5: Bestimmung der Gesamtkinetik der Tandemkatalyse. Bearbeitet durch DE-CHEMA-Forschungsinstitut (DFI)

Ziel von AP5 ist die Bestimmung der Gesamtkinetik der Tandemkatalyse, da diese essenziell für die anschließend geplanten Simulationen ist. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde die Arbeit in zwei Teile untergliedert: **Teil 1** - separate Bestimmung der Kinetik der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Direktsynthese unter enzymatischen Bedingungen.

**Teil 2** - Bestimmung der Gesamtreaktionskinetik der Ethylbenzoesäure (EBA) Hydroxylierung, insbesondere der Bildung von HEBA (Hydroxyethylbenzoesäure) als Wunschprodukt und Optimierung der Enzymmenge.

### ▪ Durchgeführte Arbeiten

**Teil 1 (Kinetik der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Direktsynthese):** Zu diesem Zweck wurde eine Reihe von geträgerten Metallkatalysatoren untersucht. Die Experimente wurden im Batch-Modus unter Bedingungen durchgeführt, die für die Enzymkatalyse relevant sind (enzymatische/neutrale Bedingungen). Auf Basis der Experimente zum Prozessfenster der Tandemkatalyse (AP1) wurden im Vorfeld folgenden Parameter festgelegt: als Reaktionsmedium diente Kaliumhydrogenphosphat Puffer (KP<sub>i</sub> 0.1 M pH7) mit 10% Methanol, jeweils mit und ohne NaBr als Zusatz. Gesamtvolumen der Flüssigphase wurde bei 30 ml fixiert. Für die Gasphasenzusammensetzung wurden zwei Varianten untersucht - zuerst oxidativ (mit O<sub>2</sub> Überschuss) und aber auch reduktiv (H<sub>2</sub> Überschuss). In beiden Fällen im nichtexplosiven Bereich der H<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> Mischungen. Die Experimente wurden bei Raumtemperatur (22±1 °C) und unter Druck (bis 6.4 bar) durchgeführt. Die Katalysatormenge wurde initial auf 1 mg/ml festgelegt, später reduziert auf 0.1 mg/ml.

Zu einem späteren Zeitpunkt wurde ein neues Messprotokoll eingeführt, das sogenannte Spike-Experiment. Dabei wurde die Reaktion zunächst wie ein reguläres H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Syntheseexperiment gestartet, bis das Gleichgewicht erreicht war. Anschließend wurde eine definierte Menge H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugegeben (Spiking), und der weitere Verlauf der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration über die Zeit beobachtet. Über die Auswertung des Konzentration-Zeit-Profiles nach dem Spiken mit einem kinetischen Modell war möglich die kinetischen Konstanten der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung ( $k_F$ , μM/h) und Zersetzung ( $k_D$ , 1/h) zu bestimmen.

**Teil 2 (Kinetik der HEBA-Bildung):** Die Experimente zur Tandem-Katalyse wurden im Batchmodus durchgeführt, zunächst mit dem 1% Pd-TiO<sub>2</sub>-Katalysator. Zusätzlich wurden in Einzelversuche zwei weiteren Pd-Au-Varianten getestet. Die Vorgehensweise entsprach der der Standard-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Syntheseexperimente, mit dem Unterschied, dass zu Beginn des Experiments in die flüssige Phase (10%MeOH in 100 mM KP<sub>i</sub> pH=7, ohne NaBr) neben dem Metallkatalysator (0.1 mg/ml) für die in-situ-Direktsynthese auch das Substrat der organischen Reaktion EBA (10 mM) sowie das Enzym AaeUPO zugegeben wurden. Die Enzymmenge wurde dabei in einem Bereich von 0 bis 500 nM variiert. Die Enzymreaktionen wurden ausschließlich unter reduktiven Bedingungen (H<sub>2</sub>-Überschuss) durchgeführt. Die Konzentrationsverläufe des Substrats (EBA) sowie der Reaktionsprodukte (HEBA und ABA) wurden mittels HPLC-Analytik verfolgt. Die Enzymaktivität wurde sowohl im Vorfeld als auch während der Reaktion mithilfe des ABTS-Assays bestimmt. Die Anfangsbildungsrate von HEBA ( $k_{B(HEBA)}$ , mM/h) wurde durch lineare Regression der HEBA-Konzentration in den ersten vier Stunden der Reaktion bestimmt. Als weitere wichtige Kenngrößen für die Bewertung der Tandem-Katalyse-Experimente wurden auch die TON (turnover number) des Enzyms sowie die HEBA-Ausbeute und Selektivität berechnet.

▪ Erzielte Ergebnisse

**Teil1 (Kinetik der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Direktsynthese):** In diesem Arbeitspaket wurden 19 von der Forschungsstelle 2 (KIT) hergestellte Pd- und Pd-X-Katalysatoren (X = Au, Sn, Ni) auf TiO<sub>2</sub>-Trägern (AP2, KIT) sowie ein kommerzieller Pd-Katalysator auf Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Alfa Aesar) untersucht. Bei den Standardexperimenten unter enzymatischen/neutralen Bedingungen zeigten alle Katalysatoren eine sehr geringe initiale H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung (< 100 µM).

In Abbildung 16 sind beispielhaft dargestellt die gemessene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationsverläufe der Direktsynthese-Experimente für zwei selbsthergestellten (1%Pd-TiO<sub>2</sub> und 2.5%Pd-2.5%AU-TiO<sub>2</sub> von der KIT) und ein kommerzieller Katalysator (1%Pd-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Alfa Aesar) in 10%MeOH-KP<sub>i</sub> Puffer (pH = 7) mit 4 mM NaBr und unter oxidativen Bedingungen (O<sub>2</sub> Überschuss im System). Aufgrund überlappender Deaktivierungseffekte (Abbildung 16) und teilweise schlechter Reproduzierbarkeit einzelner Messungen war es nicht möglich, direkt aus den Reaktions-Konzentrationsverläufen (durch lineare Regression der Anfangsbereiche) verlässliche Daten über die Anfangsbildungsraten von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu erhalten. Daher wurde ein neues Messprotokoll eingeführt, das auf Spike-Experimenten basiert (Abbildung 17). Mit diesem Messprotokoll wurden erneut mehrere Katalysatoren (1% Pd-TiO<sub>2</sub>, 2.5% Pd-TiO<sub>2</sub>, 2.5% Pd-2.5% Au-TiO<sub>2</sub>, 0.5% Pd-0.5% Au-TiO<sub>2</sub> und 1% Pd-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in einem abgegrenzten Prozessfenster (ohne NaBr, mit 0.1 mg/ml Katalysator, sowohl unter oxidativen als auch reduktiven Bedingungen) charakterisiert. Die Konzentrationsverläufe nach dem Spiking wurden mithilfe eines kinetischen Modells ausgewertet (Gl. 1).

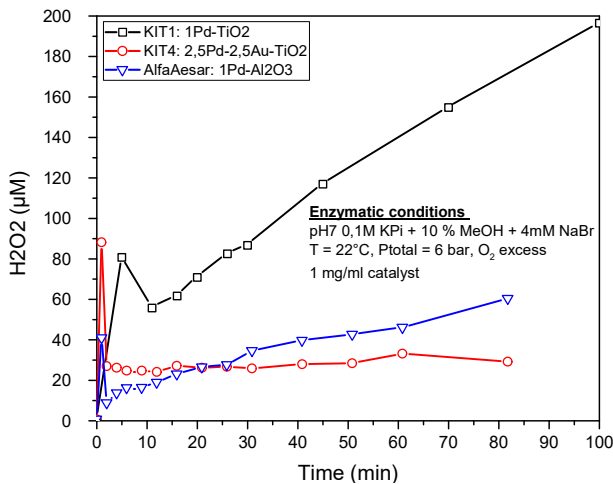


Abbildung 16: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-DS Experimente mit zwei selbsthergestellten (KIT1 und KIT4) und ein kommerziellen (AlfaAesar) Katalysatoren bei enzymatischen Bedingungen: 1 mg/ml Katalysator; 30 ml Medium = 10%MeOH / KP<sub>i</sub> 0.1 M pH7 + 4 mM NaBr, T = 22 °C, P=6 bar, O<sub>2</sub>-Überschuss.

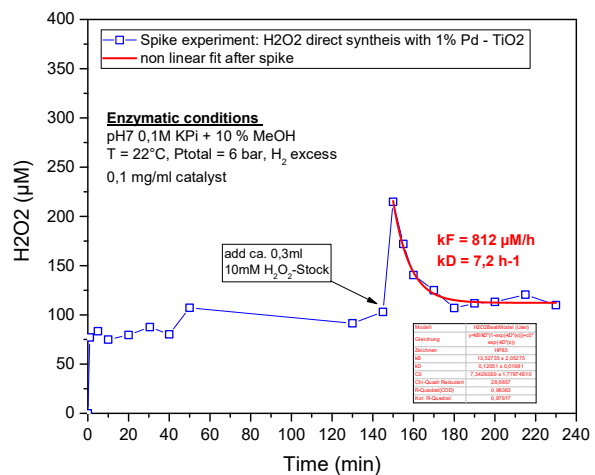


Abbildung 17: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-DS Spike Experiment. Standardbedingungen: 0.1 mg/ml Katalysator; 30 ml Medium = 10%MeOH / KP<sub>1</sub> 0.1 M pH7, T = 22 °C, P=6 bar, H<sub>2</sub>-Überschuss. Rote Linie – nichtlinearer Fit mit Gl. 1.

Das Modell basiert auf einer Kinetik nullter Ordnung für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung und einer Kinetik erster Ordnung für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Dissoziation. Dadurch konnten die kinetischen Konstanten der Bildung ( $k_B$ ) und Zersetzung ( $k_D$ ) der jeweiligen Katalysatoren ermittelt werden. Die Experimente wurden in Duplikaten/Triplikaten durchgeführt, was eine zuverlässige Bestimmung des Schwankungsbereichs ermöglichte (Abbildung 18).

$$Gl. 1: \quad c(t) = \frac{k_B}{k_D} (1 - e^{-k_D t}) + c_0 e^{-k_D t}$$

mit  $c$  und  $c_0$  – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konzentrationen [µM],  $t$  – Zeit [h],  $k_B$  – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Bildungskonstante [mM/h],  $k_D$  – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- Dissoziationskonstante [min<sup>-1</sup>]

Generell wurden unter reduktiven Bedingungen 6- bis 10-mal höhere  $H_2O_2$ -Bildungsraten als unter oxidativen Bedingungen gemessen, deshalb wurden diese für die Chemo-enzymatischen Reaktion als Standard festgelegt.

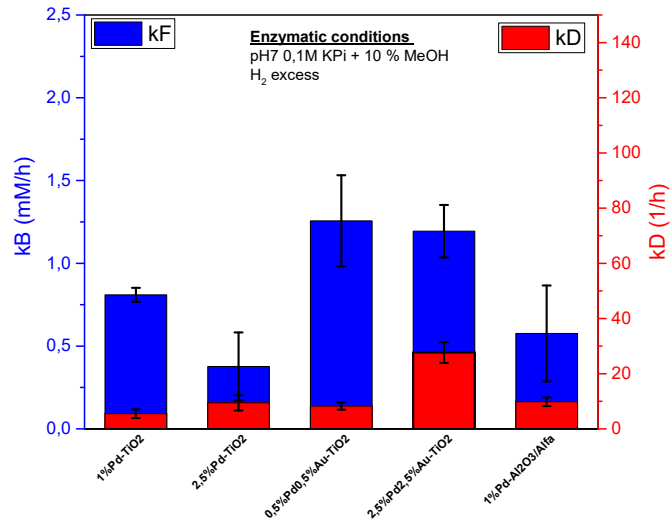


Abbildung 18: Kinetische Konstanten der  $H_2O_2$ -Bildung ( $k_B$ , linke y-Achse) und  $H_2O_2$ -Zersetzung ( $k_D$ , rechte y-Achse) für unterschiedliche Metallkatalysatoren

Die meisten im Projekt hergestellten Katalysatoren zeigten eine höhere  $H_2O_2$ -Aktivität/Bildungsrate von bis zu 1.2 mM/h (für die bimetallic Pd-Au-Katalysatoren) im Vergleich zum kommerziellen Pd-Katalysator (Abbildung 18). Der 1% Pd-TiO<sub>2</sub>-Katalysator erreichte ebenfalls sehr gute  $H_2O_2$ -Bildungsrate von 0.81 mM/h, zeigte dabei jedoch eine deutlich geringere Zersetzungsrate als die Pd-Au-Kombinationen, sowie viel geringere Schwankung zwischen wiederholten Messungen. Aufgrund dieser günstigen Eigenschaften wurde er bevorzugt für Untersuchungen der gesamten Chemo-Enzymatische Reaktion ausgewählt.

Zusätzlich wurden einzelne Spike-Experimente mit dem 1%Pd-TiO<sub>2</sub> Katalysator unter erhöhter Temperatur durchgeführt. Die Ergebnisse (kinetische Konstanten) sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Wie erwartet und auch aus der Literatur bekannt, die Erhöhung der Reaktionstemperatur hindert die  $H_2O_2$ -Bildung, vermutlich durch die geringere Löslichkeit der Reagenzien (hier gasförmiges O<sub>2</sub> als limitierende Komponente) mit der Erhöhung der Temperatur, oder durch Begünstigung der Folgereaktionen des  $H_2O_2$ .

Tabelle 4: Kinetische Daten der  $H_2O_2$  Direktsynthese unter enzymatischen Bedingungen bei erhöhter Temperatur. Weitere Bedingungen: 1%Pd-TiO<sub>2</sub>, 0,1mg/ml, P = 6,3 bar,  $H_2$ -Überschuss, 30ml 10%MeOH-KPi 0,1M pH7

Temperatur (°C)	kB HEBA ( $\mu\text{M h}^{-1}$ )	kD ( $\text{h}^{-1}$ )
22	809 ± 120	7 ± 1.2
30	378 ± 180	2 ± 1.3
35	240 ± 18	5 ± 0.2

**Teil 2 (Kinetik der HEBA-Bildung):** In diesem Arbeitspaket wurde die Tandem-Reaktion der stereoselektiven Ethylbenzoesäure (EBA)-Hydroxylierung zur R-Hydroxyethylbenzoesäure (R-HEBA) durch *AaeUPO* mit in-situ bereitgestelltem  $H_2O_2$  durch die Direktsynthese aus den Elementen über geträgerte Metall-Katalysatoren (Abbildung 19). Diese Reaktion wurde als Modellreaktion für die Kopplung beider Prozesse gewählt.

Wunschprodukt der Reaktion ist die (R)-HEBA. Als Nebenprodukt einer unerwünschten Überoxidation im System könnte auch die Acetylbenzoesäure (ABA) entstehen.

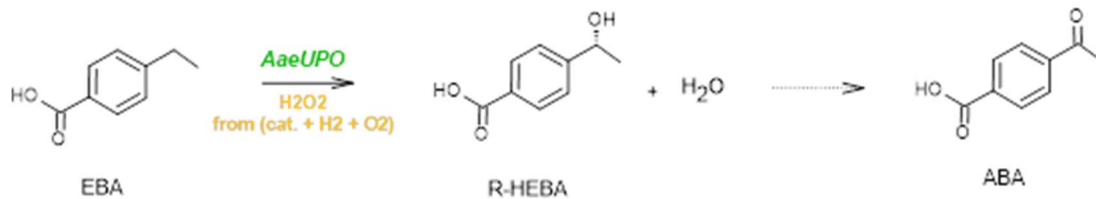


Abbildung 19: Modellreaktion zur Tandemkatalyse: Hydroxylierung von Ethylbenzoesäure (EBA) zur R-Hydroxyethylbenzoesäure (HEBA) durch AaeUPO mit in-situ Bereitstellung von  $H_2O_2$  durch Direktsynthese aus den Elementen  $H_2$  und  $O_2$  über geträgerte Katalysatoren. Als Überoxidationsprodukt könnte die Acetylbenzoesäure (ABA) entstehen.

Die Tandem-Reaktion wurde hauptsächlich hinsichtlich der Enzymmenge untersucht und anhand Kenngrößen wie HEBA-Bildungsrate ( $k_B$ ,  $\mu M h^{-1}$ ), Enzym TON (Turnover number,  $mol_{produkt}/mol_{enzym}$ ) und HEBA-Ausbeute (Y, %) optimiert.

Zur in-situ- $H_2O_2$ -Bereitstellung für das Enzym wurde zunächst der 1% Pd-TiO<sub>2</sub>-Katalysator (KIT) verwendet. Basierend auf den Erkenntnissen aus AP5/Teil 1 wurden reduktive Bedingungen ( $H_2$ -Überschuss) und ein Reaktionsgemisch aus 10% MeOH in einem 100 mM KP<sub>i</sub> Puffer (pH=7) ohne Anwesenheit von NaBr als Standard festgelegt. Die ersten Experimente wurden mit relativ hohen Enzymkonzentrationen (200–500 nM = 5.6–14.0 U/ml) durchgeführt. Abbildung 20 zeigt ein Experiment mit 200nM UPO.

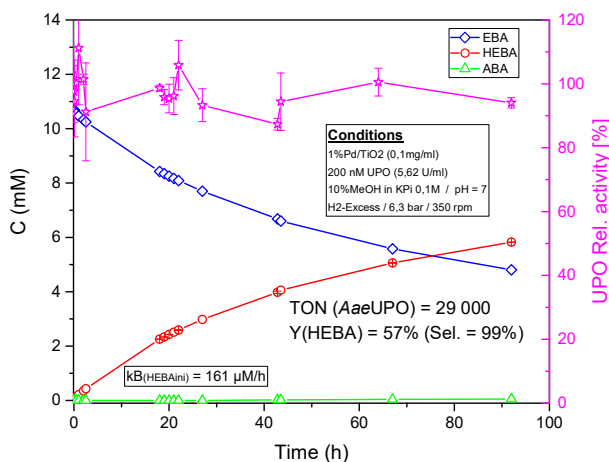


Abbildung 20: EBA-Hydroxylierung mit 200 nM (5.62 U/ml) UPO. Weitere Bedingungen: 0.1 mg/ml 1%Pd-TiO<sub>2</sub> Katalysator; 30 ml Medium = 10%MeOH in KP<sub>i</sub> 0.1M pH7,  $C_{start}(EBA) = 10$  mM,  $T = 22$  °C,  $P=6.3$  bar,  $H_2$ -Überschuss

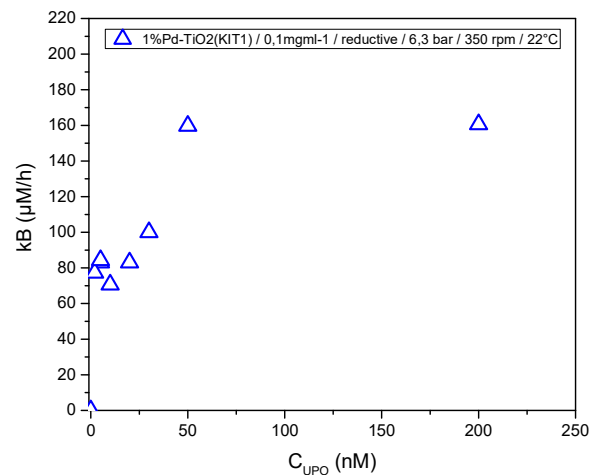


Abbildung 21: HEBA-Bildungsrate ( $k_B$ ) in Abhängigkeit der Enzymkonzentration. Weitere Bedingungen: 0.1 mg/ml 1%Pd-TiO<sub>2</sub> Katalysator; 30 ml Medium = 10%MeOH in KP<sub>i</sub> 0.1 M pH7,  $C_{start}(EBA) = 10$  mM,  $T = 22$  °C,  $P=6.3$  bar,  $H_2$ -Überschuss

Dabei wurde eine HEBA-Bildungsrate von bis zu  $161 \mu M h^{-1}$  und Ausbeute von 57% erreicht. Das Überoxidationsprodukt (ABA) blieb and der unteren Nachweisgrenze der HPLC-Methode – dadurch hatte sich eine hervorragende Selektivität zum Wunschprodukt von 99% gezeigt. Die Turnover Number (TON) des Enzyms blieb jedoch vergleichsweise niedrig (bis 29.000). Interessanterweise nahm die relative Enzymaktivität während der gesamten Reaktionszeit kaum ab und zeigte über 90% Restaktivität (Abbildung 20, rechte y-Achse). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die Enzymmenge schrittweise reduziert auf 50, 30, 20, 10, 5 und 2 nM UPO, um das optimale Verhältnis zwischen minimalem Enzymeinsatz und maximaler HEBA-Bildung zu ermitteln (Abbildung 21).

Ein Kontrollexperiment mit 0 nM UPO bestätigte, dass die One-Pot-Synthese ausschließlich in Anwesenheit des Enzyms stattfindet und nicht durch oxidative Eigenschaften des Metallkatalysators, oder die bloße Präsenz von  $H_2O_2$  im System hervorgerufen wird. Bei einer Erhöhung der Enzymkonzentration von 5 auf 20 nM wurde eine geringe, aber stabile HEBA-Bildungsrate zwischen 75 und 83  $\mu M h^{-1}$  beobachtet (Abbildung 21). Erst ab einer Konzentration von 30 nM UPO stieg die Bildungsrate signifikant an, erreichte jedoch ein Plateau und überschritt bei einer weiteren Erhöhung der Enzymkonzentration auf 50 bis 200 nM nicht mehr 160  $\mu M h^{-1}$  (Abbildung 21).

Ein ähnlicher Sättigungseffekt wurde bei der HEBA-Ausbeute in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration festgestellt (Abbildung 22). Da in allen Experimenten eine exzellente Selektivität von über 99% für das gewünschte Produkt HEBA beobachtet wurde, entspricht die HEBA-Ausbeute (Y, %) direkt dem EBA-Umsatz (X, %). Bis zu einer Enzymkonzentration von ca. 20 nM stieg die HEBA-Ausbeute/EBA-Umsetzung nahezu linear an und erreichte anschließend ein Plateau bei ca. 56%.

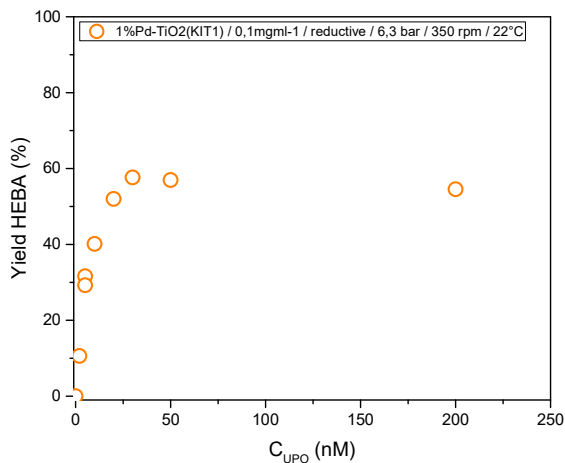


Abbildung 22: HEBA-Ausbeute (Y) in Abhängigkeit der Enzymkonzentration. Weitere Bedingungen: 0.1 mg/ml 1%Pd-TiO<sub>2</sub> Katalysator; 30 ml Medium = 10%MeOH in KP<sub>i</sub> 0.1 M pH7,  $C_{start}(EBA) = 10$  mM,  $T = 22$  °C,  $P=6.3$  bar,  $H_2$ -Überschuss

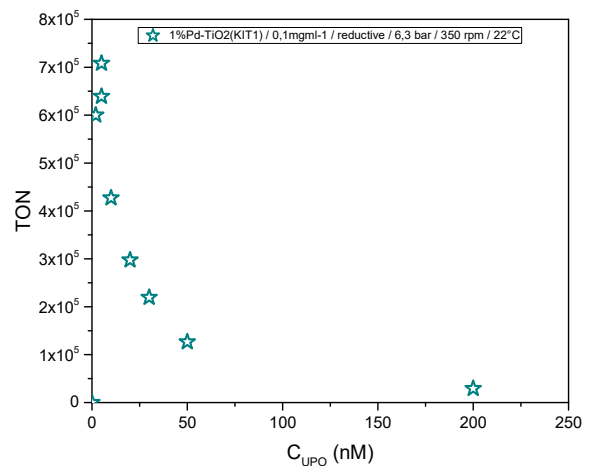


Abbildung 23: Enzym TON in Abhängigkeit der Enzymkonzentration. Weitere Bedingungen: 0.1 mg/ml 1%Pd-TiO<sub>2</sub> Katalysator; 30 ml Medium = 10%MeOH in KP<sub>i</sub> 0.1 M pH7,  $C_{start}(EBA) = 10$  mM,  $T = 22$  °C,  $P=6.3$  bar,  $H_2$ -Überschuss

Die starke Reduktion der Enzymkonzentration um den Faktor 40 (von 200 auf 5 nM) führte zu einem starken Anstieg der Enzym-TON von 29.100 auf bis zu 708.000 (Abbildung 23). Eine weitere Reduktion auf 2 nM brachte keine zusätzliche signifikante Erhöhung der TON, sondern führte lediglich zu Einbußen in der HEBA-Ausbeute. Daher wurde 5 nM UPO als optimale Enzymkonzentration für weitere Versuche festgelegt.

Zusätzlich wurde eine Temperierung auch für die Tandem-Reaktion implementiert und der Effekt von erhöhten Temperaturen untersucht. Abbildung 24 fasst die Daten für die HEBA-Bildungskonstante ( $k_B$ ) und HEBA-Ausbeute (Y) auf der linken y-Achsen und Enzym TON (rechte y-Achse) zusammen.

Die Erhöhung der Reaktionstemperatur hatte unterschiedliche/gegenläufige Effekte auf die drei Parameter gezeigt. Einerseits ist die initiale HEBA-Bildung mit steigender Temperatur angestiegen, andererseits führt eine Erhöhung der Temperatur zu einer schnelleren Enzymdeaktivierung und entsprechender Verringerung der erreichte TON, was wiederum eine Verringerung der maximalen HEBA-Ausbeute bedingte (Abbildung 24).

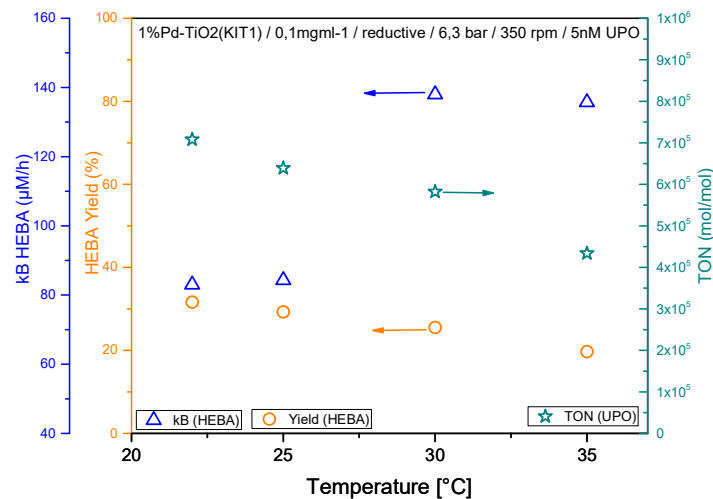


Abbildung 24: HEBA-Bildungskonstante ( $k_B$ ), HEBA-Ausbeute ( $Y$ ) und Enzym TON mit Variation der Reaktionstemperatur. Weitere Bedingungen: 0.1 mg/ml 1%Pd-TiO<sub>2</sub> Katalysator; 30 ml Medium = 10%MeOH in KP<sub>1</sub> 0.1 M pH7,  $C_{start}(EBA) = 10$  mM,  $T = 22$  °C,  $P=6.3$  bar, H<sub>2</sub>-Überschuss

Setzt man die Erkenntnisse der Temperaturabhängigkeit der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung (Tabelle 4) in Korrelation mit der Tandem-Katalyse wird erkenntlich, dass mit steigender Temperatur die HEBA-Bildungsrate ansteigt, obwohl die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildungsrate sinkt. Die niedrigere „in-situ“ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration hat anscheinend einen positiven Einfluss auf die initiale HEBA-Bildungsrate. Grund dafür könnte eine Verringerung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediierten Enzymaktivierung sein. Auf die gesamte Reaktionszeit bezogen wird das Enzym jedoch stärker thermisch inaktiviert, wodurch keine Erhöhung der TON und HEBA-Ausbeute zustande kommt.

## 1.6 Arbeitspaket 6: Identifikation geeigneter Reaktordesigns durch detaillierte Reaktorsimulationen. Bearbeitet durch Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

### ▪ Durchgeführte Arbeiten zum Batch Reaktor:

In diesem Arbeitspaket wurden zwei verschiedene Reaktorkonzepte für die Kopplung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Direktsynthese mit enzymatischen Reaktionen modellbasiert untersucht. Ziel war es, geeignete Reaktordesigns zu identifizieren und ein besseres Verständnis der relevanten Stofftransport- und Reaktionsprozesse zu erhalten.

Ein Schwerpunkt der Arbeiten lag auf der Modellierung des Batch-Reaktors mit Gasphasennachsättigung, wie er in den experimentellen Untersuchungen am DFI eingesetzt wurde. In diesem Reaktorkonzept werden Wasserstoff und Sauerstoff kontinuierlich aus der Gasphase in das flüssige Reaktionsmedium übertragen, wodurch die Konzentration der gasförmigen Edukte im Reaktionssystem aufrechterhalten wird. Zur Beschreibung dieses Systems wurde ein mathematisches Modell in MATLAB entwickelt, das sowohl die Stoffübertragung zwischen Gas- und Flüssigphase als auch die Reaktionskinetik der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung berücksichtigt. Darüber hinaus wurden die zeitlichen Konzentrationsverläufe der gelösten Gase sowie des gebildeten Wasserstoffperoxids im Reaktionsmedium simuliert. Die vom Projektpartner bereitgestellte kinetische Beschreibung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung basiert auf einer Kinetik nullter Ordnung für die Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sowie einer Kinetik erster Ordnung für die Zersetzung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, wie dargestellt in Gl. 1. Auf dieser Grundlage konnten aus Batch-Experimenten die kinetischen Konstanten der Bildung ( $k_B$ ) und der Zersetzung ( $k_D$ ) bestimmt werden. Der in

diesem Ansatz zusammengefasste Verlustterm beschreibt jedoch nicht ausschließlich die direkte Zersetzung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu Wasser und Sauerstoff, sondern umfasst auch andere konkurrierende Reaktionspfade. Experimentelle Untersuchungen der Katalysatoren im kontinuierlichen Mikrofestbettreaktor am KIT zeigten, dass unter den betrachteten Reaktionsbedingungen keine signifikante direkte Zersetzung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  beobachtet wurde. Der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Verbrauch wird daher im Modell überwiegend der Hydrierung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch Wasserstoff zugeschrieben. Diese Beschreibung nach Gl. 1 ist jedoch nur für einen begrenzten experimentellen Bereich gültig, da sie implizit konstante Konzentrationen der gasförmigen Edukte voraussetzt. Für die Modellierung von Reaktoren mit Gas-Flüssig-Stofftransport und variierenden Konzentrationen der gelösten Gase wurde daher eine erweiterte kinetische Beschreibung verwendet. In diesem Ansatz wird die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung als pseudo-erstordentliche Reaktion in Bezug auf die jeweils limitierende gelöste Gaskomponente formuliert:

$$\text{Gl. 2:} \quad r_{\text{form}} = k_B^* \cdot c_{\text{lim}}$$

wobei  $c_{\text{lim}}$  die Konzentration der limitierenden Komponente ( $\text{H}_2$  oder  $\text{O}_2$ ) darstellt und  $k_B^*$  eine effektive Geschwindigkeitskonstante ist. Die ursprüngliche Nullordnungs-Konstante  $k_B$  kann dabei über die Referenzkonzentration der limitierenden Komponente  $c_{\text{lim},0}$  in die pseudo-erstordentliche Form überführt werden:

$$\text{Gl. 3:} \quad k_B^* = \frac{k_B}{c_{\text{lim},0}}$$

Zusätzlich wurden konkurrierende Nebenreaktionen berücksichtigt. Die Hydrierung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurde als Reaktion zweiter Ordnung in Abhängigkeit von Wasserstoff- und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration beschrieben:

$$\text{Gl. 4:} \quad r_{\text{hyd}} = k_H \cdot c_{\text{H}_2} \cdot c_{\text{H}_2\text{O}_2}$$

Darüber hinaus wurde ein paralleler Wasserbildungspfad eingeführt, der proportional zur  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildungsrate angesetzt wurde:

$$\text{Gl. 5:} \quad r_{\text{H}_2\text{O}} = \alpha \cdot r_{\text{form}}$$

Dabei beschreibt der dimensionslose Faktor  $\alpha$  das Verhältnis zwischen der Bildungsrate von Wasser und der Bildungsrate von Wasserstoffperoxid auf dem Katalysator. Die vom Projektpartner bereitgestellte kinetische Beschreibung berücksichtigt ausschließlich die Bildung und Zersetzung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und enthält keinen expliziten Term für die direkte Wasserbildung aus Wasserstoff und Sauerstoff. Da diese Reaktion jedoch einen wichtigen konkurrierenden Reaktionspfad der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Direktsynthese darstellt, wurde sie im Modell zusätzlich berücksichtigt. Literaturberichte zeigen, dass unter typischen Reaktionsbedingungen die Wasserbildung häufig die dominante Reaktion darstellt und die Rate der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung um etwa den Faktor 1 bis 2 übersteigen kann, abhängig von Katalysator, Temperatur und Reaktionsbedingungen. Entsprechend wurde  $\alpha$  im Modell als

variabler Parameter im Bereich  $\alpha \approx 1-2$  betrachtet, um den Einfluss dieses konkurrierenden Reaktionspfades auf die Reaktordynamik zu untersuchen.

Der Stofftransport der gasförmigen Edukte Wasserstoff und Sauerstoff aus dem Gasraum in die Flüssigphase wurde über einen Stoffübergangsansatz beschrieben:

$$\text{Gl. 6: } r_{tr,i} = k_L a_i \cdot (c_i^* - c_i)$$

Hierbei ist  $r_{tr,i}$  die Stoffübergangsrate der Komponente  $i$ ,  $k_L a_i$  der volumetrische Stoffübergangskoeffizient,  $c_i^*$  die Gleichgewichtskonzentration in der Flüssigkeit und  $c_i$  die aktuelle Konzentration in der Flüssigkeit. Die Stoffübertragung von Wasserstoff und Sauerstoff aus dem Gasraum in die Flüssigphase wurde im Modell über einen  $k_L a$ -Ansatz beschrieben. Da es sich bei dem betrachteten Reaktorsystem nicht um einen klassisch begasten Reaktor, sondern um einen Batch-Reaktor mit Gasphasennachsättigung aus dem Headspace handelt, konnten die Stoffübergangskoeffizienten nicht direkt aus Standardkorrelationen für begaste Systeme übernommen werden. Sie wurden anhand experimenteller  $H_2O_2$ -Zeitprofile bestimmt. Hierzu wurde der  $k_L a$  im Modell so angepasst, dass die quadratische Abweichung zwischen simulierten und experimentellen  $H_2O_2$ -Konzentrationsverläufen minimiert wurde. Für die Parameterschätzung wurde der Enzympfad deaktiviert, sodass ausschließlich der chemisch-katalytische Anteil der  $H_2O_2$ -Bildung berücksichtigt wurde.

Die Gleichgewichtskonzentrationen wurden mithilfe des Henry-Gesetzes aus den jeweiligen Partialdrücken im Gasraum berechnet:

$$\text{Gl. 7: } c_i^* = H_i \cdot p_i$$

Die Partialdrücke im Gasraum wurden dabei nicht als konstant angenommen, sondern zeitabhängig aus der idealen Gasgleichung bestimmt, sodass die Abnahme der Gasphaseninventare durch den Stoffübergang in die Flüssigkeit berücksichtigt werden konnte:

$$\text{Gl. 8: } p_i = \frac{n_i \cdot R \cdot T}{V_{Gas}}$$

Auf dieser Grundlage wurden die Stoffbilanzen für die gelösten Komponenten im ideal durchmischten Batch-Reaktor formuliert. Für Wasserstoff, Sauerstoff und Wasserstoffperoxid ergaben sich die folgenden Differentialgleichungen im rein chemisch katalysierten System:

$$\text{Gl. 9: } \frac{dc_{H_2}}{dt} = -r_{form} - r_{hyd} - r_{H_2O} + r_{tr,H_2}$$

$$\text{Gl. 10: } \frac{dc_{O_2}}{dt} = -r_{form} - \frac{1}{2} r_{H_2O} + r_{tr,O_2}$$

$$\text{Gl. 11: } \frac{dc_{H_2O_2}}{dt} = r_{form} - r_{hyd}$$

Zur Untersuchung möglicher Konzentrationsgradienten innerhalb der Katalysatorpartikel wurde ergänzend ein stationäres Diffusions-Reaktionsmodell für ein kugelförmiges Partikel formuliert. Dabei wurden die radialen Konzentrationsprofile von Wasserstoff, Sauerstoff, Wasserstoffperoxid und Wasser im Partikelinneren berechnet. Die Modellierung basiert auf der stationären Stoffbilanz in Kugelkoordinaten, welche Diffusion und Reaktion innerhalb des Partikels koppelt:

$$\text{Gl. 12: } D_{\text{eff},i} = \left( \frac{1}{r^2} \frac{d}{dr} \left( r^2 \frac{dc_i}{dr} \right) \right) + R_i = 0$$

Hierbei ist  $D_{\text{eff},i}$  der effektive Diffusionskoeffizient der Komponente  $i$ ,  $c_i$  die lokale Konzentration im Partikel und  $R_i$  der jeweilige Reaktionsterm. Die Reaktionsterme ergeben sich aus den zuvor eingeführten lokalen Reaktionsraten für  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung, Hydrierung und Wasserbildung.

Die daraus resultierenden gekoppelten Differentialgleichungen wurden als Randwertproblem formuliert und numerisch gelöst. Für das kugelförmige Partikel wurden folgende Randbedingungen verwendet. Im Partikelzentrum wurde aufgrund der Symmetriebedingung kein Stofffluss angenommen:

$$\text{Gl. 13: } \frac{dc_i}{dr=0} = 0$$

An der Partikeloberfläche wurde angenommen, dass die Konzentrationen den Konzentrationen in der umgebenden Flüssigkeit entsprechen:

$$\text{Gl. 14: } c_i(r = R_p) = c_{i,\text{bulk}}$$

Das resultierende Randwertproblem wurde numerisch mit einem geeigneten BVP-Solver gelöst, wodurch die radialen Konzentrationsprofile sowie die lokalen Reaktionsraten innerhalb des Partikels bestimmt werden konnten. Auf dieser Grundlage ließ sich abschätzen, inwieweit sich Konzentrationsgradienten im Partikel ausbilden und wie stark die lokalen Reaktionsraten entlang des Partikelradius variieren.

Ergänzend wurden mögliche Stofftransportlimitierungen auch mithilfe dimensionsloser Kriterien bewertet. Hierzu wurde das Mears-Kriterium zur Abschätzung externer Stofftransportwiderstände verwendet:

$$\text{Gl. 15: } \mathbf{Mears} = \frac{r \cdot \rho_p \cdot R_p}{\beta \cdot c_b}$$

sowie das Weisz-Prater-Kriterium zur Bewertung interner Diffusionslimitierungen im Katalysatorpartikel:

$$\text{Gl. 16: } WP = \frac{r' \cdot \rho_p \cdot R_p^2}{D_{eff} \cdot c_b}$$

Dabei ist  $r'$  die Reaktionsrate bezogen auf die Katalysatormasse,  $R_p$  der Partikelradius,  $\rho_p$  die Partikeldichte,  $\beta$  der externe Stoffübergangskoeffizient und  $c_b$  die Konzentration der limitierenden Komponente in der Flüssigphase. Diese Abschätzungen dienten dazu, die Relevanz externer und interner Stofftransportwiderstände unter den betrachteten Reaktionsbedingungen zu bewerten.

Zur Beschreibung der Tandem-Katalyse wurde das Modell zusätzlich um die enzymatische Umsetzung erweitert. In den im Projekt untersuchten Reaktionen katalysiert die unspezifische Peroxygenase (UPO) die Hydroxylierung aromatischer Substrate wie EBA unter Verwendung von Wasserstoffperoxid als Cosubstrat zu HEBA. Dabei wird  $H_2O_2$  gleichzeitig als Oxidationsmittel verbraucht. Für die Modellierung wurde daher ein zusätzlicher Reaktionsterm eingeführt, der den enzymatischen Verbrauch von  $H_2O_2$  sowie die Bildung des entsprechenden Hydroxylierungsprodukts beschreibt.

Die enzymatische Reaktionsrate wurde auf Grundlage eines kinetischen Ausdrucks für die UPO-katalysierte Umsetzung formuliert. Dieser berücksichtigt sowohl die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der  $H_2O_2$ -Konzentration als auch mögliche Inhibitionseffekte bei höheren Konzentrationen. Der allgemeine kinetische Ausdruck kann in vereinfachter Form als Michaelis-Menten-artige Kinetik dargestellt werden und stammt aus wissenschaftlichen Arbeiten zur Modellierung der Hydroxylierung von EBA zu HEBA durch AaeUPO<sup>2</sup>:

$$\text{Gl. 17: } r_{enz} = \frac{k_{cat} \cdot c_E \cdot c_{H_2O_2} \cdot c_{EBA}}{(K_{M,H_2O_2} + c_{H_2O_2})(K_{M,EBA} + c_{EBA})}$$

Dabei ist  $k_{cat}$  die katalytische Umsatzfrequenz des Enzyms,  $c_E$  die Enzymkonzentration,  $c_{H_2O_2}$  die Konzentration des Cosubstrats Wasserstoffperoxid und  $c_{EBA}$  die Konzentration des organischen Substrats. Die Parameter  $K_{M,H_2O_2}$  und  $K_{M,EBA}$  beschreiben die jeweiligen Michaelis-Konstanten der Reaktion.

Der enzymatische Reaktionsterm wurde direkt in die Stoffbilanzen integriert. Dadurch ergibt sich für die Bilanz von Wasserstoffperoxid im gekoppelten System:

$$\text{Gl. 18: } \frac{dc_{H_2O_2}}{dt} = r_{form} - r_{hyd} - r_{enz}$$

Gleichzeitig wird das organische Substrat verbraucht und das entsprechende Hydroxylierungsprodukt gebildet:

$$\text{Gl. 19: } \frac{dc_{EBA}}{dt} = -r_{enz}$$

$$\text{Gl. 20: } \frac{dc_{HEBA}}{dt} = r_{enz}$$

Darüber hinaus wurde berücksichtigt, dass Enzyme gegenüber hohen  $H_2O_2$ -Konzentrationen empfindlich sind und mit der Zeit deaktiviert werden können. Um diesen Effekt zu beschreiben, wurde ein zusätzlicher Term für die zeitabhängige Abnahme der aktiven Enzymkonzentration eingeführt:

$$\text{Gl. 21: } \frac{dc_E}{dt} = -k_{inact} \cdot c_{H_2O_2}^n \cdot c_E$$

Hierbei beschreibt  $k_{inact}$  eine Inaktivierungskonstante und  $n$  die Abhängigkeit der Inaktivierung von der  $H_2O_2$ -Konzentration. Durch die Einbindung dieser Gleichung kann im Modell die zeitliche Abnahme der enzymatischen Aktivität während der Reaktion berücksichtigt werden.

Durch die Kopplung der chemisch-katalytischen  $H_2O_2$ -Bildung mit der enzymatischen Umsetzung wird im Modell die Dynamik der Tandem-Katalyse abgebildet. Insbesondere kann untersucht werden, in welchem Konzentrationsbereich  $H_2O_2$  gebildet werden muss, um eine effiziente enzymatische Umsetzung zu ermöglichen, ohne gleichzeitig eine schnelle Enzyminaktivierung zu verursachen.

- Durchgeführte Arbeiten zum Festbettreaktor:

Ein weiterer Schwerpunkt lag auf der Modellierung eines kontinuierlichen Festbettreaktors für die  $H_2O_2$ -Direktsynthese. Hierfür wurde ein vereinfachtes Reaktormodell entwickelt, in dem der Festbettreaktor als eine Reihe hintereinander geschalteter idealer kontinuierlicher Rührkesselreaktoren (CSTR) beschrieben wird. Dieses sogenannte Zellenmodell ermöglicht eine Näherung des axialen Konzentrationsprofils entlang des Reaktors und erlaubt die Untersuchung des Einflusses verschiedener Betriebsparameter auf die  $H_2O_2$ -Bildung. Die Simulationen wurden ebenfalls in MATLAB implementiert und dienen der Analyse des Zusammenspiels von Reaktionskinetik, Stofftransport und Reaktorhydrodynamik. Das Modell des Festbettreaktors ist in dem folgenden Fließbild dargestellt (Abbildung 25).

- Erzielte Ergebnisse

Zur Bewertung der vom Projektpartner bereitgestellten kinetischen Beschreibung wurde zunächst das Verhalten des Systems im Batch-Reaktor mit Gasphasennachsättigung für einen repräsentativen Katalysator (1 % Pd/TiO<sub>2</sub>) simuliert. Grundlage bildete die ursprünglich bestimmte Kinetik nullter Ordnung für die  $H_2O_2$ -Bildung sowie erster Ordnung für den  $H_2O_2$ -Verlust. Die Simulation wurde sowohl für reduzierende als auch für oxidierende Betriebsbedingungen durchgeführt, wobei jeweils eine der beiden gasförmigen Komponenten im Überschuss vorlag.

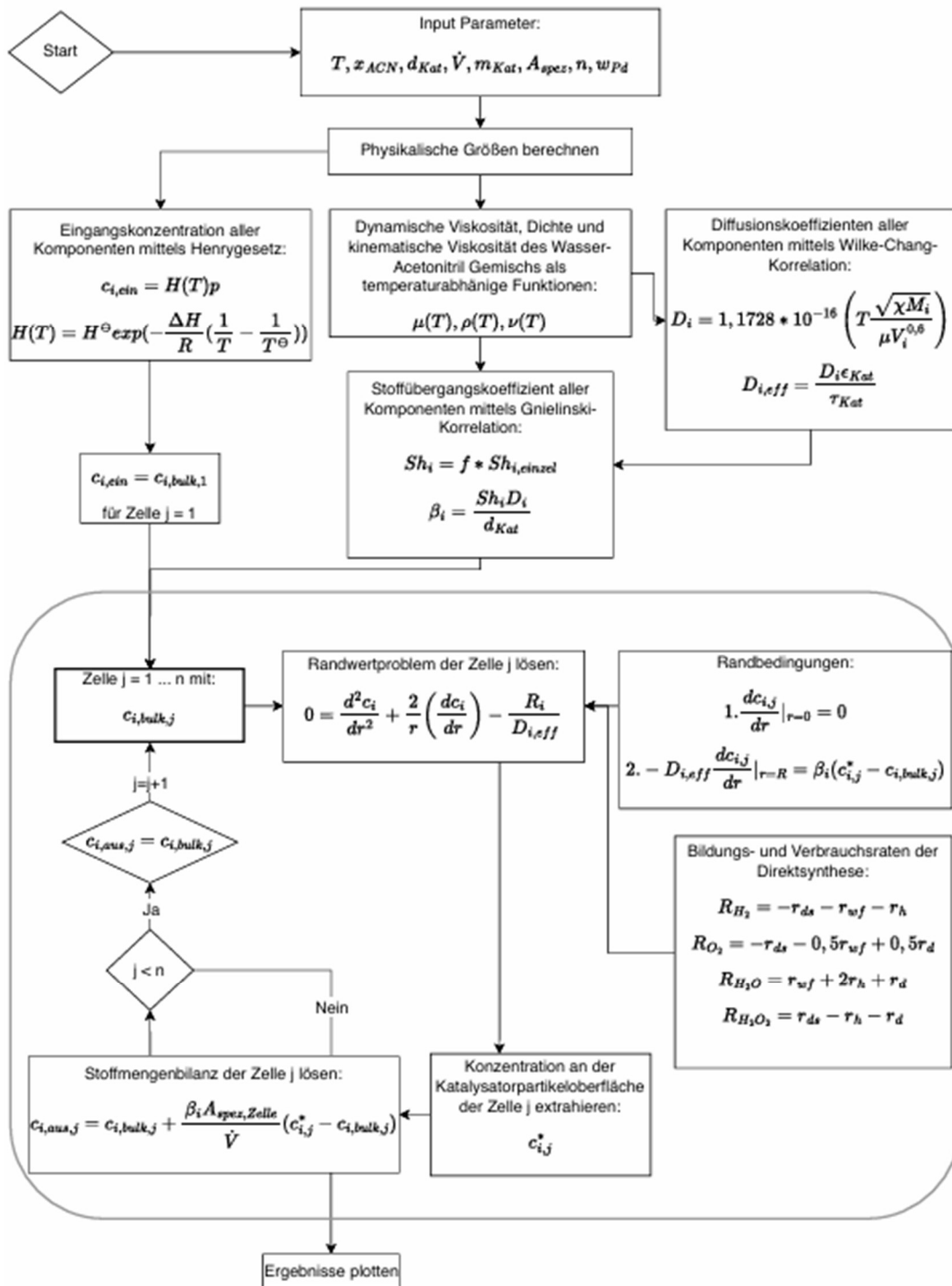


Abbildung 25: Fließschema des Zellenmodells für die  $H_2O_2$ -Direksynthese im Mikrofestbettreaktor ohne konsekutive Enzymkatalyse.

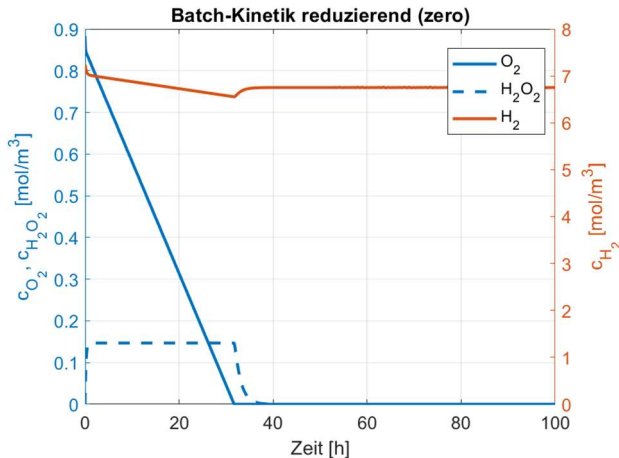


Abbildung 26: Simulierte Konzentrationsverläufe von  $O_2$ ,  $H_2$  und  $H_2O_2$  im Batch-Reaktor unter reduzierenden Bedingungen für 1 % Pd/TiO<sub>2</sub> auf Grundlage der vom Projektpartner bereitgestellten Nullordnungs-Kinetik.

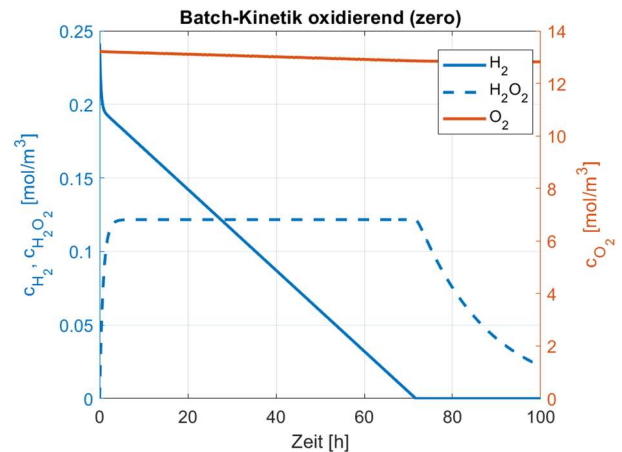


Abbildung 27: Simulierte Konzentrationsverläufe von  $H_2$ ,  $O_2$  und  $H_2O_2$  im Batch-Reaktor unter oxidierenden Bedingungen für 1 % Pd/TiO<sub>2</sub> auf Grundlage der ursprünglichen kinetischen Beschreibung.

Die Simulationsergebnisse zeigen jedoch, dass diese kinetische Beschreibung nur eingeschränkt geeignet ist, das reale Reaktionssystem abzubilden. Die Annahme einer konstanten Bildungsrate impliziert, dass die Konzentrationen der gelösten Gase keinen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit haben. Dies steht im Widerspruch zu den experimentellen Beobachtungen sowie zu der physikalischen Erwartung für ein Gas-Flüssig-Reaktionssystem, in dem die Reaktionsrate von den gelösten Konzentrationen der Edukte abhängen sollte. Insbesondere kann mit der Nullordnungs-Kinetik weder der Einfluss variierender Gaslöslichkeiten noch der Stofftransport zwischen Gas- und Flüssigphase adäquat beschrieben werden.

Aus diesem Grund wurde die kinetische Beschreibung erweitert und die  $H_2O_2$ -Bildung als pseudo-erstordentliche Reaktion in Bezug auf die jeweils limitierende gelöste Gaskomponente formuliert, wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben. Durch diese Formulierung wird die Abhängigkeit der Reaktionsrate von den gelösten Konzentrationen der gasförmigen Edukte explizit berücksichtigt. Auf Basis dieser erweiterten kinetischen Beschreibung wurden erneut Simulationen für reduzierende und oxidierende Betriebsbedingungen durchgeführt. Die entsprechenden Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen dargestellt. Im Gegensatz zur ursprünglichen Nullordnungs-Kinetik zeigt sich hierbei eine deutliche Abhängigkeit der  $H_2O_2$ -Bildungsrate von der jeweiligen Konzentration der limitierenden Komponente, wodurch der zeitliche Verlauf der Reaktion realistischer beschrieben werden kann. Die mit der erweiterten kinetischen Beschreibung berechneten Konzentrationsverläufe sind in Abbildung 28 und Abbildung 29 dargestellt. Unter reduzierenden Bedingungen (Abbildung 28) wird die Reaktion durch die Sauerstoffkonzentration bestimmt, während Wasserstoff im Überschuss vorliegt. Mit abnehmender Sauerstoffkonzentration reduziert sich die Bildungsrate von  $H_2O_2$  kontinuierlich. Unter oxidierenden Bedingungen (Abbildung 29) stellt dagegen Wasserstoff die limitierende Komponente dar, während Sauerstoff im Überschuss vorhanden ist. Auch hier führt die Konzentrationsabhängigkeit der Reaktionsrate zu einem kontinuierlichen Abfall der Bildungsrate im Verlauf der Reaktion.

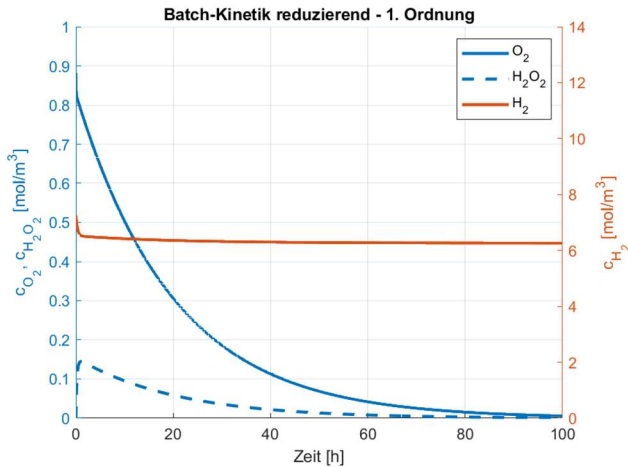


Abbildung 28: Simulierte Konzentrationsverläufe von  $O_2$ ,  $H_2$  und  $H_2O_2$  im Batch-Reaktor unter reduzierenden Bedingungen für 1 % Pd/TiO<sub>2</sub> auf Grundlage der beschriebenen Kinetik 1. Ordnung.

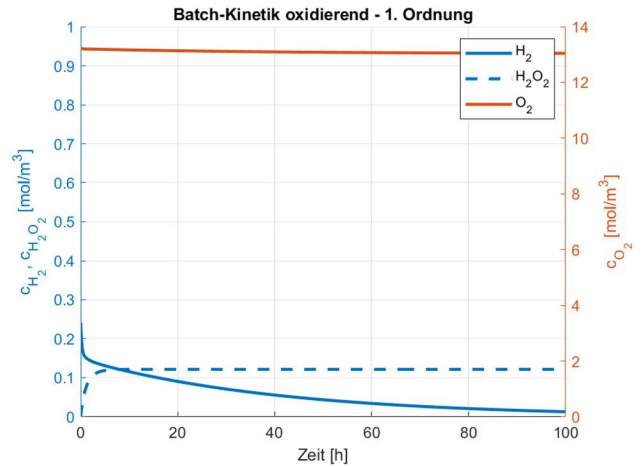


Abbildung 29: Simulierte Konzentrationsverläufe von  $H_2$ ,  $O_2$  und  $H_2O_2$  im Batch-Reaktor unter oxidierenden Bedingungen für 1 % Pd/TiO<sub>2</sub> auf Grundlage der beschriebenen Kinetik 1. Ordnung.

Um zu evaluieren, ob das System kinetisch oder Stofftransport limitiert bzw. kontrolliert ist, wurden entsprechende Kriterien wie Mears (äußerer Stofftransport) und Weisz-Prater (innerer Stofftransport) sowie Konzentrationsverläufe der Gase und der Produkte im Katalysatorpartikel modelliert (Abbildung 30, Abbildung 31).

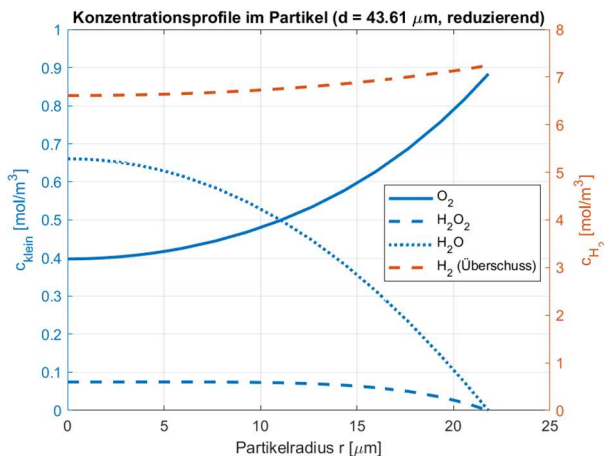


Abbildung 30: Radiale Konzentrationsprofile der Reaktionskomponenten im Katalysatorpartikel unter reduzierenden Bedingungen (1 % Pd/TiO<sub>2</sub>).

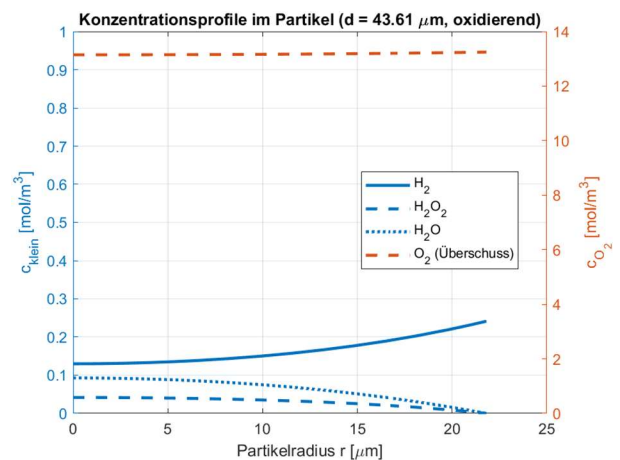


Abbildung 31: Radiale Konzentrationsprofile der Reaktionskomponenten im Katalysatorpartikel unter oxidierenden Bedingungen (1 % Pd/TiO<sub>2</sub>).

Aus den berechneten radialen Konzentrationsprofilen ist ersichtlich, dass sich innerhalb des Katalysatorpartikels deutliche Konzentrationsgradienten ausbilden. Dies deutet darauf hin, dass unter den betrachteten Bedingungen interne Diffusionswiderstände auftreten können, wodurch die effektive Reaktionsrate im Partikelinneren reduziert wird. Für die betrachteten Bedingungen ergeben sich sowohl für das Mears-Kriterium als auch für das Weisz-Prater-Kriterium Werte oberhalb der üblichen Grenzbereiche, was darauf hinweist, dass Stofftransportprozesse einen relevanten Einfluss auf die beobachteten Reaktionsraten haben können. Mit fortschreitender Reaktion kann sich dieser Effekt zusätzlich verstärken, da die Konzentrationen der Edukte im Reaktionsmedium kontinuierlich abnehmen. Dadurch sinken auch die Konzentrationsgradienten zwischen Gas- und Flüssigphase sowie innerhalb der Katalysatorpartikel, was die effektiven Reaktionsraten

weiter beeinflussen kann. Darüber hinaus zeigt die Abschätzung der Stoffübergangskoeffizienten, dass der externe Stoffübergangskoeffizient  $\beta$  mit zunehmender Partikelgröße deutlich abnimmt. Kleinere Partikelgrößen können daher zur Verbesserung des Stofftransports beitragen. Eine weitere Möglichkeit zur Verringerung von Stofftransportlimitierungen besteht in der Erhöhung der gelösten Konzentrationen der gasförmigen Edukte. Unter reduzierenden Bedingungen betrifft dies insbesondere die Sauerstoffkonzentration, während unter oxidierenden Bedingungen die Wasserstoffkonzentration die limitierende Größe darstellt. Die zeitlichen Verläufe der Headspace-Zusammensetzung und der Partialdrücke über eine Versuchszeit von 100 Stunden für den oxidierenden und reduzierenden Fall sind nachfolgend in Abbildung 32 und Abbildung 33 dargestellt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass unter experimentellen Bedingungen Probenahmen einen Einfluss auf den Gesamtdruck sowie die Gaszusammensetzung im Headspace haben können.

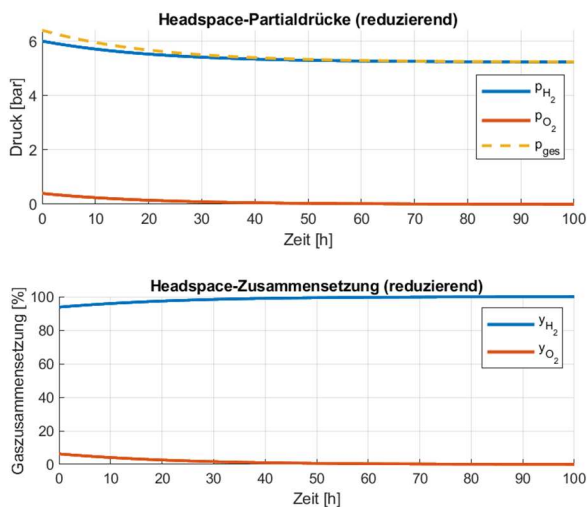


Abbildung 32: Partialdrücke und Headspace Zusammensetzung des Batch Reaktors im oxidierenden Fall.

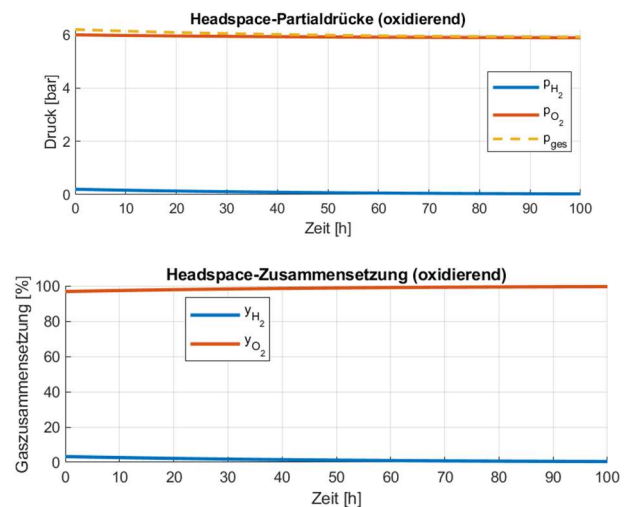


Abbildung 33: Partialdrücke und Headspace Zusammensetzung des Batch Reaktors im oxidierenden Fall.

Zur Bewertung der Modellgüte wurden die simulierten Konzentrationsverläufe anschließend mit experimentellen  $H_2O_2$ -Zeitprofilen aus Batch-Experimenten verglichen wie dargestellt in Abbildung 34 und Abbildung 35 – hier zunächst ohne Berücksichtigung der Enzymkatalyse. Abbildung 34 zeigt den Vergleich zwischen Modell und experimentellen Daten für die  $H_2O_2$ -Bildung unter reduzierenden Bedingungen, während Abbildung 35 den entsprechenden Vergleich unter oxidierenden Bedingungen darstellt. In beiden Fällen beschreibt das Modell den qualitativen Verlauf der experimentellen Daten gut, wobei die Datensätze um das Modell schwanken. Unter reduzierenden Bedingungen liegt Wasserstoff im Überschuss vor, während Sauerstoff die limitierende Komponente darstellt. Dadurch ist die Anfangsgeschwindigkeit der  $H_2O_2$ -Bildung vergleichsweise hoch. Mit zunehmender Reaktionszeit steigt jedoch gleichzeitig die Hydrierungsrate von  $H_2O_2$  an, da diese proportional zu den Konzentrationen von  $H_2$  und  $H_2O_2$  ist. Sobald die Hydrierungsrate die Bildungsrate übersteigt, nimmt die  $H_2O_2$ -Konzentration wieder ab, wodurch das charakteristische Maximum der  $H_2O_2$ -Konzentration zu frühen Reaktionszeiten entsteht, das sowohl im Experiment als auch im Modell beobachtet wird. Unter oxidierenden Bedingungen ist hingegen Wasserstoff die limitierende Komponente, während Sauerstoff im Überschuss vorliegt. Die Hydrierung von  $H_2O_2$  ist in diesem Fall weniger ausgeprägt, da sie direkt von der Wasserstoffkonzentration abhängt. Die  $H_2O_2$ -Konzentration steigt daher langsamer an und nähert sich im Verlauf der Reaktion einem Plateau an, wenn sich Bildungs- und Abbaurate annähern.

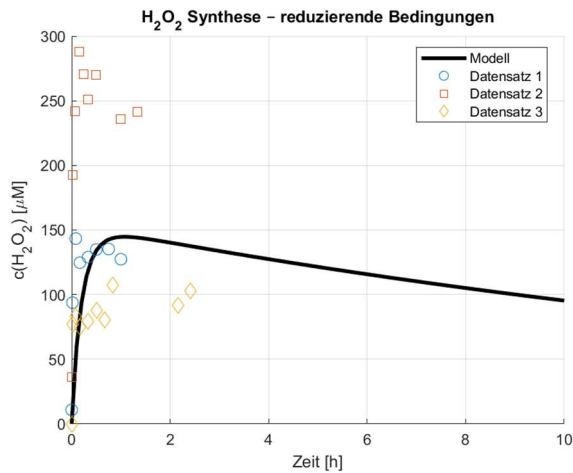


Abbildung 34: Vergleich der experimentellen  $H_2O_2$ -Konzentrationsverläufe mit den Simulationsergebnissen des kinetischen Modells unter reduzierenden Bedingungen für 1 % Pd/TiO<sub>2</sub> bei einer Katalysatorkonzentration von 0.1 mg mL<sup>-1</sup>.

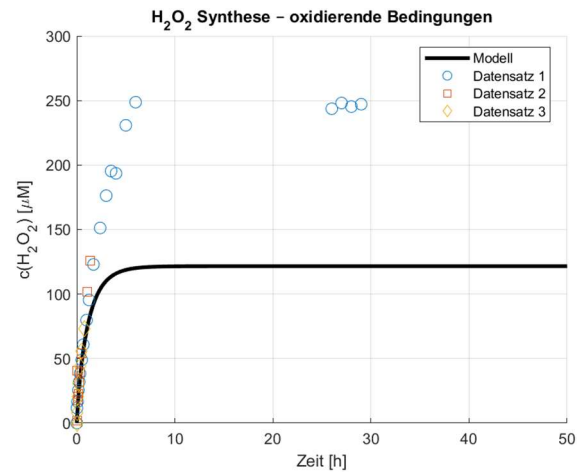


Abbildung 35: Vergleich der experimentellen  $H_2O_2$ -Konzentrationsverläufe mit den Simulationsergebnissen des kinetischen Modells unter oxidierenden Bedingungen für 1 % Pd/TiO<sub>2</sub> bei einer Katalysatorkonzentration von 0.1 mg mL<sup>-1</sup>.

Für die geplante Kopplung der  $H_2O_2$ -Direktsynthese mit der enzymatischen Umsetzung durch UPO-Enzyme ist insbesondere die hohe anfängliche Bildungsrate unter reduzierenden Bedingungen vorteilhaft. Das gebildete  $H_2O_2$  kann unmittelbar vom Enzym umgesetzt werden, wodurch eine Akkumulation im Reaktionsmedium reduziert und gleichzeitig unerwünschte Nebenreaktionen wie die Hydrierung von  $H_2O_2$  vermindert werden können. Zur Untersuchung dieses Effekts wurde das entwickelte Reaktormodell um die enzymatische Umsetzung durch UPO erweitert. Dabei wurden sowohl der enzymatische Verbrauch von  $H_2O_2$  als auch die Bildung des Hydroxylierungsprodukts berücksichtigt. Zusätzlich wurde eine mögliche zeitabhängige Inaktivierung des Enzyms in das Modell integriert.

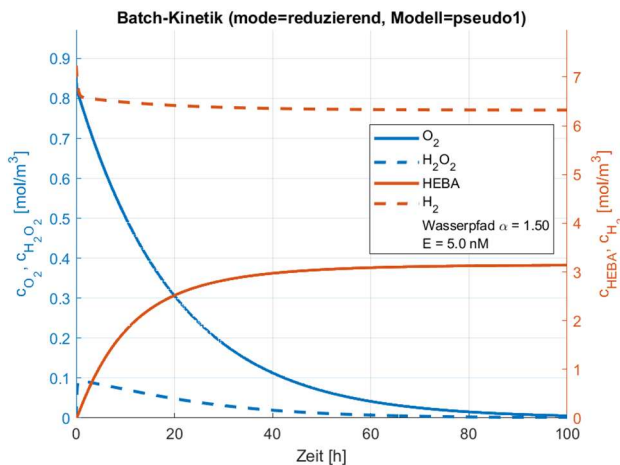


Abbildung 36: Simulierte zeitliche Konzentrationsverläufe der Reaktionskomponenten im gekoppelten System aus  $H_2O_2$ -Direktsynthese und enzymatischer Hydroxylierung unter reduzierenden Bedingungen. Dargestellt sind die Konzentrationen von  $H_2$ ,  $O_2$ ,  $H_2O_2$  sowie des Produkts HEBA für eine Enzymkonzentration von 5 nM und einen Wasserbildungspfad mit  $\alpha = 1.5$ .

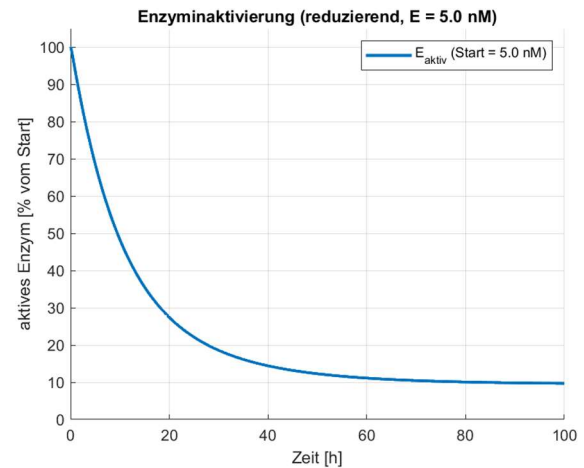


Abbildung 37: Simulierte Konzentrationsverläufe von  $H_2$ ,  $O_2$ ,  $H_2O_2$  und HEBA im gekoppelten System aus  $H_2O_2$ -Direktsynthese und enzymatischer Umsetzung unter reduzierenden Bedingungen ( $E = 5 \text{ nM}$ )

Abbildung 36 zeigt die simulierten Konzentrationsverläufe der Reaktionskomponenten im gekoppelten System aus  $H_2O_2$ -Direktsynthese und enzymatischer Umsetzung unter reduzierenden Bedingungen. Zu Beginn der Reaktion ist die Konzentration der Edukte hoch, wodurch eine hohe  $H_2O_2$ -Bildungsrate erreicht wird. Das

gebildete  $H_2O_2$  wird unmittelbar vom Enzym als Oxidationsmittel für die Hydroxylierung von EBA zu HEBA genutzt. Dadurch bleibt die  $H_2O_2$ -Konzentration im Reaktionsmedium vergleichsweise niedrig, während gleichzeitig eine kontinuierliche Produktbildung beobachtet wird. Mit fortschreitender Reaktionszeit nimmt die  $H_2O_2$ -Bildungsrate aufgrund der abnehmenden Konzentration der limitierenden Komponente ( $O_2$ ) ab. Parallel dazu steigt die Konzentration des Produkts HEBA an, während das Substrat EBA entsprechend umgesetzt wird. Da  $H_2$  weiterhin im Überschuss vorliegt, bleibt dessen Konzentration über den betrachteten Zeitraum nahezu konstant. Abbildung 37 zeigt zusätzlich den simulierten zeitlichen Verlauf der Enzyminaktivierung. Aufgrund der Anwesenheit von  $H_2O_2$  nimmt die aktive Enzymkonzentration im Verlauf der Reaktion kontinuierlich ab. Besonders zu Beginn der Reaktion, wenn die  $H_2O_2$ -Bildungsrate hoch ist, erfolgt eine schnelle Deaktivierung des Enzyms. Mit abnehmender  $H_2O_2$ -Konzentration verlangsamt sich dieser Prozess, sodass nach längeren Reaktionszeiten nur noch ein geringer Anteil des Enzyms aktiv ist. In den folgenden Abbildungen sind die simulierten Konzentrationsverläufe sowie die Enzymkonzentration unter oxidativen Bedingungen dargestellt.

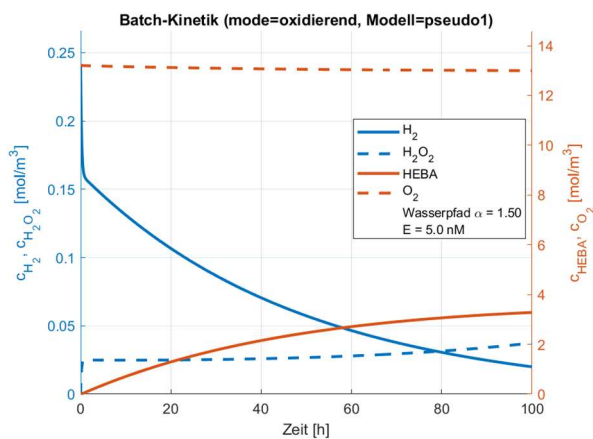


Abbildung 38: Simulierte zeitliche Konzentrationsverläufe der Reaktionskomponenten im gekoppelten System aus  $H_2O_2$ -Direktsynthese und enzymatischer Hydroxylierung unter oxidierenden Bedingungen. Dargestellt sind die Konzentrationen von  $H_2$ ,  $O_2$ ,  $H_2O_2$  sowie des Produkts HEBA für eine Enzymkonzentration von 5 nM und einen Wasserbildungspfad mit  $\alpha = 1.5$ .

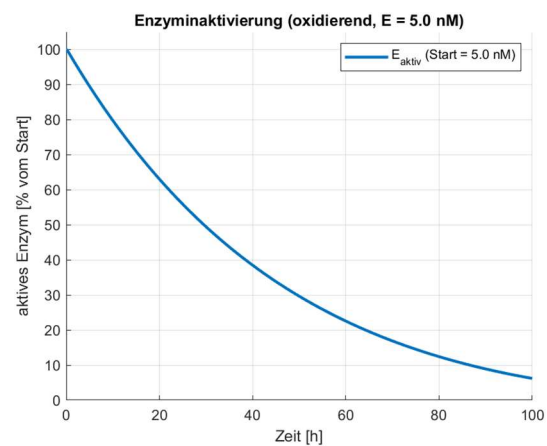


Abbildung 39: Simulierte Konzentrationsverläufe von  $H_2$ ,  $O_2$ ,  $H_2O_2$  und HEBA im gekoppelten System aus  $H_2O_2$ -Direktsynthese und enzymatischer Umsetzung unter oxidierenden Bedingungen ( $E = 5 \text{ nM}$ )

Im Vergleich zu den reduzierenden Bedingungen verläuft die gekoppelte Reaktion unter oxidierenden Bedingungen deutlich langsamer (Abbildung 38). Die  $H_2O_2$ -Bildung ist aufgrund der limitierenden Wasserstoffkonzentration geringer, sodass auch die Bildung von HEBA langsamer erfolgt und erst zu späteren Reaktionszeiten ein Plateau erreicht wird. Gleichzeitig wird  $H_2O_2$  weniger stark akkumuliert und  $H_2$  liegt in einer deutlich geringeren Konzentration vor, wodurch unerwünschte Nebenreaktionen abgeschwächt werden. Nach langen Reaktionszeiten ergibt sich dadurch trotz geringerer Anfangsgeschwindigkeit eine leicht höhere HEBA-Konzentration als unter reduzierenden Bedingungen.

Zum Abschluss wurde das entwickelte Modell für verschiedene Enzymkonzentrationen mit experimentellen Daten verglichen (Abbildung 40 - Abbildung 45). Hierzu wurden Batch-Experimente mit 2, 5, 10, 20, 50 und 200 nM UPO unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt und die zeitlichen Konzentrationsverläufe von EBA und HEBA sowie die Enzymaktivität mit den Simulationsergebnissen verglichen.

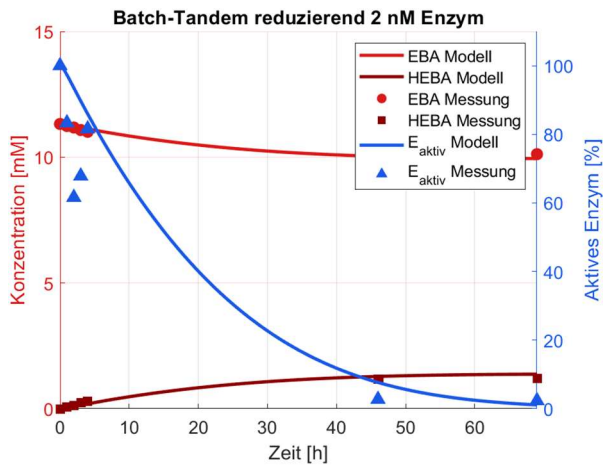


Abbildung 40: Vergleich von Modell und Experiment für die Tandemreaktion unter reduzierenden Bedingungen (2 nM UPO). Dargestellt sind EBA- und HEBA-Konzentrationen sowie die Enzymaktivität.

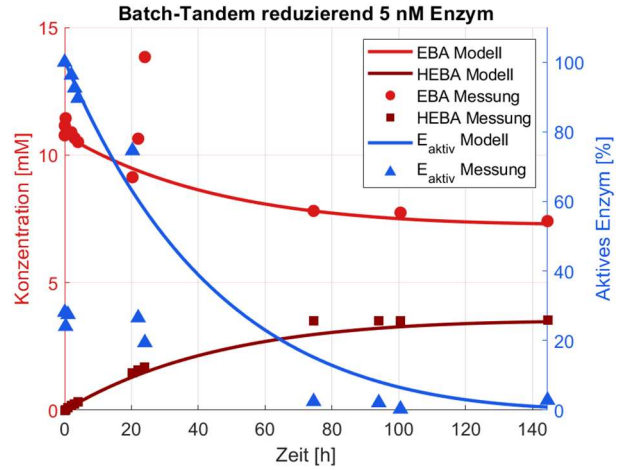


Abbildung 41: Vergleich von Modell und Experiment für die Tandemreaktion unter reduzierenden Bedingungen (5 nM UPO). Dargestellt sind EBA- und HEBA-Konzentrationen sowie die Enzymaktivität.

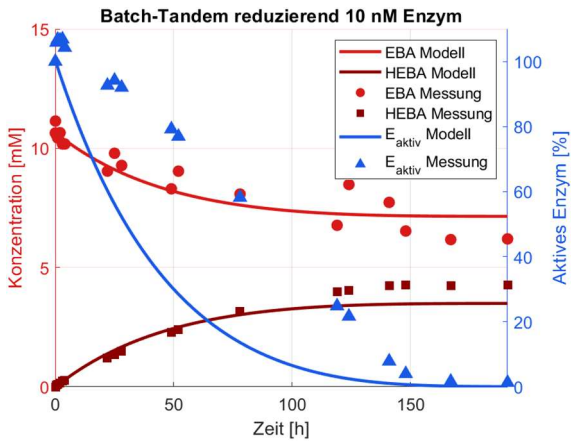


Abbildung 42: Vergleich von Modell und Experiment für die Tandemreaktion unter reduzierenden Bedingungen (10 nM UPO). Dargestellt sind EBA- und HEBA-Konzentrationen sowie die Enzymaktivität.

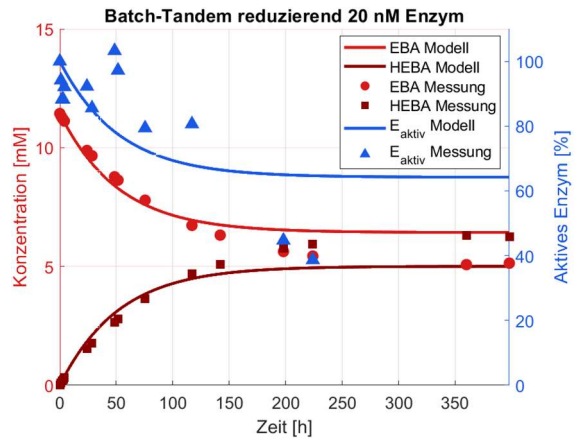


Abbildung 44: Vergleich von Modell und Experiment für die Tandemreaktion unter reduzierenden Bedingungen (20 nM UPO). Dargestellt sind EBA- und HEBA-Konzentrationen sowie die Enzymaktivität.

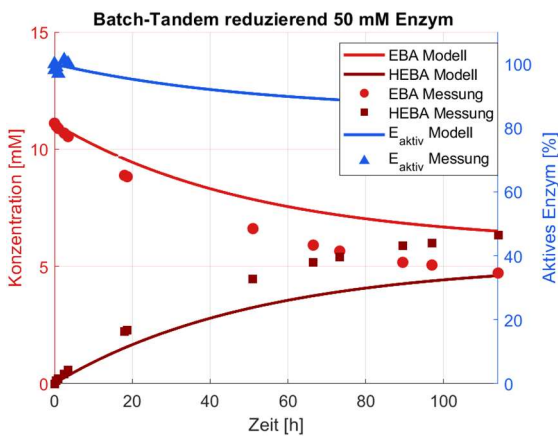


Abbildung 43: Vergleich von Modell und Experiment für die Tandemreaktion unter reduzierenden Bedingungen (50 nM UPO). Dargestellt sind EBA- und HEBA-Konzentrationen sowie die Enzymaktivität.

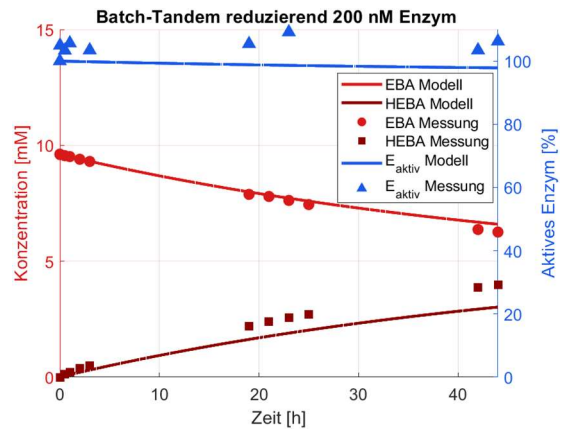


Abbildung 45: Vergleich von Modell und Experiment für die Tandemreaktion unter reduzierenden Bedingungen (200 nM UPO). Dargestellt sind EBA- und HEBA-Konzentrationen sowie die Enzymaktivität.

Insgesamt beschreibt das Modell die experimentellen Ergebnisse qualitativ gut. Insbesondere die Bildung von HEBA aus EBA wird über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich der Enzyme zuverlässig abgebildet. Die simulierten Konzentrationsverläufe zeigen eine gute Übereinstimmung mit den experimentell beobachteten Trends der Substratumsetzung und Produktbildung. Die zeitliche Abnahme der Enzymaktivität kann durch das Modell ebenfalls qualitativ erfasst werden. Allerdings zeigen sich insbesondere bei höheren Enzymkonzentrationen zunehmende Abweichungen zwischen Modell und Experiment. Dies deutet darauf hin, dass die im Modell verwendete vereinfachte Beschreibung der Enzyminaktivierung die realen Deaktivierungsmechanismen nur näherungsweise abbildet. Ein Vergleich zwischen Modell und Experiment konnte nur für reduzierende Bedingungen durchgeführt werden, da für oxidierende Bedingungen keine entsprechenden experimentellen Datensätze vorlagen. Das Modell ermöglicht jedoch auch für diesen Betriebsmodus eine Abschätzung des Reaktionsverhaltens und wurde daher ergänzend zur Analyse der Reaktionsdynamik unter oxidierenden Bedingungen eingesetzt. Insgesamt zeigt das Modell, dass die gekoppelte Beschreibung von  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Direktsynthese, enzymatischer Umsetzung und Enzyminaktivierung geeignet ist, die wesentlichen Trends der Tandem-Katalyse zu erfassen und den Einfluss von Reaktionsbedingungen auf die Produktbildung abzuschätzen.

Es wurde ergänzend ein betriebenen Mikro-Festbettreaktors entwickelt, wie er auch experimentell am KIT eingesetzt wurde. Im Fokus dieser Modellierung stand zunächst ausschließlich die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Direktsynthese auf dem heterogenen Katalysator. Die enzymatische Umsetzung wurde in diesem Schritt noch nicht berücksichtigt, da das Hauptziel darin bestand, das Verhalten der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung sowie mögliche Stofftransport- und Reaktionslimitierungen im Festbettreaktor zu analysieren. Im Rahmen der Modellierung wurde zunächst versucht, eine eigene kinetische Beschreibung auf Grundlage der im Projekt erhobenen experimentellen Daten zu entwickeln. Aufgrund einer begrenzten Reproduzierbarkeit der experimentellen Ergebnisse konnte jedoch keine ausreichend robuste Kinetik abgeleitet werden. Daher wurde für die weitere Modellierung auf eine in der Literatur beschriebene kinetische Formulierung für die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Direktsynthese zurückgegriffen<sup>3</sup>.

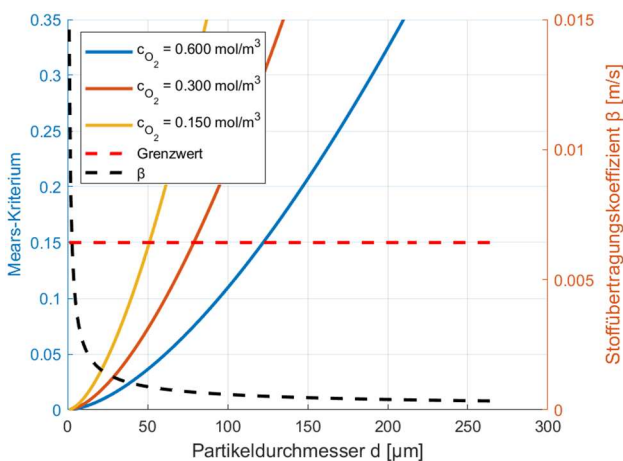


Abbildung 46: Berechnung des Mears-Kriteriums und des externen Stoffübergangskoeffizienten  $\beta$  in Abhängigkeit vom Partikeldurchmesser für verschiedene Sauerstoffkonzentrationen im Festbettreaktor.

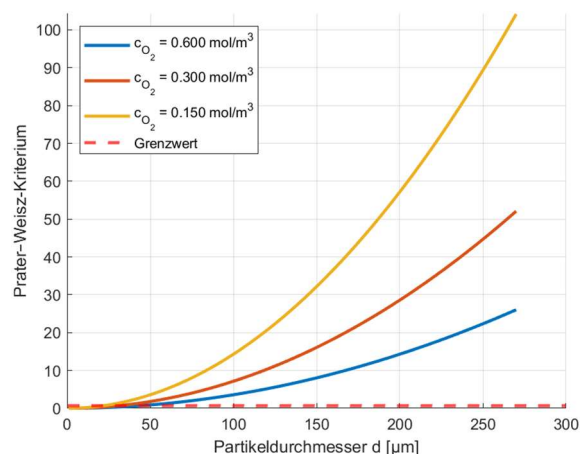


Abbildung 47: Berechnung des Weisz-Prater-Kriteriums zur Bewertung interner Diffusionslimitierungen in Abhängigkeit vom Partikeldurchmesser für verschiedene Sauerstoffkonzentrationen.

Auf Basis dieser kinetischen Beschreibung wurde der Festbettreaktor als eine Reihe ideal durchmischter Reaktionszellen modelliert, wodurch axiale Konzentrationsprofile der Reaktanden und Produkte entlang des

Reaktors berechnet werden konnten. Zunächst wurden auf Grundlage der experimentell ermittelten Reaktionsraten erneut Abschätzungen möglicher Stofftransportlimitierungen vorgenommen. Hierzu wurden das Mears-Kriterium für externe Stofftransportwiderstände (Abbildung 46) sowie das Weisz-Prater-Kriterium für interne Diffusionslimitierungen in Abhängigkeit vom Partikeldurchmesser (Abbildung 47) berechnet. Betrachtet man die Partikelgrößenverteilung (PGV) des eingesetzten 1 % Pd/TiO<sub>2</sub>-Katalysators, liegt der Großteil der Partikel im Bereich von etwa 30 µm bis 60 µm. Auf Basis der berechneten Parameter würde eine Limitierung durch äußeren Stofftransport gemäß dem Mears-Kriterium erst bei hohen Umsätzen auftreten. Es ist jedoch möglich, dass bereits bei geringeren Umsätzen Stofftransportlimitierungen auftreten, da die verwendete beobachtbare Reaktionsrate aus der am Reaktorauslass gemessenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration bestimmt wird. Diese stellt eine Nettokonzentration dar, bei den Verlusten durch Hydrierung bereits enthalten sind. Da ein Teil des gebildeten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch Hydrierung umgesetzt wird, kann die tatsächliche intrinsische Reaktionsrate höher sein als die berechnete beobachtbare Rate. Dadurch könnte eine Limitierung durch äußeren Stofftransport unterschätzt werden.

Für die interne Diffusion zeigt das Weisz-Prater-Kriterium deutlichere Effekte. Aufgrund der quadratischen Abhängigkeit vom Partikeldurchmesser wird der Grenzwert von 0.6 bereits für Partikelgrößen oberhalb von etwa 70 µm überschritten. Mit zunehmender Partikelgröße und damit größerem Diffusionsweg zu den aktiven Zentren innerhalb der Poren gewinnt die Diffusion zunehmend Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Bei geringeren Sauerstoffkonzentrationen wird der Grenzwert bereits bei kleineren Partikeln erreicht, da das Substrat im Porenraum schneller umgesetzt wird, als es nachdiffundieren kann. Damit ist davon auszugehen, dass unter den betrachteten Bedingungen sowohl äußere als auch innere Stofftransportlimitierungen eine Rolle spielen und daher im Modell berücksichtigt werden müssen.

In den Abbildung 48 und Abbildung 49 werden die Simulationsergebnisse beider kinetischer Ansätze – d.h. der vom Gemo et al. sowie der oben erarbeitete Ansatz basierend auf den kinetischen Untersuchungen vom DFI für den Festbettreaktor gegenübergestellt, um den Einfluss der unterschiedlichen kinetischen Beschreibungen auf die berechneten Konzentrationsprofile im Reaktor zu vergleichen.

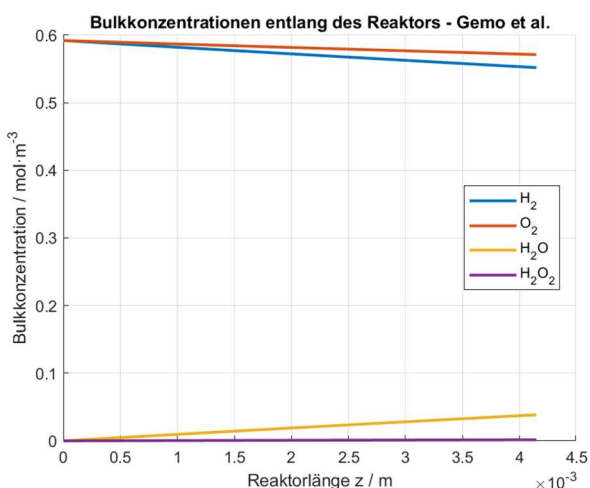


Abbildung 48: Simulierte axiale Konzentrationsprofile im Mikro-Festbettreaktor auf Basis der kinetischen Beschreibung nach Gemo et al.

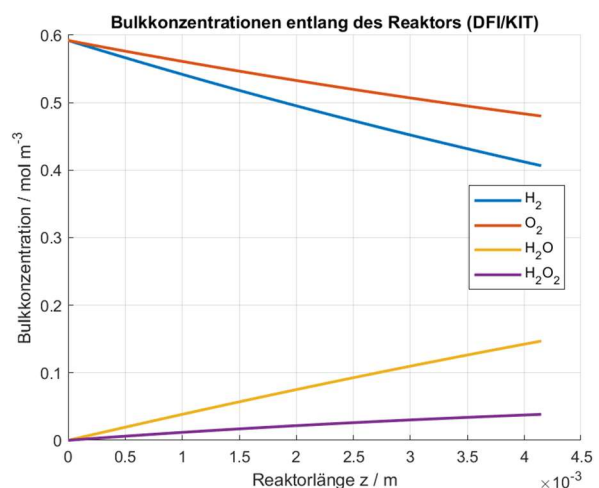


Abbildung 49: Simulierte axiale Konzentrationsprofile im Mikro-Festbettreaktor auf Basis der aus Batch-Experimenten (DFI/KIT) abgeleiteten kinetischen Beschreibung.

Die beiden kinetischen Ansätze führen zu deutlich unterschiedlichen Konzentrationsprofilen entlang des Festbettreaktors. Bei Verwendung der kinetischen Beschreibung nach Gemo et al. ergibt sich unter den

betrachteten Reaktionsbedingungen nur eine sehr geringe Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Trotz einer Katalysatormasse von 16 mg und einem Volumenstrom von  $5 \text{ mL min}^{-1}$  wird entlang der gesamten Reaktorlänge nur eine minimale Produktkonzentration berechnet. Im Gegensatz dazu zeigt die auf den Batch-Experimenten basierende kinetische Beschreibung (DFI/KIT) eine deutlich stärkere Umsetzung der Edukte und eine relevante Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  entlang des Reaktors. Entsprechend nimmt die Konzentration von Wasserstoff und Sauerstoff stärker ab, während gleichzeitig höhere Konzentrationen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Wasser entstehen. Dies deutet darauf hin, dass die aus den eigenen experimentellen Daten abgeleitete Kinetik das reale Reaktionsverhalten unter den untersuchten Bedingungen besser beschreibt als die Literaturkinetik nach Gemo et al. Insbesondere kann mit der DFI/KIT-Kinetik die experimentell beobachtete  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung im Festbettreaktor realistischer abgebildet werden.

### **1.7 Arbeitspaket 7: Weitere Optimierung der immobilisierten Enzyme hinsichtlich Stabilität und Selektivität unter den identifizierten Reaktionsbedingungen. Bearbeitet durch Technische Hochschule Mittelhessen (THM)**

#### ▪ Durchgeführte Arbeiten

Die weitere Optimierung immobilisierter Enzyme hinsichtlich Stabilität und Selektivität unter den identifizierten Reaktionsbedingungen kann insbesondere auf Grundlage der experimentellen Ergebnisse der untersuchten Enzymvarianten erfolgen. Docking-Ergebnisse legen nahe, dass Veränderungen im Zugangskanal zum aktiven Zentrum einen entscheidenden Einfluss auf Aktivität, Substratpräferenz und Selektivität der Enzyme haben. Dabei wurde deutlich, dass nicht ausschließlich die chemische Natur der Aminosäuren im Zugangskanal für die Substratspezifität verantwortlich ist, sondern vor allem die sterischen Bedingungen im Bereich des aktiven Zentrums eine zentrale Rolle spielen.

#### ▪ Erzielte Ergebnisse

Die experimentelle Untersuchung verschiedener Mutationen zeigte, dass insbesondere Aminosäurereste in unmittelbarer Nähe des Hämzentrums entscheidend für die katalytische Aktivität sind. Substitutionen bestimmter Phenylalaninreste führten teilweise zu einem deutlichen Aktivitätsverlust gegenüber aliphatischen Substraten. Dies deutet darauf hin, dass diese Aminosäuren eine wichtige Funktion bei der korrekten Positionierung der Substrate im aktiven Zentrum übernehmen. Wird diese räumliche Struktur verändert, kann das Substrat nicht mehr in einer katalytisch günstigen Orientierung an das Hämzentrum gelangen, wodurch die Reaktionsaktivität stark reduziert wird. Für zukünftige Optimierungen bedeutet dies, dass strukturelle Veränderungen im unmittelbaren aktiven Zentrum nur sehr gezielt vorgenommen werden sollten, um die katalytische Funktion nicht zu beeinträchtigen. Ein weiteres relevantes Ergebnis betrifft die Substratpräferenz der untersuchten Enzymvarianten. Entgegen der ursprünglichen Annahme führte der Austausch aromatischer Aminosäuren im Zugangskanal gegen aliphatische Aminosäuren nicht zu einer erhöhten Aktivität gegenüber aliphatischen Substraten. Stattdessen zeigte sich in vielen Fällen eine stärkere Aktivität gegenüber aromatischen Substraten, während die Aktivität gegenüber linearen Alkanen deutlich reduziert war. Diese Beobachtung verdeutlicht, dass die Wechselwirkungen zwischen Substrat und aktivem Zentrum komplexer sind als zunächst angenommen und stark von der räumlichen Struktur des Zugangskanals abhängen. Für eine

weitere Optimierung der Selektivität ist daher eine detaillierte strukturelle Analyse des Zugangskanals notwendig. Darüber hinaus zeigte sich, dass Mutationen im äußeren Bereich des Zugangskanals teilweise geringere Auswirkungen auf die grundlegende Enzymaktivität hatten als Veränderungen im unmittelbaren aktiven Zentrum. Dies eröffnet Möglichkeiten für eine gezielte Modifikation dieser Regionen, um beispielsweise die Substratzugänglichkeit oder Diffusionsprozesse zu beeinflussen, ohne die grundlegende katalytische Funktion zu verlieren. Insbesondere bei immobilisierten Enzymen kann dies von Vorteil sein, da hier zusätzlich Transportprozesse innerhalb des Trägermaterials oder entlang der Zelloberfläche eine Rolle spielen. Ein weiterer wichtiger Aspekt der Ergebnisse ist die Beobachtung, dass einige Enzymvarianten zwar eine verringerte Aktivität gegenüber bestimmten Substraten aufwiesen, gleichzeitig jedoch eine veränderte Reaktionsselektivität zeigten. Dies kann beispielsweise zu einer reduzierten Bildung von Nebenprodukten oder zu einer veränderten Regio- bzw. Stereoselektivität führen. Solche Effekte können gezielt genutzt werden, um biokatalytische Prozesse stärker auf die Bildung eines gewünschten Produkts auszurichten.

### **1.8 Arbeitspaket 8: Reaktorkonstruktion, Reaktorfertigung und maßgeschneiderte Katalysatorintegration. Bearbeitet durch Karlsruher Institut für Technologie (KIT)**

Ein Großteil der experimentellen Untersuchungen im Projekt wurde zunächst im Batch-Reaktor am DE-HEMA-Forschungsinstitut (DFI) durchgeführt. Dabei handelte es sich um einen Glasreaktor mit einem Flüssigkeitsvolumen von 30 mL und einem Gasraumvolumen von 48 mL. Die Reaktionen wurden typischerweise bei Temperaturen zwischen 10 und 40 °C sowie bei Gesamtdrücken zwischen 1 und 6 bar durchgeführt mit Rührer mit Drehzahlen zwischen 300 und 800 rpm. Dieser Batch-Reaktor wurde im Rahmen der Arbeiten am KIT modelliert, um die relevanten Stofftransport- und Reaktionsprozesse im System quantitativ zu beschreiben. Die entwickelten Modelle konnten die experimentell beobachteten Konzentrationsverläufe der Edukte und Produkte gut reproduzieren. Dadurch konnte das Modell als Grundlage für weiterführende Reaktorsimulationen verwendet werden.

Aufbauend auf dieser Modellierung wurde zusätzlich ein kontinuierlich betriebener Mikro-Festbettreaktor betrachtet, wie er auch experimentell am KIT eingesetzt wurde. Das Reaktordesign orientiert sich an Literaturarbeiten von Deschner et al. und besteht aus einem mikrostrukturierten Kanal, der mit dem heterogenen Katalysator befüllt wird. Der Reaktorkanal besitzt eine Gesamtlänge von 0.1 m, wovon eine zugängliche Bettlänge von 0.058 m und eine tatsächlich mit Katalysator gefüllte Länge von 0.029 m vorliegen. Der rechteckige Kanal weist eine Breite von 1 mm und eine Tiefe von 5 mm auf, was einer Querschnittsfläche von 5 mm<sup>2</sup> entspricht. Daraus ergibt sich ein Reaktorvolumen von etwa 0.5 mL. Das freie Reaktorvolumen beträgt etwa 0.29 mL. Der hydraulische Durchmesser des Kanals liegt bei etwa 1.67 mm. Diese geometrischen Parameter bilden die Grundlage für die Modellierung der Strömungs- und Stofftransportprozesse im Festbettreaktor. Zum einen wurde eine Reaktorversion aus Edelstahl gefertigt, die insbesondere für Experimente unter erhöhtem Druck und mit gasförmigen Edukten geeignet ist. Zusätzlich wurde eine zweite Variante aus PEEK (Polyetheretherketon) hergestellt. Der Einsatz von PEEK ist insbesondere für Experimente mit Wasserstoffperoxid vorteilhaft, da das Material gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> weitgehend inert ist und keine katalytische Zersetzung oder Hydrierung des Peroxids an der Reaktorwand stattfindet. Von einem Edelstahlfestbettreaktor und dem PEEK-Festbettreaktor sind Fotos nachfolgend dargestellt (Abbildung 50 und Abbildung 51).

Das Modell zu den Festbettreaktoren ist im vorherigen AP 6 beschrieben und erklärt worden. Die Direktsynthese Ergebnisse aus AP2 sind primär mit diesen Reaktoren erreicht worden.



Abbildung 50: Mikro-Festbettreaktor für die Tandemkatalyse - geöffnete -Reaktorhälfte mit gepacktem Kanal, befüllt mit gefriergetrockneten Hefezellen mit über Yeast Surface Display immobilisierten UPO-Enzymen.



Abbildung 51: Mikro-Festbettreaktoren für die Tandemkatalyse: links geöffneter Edelstahlreaktor mit gepacktem Kanal (gefriergetrocknete Hefezellen mit immobilisierten UPOs), rechts geschlossener PEEK-Reaktor.

Darüber hinaus wurden im Projekt verschiedene Reaktorbauteile und Einbauten für den Einsatz in durchströmten Flow-Reaktoren konzipiert, diskutiert und prototypisch gefertigt. Ziel war es, geeignete Strukturen zur Integration von Katalysatoren und Enzymen in kontinuierlich betriebenen Reaktorsystemen zu entwickeln. Hierzu wurden unter anderem katalytische statische Mischer (CSM, Catalytic Static Mixers) aus Edelstahl mittels selektivem Laserschmelzen (SLM) additiv gefertigt und anschließend mit Pd/TiO<sub>2</sub>-Katalysator beschichtet. Solche Strukturen ermöglichen eine verbesserte Durchmischung der Reaktionsströme bei gleichzeitig hoher katalytischer Oberfläche. Zusätzlich wurden verschiedene monolithische Strukturen mittels FDM-3D-Druck aus PLA hergestellt. Dazu zählen klassische Honeycomb-Monolithe sowie geometrisch modifizierte „shifted honeycomb“-Strukturen, die anschließend mit Pd/TiO<sub>2</sub>-Katalysator beschichtet wurden. Ergänzend wurden Enzymkartuschen mittels 3D-Druck entwickelt, die mit gefriergetrocknetem Zellmaterial befüllt werden können, um immobilisierte UPO-Enzyme in kontinuierliche Reaktorsysteme zu integrieren.

Darüber hinaus werden aktuell PLA-Honeycomb-Strukturen zur Enzymimmobilisierung untersucht. Hierbei erfolgt eine kovalente Anbindung der UPO-Enzyme über eine mehrstufige Oberflächenfunktionalisierung mit Dopamin, Polyethylenimin (PEI) und Glutaraldehyd. Diese Arbeiten dienen der Entwicklung geeigneter Enzymträgerstrukturen für den Einsatz in kontinuierlich betriebenen Flow-Reaktoren und werden derzeit weiter untersucht.

Abbildung 52 zeigt einen tubularen Reaktor mit eingesetzten katalytisch beschichteten statischen Mischerstrukturen (Catalytic Static Mixers, CSM). Die additiv gefertigten Edelstahlstrukturen wurden mit Pd/TiO<sub>2</sub>-Katalysator beschichtet, wobei sowohl Varianten mit 1 wt.-% als auch mit 5 wt.-% Pd untersucht wurden. Mit diesem Reaktorkonzept wurden in Kooperation mit der Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO, Melbourne, Australien) detaillierte Untersuchungen zur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Direktsynthese in kontinuierlich betriebenen Systemen durchgeführt. Der Fokus lag insbesondere auf der Analyse möglicher Stofftransportlimitierungen innerhalb des Reaktors. Hierzu wurden externe und interne Stofftransportphänomene systematisch untersucht, indem Parameter wie Verweilzeit, Volumenstrom sowie die Schichtdicke der katalytischen Beschichtung variiert wurden. Parallel dazu wurden unterschiedliche Katalysatorsysteme getestet, wobei insbesondere ein 0.7 wt.-% Pd–0.3 wt.-% Sn/TiO<sub>2</sub>-Katalysator detailliert untersucht wurde.

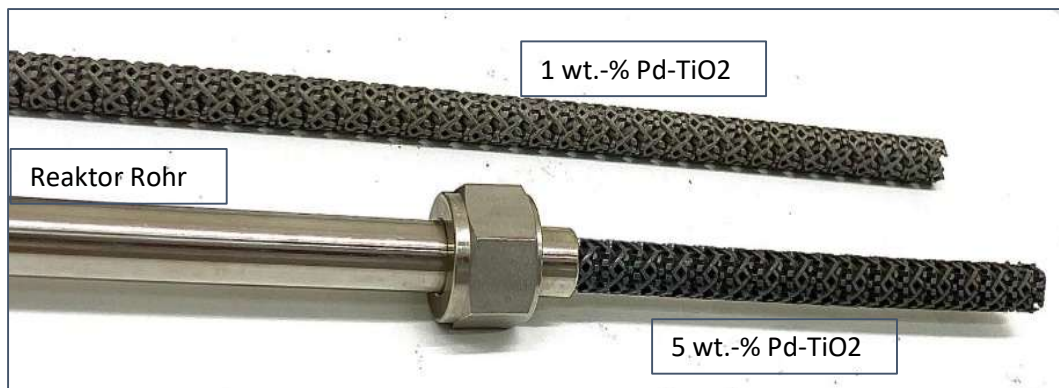


Abbildung 52: Tubularer Festbettreaktor mit eingesetzten monolithischen Katalysatorstrukturen. Gezeigt sind additiv gefertigte statische Mischerstrukturen (CSM) aus Edelstahl, die mit Pd/TiO<sub>2</sub>-Katalysator beschichtet wurden (1 wt.-% Pd/TiO<sub>2</sub> und 5 wt.-% Pd/TiO<sub>2</sub>).

Aufbauend auf den zuvor beschriebenen Reaktorkonzepten wurde anschließend versucht, ein Reaktordesign zu entwickeln, das die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Direktsynthese und die enzymatische Umsetzung in einem kontinuierlich betriebenen System kombiniert. Ziel dieser Arbeiten war die Entwicklung eines Kaskadenreaktors, in dem beide Reaktionsschritte räumlich getrennt, jedoch in einem durchströmten Gesamtsystem miteinander gekoppelt werden können.

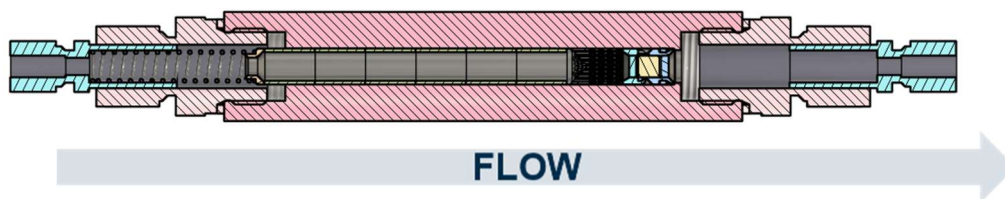


Abbildung 53: Tubularer Festbettreaktor mit eingesetzten monolithischen Katalysatorstrukturen. Gezeigt sind additiv gefertigte statische Mischerstrukturen (CSM) aus Edelstahl, die mit Pd/TiO<sub>2</sub>-Katalysator beschichtet wurden (1 wt.-% Pd/TiO<sub>2</sub> und 5 wt.-% Pd/TiO<sub>2</sub>).

Für die Umsetzung der enzymatischen Reaktion wurden zunächst UPO-Enzyme verwendet, die über Yeast Surface Display auf Hefezellen immobilisiert waren. Diese immobilisierten Enzyme konnten in Form von gefriergetrocknetem Zellmaterial als Festbett in durchströmten Reaktorsystemen eingesetzt werden. Zu diesem Zweck wurden spezielle Enzymkartuschen entwickelt und gefertigt, die eine einfache Integration des immobilisierten Zellmaterials in einen kontinuierlich betriebenen Kaskadenreaktor ermöglichen. Abbildung 53 zeigt zunächst ein CAD des entwickelten Kaskadenreaktors.

Für die Integration der enzymatischen Reaktion in den kontinuierlichen Kaskadenreaktor wurde eine Festbett-Enzymkartusche entwickelt (Abbildung 54, Abbildung 55). Diese dient zur Aufnahme von gefriergetrockneten Hefezellen, auf denen die UPO-Enzyme über Yeast Surface Display immobilisiert sind. Ziel des Designs war es, die immobilisierten Zellen sicher im Reaktor zu fixieren und gleichzeitig eine effektive Durchströmung mit dem Eduktstrom zu gewährleisten. Bei der Auslegung der Kartusche mussten mehrere Anforderungen berücksichtigt werden. Zum einen sollte der Einschluss der immobilisierten Hefezellen zuverlässig erfolgen, sodass diese während des Betriebs nicht ausgetragen werden. Gleichzeitig müssen die Reaktionsgase sowie das in flüssiger Phase vorliegende Enzymsubstrat mit den immobilisierten Enzymen in Kontakt gebracht werden. Da eine gewisse Deaktivierung der Enzyme durch Wasserstoffperoxid nicht ausgeschlossen werden kann, wurde außerdem darauf geachtet, dass das Zellmaterial möglichst einfach ausgetauscht bzw. nachgefüllt werden kann. Ein zentrales Designziel war daher eine gute Retention der Hefezellen bei gleichzeitig

akzeptablem Druckabfall im Reaktor. Darüber hinaus wurde eine Zwangsdurchströmung durch das Hefefestbett vorgesehen, um eine möglichst homogene Kontaktierung zwischen Substratstrom und immobilisierten Enzymen zu erreichen. Die Kartusche wurde mittels additiver Fertigung hergestellt, wodurch eine schnelle Anpassung und Iteration des Designs möglich war. Aufgrund der Anforderungen des verwendeten Herstellungsverfahrens (SLM) musste eine minimale Wandstärke von etwa 0.25 mm berücksichtigt werden. Die äußeren Abmessungen der Kartusche wurden an den Durchmesser des vorgesehenen Testreaktors angepasst. Für den Betrieb des Systems wurde ein Volumenstrom von etwa  $5 \text{ mL min}^{-1}$  vorgesehen.



Abbildung 54: CAD-Darstellung der Festbett-Enzymkartusche zur Integration immobilisierter UPO-Enzyme in einen kontinuierlichen Reaktor. Links: montierter Zustand mit O-Ring-Dichtung. Rechts: Explosionsdarstellung mit Kartuschengehäuse und eingesetztem Enzym/Hefezellen-Festbett.

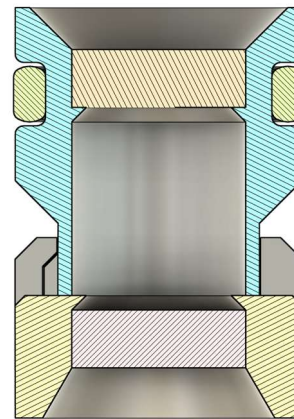


Abbildung 55: Längsschnitt der additiv gefertigten Festbett-Enzymkartusche zur Aufnahme gefriergetrockneter Hefezellen mit immobilisierten UPO-Enzymen.

Neben der Entwicklung der Enzymkartusche wurden auch strukturierte Monolithträger für den Einsatz in kontinuierlich durchströmten Reaktoren untersucht (Abbildung 56, Abbildung 57). Hierfür wurden sowohl klassische Wabenkörper-Monolithe (Honeycomb Monoliths) als auch geometrisch modifizierte Shifted Honeycomb Monoliths (SHMs) entwickelt und eingesetzt.

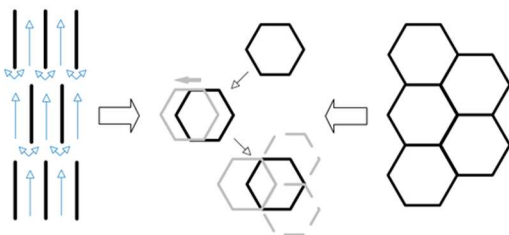


Abbildung 56: Links: Prinzipskizze eines einfachen Mischers, Rechts: Schematischer Querschnitt eines Wabenkörper Monolith, Mitte: Schwarze Grundschicht mit darüber liegender Grauer Verschobener Ebene

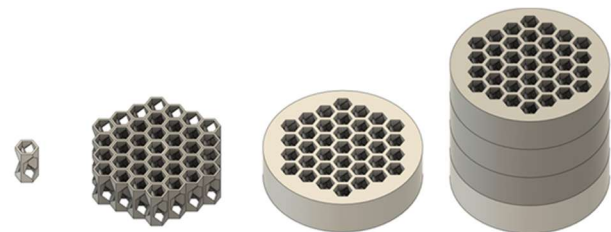


Abbildung 57: Aufbau eines SHMs

Abbildung 58 zeigt REM-Aufnahmen der katalytisch beschichteten additiv gefertigten Shifted Honeycomb Monoliths (SHMs). Die charakteristische, versetzte Kanalstruktur ist deutlich erkennbar und bestätigt die erfolgreiche Umsetzung des Designs.

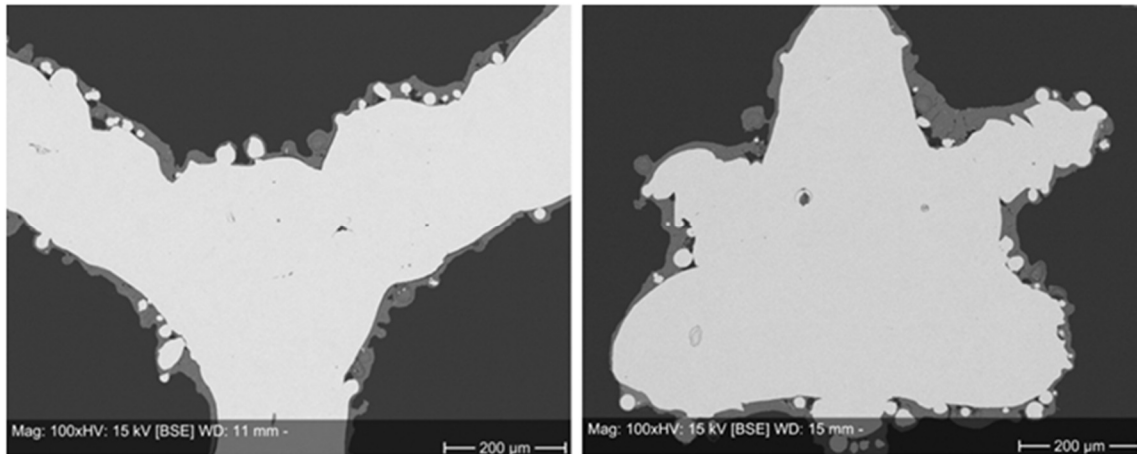


Abbildung 58: Entgegenstellung der Beschichtung an verschiedenen Strukturen. Links: Wabenkörper, Rechts: SHM-Interface Struktur, Hellgrau: metallische Grundstruktur, Dunkelgrau: Katalysatorbeschichtung

Neben den zuvor beschriebenen SHM-Strukturen wurden auch konventionelle Wabenkörper-Monolithe (HCM) für die Enzymimmobilisierung untersucht, basierend auf Ansätzen aus der Literatur<sup>4</sup>. Dabei wurde freies UPO-Enzym auf die Monolithoberflächen immobilisiert. Die Versuche befinden sich derzeit noch in Bearbeitung, zeigen jedoch bereits vielversprechende Ergebnisse.

Für die Immobilisierung wurde eine mehrstufige Beschichtung bestehend aus Polydopamin, Polyethylenimin (PEI), Glutaraldehyd und anschließend Enzymauftrag verwendet (Abbildung 59). Im Gegensatz zu Literaturangaben wurde dabei eine deutlich geringere Enzymkonzentration von etwa  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  eingesetzt (Literatur: ca.  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Untersucht wurden drei verschiedene Immobilisierungsprotokolle auf Wabenkörper-Monolithen: (i) Enzyminkubation für 1 h bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , (ii) Enzyminkubation für 3 h bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  sowie (iii) verlängerte Inkubation über 7 Tage im Kühlschrank. Die resultierenden Aktivitäten wurden zunächst anhand der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Dosierung sowie der ABTS-Oxidation bewertet.

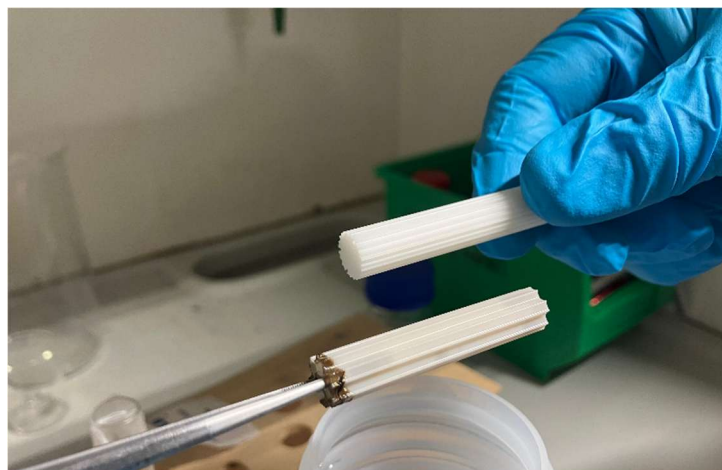


Abbildung 59: 3D-gedruckte PLA-Monolithen vor und nach Oberflächenfunktionalisierung. Der untere Monolith wurde mit einer Polydopamin/PEI-Schicht beschichtet, was durch die charakteristische Braunfärbung infolge der Dopaminpolymerisation erkennbar ist, während der obere Monolith den unbehandelten Zustand zeigt.

Zur Bewertung der Enzymimmobilisierung wurde die Enzymkonzentration vor und nach der Immobilisierung mittels Bradford-Assay bestimmt. Zusätzlich wurde die katalytische Aktivität über die ABTS-Oxidation

gemessen, um zu überprüfen, inwieweit die Enzymaktivität durch die Immobilisierung beeinflusst wird und ob eine erfolgreiche Anbindung des Enzyms an die Monolithoberfläche erfolgt ist. (Abbildung 60, Abbildung 61)

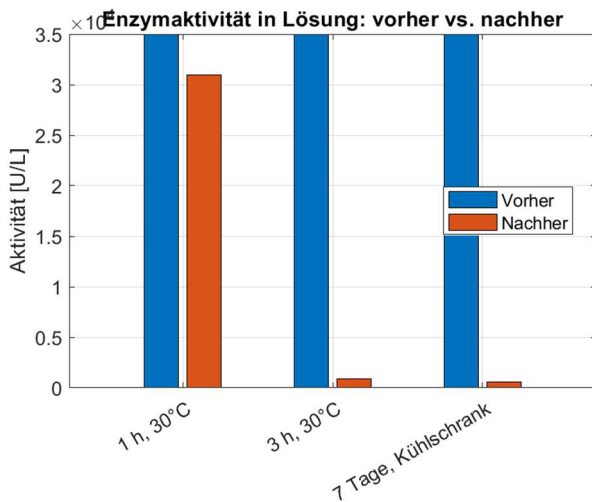


Abbildung 60: Enzymaktivität (ABTS-Assay) in Lösung vor und nach Immobilisierung auf PLA-Monolithen für verschiedene Immobilisierungsbedingungen.

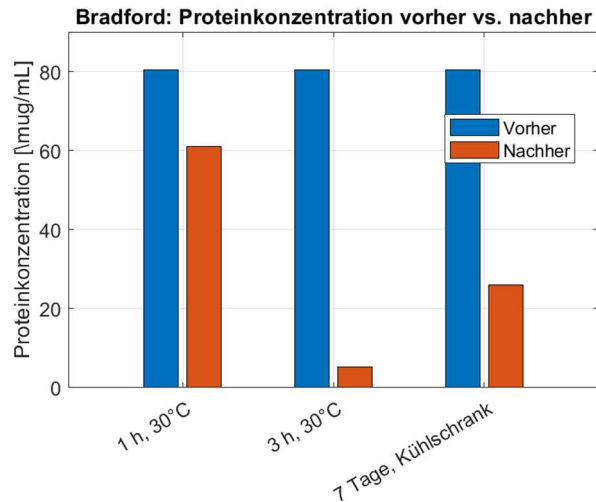


Abbildung 61: Proteinkonzentration in Lösung vor und nach Immobilisierung auf PLA-Monolithen, bestimmt mittels Bradford-Assay, für verschiedene Immobilisierungsbedingungen. Die Abnahme der Proteinkonzentration weist auf eine erfolgreiche Bindung des Enzyms an die Monolithoberfläche hin.

Die immobilisierten Monolithen wurden anschließend in einem kontinuierlich betriebenen Rohrreaktor getestet. Hierzu wurden die Strukturen jeweils dreimal unter definierten Bedingungen untersucht. Als Reaktionssystem wurde eine kontinuierliche Dosierung von 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 1 mM ABTS eingesetzt, um die katalytische Leistungsfähigkeit der immobilisierten Enzyme unter Durchflussbedingungen zu evaluieren (Abbildung 62).

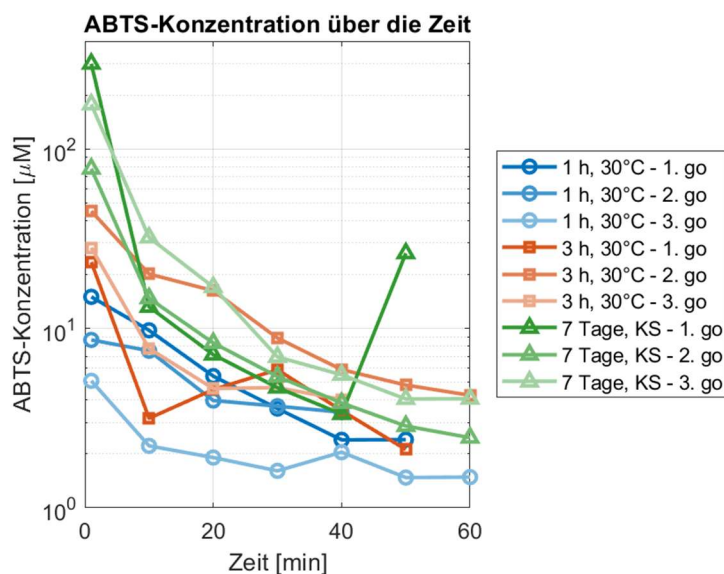


Abbildung 62: Zeitlicher Verlauf der ABTS-Konzentration (logarithmisch dargestellt) für verschiedene Immobilisierungsbedingungen auf PLA-Monolithen bei kontinuierlicher Zudosierung von 1 mM ABTS und 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Jeder Monolith wurde dreifach im kontinuierlichen Betrieb zur Bewertung der Wiederverwendbarkeit getestet.

## 1.9 Arbeitspaket 9: Systemintegration zur Realisierung der Tandem-Katalyse im kontinuierlichen Betrieb und Evaluierung der Langzeitstabilität. Bearbeitet durch DECHEMA-Forschungsinstitut (DFI) und Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

### Durchgeführte Arbeiten

Ziel dieses Arbeitspakets ist es, die Kombination aus Chemo- und Enzymkatalyse als kontinuierliches Verfahren umzusetzen und zu optimieren. Daher wurde am DFI der bestehende Batch-Versuchsaufbau für halbkontinuierliche Messungen mit freiem Enzym und der Modellreaktion der EBA-Hydroxylierung angepasst, was ohne großen experimentellen Aufwand möglich war. Parallel dazu wurde am KIT eine vollständig kontinuierliche Implementierung der Tandem-Katalyse realisiert mit immobilisiertem Enzym, da dort bereits eine kontinuierliche Anlage zur  $H_2O_2$ -Direktsynthese vorhanden ist, die für die Tandem-Katalyse nur minimal angepasst werden musste. Gleichzeitig wurden am KIT weitere Reaktionen mit ABTS und NBD als Substrate getestet.

Weiterhin wurde in diesem Arbeitspaket am DFI ein detaillierter Vergleich der im Projekt erzielten Ergebnisse mit Literaturdaten zu alternativen  $H_2O_2$ -Bereitstellungsstrategien (enzymatisch, elektrochemisch und photochemisch) im Kontext der Tandem-Reaktion mit Ethylbenzoesäure (EBA) und Ethylbenzol (EB) als Substraten durchgeführt.

### Erzielte Ergebnisse am DFI

Im Arbeitspaket 5 wurde eine optimale Enzymkonzentration von 5 nM UPO für den Batch-Prozess ermittelt. Ziel nachfolgender Experimente war es, die HEBA-Ausbeute bei 5 nM UPO zu maximieren, indem frisches Enzym nachdosiert wird, um dessen Deaktivierung zu kompensieren. Als erster Ansatz wurde hierzu eine quasi-kontinuierliche Enzymzugabe durch diskrete Zudosierungen („enzyme spiking“) erprobt, die mit geringem experimentellem Aufwand im Labor umgesetzt werden konnte (Abbildung 63).

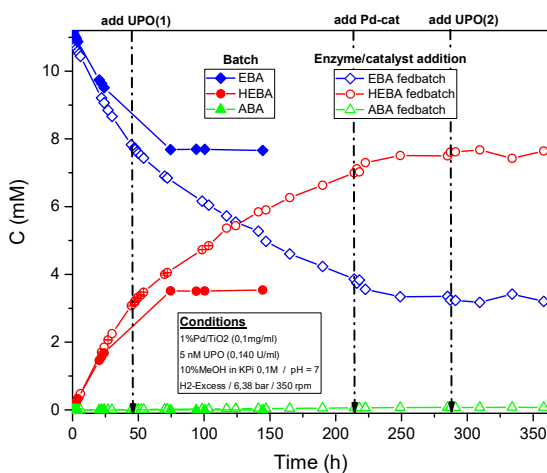


Abbildung 63: EBA-Hydroxylierung bei 5 nM (0,14 U/ml) UPO mit diskreter Zugabe von frischem Enzym/Katalysator/Enzym (geöffnete Symbole) und Vergleich mit dem entsprechenden Batch Experiment (gefüllte Symbole). Weitere Bedingungen: 0.1 mg/mL 1%Pd-TiO<sub>2</sub> Katalysator; 30 mL Medium = 10%MeOH in KPI 0.1 M pH7,  $C_{start}(EBA) = 10$  mM,  $T = 22$  °C,  $P=6.3$  bar,  $H_2$ -Überschuss

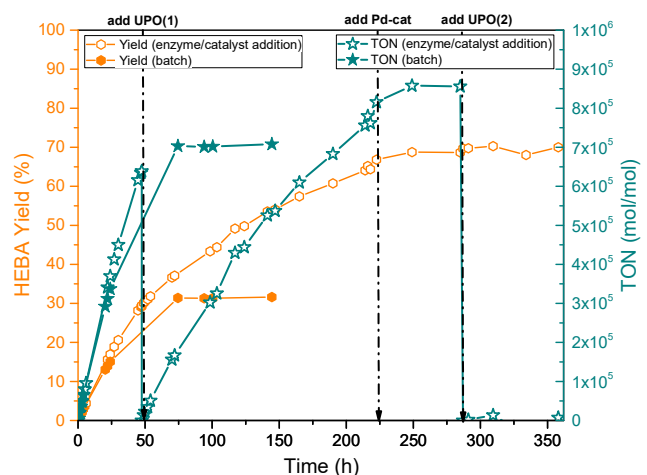


Abbildung 64: HEBA-Ausbeute (linke y-Achse) und Enzym TON (rechte y-Achse) für die Experimente in Abbildung 63. Weitere Bedingungen: 0.1 mg/mL 1%Pd-TiO<sub>2</sub> Katalysator; 30 mL Medium = 10%MeOH in KPI 0.1 M pH7,  $C_{start}(EBA) = 10$  mM,  $T = 22$  °C,  $P=6.3$  bar,  $H_2$ -Überschuss

Dadurch ließ sich die HEBA-Ausbeute bei 5 nM UPO (Abbildung 64, geöffnete Symbole) im Vergleich zu Batch-Reaktion (Abbildung 64, gefüllte Symbole) um den Faktor 2.9 steigern – von 32% auf 72%. TON des Enzyms blieb exzellent (Über 700 000 für den Batch-Prozess) und über 800 000 nach erneuter Enzymzugabe. (Abbildung 64). Beim in Abbildung 63 dargestellten Experiment mit Enzymzudosierung wurde zu einem späteren Zeitpunkt zunächst frischer Katalysator und anschließend ein weiteres Mal frisches Enzym zugegeben. Beide Zugaben konnten die Reaktion jedoch nicht mehr revitalisieren. Dies deutet auf eine unzureichende H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung hin, da das organische Substrat (EBA) mit etwa 4 mM weiterhin in ausreichender Menge im Reaktionsgemisch vorhanden war. Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung ist möglicherweise durch die Verfügbarkeit von O<sub>2</sub> im System limitiert, da das Experiment unter H<sub>2</sub>-Überschuss durchgeführt wurde und der Sauerstoff in der Gasphase als entscheidende Komponente fungiert.

Als nächster Schritt wurde daher die Laboranlage so umgebaut, dass die Gasphase mithilfe von zwei Mass-Flow-Controllern kontinuierlich zudosiert werden kann. Für diese halbkontinuierlichen Experimente (Fed-Batch-Betrieb) wurden weiterhin reduktive Bedingungen gewählt und die Enzymkonzentration auf 20 nM UPO erhöht, sodass die Enzymdeaktivierung während der Reaktionszeit vernachlässigbar ist. Die Ergebnisse sind in Abbildung 65 und Abbildung 66 dargestellt und zusätzlich im Vergleich mit dem entsprechenden Batch-Experiment unter identischen Bedingungen zusammengefasst.

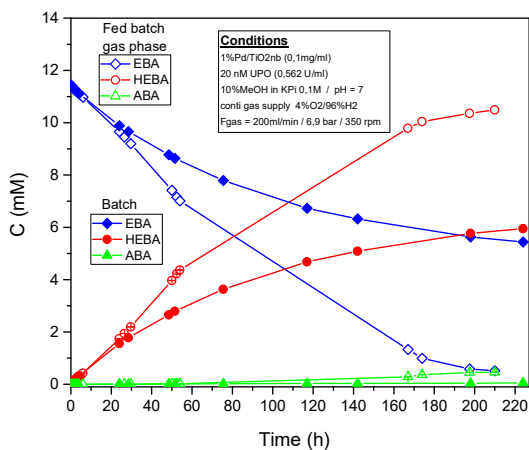


Abbildung 65: EBA-Hydroxylierung bei 20 nM (0.562 U/ml) UPO und kontinuierlicher Zudosierung der Gasphase (geöffnete Symbole) und Vergleich mit dem entsprechenden Batch-Experiment (gefüllte Symbole). Weitere Bedingungen: 0.1 mg/mL 1%Pd-TiO<sub>2</sub> Katalysator; 30 mL Medium = 10%MeOH in KP<sub>i</sub> 0.1 M pH7, C<sub>start</sub>(EBA) = 10 mM, T = 22 °C, P=6.3 bar, O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>= 4/96 %, F<sub>gas</sub>=200 mL/min

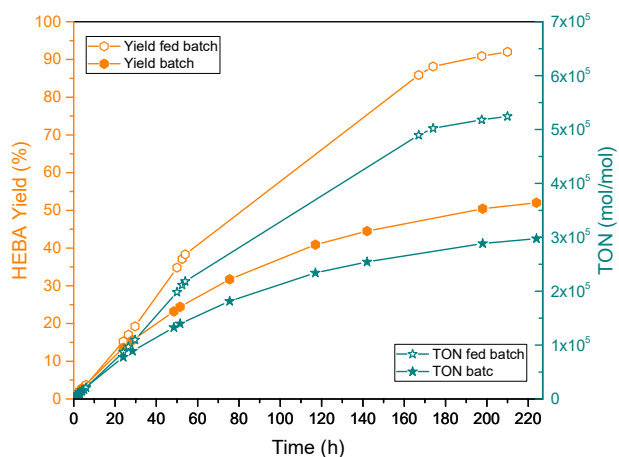


Abbildung 66: HEBA-Ausbeute (linke y-Achse) und Enzym TON (rechte y-Achse) für die Experimente in Abbildung 65. Weitere Bedingungen: 0.1 mg/ml 1%Pd-TiO<sub>2</sub> Katalysator; 30 mL Medium = 10%MeOH in KP<sub>i</sub> 0.1 M pH7, C<sub>start</sub>(EBA) = 10 mM, T = 22 °C, P=6.3 bar, O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>= 4/96 %, F<sub>gas</sub>=200 mL/min

Weiterhin wurde zusätzlich zur kontinuierlichen Gasphasendosierung eine gleichzeitige kontinuierliche Enzymzugabe mittels Spritzenpumpe implementiert, sodass im Reaktor eine konstante niedrige Enzymkonzentration von 10 nM gewährleistet ist. Dennoch traten Schwierigkeiten bei der Enzymzugabe auf, da das Enzym im Reaktor trotz kontinuierlicher Zudosierung nach etwa 50 Stunden deaktiviert war und die Reaktion nicht weiter fortschreiten konnte. Nichtsdestotrotz lassen sich die Ergebnisse nach 50 Stunden gut vergleichen, da für alle drei Betriebsvarianten zu diesem Zeitpunkt eine relative Enzymaktivität von über 80% vorlag. Abbildung 67 sowie Tabelle 5 fassen die Ergebnisse der drei Betriebsmodi zusammen.

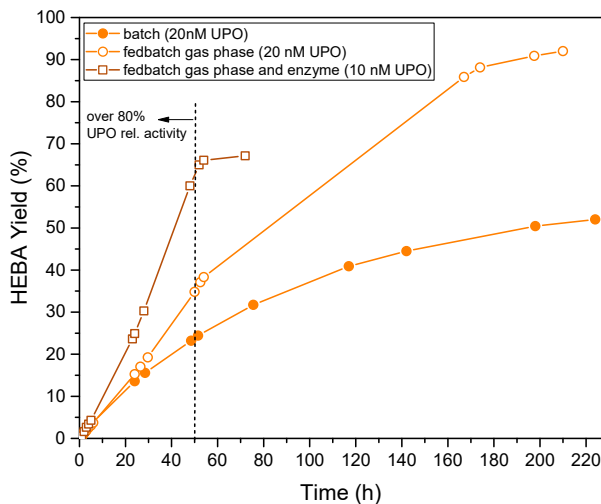


Abbildung 67: HEBA-Yield für unterschiedliche Betriebsweisen: batch (gefüllte Kreise), mit kontinuierlicher Gasphasen Zudosierung (geöffnete Kreise), mit kontinuierlicher Gasphase- und UPO-Zudosierung (geöffnete Quadrate). Weitere Bedingungen: 0.1 mg/mL 1%Pd-TiO<sub>2</sub> Katalysator; 30 mL Medium = 10%MeOH in KP; 0.1 M pH7, C<sub>start</sub>(EBA) = 10 mM, T = 22 °C, P=6.3 bar, O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>= 4/96 %, F<sub>gas</sub>=200 mL/min; F<sub>UPO</sub>=3 µL/min

Betriebsmodus	k <sub>B</sub> HEBA (µM/h)	Y-HEBA @ 50h (%)
Batch	71	23
Fed-batch Gasphase	77	37
Fed-batch Gasphase und Enzym	88	65

Tabelle 5: Zusammenfassung der HEBA-Bildungsrate (k<sub>B</sub>) und HEBA-Ausbeute (Y) für unterschiedliche Betriebsmodi

Es ist deutlich erkennbar, dass durch die kontinuierliche Gasphasenführung die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung nicht mehr gehemmt ist und ein HEBA-Umsatz von 92% erreicht werden konnte (Abbildung 66, geöffnete Kreise). Die HEBA-Ausbeuten (Y) nach 50 h sowie die kinetischen Daten (HEBA-Bildungsraten, k<sub>B</sub>) verdeutlichen zudem die erhebliche Reaktionsintensivierung durch den Übergang zur halbkontinuierlichen Betriebsweise: Bei kombinierter Gasphasen- und Enzymzudosierung wurde die HEBA-Ausbeute um den Faktor 2.8 gegenüber dem reinen Batch-Experiment verbessert, was unter anderem auf eine deutliche Steigerung der initialen HEBA-Bildungsrate zurückzuführen ist.

Um die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildungsrate zu erhöhen und damit auch die HEBA-Bildung zu intensivieren, wurde in einem Einzelversuch ein Fed-Batch-Experiment mit einer Gasphasenzusammensetzung im Explosionsbereich (30 % O<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>) und einer AaeUPO-Konzentration von 5 nM durchgeführt. Aus der klassischen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Direktsynthese ist bekannt, dass solche Bedingungen vorteilhaft für hohe initiale H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildungsraten sind. Tatsächlich wurde in diesem Experiment eine sehr hohe HEBA-Bildungsrate von 422 µM h<sup>-1</sup> erreicht (TON = 434 000, STY = 1.7 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>). Limitierend war in diesem Fall jedoch die niedrige UPO-Konzentration; bereits nach etwa 6 Stunden wurde eine Deaktivierung des Enzyms beobachtet, wodurch die Reaktion zum Stillstand kam. Solche harschen Reaktionsbedingungen wurden im weiteren Projektverlauf jedoch nicht weiterverfolgt, da eine zentrale Zielsetzung des PeroxyDirekt-Projekts darin bestand, ein sicheres Verfahren zu entwickeln und zu demonstrieren. Dennoch zeigen die Ergebnisse deutlich, dass bei geeigneten und sicher beherrschbaren Sicherheitskonzepten für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Direktsynthese – beispielsweise durch am KIT entwickelte Membranreaktoren oder durch Konzepte mit Vorsättigung der Flüssigphasenströme – eine deutliche Intensivierung der gekoppelten enzymatischen Reaktion möglich ist. Die Ergebnisse verdeutlichen somit das erhebliche Potenzial einer prozessintegrierten direkten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Erzeugung zur Steigerung der Leistungsfähigkeit UPO-katalysierter Oxyfunktionalisierungen.

Mit diesen Experimenten sind wir jedoch an den Grenzen der Laboranlage am DFI angelangt. Trotz experimenteller Herausforderungen konnte eine halbkontinuierliche Reaktionsführung erfolgreich realisiert

werden. Die Ergebnisse sind vielversprechend und unterstreichen die Notwendigkeit einer vollständigen kontinuierlichen Durchführung der Tandemreaktion mit immobilisiertem Enzym.

Als weiterer Schwerpunkt dieses Arbeitspakets wurde am DFI eine Bewertung der bisher im Projekt erzielten Ergebnisse durchgeführt. Ein Vergleich mit etablierten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bereitstellungsmethoden für enzymatische Hydroxylierungsreaktionen mit Ethylbenzoesäure (EBA) oder Ethylbenzol (EB) als Substraten und AaeUPO als Enzym ist in Tabelle 6 dargestellt.






Methode zur „in-situ“ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Bereitstellung	Substrat [mM]	Bedingungen	TON [mol <sub>Produkt</sub> /mol <sub>Enzym</sub> ]	STY HEBA or 1-PE [g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ]	Lit.
<b>Chemokatalytisch</b> 	EBA [10]	Free AaeUPO / 96 % H <sub>2</sub> , 4% O <sub>2</sub> / 6 bar / Pd-Katalysator / 10% MeOH in KPi 100 mM pH7 / 25°C	430 000 – 860 000	0.5 (1.7 <sup>a</sup> )	*
	EB [10]	Free AaeUPO / 80% H <sub>2</sub> , 20% Luft / 2 bar / PdAu-Katalysator / KPi 100 mM pH7 / 20°C	28 200	1.9 <sup>b</sup>	5
<b>Photokatalytisch</b> 	EBA [10]	Free AaeUPO / 10% MeOH in KPi 100 mM pH7 / g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> / hv / O <sub>2</sub>	75 000 – 250 000	3.0 <sup>b</sup>	6
	EBA [30]	Immobil. AaeUPO / 10% MeOH in KPi 100 mM pH7 / g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> / hv / O <sub>2</sub>	200 000 – 300 000	4.8 <sup>b</sup>	6
	EB [10]	Free AaeUPO / 5% MeOH in KPi 100 mM pH7 / TiO <sub>2</sub> / hv / O <sub>2</sub>	220 000	2.6	7
<b>Elektrochemisch</b> 	EBA [8]	Free AaeUPO / KPi 100 mM pH7 / GDE / air / 22°C	360 000 – 710 000	10.5	8
	EB [137 <sup>b</sup> ]	Free AaeUPO / 405 mM Ac in KPi 100 mM pH7 / GDE / air / 22°C	400 000	25.0	9
	EBA [10]	Free AaeUPO / KPi 100 mM pH7 / GDE / air / RT	400 000	11.9 <sup>b</sup>	2
<b>Enzymatisch</b> 	EB [15]	Free AaeUPO / 200 mM MeOH in KPi 100 mM pH7 / AOx / FDM / FDH, NAD <sup>+</sup> , 3HB6H / O <sub>2</sub> / 30°C	294 700	22.0 <sup>b</sup>	10
<b>Stoichiometrische Zugabe</b> 	EB [3600]	Immobil. AaeUPO / 2LPS rotating bed reactor / feed <sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub> = 0,7 ml h <sup>-1</sup> = 7 mM·h <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / KPi 50mM pH7 / EB : KPi = 1 : 1 / 30°C	360 000 – 900 000	10.5	11
	EB [12,5]	Free AaeUPO / SS capillary (0.17 mm ID) / feed <sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + EB</sub> = 3 ml h <sup>-1</sup> / 7,4 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / 50% MeCN in KPi 10 mM pH7 / RT	43 000	60	12

Tabelle 6: Vergleich von Literaturdaten zur verschiedenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Bereitstellungsmethoden für AaeUPO (als freie Enzym oder Immobilisat) für die enantioselektive Hydroxylierung von Ethylbenzol (EB) zu 1-Phenylethanol (1-PE) oder Ethylbenzoesäure (EBA) zu Hydroxyethylbenzoesäure (HEBA). Tabellenparameter: TON – total turnover number; STY – space time yield; KPi – Kaliumphosphatpuffer; Ac – Aceton; MeOH – Methanol; MeCN – Acetonitril; GDE – Gasdiffusionselektrode; 2LPS – two-liquid-phase system; AOx – Alkoholoxidase; FDM – Formaldehyddismutase; FDH – Formaldehyddehydrogenase; 3HB6H – 3-Hydroxybenzoat-6-hydroxylase; hv – Licht; RT – Raumtemperatur;

\* im Rahmen des PeroxyDirekt Projektes entstandene Ergebnisse; a – im explosiven Bereich der Gasphase; b – geschätzt von publizierten Daten/Ergebnissen

Im Vergleich zu den anderen Methoden zeigt der chemokatalytische Ansatz eine sehr hohe enzymatische Effizienz (TON) und damit eine ausgezeichnete Enzymausnutzung. Die derzeit noch moderaten STY-Werte sind hauptsächlich auf limitierende Prozessbedingungen und Sicherheitsrestriktionen bei der Gasphase zurückzuführen. Die Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass bei geeigneter Reaktor- und Sicherheitskonzeption (z. B. Membranreaktoren oder kontrollierte Gasdosierung) ein erhebliches Potenzial zur Prozessintensivierung besteht.

Insgesamt zeigt der PeroxyDirekt-Ansatz damit eine vielversprechende Alternative zu bestehenden  $H_2O_2$ -Bereitstellungsmethoden

#### ▪ Erzielte Ergebnisse am KIT

Im Rahmen der Arbeiten am KIT wurde die Kopplung der  $H_2O_2$ -Direktsynthese mit der enzymatischen Umsetzung in einem kontinuierlich betriebenen Festbettreaktor untersucht. Dabei wurden heterogene Pd/TiO<sub>2</sub>-Katalysatoren zur in situ-Erzeugung von Wasserstoffperoxid mit auf Hefezellen immobilisierten UPO-Enzymen (Yeast Surface Display, YSD-UPOs in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Holtmann) kombiniert. Die Leistungsfähigkeit des gekoppelten Systems wurde anhand von Modellreaktionen, insbesondere der ABTS-Oxidation sowie der Hydroxylierung von NBD, bewertet.

Zunächst wurden die auf Hefezellen immobilisierten UPO-Enzyme nach Durchführung der Oberflächen-Assays durch Behandlung mit organischen Lösungsmitteln inaktiviert, um ein definiertes, nicht-wachsendes Biokatalysatorsystem zu erhalten. Anschließend wurden die Zellen unter verschiedenen Reaktionsbedingungen hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität untersucht. Dabei wurden sowohl die Langzeitstabilität bei unterschiedlichen Lagerbedingungen (Abbildung 68) als auch der Einfluss von Lösungsmittelanteilen (insbesondere Acetonitril) sowie des pH-Werts (pH 6 und 7) systematisch analysiert (Abbildung 69). Ziel dieser Untersuchungen war es, ein geeignetes Betriebsfenster zu identifizieren, das sowohl mit den Anforderungen der UPO-Enzyme als auch mit der  $H_2O_2$ -Direktsynthese über den 1 Gew.-% Pd/TiO<sub>2</sub>-Katalysator kompatibel ist.

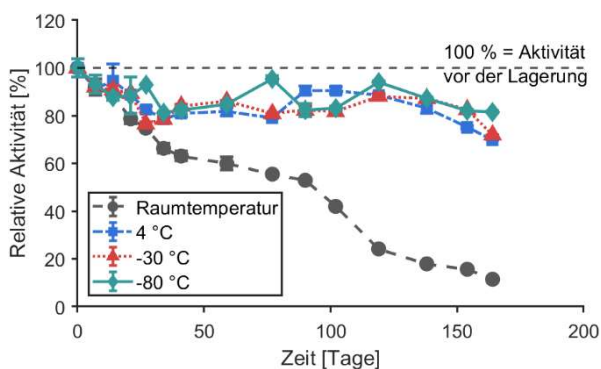


Abbildung 68: Langzeitstabilität der YSD-UPO-Zellen bei unterschiedlichen Lagerbedingungen, dargestellt als relative Aktivität über die Zeit.

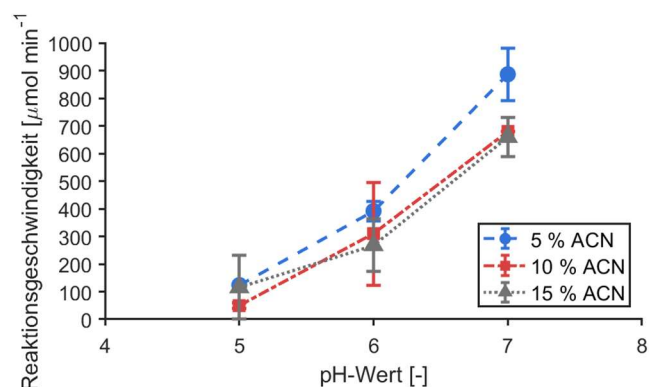


Abbildung 69: Einfluss von pH-Wert und Acetonitrilgehalt auf die enzymatische Reaktionsgeschwindigkeit der YSD-UPO-Zellen.

Auf Grundlage dieser Untersuchungen konnte ein geeignetes Betriebsfenster für die enzymatische Reaktion definiert werden. Unter diesen Bedingungen wurden anschließend Experimente im kontinuierlich betriebenen Festbettreaktor durchgeführt, bei denen die Kopplung von  $H_2O_2$ -Direktsynthese und enzymatischer

Umsetzung untersucht wurde. Die zeitlichen Konzentrationsverläufe der relevanten Reaktionskomponenten sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

Erste Untersuchungen zeigten, dass ein Gesamtvolumenstrom von  $5 \text{ mL min}^{-1}$  für den kontinuierlichen Betrieb geeignet ist. Zudem führte eine direkte Durchmischung des Pd/TiO<sub>2</sub>-Katalysators mit den gefriergetrockneten YSD-UPO-Zellen im Reaktionskanal zu höheren Umsätzen als eine räumliche Trennung von Katalysator- und Enzyrbett. Die eingesetzten Biokatalysatoren wiesen spezifische Aktivitäten von  $0.18 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  (ABTS) und  $0.03 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  (NBD) auf. Die erzielten Produktkonzentrationen für die ABTS-Oxidation und die NBD-Hydroxylierung sind in Abbildung 70 dargestellt. Für die ABTS-Oxidation wurden zunächst Produktkonzentrationen bis zu  $25 \text{ } \mu\text{M}$  erreicht, jedoch nahm die Aktivität im Verlauf der Reaktion deutlich ab. Im Vergleich zur direkten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe zeigte das Tandemsystem mit in situ gebildetem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine langsamere Deaktivierung, was den Vorteil einer kontinuierlichen, moderaten Peroxidbereitstellung verdeutlicht. Ein Teil des Aktivitätsverlustes ist auf einen Austrag des Biokatalysators zurückzuführen, wobei insgesamt nur geringe Proteinmengen im Flüssigstrom nachgewiesen wurden.

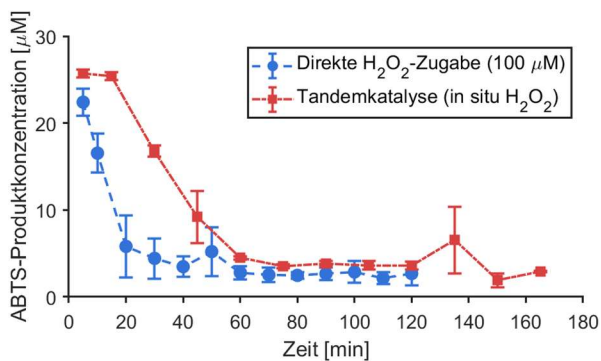


Abbildung 70: Produktbildung bei der ABTS-Oxidation im kontinuierlichen Festbettreaktor: Vergleich zwischen direkter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe und in situ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung (Tandemkatalyse).

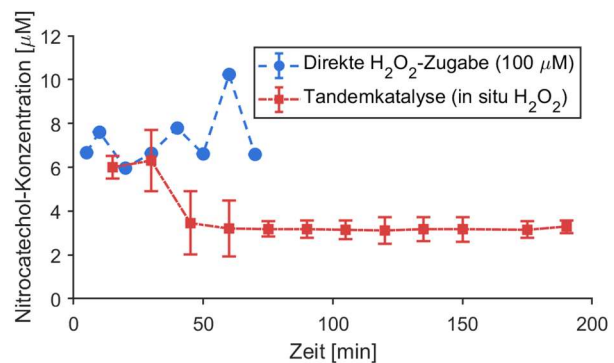


Abbildung 71: Produktbildung bei der NBD-Hydroxylierung im kontinuierlichen Festbettreaktor: Vergleich zwischen direkter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe und in situ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung (Tandemkatalyse).

Im Gegensatz dazu führte die NBD-Hydroxylierung zu deutlich niedrigeren und weitgehend konstanten Produktkonzentrationen (Abbildung 71). Hier zeigte die in situ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung keinen klaren Vorteil gegenüber der direkten Dosierung, was auf eine geringere Effektivität der Peroxidbildung unter den eingesetzten Bedingungen hinweist. Während der ABTS-Experimente wurde ein Wasserstoffumsatz von etwa  $200 \text{ } \mu\text{M}$  ( $\approx 40 \%$ ) beobachtet, während dieser bei der NBD-Reaktion in Gegenwart von Acetonitril deutlich geringer ausfiel ( $\approx 50 \text{ } \mu\text{M}$ ,  $\approx 8 \%$ ). Dies deutet auf eine reduzierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung in Anwesenheit organischer Lösungsmittel hin.

Tabelle 7: Leistungskennzahlen der Tandemkatalyse: Umsatzzahl (TON), Umsatzfrequenz (TOF) und Raum-Zeit-Ausbeute (STY)

Substrat	ABTS	NBD
TON	6350	3596
TOF	0.64	0.36
STY	461	242

Insgesamt zeigte die ABTS-Oxidation höhere Umsätze und Raum-Zeit-Ausbeuten als die NBD-Reaktion (Tabelle 7). Neben Lösungsmittel-Effekten ist dies auch auf mechanistische Unterschiede zurückzuführen, da die ABTS-Oxidation über schnelle Elektronentransfer erfolgt, während die NBD-Hydroxylierung einen kinetisch anspruchsvolleren Sauerstofftransfer erfordert. Besonders hervorzuheben ist, dass diese Arbeiten erstmals die Kopplung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Direktsynthese und UPO-katalysierter Umsetzung in einem kontinuierlich betriebenen Flow- bzw. Festbettreaktor demonstrieren.

## 2 Verwendung der Zuwendung

### Forschungseinrichtung 1: DFI

Alle für die Durchführung der Forschungsarbeiten benötigten Geräte, Bauteile und Verbrauchsmaterialien besitzen Beschaffungswerte unterhalb von 2.500 € und wurden jeweils über die entsprechenden Pauschale für sonstige Ausgaben beschafft.

- Wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans): Am DFI wurden über die gesamte Projektdauer wissenschaftliche Mitarbeiter (HPA-A) mit insgesamt 27,4 PM beschäftigt, davon jeweils 22,4 PM für einen Postdoc und 5 PM für einen Projektleiter.
- Geräte (Einzelansatz B des Finanzierungsplans): Geräte wurden nicht beschafft.
- Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans): Leistungen Dritter wurden nicht beansprucht.

### Forschungseinrichtung 2: THM

An der THM erfolgten die folgenden Verwendungen der Mittel:

- wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans): An der THM wurden wissenschaftliche Mitarbeiter (HPA-A) mit 27 PM beschäftigt. Zusätzlich wurden studentisch Hilfskräfte eingesetzt (insgesamt 9,34) PM).
- Geräte (Einzelansatz B des Finanzierungsplans): Geräte wurden nicht beantragt und daher nicht beschafft.
- Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans): Leistungen Dritter wurden nicht beantragt und daher nicht beauftragt.

### Forschungseinrichtung 3: KIT

Alle für die Durchführung der Forschungsarbeiten benötigten Geräte, Bauteile und Verbrauchsmaterialien besitzen Beschaffungswerte unterhalb von 2.500 € und wurden jeweils über die entsprechenden Pauschale für sonstige Ausgaben beschafft.

- wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans): Am KIT wurden wissenschaftliche Mitarbeiter (HPA-A) mit 33,93 PM beschäftigt
- Geräte (Einzelansatz B des Finanzierungsplans): Geräte wurden nicht beschafft.
- Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans): Leistungen Dritter wurden nicht beansprucht.

### 3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

**DFI, KIT, THM:** Die von den Forschungsstellen durchgeführten Forschungsarbeiten im Berichtszeitraum entsprechen den im Forschungsantrag formulierten Plänen und waren somit für die Durchführung des Vorhabens notwendig und angemessen.

### 4 Darstellung des wissenschaftlich-technischen und wirtschaftlichen Nutzens der erzielten Ergebnisse insbesondere für KMU sowie ihres innovativen Beitrags und ihrer industriellen Anwendungsmöglichkeiten

Die durch das vorgestellte Projekt erzielten Ergebnisse bieten sowohl wissenschaftlich-technische als auch wirtschaftliche Vorteile, insbesondere für kleine und mittelständische Unternehmen (KMU) aus den Bereichen Enzymkatalyse, chemische Technik und Apparatebau. Diese sind im Folgenden aufgelistet:

#### **Wissenschaftlich-technische Vorteile:**

- **Innovative Technologieintegration:** Die Anwendung der Direktsynthese von Wasserstoffperoxid und des Oberflächendisplay der Enzyme sowie deren Kopplung ermöglicht eine effiziente Enzymkatalyse. Von diesen Technologien können KMU profitieren, die chemisch-enzymatische Prozesse betreiben oder im Bereich der Enzymproduktion tätig sind, um die Effizienz ihrer Prozesse zu steigern.
- **Ressourcennutzung:** Durch Prozesse mit hohen KPI zur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Synthese wie Enzymproduktion und -katalyse wird die Möglichkeit geschaffen, wertvolle chemische Produkte nachhaltig zu erzeugen. Dies kann den technologischen Fortschritt und die Wettbewerbsfähigkeit von KMU im Bereich der umweltfreundlichen Chemie fördern.
- **Flexibilität bei der Anwendung:** Der Einsatz der unterschiedlichen Technologien ermöglicht es KMU, je nach Produktionsbedarf die geeigneten Verfahren auszuwählen. Dadurch wird der Betrieb flexibler und anpassungsfähiger.

#### **Wirtschaftliche Vorteile:**

- **Kostenreduktion:** Der Einsatz der entwickelten Technologie kann den Energie- und Ressourcenverbrauch signifikant senken, wodurch sich die Betriebskosten reduzieren.
- **Erhöhte Wertschöpfung:** Die Möglichkeit zur enzymatischen Umwandlung von Chemikalien in wirtschaftlich nutzbare, biobasierte Produkte eröffnet KMU zusätzliche Einnahmequellen und diversifiziert ihr Produktportfolio. Insbesondere Unternehmen, die im Bereich der chemischen Produktion tätig sind, können von der verbesserten Wirtschaftlichkeit und den neuen Geschäftsmöglichkeiten profitieren.
- **Wettbewerbsfähigkeit durch Nachhaltigkeit:** Die ökologische Bewertung und die damit verbundenen Einsparungen bei Energie- und Materialaufwand stärken das Image von KMU als umweltbewusste und nachhaltige Unternehmen. Dies kann den Zugang zu umweltbewussten Märkten und Förderprogrammen erleichtern.

Fazit: Das vorgestellte Projekt zeigt, wie KMU in der chemischen Produktion durch die Kombination innovativer Technologien und nachhaltiger Prozesse profitieren können. Die Technologien helfen, den Energieverbrauch zu senken, die Bioökonomie der chemischen Industrie zu ermöglichen und die Wirtschaftlichkeit durch die Schaffung neuer Umsatzpotenziale zu steigern. KMU, die diese Technologien adaptieren, können somit ihre Wettbewerbsfähigkeit verbessern, Kosten senken und zur Reduzierung der Emissionen beitragen.

## 5 Wissenstransfer in die Wirtschaft

Der Wissenstransfer in die Wirtschaft war ein zentrales Element des Projekts PeroxyDirekt. Das Ziel bestand darin, die entwickelten technologischen Innovationen im Bereich der chemo-enzymatischen Tandem-Katalyse insbesondere für kleine und mittelständische Unternehmen (KMU) nutzbar zu machen. Ein wesentliches Instrument hierfür war der projektbegleitende Ausschuss (PBA), im Rahmen dessen insgesamt fünf Sitzungen stattfanden. Diese dienten nicht nur der Präsentation der Forschungsergebnisse, sondern ermöglichten auch einen direkten Austausch über industrielle Anforderungen. Zudem konnten die beteiligten Unternehmen aktiv Feedback in die Versuchsplanung einbringen. Die wissenschaftliche Verbreitung der Ergebnisse erfolgte und erfolgt auch weiterhin über zahlreiche Kanäle, um ein breites Fachpublikum in den Bereichen Chemie und Biotechnologie zu erreichen. Hierzu zählen weitere Publikationen in international renommierten Fachzeitschriften wie Green Chemistry oder ChemCatChem sowie Präsentationen auf bedeutenden Fachtagungen. Besonders hervorzuheben sind anwendungsorientierte Formate wie der „DFI-Tag Lab<sub>2</sub>industry“, die den Transfer von der Grundlagenforschung in die industrielle Praxis gezielt adressieren.

Ein nachhaltiger Transfer wurde zudem durch die Ausbildung hochqualifizierter Fachkräfte erreicht. Im Rahmen des Projekts wurden zahlreiche Bachelor- und Masterarbeiten sowie Praxissemester betreut, die Themen von der Enzymoptimierung bis zur Reaktortechnik abdeckten. Beispielsweise wurden an der THM und dem KIT spezifische Arbeiten zur Produktion der Vanadium-Chloroperoxidase und der UPO durchgeführt.

Für die Zeit nach Projektende ist eine Verstetigung des Transfers durch gezielte Beratungsgespräche sowie die Planung von Folgeprojekten vorgesehen. Ein bei der DFG eingereichter Antrag sowie die finale Abstimmung eines AiF-ZIM-Projekts mit einem KMU unterstreichen das hohe Verwertungspotenzial der Ergebnisse. Der ursprünglich geplante Workshop „Druckreaktionen für Biotechnologen“ wird inhaltlich in die DECHEMA-Himmelfahrtstagung 2027 integriert, um eine noch größere Reichweite und Akzeptanz für diese neuen Technologien in der industriellen Bioökonomie zu erreichen. Damit leistet PeroxyDirekt einen messbaren Beitrag zur Steigerung der Wettbewerbsfähigkeit von KMU durch ressourceneffiziente und nachhaltige Produktionsverfahren.

## 6 Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft

### 6.1 Durchgeführte Transfermaßnahmen (vom Projektstart bis zum Projektende)

Maßnahme	Ziel	Rahmen	Ort/Datum/Zeitraum
Sitzungen des Projektbegleitenden Ausschusses	Diskussion der Forschungsergebnisse, weitere Versuchsplanung und Wissenstransfer in die Industrie	Gemeinsame Sitzungen und Besuche einzelner Mitglieder	<u>DFI, THM, KIT</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 01.03.2023 (Online)</li> <li>• 21.11.2023 (Online)</li> <li>• 16.07.2024 (Online)</li> <li>• 11.02.2025 (Online)</li> <li>• 01.12.2025 (Online)</li> </ul>
Publikation in Fachzeitschriften	Dissemination und unabhängige Begutachtung der Ergebnisse durch peer-review	Green Chem., Chem. Commun., ACS Catal, J. Am. Chem. Soc., Catal. Today, J. Catal., Org. Biomol. Chem., ChemCatChem, Catalysts, CIT, ChemSusChem, Chem. Sci. Technol., Angew. Chem., Chem. Eng. Sci., Chem. Eng. J.	<u>THM</u> Die grundlegenden Fragestellungen wurden im Übersichtsartikel <a href="https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/psr-2022-0110/html">https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/psr-2022-0110/html</a> veröffentlicht. <u>DFI</u> Publikation in Arbeit <u>KIT</u> "A Continuous Tandem Catalytic Platform Linking Direct H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Synthesis to Yeast Surface-Displayed Peroxygenases" Als Publikation in Chemical Engineering Transactions angenommen
Vorträge und Poster auf Konferenzen, Kongressen	Diskussion der Ergebnisse mit Fachkollegen, interdisziplinärer Austausch, Kontakt zu weiteren Interessengruppen aus dem KMU-Segment	Reaktionstechnik-Jahrestreffen, Jahrestreffen deutscher Katalytiker, Biotrans, Biocat, DECHEMA-Himmelfahrtstagung	<u>DFI</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• DFI-Tag Lab<sub>2</sub>industry 2023 (am 6.12.2023)</li> <li>• DFI-Tag Lab<sub>2</sub>industry (27.11.2024)</li> <li>• ECCE/ECAB 2025, Lisabon (10-12.09.2025)</li> </ul> <u>KIT</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• IMRET 17 (27-30.10.2024)</li> <li>• IMVT-Institutseminar (10.10.2024)</li> <li>• ECCE 15 &amp; ECAB 8 in Lisabon (08.09.–10.09.2025)</li> <li>• IMRET 18 (September 2026)</li> </ul>
Beratung von Unternehmen	Ergebnistransfer und industrielle Umsetzung	Persönliches oder telefonisches Gespräch	<u>THM</u> Erste Sondierungsgespräche mit einem KMU aus der PBA im Rahmen der geplanten Fortführung der Forschungsarbeiten wurden durchgeführt

Übernahme in die berufliche Weiter- und Ausbildung	Wissenstransfer in die Lehre	Vorlesungen / Praktikums- und Abschlussarbeiten	<p><u>DFI</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Praxissemesterarbeit (6 Monate)</li> <li>• Bachelorarbeit (3 Monate)</li> </ul> <p><u>THM</u> Zwei Abschlussarbeiten</p> <p><u>KIT</u> Zwei Bachelorarbeiten (3 Monate); drei Masterarbeiten (6 Monate)</p>
Veröffentlichung im Internet	Forschungsthema bekannt machen	Webseiten der Forschungsstellen und der KMU	Projekthomepage auf der Internetpräsenz des DFI ( <a href="#">Link</a> )

## 6.2 Geplante Transfermaßnahmen (nach Projektende)

Maßnahme	Ziel	Rahmen	Ort/Datum/Zeitraum
Abschlussbericht	Ausführliche Beschreibung des Vorgehens und der Ergebnisse des Projekts, allgemeine Verfügbarkeit der Ergebnisse	Schriftlicher Bericht	Nach Aufforderung durch die Forschungsstelle
Sitzungen des Projektbegleitenden Ausschusses	Diskussion der Forschungsergebnisse, weitere Versuchsplanung und Wissenstransfer in die Industrie	Gemeinsame Sitzungen und Besuche einzelner Mitglieder	Insgesamt fünf Sitzungen für die Projektlaufzeit
Vorträge und Poster auf Konferenzen	Vorstellung und Diskussion der Projektergebnisse	Nationale und internationale Konferenzen	Der Zeitraum für Präsentation der Ergebnisse wird noch bis etwa ein Jahr nach Projektende andauern  KIT: IBIC2026, Palermo, Italy, 10-13 May, 2026
Kurzberichte in deutschsprachigen Zeitschriften	Bekanntmachung der Forschungsergebnisse insbesondere für deutsche Unternehmen	Chemie Ingenieur Technik	Unmittelbar nach Projektende

Beratung von Unternehmen	Ergebnistransfer und industrielle Umsetzung	Persönliches Gespräch oder telefonisch	Erfolgt laufend im Rahmen des Projektbegleitenden Ausschusses. Sobald schlüssige und verwertbare Ergebnisse vorliegen, wird dieser Rahmen auch auf andere Unternehmen ausgedehnt werden.
Weiterführung der Forschungen im Rahmen eines AiF-ZIM-Projektes	Industrielle Implementierung des Prozesses	Öffentlich gefördertes Projekt	Nach Projektende
Übernahme der Projektergebnisse in die Lehre	Ausbildung zukünftiger Entscheidungsträger	Vorlesungen an der THM und KIT	Fortlaufend und auch nach Projektende
Veröffentlichung im Internet	Forschungsthema bekannt machen	Webseiten der Forschungsstellen und der KMU	Eine Übersicht über das Projekt ist bereits zugänglich und wird laufend aktualisiert ( <a href="#">Link</a> ).
Workshop „Druckreaktionen für Biotechnologen“	Akzeptanz und Expertise in diesem Bereich bei KMU fördern, dadurch die Markteintrittsbarriere für derartige Technologien senken und erste Projektergebnisse präsentieren	Als Workshop in Kooperation mit dem DECHEMA e.V.	Im letzten halben Jahr des Projektes (Monat 25-30)

## 7 Literaturverzeichnis

1. Dirks T, Yayci A, Klopsch S, et al. Immobilization protects enzymes from plasma-mediated inactivation. *J R Soc Interface*. 2023;20(207). doi:10.1098/rsif.2023.0299
2. Bormann S, Hertweck D, Schneider S, et al. Modeling and simulation-based design of electroenzymatic batch processes catalyzed by unspecific peroxygenase from *A. aegerita*. *Biotechnol Bioeng*. 2020. doi:10.1002/bit.27545
3. Gemo N, Biasi P, Canu P, Salmi TO. Mass transfer and kinetics of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> direct synthesis in a batch slurry reactor. *Chem Eng J*. 2012;207-208:539-551. doi:10.1016/j.cej.2012.07.015
4. Gkantzou E, Koulopoulou T, Brass H, Schönauer D, Glieder A, Kara S. Unspecific peroxygenase immobilization in 3D-printed microfluidics: towards tailor-made screening platforms. *Catal Sci Technol*. 2024;14(22):6496-6502. doi:10.1039/D4CY00869C
5. Freakley SJ, Kochius S, Marwijk J Van, et al. A chemo-enzymatic oxidation cascade to activate C-H bonds with in situ generated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Nat Commun*. (2019). doi:10.1038/s41467-019-12120-w

6. De Santis P, Wegstein D, Burek BO, et al. Robust Light Driven Enzymatic Oxyfunctionalization via Immobilization of Unspecific Peroxygenase. *ChemSusChem*. 2023;16(23):1-8. doi:10.1002/cssc.202300613
7. Burek BO, de Boer SR, Tieves F, et al. Photoenzymatic Hydroxylation of Ethylbenzene Catalyzed by Unspecific Peroxygenase: Origin of Enzyme Inactivation and the Impact of Light Intensity and Temperature. *ChemCatChem*. 2019;11(13):3093-3100. doi:10.1002/cctc.201900610
8. Sayoga G V., Bueschler VS, Beisch H, et al. Electrochemical H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - stat mode as reaction concept to improve the process performance of an unspecific peroxygenase. *N Biotechnol*. 2023;78(October):95-104. doi:10.1016/j.nbt.2023.10.007
9. Horst AEW, Bormann S, Meyer J, et al. Electro-enzymatic hydroxylation of ethylbenzene by the evolved unspecific peroxygenase of *Agroclybe aegerita*. *J Mol Catal B Enzym*. 2016;133:S137-S142. doi:10.1016/j.molcatb.2016.12.008
10. Ni Y, Fernández-Fueyo E, Baraibar AG, et al. Peroxygenase-Catalyzed Oxyfunctionalization Reactions Promoted by the Complete Oxidation of Methanol. *Angew Chemie - Int Ed*. 2016;55(2):798-801. doi:10.1002/anie.201507881
11. Hobisch M, De Santis P, Serban S, Basso A, Byström E, Kara S. Peroxygenase-Driven Ethylbenzene Hydroxylation in a Rotating Bed Reactor. *Org Process Res Dev*. 2022;26(9):2761-2765. doi:10.1021/acs.oprd.2c00211
12. Kluge M, Ullrich R, Scheibner K, Hofrichter M. Green Chemistry Stereoselective benzylic hydroxylation of alkylbenzenes and epoxidation of styrene derivatives catalyzed by the peroxygenase of *Agroclybe aegerita* †. 2012. doi:10.1039/c1gc16173c