

Optimierung neuartiger Aufreinigungsverfahren in der Aminosäuredarstellung am Beispiel Leucin und Isoleucin

Vom Fachbereich Chemie
Der Universität Hannover
Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

-Dr. rer. Nat.-

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Chem. Eckhard Schwabe
geboren am 08.05.1971

Hannover 2000

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. Dr. h.c. Karl Schügerl

Tag der Promotion: 28.1.2000

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von Oktober 1996 bis Dezember 1999 am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper angefertigt. Ihm möchte ich an dieser Stelle für die Aufgabenstellung und die mir gebotenen Arbeitsmöglichkeiten danken.

Herrn Prof. Dr. h.c. Karl Schügerl danke ich für die Übernahme des Korreferendariats.

Den Mitarbeitern des Instituts für Technische Chemie, insbesondere der IS-Gruppe danke ich für das gute Arbeitsklima.

Thorsten „mit h“ danke ich für die abwechslungsreichen Streitgespräche.

Torsten „Special Agent“ Knüttel und Simona „Putzig“ Becker danke ich für die Korrektur dieser Arbeit.

Frau Martina Weiß möchte ich für die bereitwillige Messung meiner kurzfristig abgegebenen Proben danken.

Großer Dank gebührt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht und mich in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG.....	1
2 THEORIE	3
2.1 AMINOSÄUREN	3
2.1.1 Chemische Eigenschaften.....	3
2.1.2 Anwendungen.....	5
2.1.3 Produktion	6
2.2 LEUCIN UND ISOLEUCIN	11
2.2.1 Pharmakologische Eigenschaften.....	12
2.2.2 Verwendung	13
2.2.3 Trennmethode n.....	13
2.3 ÜBERKRITISCHES KOHLENDIOXID.....	17
2.4 ZEOLITHE.....	19
2.4.1 Synthese der Zeolithe.....	20
2.4.2 Einsatz von Zeolithen.....	21
2.4.3 Adsorption	22
2.4.4 Adsorptionstheorie.....	25
2.4.5 Aminosäuren und Zeolithe.....	28
2.5 POLYMERISATIONEN	29
2.5.1 Polystyrol.....	29
2.5.2 Polyurethan	30
2.5.3 Polyacrylamid.....	31
2.5.4 Perlpolymerisation (Suspensionspolymerisation).....	33
2.5.5 Emulsionspolymerisation.....	33
3 MATERIAL UND METHODEN.....	34
3.1 BETAMINO BC	34
3.2 DIE SCCO ₂ - ANLAGE	34
3.2.1 Kontinuierliche Extraktion	36
3.2.2 L-Leucinmethylester-HCl	39
3.2.3 N-Acetyl-Aminosäure.....	40

3.3 ZEOLITHE.....	40
3.3.1 Aktivitätsbestimmung.....	40
3.4 ANALYTIK	41
3.4.1 Kupfer-Analytik	41
3.4.2 Kobalt-Analytik.....	41
3.4.3 Photometer	42
3.4.4 Aminosäure-Analytik	42
4 EXPERIMENTELLER TEIL	43
4.1 EXTRAKTIONEN MIT SCCO ₂	43
4.1.1 Modifier	43
4.1.2 Derivatisierungen	48
4.2 LIGANDENAUSTAUSCH AN SCHWERMETALLIONEN	53
4.2.1 Sephadex / Cu(OH) ₂	53
4.2.2 Kupferoxid	54
4.2.3 Chelatisierende Sepharose	56
4.2.4 Kobalt beladene Materialien	57
4.2.5 Zusammenfassung.....	60
4.3 ZEOLITHE.....	61
4.3.1 Adsorption von Aminosäuren auf Zeolithen	61
4.4 IMMOBILISIERUNGEN	81
4.4.1 Membranreaktor.....	81
4.4.2 Wirbelschicht	82
4.4.3 Immobilisierung auf Glas mittels Epoxydklebstoff.....	84
4.4.4 Polymer-Träger	84
5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	92
6 ANHANG	95
6.1 BEHANDLUNG DER IONENAUSTAUSCHERHARZE	95
6.1.1 Sephadex - Cu(OH) ₂	95
6.1.2 Chelatisierende Sepharose	95
6.1.3 Beladung der Austauscherharze mit Kobalt.....	95
6.2 DURCHFÜHRUNG DER POLYMERISATIONEN	97
6.2.1 Alginat	97

6.2.2 <i>Polystyrol</i>	97
6.2.3 <i>Polyurethan</i>	98
6.2.4 <i>Polyacrylamid</i>	99
6.3 VERWENDETE MATERIALIEN	104
6.4 ABKÜRZUNGEN.....	106
7 LITERATURVERZEICHNIS	108

Abstract

Optimierung neuartiger Aufreinigungsverfahren in der Aminosäure-darstellung am Beispiel Leucin und Isoleucin

Im Rahmen der Dissertation werden verschiedene neuartige Aufreinigungsverfahren zur Trennung von Aminosäuren am Beispiel der Isomere Leucin und Isoleucin untersucht und optimiert.

In Versuchen zur Extraktion von Aminosäuren mit überkritischem CO_2 (SCCO_2) werden Wasser, Butanol, Ameisen- und Essigsäure als Modifier zur Verbesserung der Löslichkeit der reinen Aminosäuren untersucht, während Leucinmethylester und N-Acetyl-Leucin als Modelle für Aminosäurederivate dienen. N-Acetyl-Leucin löst sich in SCCO_2 , seine Löslichkeit kann durch den Zusatz von Modifiern weiter erhöht werden. Bei 120 bar und $45\text{ }^\circ\text{C}$ lösen sich 0,2 g N-Acetyl-Leucin pro Liter SCCO_2 bei 3 % Ethanol-Zusatz.

An Schwermetallionen wie Cu^{2+} und Co^{2+} , die auf Ionenaustauscherharzen gebunden sind, lässt sich Leucin selektiv adsorbieren. Durch eine Variation des Säulenmaterials und durch Wahl einer anderen Wertigkeit der Metallionen soll eine Verringerung des Metallaustrags während der Beladung und Elution erreicht werden. Dabei zeigt sich, dass Co^{3+} keine Affinität zu Aminosäuren besitzt und leicht wieder in die Oxidationsstufe +2 reduziert wird, wodurch ebenfalls wieder eine Abspülung vom Säulenmaterial erfolgt.

Alginate sowie Copolymere aus Acrylamid und N,N'-Dimethylacrylamid (NDA) können zur Immobilisierung von ZSM5-Zeolithen benutzt werden, die danach weiterhin Aktivität zur Adsorption von Aminosäuren zeigen. Das Polyacrylamid-Copolymer lässt sich zur Trennung von Leucin und Isoleucin in einem präparativen Säulen-Flüssig-Chromatographieverfahren einsetzen. In einem einfachen Aufbau wird eine Reinheit des Leucin von 85 % erreicht, indem aus einer Rohlösung beider Aminosäuren im gleichen Verhältnis Leucin stärker auf dem immobilisierten Zeolithen gebunden und anschließend wieder eluiert wird. Im Gegensatz zu bisher gängigen Immobilisierungsmethoden für Zeolithe bietet dies eine kostengünstige, einfach anzuwendende Alternative für wässrige Systeme mit hohen Durchsatzraten.

Schlagwörter: Aminosäuren, Aufreinigung, Zeolithe

abstract

Optimisation of new separation procedures in the production of amino acids by the example of leucine and isoleucine

In this thesis different new methods for the separation of amino acids were studied and optimised.

Experiments concerning the extraction of amino acids with supercritical CO₂ were performed, using water, butanol, formic- and acetic acid as modifiers to increase the solubility of the pure amino acids. L-leucinemethylester and N-acetylleucine were used as model substances for amino acid derivatives. N-acetylleucine is soluble in SCCO₂ in concentrations of about 0,2 g /L at 120 bars and 45 °C using additional 3 % ethanol as modifier.

Leucine gets selectively adsorbed on heavy metals ions like Co²⁺ and Cu²⁺ bound on ion exchange resins. By variation of the resin material and the use of higher charged ions the loss of metal from the material should be prevented. Co³⁺ did not show any affinity to amino acids and was easily reduced to oxidation state +2, leading to further leakage from the column material.

Alginate and copolymers from acrylamide and N,N'-dimethylacrylamide can be used to immobilise zeolites of the ZSM5-type, which keep their activity to adsorb amino acids. These copolymers are used for the separation of leucine and isoleucine in a preparative liquid column chromatography procedure. With a simple experimental setup a purity of 85% for leucine from a solution of both amino acids can be obtained because of the stronger adsorption of leucine. In comparison to commonly applied procedures this immobilisation method offers a cheap and easy alternative for aqueous systems with high throughput rates.

Keywords: amino acids, separation, zeolites

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Leucin und Isoleucin werden wegen ihrer biologischen Wirkungen in der pharmazeutischen Industrie benötigt und müssen dabei in hoher Reinheit produziert werden. Die Trennung dieser beiden isomeren Aminosäuren voneinander gestaltet sich nach den bisher verwendeten Verfahren aufwendig.

Im Rahmen der Dissertation werden neuartige Aufreinigungsverfahren in der Aminosäuredarstellung am Beispiel Leucin und Isoleucin untersucht und optimiert.

Die konventionellen Trennmethode machen sich folgende Eigenschaften der beiden Isomere zu Nutze:

- Unterschiede in der Löslichkeit in organischen Lösemitteln
- die größere Stabilität der Leucin-Komplexe mit Schwermetallionen
- die unterschiedliche Adsorption in den Poren synthetischer Zeolithe

Für eine Optimierung dieser Verfahren bestehen folgende Möglichkeiten:

1. Bei Methoden, in denen eine selektive Extraktion mit organischen Lösemitteln durchgeführt wird, soll überkritisches Kohlendioxid als alternatives Solvent untersucht werden. Im Rahmen dieser Dissertation wird dessen Fähigkeiten als Extraktionsmittel für Aminosäuren untersucht. Es lässt sich rückstandsfrei vom Extrakt trennen und ist weder für den Menschen noch für die Umwelt schädlich. Da es sich bei überkritischem Kohlendioxid um ein unpolares Lösemittel handelt, werden Verfahren untersucht, entweder die Polarität der Aminosäuren zu erniedrigen (Derivatisierungen), oder die Polarität des Solvents zu erhöhen.
2. Wenn die unterschiedliche Stabilität von Metall-Aminosäurekomplexen zur Trennung verwendet wird, sollte sich durch Bindung der Schwermetallionen auf einem Träger die Aufarbeitung verbessern lassen. Im Vergleich zu schon bekannten Verfahren werden in dieser Arbeit zum einen alternative Elutionslösungen, andere Ionenaustauscherharze und Co^{3+} als Metallion mit starker Bindung zu Kationenaustauschern betrachtet.
3. Die Handhabbarkeit von Zeolithen wird durch eine Form der Immobilisierung soweit verbessert, dass der Einsatz auf eine einfache und kostengünstige

Weise ermöglicht wird. Dafür werden die Einbettung in unterschiedliche Polymere sowie Membran- und Wirbelschichtreaktoren untersucht.

2 Theorie

2.1 Aminosäuren

Während Pflanzen alle Aminosäuren aus einfachen Vorstufen synthetisieren, können Mensch und Tier nur die sogenannten „nicht essentiellen“ Aminosäuren Alanin (Ala), Arginin (Arg), Asparagin (Asn), Asparaginsäure (Asp), Cystein (Cys), Glutamat (Glu), Glutamin (Gln), Glycin (Gly), Prolin (Pro), Serin (Ser) und Tyrosin (Tyr) selbst darstellen. Die „essentiellen“ Aminosäuren Histidin (His), Isoleucin (Ile), Leucin (Leu), Lysin (Lys), Methionin (Met), Phenylalanin (Phe), Threonin (Thr), Tryptophan (Trp) und Valin (Val) müssen mit der Nahrung aufgenommen werden [1,2].

Aminosäuren sind wichtige Bausteine für die Biosynthese der Proteine; in Abwesenheit von essentiellen Aminosäuren in der Nahrung gerät die Eiweiß-Synthese ins Stocken, als Folge stellen sich unter Umständen lebensbedrohliche Mangelerscheinungen ein. In der Neurochemie erfüllen Aminosäuren und ihre Derivate wichtige Aufgaben als Neurotransmitter [3].

Aus diesen Gründen stellen Aminosäuren wertvolle Rohstoffe für die Nahrungs-, Futtermittel- und pharmazeutische Industrie dar. Die ökonomische und ökologische Produktion der Aminosäuren hat deshalb große wirtschaftliche Bedeutung.

2.1.1 Chemische Eigenschaften

Aminosäuren sind bifunktionelle Verbindungen. Da die beiden funktionellen Gruppen sowohl saure als auch basische Eigenschaften haben, handelt es sich um Ampholyte, die als innere Salze existieren.

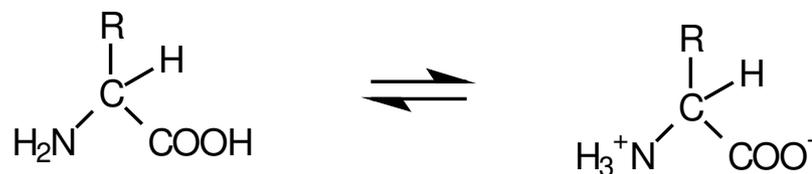


Abbildung 2-1:

Dissoziationsgleichgewicht der α -Aminosäuren

Die chemischen Eigenschaften der Aminosäuren werden bestimmt von der Amino- und der Carboxylgruppe. In sauren Medien liegen sie als Kationen, im

basischen Medium als Anionen vor. Am isoelektrischen Punkt pI ist ausschließlich das Zwitterion in Lösung vorhanden. Im Bereich ihrer pK_s Werte wirken die Aminosäuren als Puffer. Die pH-Werte der wässrigen Lösungen der Monoaminomonocarboxylsäuren liegen zwischen 5,5 und 6. Lösungen der sauren Aminosäuren Asparagin- und Glutaminsäure haben einen pH-Wert von ca. 2. Der pH-Wert einer wässrigen Lösung der schwach basischen Aminosäure Histidin liegt bei 7,5, während die Lösungen der stark basischen Aminosäuren Lysin und Arginin pH-Werte von 11 bis 12 aufweisen. Die Unterschiede in der Acidität und Basizität der Aminosäuren werden genutzt, um ihre Mischungen mittels Ionenaustauschchromatographie und Elektrophorese zu trennen [3].

Das Vorliegen der Aminosäuren als Zwitterionen bewirkt eine starke Polarität dieser Substanzen. Aufgrund ihrer elektrostatischen Anziehung führt dies zu sehr stabilen Kristallgitterstrukturen, anstatt zu schmelzen, zersetzen sie sich daher zumeist. Die Zersetzungspunkte liegen zwischen 200 °C und 300 °C. Diese intermolekularen Kräfte bewirken auch, dass die meisten Aminosäuren nur wenig in polaren Lösungsmitteln und gar nicht in unpolaren Lösungsmitteln löslich sind. Ausnahmen hiervon sind Glycin, Alanin, Lysin und Arginin, welche dank kurzer unpolarer Reste bzw. basischer Seitenketten gut wasserlöslich sind. Prolin und Hydroxyprolin sind hingegen wegen der sekundären anstelle einer primären Aminogruppe in Alkoholen löslich. Die Löslichkeit in Wasser ist pH-abhängig. Die geringste Löslichkeit liegt am isoelektrischen Punkt vor, der eine physikalische Konstante für jede Aminosäure darstellt. Dieses Löslichkeitsminimum wird zur Reinigung der Aminosäuren durch Umkristallisieren genutzt, aber auch zur analytischen Trennung mittels Elektrophorese.

Mit Ausnahme von Glycin und Aminomalonsäure verfügen alle α -Aminosäuremoleküle über ein asymmetrisches α -C-Atom. Die dadurch bedingten zwei stereoisomeren Formen (Enantiomere) sind in der Lage, die Ebene des linear polarisierten Lichts um einen bestimmten Winkel nach links bzw. nach rechts zu drehen.

α -Aminosäuren bilden Chelat-Komplexe mit Schwermetallionen. Am bekanntesten sind die dunkelblauen, leicht kristallisierenden Kupfer-Chelate (Abbildung 2-2), die dank ihrer unterschiedlichen Stabilität für die Trennung der Aminosäuren genutzt werden können.

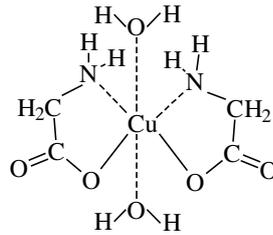


Abbildung 2-2: Bis (glycinato) Kupfer (II) hydrat

2.1.2 Anwendungen

Die Gesamtproduktion an Aminosäuren betrug im Jahre 1986 weltweit etwa 650.000 t mit einem geschätzten Wert von 2 Milliarden US \$. Für das Jahr 1996 wurde der Markt auf 3 Mrd. US \$ geschätzt [4]. Das Hauptprodukt ist dabei Natriumglutamat (Mono Sodium Glutamat, MSG), welches als Geschmacksverstärker Verwendung findet. Die weltweite Gesamtproduktion an MSG betrug im Jahr 1996 800.000 t. Die Anwendungen sind im folgenden nach Industriezweigen aufgeschlüsselt:

In der Nahrungsmittelindustrie:

Die meisten Aminosäuren haben fast keinen Eigengeschmack, trotzdem tragen sie zum spezifischen Geruch und Geschmack eines Lebensmittels erheblich bei. Oft haben Aminosäuren geschmacksverstärkende Wirkung, eine Eigenschaft, die sie für die Herstellung natürlicher Aromen interessant werden lässt.

Zusätzlich werden L-Asparaginsäure, L-Phenylalanin und L-Cystein als Geschmacksverstärker eingesetzt, L-Aspartyl-L-phenylalanin (Aspartam) findet als synthetischer Süßstoff Verwendung.

In der Futtermittelindustrie:

Für einige Tiere wie z.B. Schweine und Geflügel, ist die Hälfte der proteinogenen Aminosäuren essentiell. Da in den herkömmlichen Futtermitteln wie Fischmehl, Soja und Getreideprodukten einige der essentiellen Aminosäuren (D,L-Methionin, L-Lysin, L-Threonin) nicht in ausreichenden Mengen vorhanden sind, ist die Zufütterung dieser Aminosäuren erforderlich.

In der Pharmazeutischen- und Kosmetischen Industrie:

In der Pharmazeutischen Industrie werden Aminosäuren von höchster Reinheit benötigt. Ein sehr wichtiges Beispiel ist die Verwendung für prä- oder postoperative parenterale (= unter Umgehung des Verdauungstraktes stattfindende) Ernährung. Eine Standard-Infusionslösung beinhaltet zum Beispiel die acht essentiellen Aminosäuren (L-Methionin, L-Phenylalanin, L-Threonin, L-Tryptophan, L-Lysin, L-Isoleucin, L-Leucin und L-Valin) und außerdem auch einige nicht-essentielle Aminosäuren, z.B. Glycin, L-Glutaminsäure, L-Serin, L-Prolin und L-Alanin. Tryptophan wird wegen seiner sedativen Eigenschaften als Beruhigungsmittel angewendet.

In der Kosmetikindustrie dienen Aminosäuren u.a. als Ausgangssubstanzen für die Herstellung hochwertiger Hautcremes.

2.1.3 Produktion

Als Produktionsverfahren für Aminosäuren finden folgende technische Verfahren Anwendung:

- die Extraktion (aus Proteinhydrolysaten oder anderen natürlichen Quellen)
- chemische Synthese
- Produktion mit Hilfe von Mikroorganismen
- enzymatische Katalyse

Durch *Extraktion* aus Proteinhydrolysaten lassen sich beinahe alle L-Aminosäuren gewinnen. Rohstoffe hierfür sind proteinreiche Produkte, wie z.B. Keratin, Federn oder Blutmehl. Bei der industriellen Herstellung von Ölen aus Ölsaaten von Raps, Hanf und Soja fallen überdies Rückstände an, die zu ca. 30 % aus Proteinen bestehen. Die Hydrolyse von Eiweiß lässt sich durch Kochen mit Salz- (Maggi-Prozeß) oder Schwefelsäure, durch Einwirkung eiweiß-spaltender Enzyme (Pepsin, Trypsin) oder - weniger gut- durch Kochen mit Alkalien ausführen. Die Melasse aus der Zuckerrübenverarbeitung enthält ebenfalls Aminosäuren, die bei der Firma Amino GmbH, Frelstedt durch Ionenausschlußchromatographie gewonnen werden.

Beispielhaft sei im folgenden Kapitel ein typischer Ablauf der Aminosäuregewinnung aus Proteinhydrolysaten wiedergegeben [5, 6].

2.1.3.1 Aminosäuregewinnung aus Proteinhydrolysaten

Der Aufschluss proteinogener Rohstoffe tierischen oder pflanzlichen Ursprungs geschieht durch saure Hydrolyse in emaillierten Autoklaven in 5,8 molarer Salzsäure, je nach Rohstoff über 6 - 10 h bei 130 °C, wobei pro mol Peptidbindung ca. 1,2 mol aktive Protonen benötigt werden.

Nach erfolgter Hydrolyse wird der Reaktionsansatz von unlöslichen Bestandteilen (Faserstoffe, Huminstoffe etc.) durch Filtration befreit und der Filterkuchen nachextrahiert. Der Hydrolysatrückstand kann in neutralisierter und gewaschener Form als Bodenverbesserer eingesetzt oder muss verbrannt oder deponiert werden.

Das flüssige Hydrolysat wird durch Aktivkohlefiltration entfärbt und neutralisiert. Dies geschieht entweder durch Zugabe von Natronlauge oder mittels eines schwachbasischen Anionenaustauschers, der allerdings in Folge auch mit noch größeren Alkalienmengen (NH₃ und NaOH) regeneriert werden muss.

Bei Erreichen eines pH-Wertes von 3,2, dem isoelektrischen Punkt der Glutaminsäure, lässt sich diese anteilmäßig wichtigste Aminosäure durch Fällungskristallisation zu 60 - 80 % abtrennen. Eine quantitative Abtrennung der sauren Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure erfolgt dann bei pH 4,7 durch Bindung auf einem schwachbasischen Anionenaustauscherharz in Chloridform, während sich die neutralen und basischen Aminosäuren im Durchlauf wiederfinden. Die basischen Aminosäuren Arginin und Lysin können dann analog bei pH 7 und Histidin bei pH 4,7 auf einem schwachsauren Kationenaustauscher in H⁺-Form binden. Die aromatischen Aminosäuren werden schließlich durch Adsorption an spezifische Adsorberharze von den anderen neutralen Aminosäuren getrennt. Eine Trennung der verbleibenden aliphatischen Aminosäuren Leucin, Isoleucin, Valin, Alanin, Glycin sowie Threonin, Serin, Prolin kann durch chromatographische Trennverfahren sowie Extraktion und fraktionierte Fällungen erreicht werden. Entsprechende Verfahren sind zumeist spezifisches Firmen Know-How und in der Literatur nicht immer adäquat beschrieben.

Die Säureamide Glutamin und Asparagin sowie Cystein und Tryptophan werden größtenteils bei den oben beschriebenen Hydrolysebedingungen zerstört und sind deshalb nicht zugänglich.

Somit müssen für einige Aminosäuren entweder sehr schonende Hydrolysen unter Schutzgasatmosphäre und Zusatz von Antioxidantien gewählt, oder falls der Gehalt im Rohstoff sehr klein ist (Methionin, Tryptophan), alternative synthetische

Verfahren (chemisch oder biotechnologisch) zu deren Herstellung verwendet werden.

Im Prinzip lassen sich alle Aminosäuren auch auf dem konventionellen *synthetischen Weg* gewinnen. Die Strecker Synthese und ihre Varianten führen, ausgehend von einfachen Ausgangssubstanzen, zu racemischen Gemischen der α -Aminosäuren bzw. zum achiralen Glycin (Abbildung 2-3).

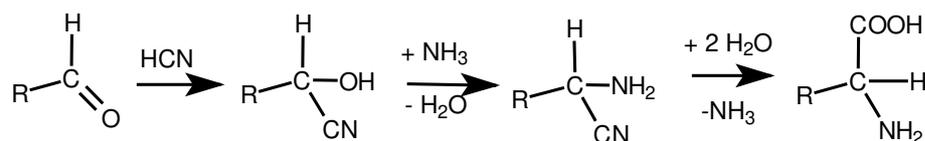


Abbildung 2-3: Strecker-Synthese der α -Aminosäuren

Die durch Addition von Blausäuren an Aldehyde zugänglichen Cyanhydrine gehen mit Ammoniak in Aminonitrile über, aus denen bei der Hydrolyse mit konzentrierten Mineralsäuren α - D,L-Aminosäuren entstehen [7]. Die anschließende Stereoisomerentrennung lässt sich mittels eines Kristallisationsverfahrens oder unter Einsatz einer enzymatischen Verfahrenstechnik durchführen. Zur Nutzung des D-Enantiomers muss dieses racemisiert und erneut aufgereinigt werden. Diese beiden zusätzlichen Verfahrensschritte sind ein schwerwiegender Nachteil für die chemische Synthese im Verhältnis zur fermentativen Darstellung der L-Aminosäuren. Ökonomisch interessante racemische, ernährungsphysiologisch verwertbare Aminosäuren sind Methionin und Alanin. In Einzelfällen lässt sich die L-Aminosäure direkt durch chirale Synthese aus einer prochiralen Vorstufe darstellen. Die N-Acetyl Derivate von D,L-Valin, D,L-Phenylalanin und D,L-Tryptophan sind Zwischenprodukte bei der Produktion von L-Aminosäuren mittels der enzymatischen Racematspaltung. Durch die Verwendung von Mikroorganismen in *Fermentationsprozessen* lassen sich optisch reine Aminosäuren darstellen. Als Kohlenstoffquelle werden hier Saccharose (aus Melasse) oder Glucose (aus Stärkehydrolysat) eingesetzt. Die Stickstoffquelle bildet entweder Harnstoff oder Ammoniumsulfat.

Wildstämme führen zu folgenden Aminosäuren: Glutaminsäure, Alanin und Valin [8].

Durch Mutanten zugänglich sind: Lysin, Threonin, Arginin, Citrullin, Ornithin, Homoserin, Tryptophan, Phenylalanin, Histidin.

Der Zusatz von Precursoren zur Fermentation liefert Threonin, Isoleucin, Tryptophan.

Zur *enzymatischen Katalyse* werden entweder ganze Zellen oder aktive Zellkomponenten (welche die entsprechenden Enzyme enthalten) eingesetzt. Bei kontinuierlicher Durchführung ist noch eine Immobilisierung der Biokatalysatoren nötig.

Zugänglich sind durch diese Methode unter anderem Lysin, Asparaginsäure, Alanin, D-p-Hydroxyphenylglycin und Tryptophan.

Eine Übersicht über die gängigen industriellen Darstellungsmethoden und Produktionsmengen von Aminosäuren in den Jahren 1982, 1986 bzw. 1996 ist in Tabelle 2-1 gegeben.

**Tabelle 2-1: Jahresproduktion an Aminosäuren 1982 [9], 1986 [4], 1996 [10]
Produktionsmethoden**

Aminosäure	Produktion (Jahrestonnen)		Produktion (Jahrestonnen)		Produktionsmethoden				
	1982	1986	1986	1996	x = 1986 o = 1996				
	Weltweit	Japan	Weltweit	Weltweit	F	E	C	C +R	Ex
Glycin	6.000	3.500	6.000	8.000-100.000			x, o		
L-Alanin	130	150		100-1.000		x, o		x	
DL-Alanin	2.000	1.500					x		
L-Asparaginsäure	450	2.000	4.000	8.000-100.000		x, o			
L-Asparagin	50	30		100-1.000		x			x, o
L-Arginin	500	700	1.000	1.000-8.000	x, o				x, o
L-Cystein	700 ^a	300	1.000	1.000-8.000		x	o		x, o
L-Glutarsäure	340.000	80.000	340.000	100.000-800.000	x, o				
L-Glutamin	500	850		100-1.000	x, o				o
L-Histidin	200	250		100-1.000	x, o				o
L-Isoleucin	150	200		100-1.000	x, o				o
L-Leucin	150	200		100-1.000	o				x, o
L-Lysin	34.000	30.000	70.000	100.000-800.000	x, o	x			
L-Methionin	150	150		100-1.000		o		x	
DL-Methionin	110.000	30.000	250.000	100.000-800.000			x, o		
L-Ornithin	50	70			x				
L-Phenylalanin	150	1.500	3.000	8.000-100.000	x, o			x	
L-Prolin	100	150		100-1.000	x, o				x, o
L-Serin	50	60		100-1.000	x, o				x, o
L-, DL-Threonin	160	200		8.000-100.000	x, o		x		
L-, DL-Tryptophan	200	250		1.000-8.000	x, o	x	x	x	x
L-Tyrosin	50	60		100-1.000					x, o
L-Valin	150	200		100-1.000	x, o	o		x	

(F) Fermentation, (E) Enzymatisch, (C) Chemische Synthese, (R) Enantiomerentrennung, (Ex) Extraktion

^a L-Cystein + L-Cystin, Hydrochlorid und freie Aminosäure

Der Verwendungszweck lässt sich anhand der Tabelle 2-2 erkennen. Bedingt durch die hohen Preise im pharmazeutischen Sektor liegt der mengenmäßige Anteil hier zwar nur bei 1 %, der Marktanteil jedoch bei 18 %. Die Produktion dieser teuren Aminosäuren erfordert allerdings auch einen deutlich höheren Aufwand, da die Qualität von Arzneimitteln in allen Ländern besonderen Anforderungen entsprechen muss und von staatlichen Behörden kontrolliert wird.

Tabelle 2-2: Marktvolumen und -anteil, aufgeschlüsselt nach Verwendungszweck [100]

Verwendung	Menge (%)	Marktanteil (%)
Menschliche Ernährung	66	52
Futtermittelzusätze	33	30
Pharmazeutica, Kosmetika, Agrochemikalien,	1	18
Industrielle Anwendungen		
	100 = 455.000 t/a	100 = 1.150.000.000 \$/a

Eine asymmetrische Synthese von L-Aminosäuren aus prochiralen Edukten wird zur Zeit nur zur Darstellung von L- β (3,4-Dihydroxy-phenyl)alanin (L-Dopa) angewendet [11]. Diese Aminosäure findet Verwendung in der Behandlung der Parkinsonschen Krankheit und hat einen hohen Marktwert.

2.2 Leucin und Isoleucin

Leucin und Isoleucin sind isomere Aminosäuren, welche sich nur in der Verzweigung am β - bzw. γ - Kohlenstoffatom unterscheiden (Abbildungen 2-4 und 2-5).

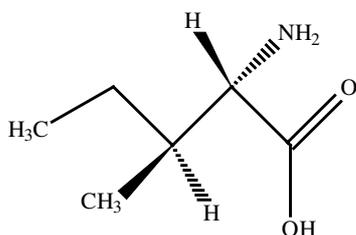


Abbildung 2-4: L-Isoleucin

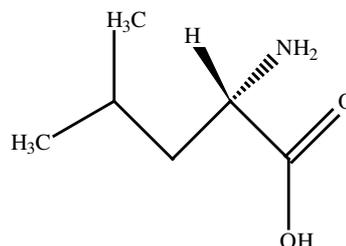


Abbildung 2-5: L-Leucin

Leucin ist in hohen Konzentrationen in Fleisch und Milchprodukten, zu einem geringeren Grad in Weizenkeimen, braunem Reis, Sojabohnen, Mandeln, Cashew- und Paranüssen, Kichererbsen, Linsen und Mais enthalten.

Isoleucin findet sich in besonders großen Mengen in Fleisch, Fisch, Käse, den meisten Saaten und Nüssen, Eiern, Geflügel und Linsen.

Beide Aminosäuren sind „essentiell“, können also vom menschlichen und tierischen Organismus nicht synthetisiert werden sondern müssen statt dessen mit der Nahrung aufgenommen werden. Dagegen können Pflanzen und einige Mikroorganismen diese Aminosäuren selber produzieren [1].

2.2.1 Pharmakologische Eigenschaften

Wie alle natürlichen Aminosäuren sind auch Leucin und Isoleucin zur Biosynthese der Proteine notwendig. Zusammen mit Valin gehören sie zu den sogenannten „verzweigt-kettigen essentiellen Aminosäuren“ (BCAA: branched chain amino acids), welche in hohen Konzentrationen im Muskelgewebe vorkommen. In Tabelle 2-3 ist eine Zusammenfassung der Wirkungen verzweigt-kettiger Aminosäuren gegeben.

Tabelle 2-3: Pharmakologische Wirkungen verzweigt-kettiger essentieller Aminosäuren [12,13,14]

verzweigt-kettige essentielle Aminosäuren (leu, ile, val)	Leucin	Isoleucin
Helfen beim Wiederaufbau von Muskelmasse nach Operationen oder Traumata	Stimuliert die Proteinsynthese in Muskeln, ist essentiell für das Wachstum.	Notwendig für die Hämoglobinbildung und bei der Stabilisierung und Regulation des Blutzuckerspiegels. Ein Defizit an Isoleucin führt zu Symptomen, die denen der Hypoglykämie ähneln.
Scheinen bei der Behandlung und in einigen Fällen sogar bei der Rückentwicklung der „Leber Encephalopathy“, einer Form der Leberschädigung bei Alkoholikern zu helfen.	Fördert die Heilung von Knochen, Haut und Muskelgewebe.	Isoleucin ist häufig bei älteren Menschen in zu geringen Konzentrationen vorhanden und trägt dadurch wahrscheinlich zu Muskelschwund, -zerrungen und -zittern bei.
Helfen möglicherweise bei „Amiotropher lateraler Sklerose“ (ALS, besser bekannt als „Lou Gehrig Erkrankung“) Da es sich dabei um eine tödlich verlaufende Erkrankung ohne bekannte Heilmethode handelt verdient diese Entdeckung weitere Untersuchungen.	Mögliche Behandlung neurologischer Störungen. Vorläufige Ergebnisse deuten auf eine Wirkung bei Parkinson Patienten hin. Verwendet wurden hierbei Dosen von 10 g Leucin pro Tag.	
Durch ihre Wirkung auf Neurotransmitter helfen sie, einige schädliche neurologische Symptome bei chronischen Lebererkrankungen zu behandeln.		

Die Fähigkeiten dieser Aminosäuren im Krankheitsfall zu helfen, bedeutet jedoch nicht, dass auch bei gesunden Individuen Effekte erzielt werden. Obwohl zur Zeit keine Studie einen Einfluss auf das Muskelwachstum durch die zusätzliche Einnahme von verzweigtkettigen essentiellen Aminosäuren zeigt, existieren mehrere Produkte für Body-BUILDER, welche hohe Dosen dieser Aminosäuren enthalten.

2.2.2 Verwendung

Die reinen kristallinen Aminosäuren werden hauptsächlich zur Herstellung von Infusionslösungen benötigt, und daher hauptsächlich in der Pharmazeutischen Industrie verarbeitet. Wegen ihrer biologischen Eigenschaften enthalten die Lösungen für Patienten mit Leberschäden besonders hohe Konzentrationen an verzweigtkettigen essentiellen Aminosäuren. Für Patienten mit Nierenschäden sind nur die essentiellen Aminosäuren enthalten [12,13,14]. In Lösungen zur parenteralen Ernährung sind neben einigen anderen auch alle essentiellen Aminosäuren enthalten. In Produkten für Bodybuilder finden sich die BCAA in unterschiedlichen Konzentrationen und Verhältnissen.

Isoleucin ist deutlich teurer als Leucin, bedingt durch seine geringere Konzentration in den natürlichen Quellen. Die Preise betragen zur Zeit 40 DM/kg für Leucin und 100 DM/kg für Isoleucin.

2.2.3 Trennmethoden

Die industrielle Herstellung beider Aminosäuren erfolgt hauptsächlich durch Extraktion aus Protein-Hydrolysaten oder Fermentationen. Die Firma Amino GmbH, Frelstedt, trennt neben anderen Produkten auch Leucin und Isoleucin aus Melasse der Zuckerrübenverarbeitung in pharma-Qualität ab. Der aufwendigste Schritt der Aufarbeitung besteht in jedem Fall in der Trennung der beiden Isomere.

Bisher angewandte Verfahren zur Trennung von Leucin und Isoleucin sind in Tabelle 2-4 zusammengefasst. Zwar lässt sich auch die Kapillarelektrophorese benutzen, sie ist jedoch nur für analytische Zwecke geeignet, da nur geringste Mengen an Lösung durch die Kapillare gefördert werden.

Tabelle 2-4: klassische Methoden der Trennung von Leucin und Isoleucin

Methoden		Problem
Ausfällen von Salzen	als Sulfonsäuresalze [15, 16, 17, 18]	Entfernung der giftigen Sulfonate, wiederholte Kristallisation
	Ausfällen von $\text{Cu}(\text{Leu})_2$ mit CuCO_3 oder $\text{Cu}(\text{OH})_2$: Isoleucin bleibt in Lösung [19]	Entfernung des Kupfer
	Ausfällen von $\text{Cu}(\text{Leu})_2$ aus Leucin / Isoleucin / Cu^{2+} / NH_3 - Lösung [20]	Entfernung des Kupfer
	Umkristallisieren von Leucin -HCl aus Lösung beider Aminosäuren [21]	niedrige Ausbeute oder Reinheit, mehrere Kristallisationsschritte nötig, niedriger pH-Wert
	Mehrfaches Umkristallisieren von Leucin -HCl [22]	niedrige Ausbeute oder Reinheit, mehrere Kristallisationsschritte nötig, niedriger pH-Wert
Extraktion	mit organischen Lösemitteln (Butanol, Isopropanol, andere aliphatische Alkohole) aus saurer Aminosäurelösung [23, 24]	niedriger pH-Wert Entfernung des organischen Lösemittels Leucin sehr rein, jedoch nicht das Isoleucin
Reaktiv Extraktion	Extraktion mit D2EHPA / organischen Lösemitteln [25, 26]	Entfernung des organischen Lösemittels / Organophosphats, geringe Ausbeute
	Extraktion der Cu-Salze mit Alkohol (erstes bekanntes Verfahren zur Trennung der Isomeren) [27]	Entfernung des Kupfer aus dem Produkt
Derivatisierung und nachfolgende Hydrolyse (enzymatisch bzw. sauer)	Veresterung und nachfolgende Hydrolyse (durch Esterase) [28]	zusätzlicher Reaktionsschritt, Rückgewinnung der Alkohole
	N-Acetylierung und nachfolgende Hydrolyse (durch Aminoacylase) [29]	zusätzlicher Reaktionsschritt mit aggressiven Chemikalien, teures Enzym (Schweinenieren Aminoacylase)
Ligandenaustausch Chromatographie	Adsorption auf Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} beladene Ionenaustauscherharzen [30]	Me^{2+} -Bluten aus dem Säulenmaterial -> geringe Standzeit, Entfernung der Schwermetallionen
Adsorption / Desorption	selektive Adsorption auf synthetischen Zeolithen [31]	geringe Partikelgröße der verwendeten Zeolithe -> aufwendiger Aufbau

Die Methoden, welche organische Lösemittel zur Trennung verwenden, nutzen die geringen Unterschiede in der Löslichkeit von Leucin und Isoleucin in aliphatischen Alkoholen bzw. in der Komplexbildung mit organischen Phosphaten aus. Problematisch ist hierbei die spätere Aufreinigung des Produktes, welches für eine Verwendung in der pharmazeutischen Industrie keine Reste an toxischen Substanzen enthalten darf.

Die Affinität der Aminosäuren zu Schwermetallionen ist bereits in Kapitel 2.1.1 erwähnt worden. Hierauf beruhen die Trennmethode, welche das Ausfällen des schwerer löslichen Leucin-Schwermetall-Komplexes aus einem Gemisch beider Aminosäuren nutzen. Schwierig ist hierbei jedoch die nachfolgende Aufarbeitung der Produkte, bei der die eingesetzten Schwermetalle wieder entfernt werden müssen.

Wenn die Metallionen auf einem Ionenaustauscherharz immobilisiert werden, sollte eine nachträgliche Entfernung aus dem Produkt nicht mehr notwendig sein. Tatsächlich wird die Metallionenkonzentration im Produkt verringert, die Bindung im Aminosäure-Komplex ist aber so stark, dass immer noch eine Auslösung vom Säulenmaterial stattfindet.

Die Derivatisierung und anschließende enzymatische Hydrolyse wird normalerweise nur für die Spaltung von Enantiomeren eingesetzt, da die Kosten durch die verwendeten Enzyme und die zusätzlichen Reaktionsschritte hoch sind.

Die Benutzung von Zeolithen zur Trennung isomerer Verbindungen ist industriell bisher nur für organische Verbindungen eingesetzt worden, der sogenannte „Molekularsiebeffekt“ lässt sich aber auch auf die geringen Unterschiede in der Struktur von Leucin und Isoleucin anwenden. Als Nachteil ist hier die geringe Partikelgröße der verwendeten synthetischen Zeolithe zu sehen, die sich bisher nur in aufwendigen und teuren Anlagen einsetzen lassen.

Für eine Optimierung im Sinne einer ökologischen und ökonomischen Art der Trennung der beiden Isomeren bestehen folgende Möglichkeiten:

1. Die organischen Lösemittel werden durch ein alternatives Solvent mit besseren Eigenschaften ersetzt. Im Rahmen dieser Dissertation wird daher SCCO_2 auf seine Fähigkeiten als Extraktionsmittel für Aminosäuren untersucht

(Kapitel 4.1), da es sich rückstandsfrei vom Extrakt trennen lässt und weitere interessante Vorteile bietet, die in Kapitel 2.3 dargelegt sind.

2. Die Bindung der Schwermetallionen auf dem Träger wird verbessert. Hierzu werden zum einen alternative Elutionslösungen, andere Ionenaustauscherharze und Co^{3+} als Metallion mit starker Bindung zu Kationenaustauschern betrachtet (Kapitel 4.2).
3. Die Handhabbarkeit der Zeolithe wird durch eine Form der Immobilisierung soweit verbessert, dass der Einsatz auf eine einfache und kostengünstige Weise ermöglicht wird (Kapitel 4.3).

2.3 Überkritisches Kohlendioxid

Eine Phase wird dann als überkritisch bezeichnet, wenn sowohl Temperatur als auch Druck oberhalb der stoffspezifischen kritischen Werte liegen. Bei Temperaturen oberhalb der kritischen Temperatur liegt kein Zweiphasengebiet vor, es ist deshalb keine Verflüssigung des Gases durch Druckerhöhung möglich. Genauso kann eine Flüssigkeit oberhalb ihres kritischen Druckes nicht mehr durch eine Temperaturerhöhung verdampft werden.

Tabelle 2-5: physikalische Eigenschaften von CO₂ [32]

Eigenschaft	Einheit	Gas	Flüssigkeit	Überkritische Phase
Dichte	g/cm ³	10 ⁻³	1	0,4 bis 1,0
Diffusionskoeffizient	cm ² /s	10 ⁻¹	2×10 ⁻⁶	7×10 ⁻³
Viskosität	(g·cm ⁻¹ ·s ⁻¹)	10 ⁻⁴	3×10 ⁻²	3×10 ⁻⁴

Die dargestellten Größen zeigen, dass überkritische Fluide einen höheren Diffusionskoeffizienten und eine geringere Viskosität als konventionelle Lösemittel haben, während die Dichte der einer Flüssigkeit ähnelt. Durch die geringe Viskosität kann das überkritische Fluid besser in die Matrix eines zu extrahierenden Stoffes eindringen, während der hohe Diffusionskoeffizient den Transport von Molekülen aus der Grenzfläche in das Fluid erleichtert. Daher sind überkritische Fluide besonders als Extraktionsmittel in der SFE (Supercritical Fluid Extraction) geeignet [33].

Die Lösemitteleigenschaften eines überkritischen Fluids können durch Variation von Druck und Temperatur den Bedürfnissen angepasst werden. Da CO₂ ein unpolares Molekül ist, ist auch überkritisches CO₂ (SuperCritical CO₂, SCCO₂) ein geeignetes Lösemittel-System für unpolare Solventien.

Durch die Beimengung geringer Mengen von polaren Lösemitteln, wie z.B. Methanol oder Ethanol, kann auch die Löslichkeit von polaren Solventien stark erhöht werden [34]. Solche Zusätze, welche die Eigenschaften eines überkritischen Fluids verändern, nennt man „Modifier“ oder „Entrainer“. Selbst bei Verwendung dieser Zusätze ist SCCO₂ für die Umwelt immer noch ungefährlicher als die meisten anderen organischen Lösemittel.

Die Vorteile der Verwendung überkritischer Fluide gegenüber konventionellen Lösemitteln [35] sind nachfolgend beschrieben.

Der Energieverbrauch bei der Anwendung überkritischer Lösemittel in der Separationstechnik ist verglichen mit der Destillation geringer. Eine Abtrennung der gelösten Substanzen kann durch eine einfache Druckverringerung erfolgen, welche für temperaturempfindliche Substanzen schonender ist. Besonders in der Pharma- und Lebensmittelindustrie bietet die physiologische Unbedenklichkeit und die problemlose Abtrennung von überkritischem Kohlendioxid einen deutlichen Vorteil gegenüber Kohlenwasserstoffen und halogenierten Lösemitteln. In der EG-Vorschrift 88/344/EEC ist die Verwendung von Extraktionsmitteln für die Lebensmittelindustrie reguliert. Nach dieser EG-Vorschrift gilt CO₂ als „generally regarded as safe (GRAS)“. Dies bedingt den großen Vorteil bei der Verwendung in der Lebensmittelindustrie, da Produkte, welche mit SCCO₂ gelöst wurden, als „natürlich“ bezeichnet werden dürfen. Außerdem ist Kohlendioxid nach §11, Abs. 2, Nr. 2 LMBG (i.d.F. vom 25.11.1994) ausdrücklich vom Zusatzstoffverbot ausgenommen (neben Luft, Stickstoff und demineralisiertem Wasser) [36].

Überkritische Fluide werden industriell zur Extraktion von Koffein [37], Hopfenharz [38], Aromastoffen (z.B. Pfefferminzöl [39]), Nikotin [40], Cholesterin [41], Pflanzenölen und Fischtran benutzt. Eine detaillierte Beschreibung der technischen Durchführungen findet sich bei King et al. (1993) [42].

Die niedrige kritische Temperatur von Kohlendioxid (31°C) macht es auch als Lösemittel für enzymatische Reaktionen interessant, da die meisten Enzyme bei diesen Temperaturen gute Aktivitäten zeigen, sich nicht lösen und daher sehr leicht vom Reaktionsgemisch abgetrennt werden können.

Eine höhere Temperatur führt zu einer erhöhten Löslichkeit von Substanzen, da jedoch gleichzeitig die Dichte des Fluids abnimmt, liegen zwei gegenläufige Effekte vor, welche beide die Lösemitteleigenschaften beeinflussen. Die Solvatationskraft von überkritischem CO₂ sinkt bei niedrigen Drücken mit steigender Temperatur, während sie bei hohen Drücken mit steigender Temperatur größer wird [43]. Es gibt unterschiedliche Modelle, mit denen versucht wird, die Löslichkeiten von Substanzen in überkritischem CO₂ zu berechnen [44,45,46,47]. Die starke Druckabhängigkeit der Löslichkeiten (bei allen überkritischen Fluiden) kann man sich bei der Fraktionierung des Extraktes durch Druckreduzierung zu nutze machen [48].

Um den energieaufwendigen Schritt der Kompression und Dekompression zu vermeiden, sind mehrere isobare Methoden der Abscheidung des Extrakts entwickelt worden: Adsorption, Absorption, Temperaturgradienten, Membranseparation und Entfernung des Modifiers. Eine Übersicht über diese Methoden geben Birgith et al. (1995) [49].

Weitere Anwendungsgebiete für überkritische Fluide sind:

Färbemedien für Synthetikfasern [50], chemische Reaktionen [51] und die Müllverbrennung nach dem Hydrothermal-Prinzip mit überkritischem Wasser [52]. In der SFC (Supercritical Fluid Chromatography) wird ein überkritisches Fluid als mobile Phase in der Chromatographie eingesetzt [53].

2.4 Zeolithe

Das Wort „Zeolith“ ist griechischen Ursprungs und heißt „kochender Stein“, da natürliche Zeolithe beim Erhitzen sichtbar Wasser abgeben. Dieser Prozess ist reversibel und lässt sich durch ihre Kristallstruktur erklären.

Die allgemeine Formel der Zeolithe lautet:



Es handelt sich bei Zeolithen also um mikroporöse, kristalline Alumosilicate, deren dreidimensionale Gitterstruktur aus eckenverknüpften $[SiO_4]^{4-}$ und $[AlO_4]^{5-}$ Tetraedern besteht, siehe Abbildung 2-6 (a). Durch Eckenverknüpfung der Tetraeder bilden sich Polyeder (b). Die weitere Verknüpfung dieser Polyeder führt schließlich zu dreidimensionalen Netzwerken (c). Die offene Netzwerkstruktur enthält Kanäle und Hohlräume, in welche leicht Wasser und andere Moleküle eingelagert werden können [54, 55].

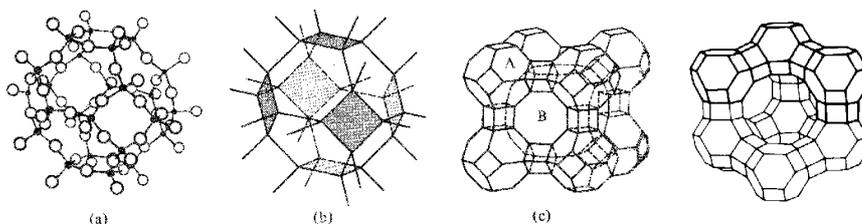


Abbildung 2-6: Struktur der Zeolithe vom Typ A und X

Die Abmessung der Öffnungen ermöglicht eine selektive Aufnahme auch isomerer Moleküle ("Molekularsieb-Effekt"). Die verschiedenen Strukturtypen unterscheiden sich in den Ausmessungen der Hohlräume und Öffnungen (die Typen A und X sind in Abbildung 2-6 gezeigt). In synthetischen Zeolithen kann man die Hohlraumstruktur definiert erzeugen, um unterschiedlichen Problemstellungen gerecht zu werden. Ein Vergleich der Porendurchmesser zweier Zeolithe zeigt die mögliche Bandbreite. Sie reicht von 4,1 Å beim Typ A bis zu einem Porendurchmesser von 30 Å bei Typ MCM 41.

2.4.1 Synthese der Zeolithe

In der Natur sind fast 40 zeolithische Mineralien bekannt. Synthetisch konnten bisher mehr als 100 verschiedene Strukturen hergestellt werden, von denen allerdings bisher nur wenige eine technische Bedeutung erlangt haben [56].

Die Synthese von Zeolithen erfolgt durch hydrothermale Kristallisation von Gelen, die aus wässrigen, stark alkalischen Silikat- und Aluminatlösungen gebildet werden. Geeignete silikatische Ausgangsmaterialien sind Wasserglas sowie aktives, amorphes SiO_2 in Form von Kieselolen oder -gelen. Die Aluminatlösung wird in der Regel durch Auflösen von Aluminiumoxidhydraten in Alkalihydroxidlösung hergestellt. Als Alkalihydroxidlösungen werden wässrige NaOH und KOH Lösungen eingesetzt, für die Synthese bestimmter Strukturen auch im Gemisch mit organischen Aminen und quartären Ammoniumverbindungen. Welche Struktur bei der Synthese gebildet wird, hängt von folgenden Variationen ab:

- dem $\text{SiO}_2 / \text{Al}_2\text{O}_3$ - Verhältnis im Syntheseansatz
- der Art und Konzentration der Alkali-Kationen
- sofern vorhanden, der Art und Konzentration der organischen Amine bzw. Ammoniumionen [57]
- Kristallisationsdruck und -temperatur sowie Temperaturführung
- der Intensität der mechanischen Bewegung.

Auch Teilchengröße und -verteilung werden in entscheidender Weise von der Einhaltung dieser Reaktionsparameter beeinflusst.

ZSM-5 und ZSM -21 werden aus folgendem System synthetisiert:

Na_2O / $(\text{NR}_4)_2\text{O}$ / Al_2O_3 / SiO_2 - System, Überdruck.

2.4.2 Einsatz von Zeolithen

Zeolithe werden vorwiegend als Zusatz zu Waschmitteln (adsorbieren Ca^{2+} und Mg^{2+} und reduzieren dadurch die Wasserhärte), als Katalysatoren und als Adsorbentien eingesetzt [58]. Sterische Effekte von Molekülen können zur Trennung genutzt werden (z.B. Leucin/Isoleucin).

Als Nachteil der Verwendung von Zeolithen stellt sich bei synthetisch erzeugten Zeolithtypen die geringe Partikelgröße dar. Die Verwendung von Zeolithpulver hat zwar Vorteile hinsichtlich der Kinetik der Adsorption und Desorption, da das Adsorptionsgleichgewicht schneller erreicht wird, allerdings ist die Abtrennung vom Rohprodukt erschwert. Die Zeolithe werden daher entweder auf poröse Träger aufgebracht oder auf anderen Oberflächen abgeschieden (sogenannte mesoporöse Phasen oder Zeolith-Membrane). Die Anwendung mesoporöser Phasen ist zum einen durch die hohen Herstellungskosten, zum anderen durch einen hohen Druckabfall benachteiligt. Eine sehr gute Übersicht über den aktuellen Stand der Anwendung und die Darstellung von Zeolith-Membranen bietet [59].

Die einfachste Form der Anwendung wäre die Verwendung von Zeolithformkörpern in einem Festbett bzw. einer Säule. Dies ist jedoch bei wässrigen Lösungen nicht möglich, da keine in der wässrigen Phase stabilen Formkörper zur Verfügung stehen.

Um die Zeolithpartikel im Reaktor zurückzuhalten, werden zur Zeit Membrane mit niedrigen Porendurchmessern verwendet. Als Beispiel hierfür sei der Aufbau eines Zeolith-Membran-Reaktors der DEGUSSA zur Peptidreinigung dargestellt [101].

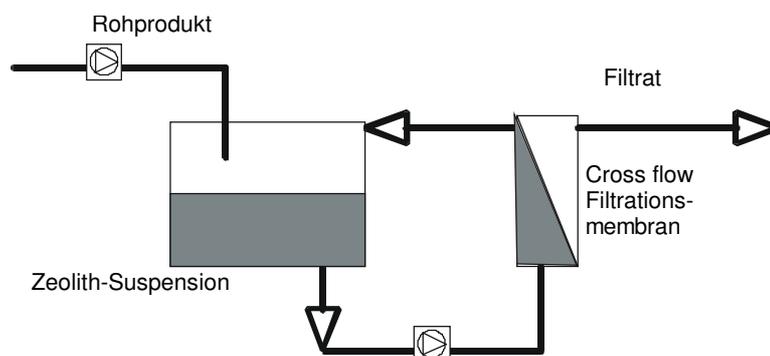


Abbildung 2-7: Zeolith-Membran-Reaktor zur Peptidreinigung

Eine Zeolith-Suspension wird in einer Crossflow Filtrationsanlage umgepumpt. Die verwendete Pumpe muss dabei in der Lage sein, die Suspension zu fördern. Während Aminosäuren auf dem Zeolithen adsorbiert werden, können die Peptide aufgrund ihrer Molekülgröße nicht in die Poren des Zeolithen diffundieren und verbleiben daher in der Produktlösung. Der Durchsatz ist durch die Verwendung der Crossflow Filtration nur gering.

2.4.3 Adsorption

Das in Zeolithen enthaltene Kristallwasser kann ohne Zerstörung der Gitterstruktur entfernt werden. Die so entwässerten Zeolithe sind in der Lage, nicht nur Wasser, sondern auch andere Moleküle aufzunehmen; sie wirken als Adsorptionsmittel.

Die besonderen Kennzeichen der zeolithischen Adsorption sind [60,61]:

- regelmäßige Porenstruktur mit genau definierten Porendurchmessern zwischen 0,3 und 0,9 nm
- in Abhängigkeit des Al-Gehaltes im Zeolithgitter negative Überschussladungen, die durch angelagerte bewegliche Kationen kompensiert werden (= Ionenaustauscher), daraus ergeben sich hohe elektrostatische Adsorptionskräfte
- große innere Oberfläche (600-800 m²/g) durch das dichte Porensystem
- hohe Struktur- und Thermostabilität, geringe Kompressibilität
- Änderung der Polarität durch Variation im Si/Al-Verhältnis
- unterschiedliche Gerüststruktur, je nach Kombination der sekundären Baueinheiten.

Die für die Anwendung der Zeolithe wichtigste Kenngröße ist der Durchmesser der Zuführungsporen zu den Adsorptionshohlräumen. Es werden daher nur Stoffe adsorbiert, deren Moleküldurchmesser kleiner ist als der Durchmesser der Poren. Unter Ausnutzung dieses „Sieb-effektes“ können Gemische auch chemisch verwandter Stoffe mit hoher Selektivität voneinander getrennt werden. In einige Publikationen [60, 62, 63] ist die Siebwirkung der einzelnen Zeolithtypen auf eine ganze Reihe von Stoffen aufgeführt, so dass danach beurteilt werden kann, ob

und ggf. an welchem Zeolithen die Trennung von Gemischen verschiedener Stoffe nach ihrer Molekülgröße möglich ist.

Eine weitere wichtige Kenngröße ist das Verhältnis von Silizium und Aluminium im Gitter, das meist als molares $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ -Verhältnis angegeben wird. Je höher dieses „Modul“ ist, desto stabiler ist die Struktur gegen Säuren und saure Medien. In Zeolithen mit niedrigem $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ Modul (der niedrigstmögliche von $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3 = 2$ liegt im Zeolith A vor) führt eine Säureeinwirkung zum Herauslösen von Aluminium aus dem Gitter unter Zusammenbruch der Struktur. Zeolithe mit einem Modul > 6 können ohne Strukturveränderung mit Mineralsäuren behandelt werden. Das Modul bestimmt darüber hinaus das hydrophobe Verhalten der Zeolithe. Zeolithe mit einem Modul kleiner 10 sind hydrophil. Mit steigendem Modul nehmen die hydrophoben Eigenschaften zu. Je geringer das Modul des Zeolithen, d.h. je höher der Al-Gehalt im Zeolithgitter ist, desto stärker wird darüber hinaus die Befähigung des Zeolithen zum Ionenaustausch.

Aus diesen Eigenschaften folgt, dass die Adsorption von Substanzen an Zeolithen sowohl durch die Größe der Moleküle als auch durch ihre Polarität beeinflusst wird.

Durch die große Oberfläche und dadurch bedingte Dispersionskräfte können an Zeolithe speziell im Bereich niedriger Adsorbat-Konzentrationen höhere Beladungen erzielt werden als an anderen Adsorbentien (z.B. Kieselgel mit 500 bis 600 m^2/g und Aluminiumoxid mit 300 bis 350 m^2/g). Zu diesen Dispersionskräften kommen noch hohe elektrostatische Kräfte hinzu, die innerhalb der Hohlräume dadurch entstehen, dass aufgrund der starren Struktur des Kristallgitters die Schwerpunkte negativer Ladung und positiver Ladung räumlich nicht zusammenfallen. Das dadurch entstehende elektrische Feld bewirkt eine hohe Affinität zu polaren (H_2O , NH_3) und polarisierbaren (CO_2 , ungesättigte Kohlenwasserstoffe) Molekülen. Das Zusammenwirken von Dispersions- und elektrostatischen Kräften hat zur Folge, dass selbst bei niedrigen Konzentrationen der zu adsorbierenden Stoffe noch hohe Beladungen erreicht werden können, d.h. Zeolithe sind besonders gut zur Entfernung von Spuren an Verunreinigungen aus Gas- und Flüssigkeitsströmen geeignet.

Die Adsorption an Zeolithen lässt sich durch thermodynamische (Adsorptionsgleichgewicht, Adsorptionswärme und -entropie) und kinetische Daten (Diffusion) beschreiben [64].

Eine Anwendung in der präparativen Säulen-Flüssig-Chromatographie (PLC) kann die Eigenschaften der Zeolithe in einer Grundoperation der Technischen Chemie ausnutzen. Die PLC wird zur Isolierung und Reinigung von Wertprodukten in der chemischen, pharmazeutischen und zunehmend in der lebensmittelverarbeitenden Industrie eingesetzt. Im Gegensatz zu anderen Verfahren wie Destillation, Kristallisation und Extraktion ist sie ein aufwendiges und teures Verfahren. Eine ökonomisch sinnvolle Verwendung ist daher nur dann gegeben, wenn andere Verfahren nicht zum gewünschten Erfolg führen oder die Herstellungskosten der Produkte 2000 DM/kg übersteigen.

Die wesentlichen Kosten bei der Reinigung mittels PLC entstehen durch die Investition für Anlagen und Peripheriegeräte sowie die Aufarbeitung der Fraktionen und Fließmittel. Die Anwendung spezieller Verfahrensweisen wie des Recyclings, des Flip-Flop- und des Simulated Moving Bed-Verfahrens bieten Möglichkeiten zur Kostenreduzierung [65, 66].

Einen bedeutenden Kostenfaktor stellen die zur Trennung eingesetzten Adsorbentien dar. Die üblicherweise verwendeten feinkörnigen Reversed-Phase Materialien auf Kieselgelbasis kosten ca. 8000 DM/kg. Synthetisch hergestellte Zeolithe sind dagegen wesentlich preisgünstiger (ca. 50 DM/kg). Sie werden bereits zur Trennung von Bulk-Chemikalien in der Gas- und Flüssigphasen-Adsorption im großtechnischen Maßstab verwendet.

Ein Vergleich zwischen Adsorbentien auf Zeolith- und Kieselgelbasis ist in Tabelle 2-6 gegeben. Bei der Beurteilung der technischen Durchführbarkeit wurde hier allerdings von natürlichen Zeolithen mit größeren Partikeln bzw. von der Verwendung von Zeolith-Formkörpern mit organischen Lösemitteln oder Gasen ausgegangen, für die Anwendung in wässrigen Systemen müssen zunächst taugliche Trägersysteme gefunden werden.

Tabelle 2-6: Vergleich von Adsorbentien auf Zeolith- und Kieselgelbasis [67]

Gesichtspunkt	Verfahren mit Adsorbentien auf Kieselgelbasis	Verfahren mit Adsorbentien auf Zeolithbasis
Preis	8000 DM/kg für modifiziertes Material	50 DM/kg
Reproduzierbarkeit der Synthese	Nach Möglichkeit Verwendung derselben Charge für ein gegebenes Trennproblem	Wechsel zwischen verschiedenen Chargen unbedenklich
Kapazitäten	ca. 50 mg/g	bis ca. 250 mg/g Zeolith HY
Regenerierung des Adsorbenten	durch das Lösen und Herauswaschen der Verunreinigungen, bei modifizierten Materialien zum Teil schwierig	durch das Lösen und Herauswaschen der Verunreinigungen, im Bedarfsfalle calcinieren des Zeolithen möglich
Fließmitteleinsparung	durch Optimierung der Trennung, Fließmittel-Recycling zwischen den Fraktionen	da selten Betrieb im Elutionsmodus, keine Fraktionen mit reinem Fließmittel, maximale Nutzung des Fließmittels, unterschiedliche Fließmittel zur Adsorption und Desorption
Konzentrationsänderung der Substanz(en)	im Elutionsmodus stets verdünnt	z.T. erhebliche Aufkonzentrierung
Anwendbarkeit auf Trennprobleme	allgemein anwendbar, insbesondere auf Systeme mit vielen Komponenten, da im Elutionsmodus gearbeitet wird, auch für große Moleküle (z.B. Proteine) anwendbar	schlecht anwendbar im Elutionsmodus, sinnvoll nur für Systeme mit wenig Komponenten, sinnvoll insbesondere für Isomeren-Trennungen (Ausschlußmechanismus)
Technische Durchführbarkeit	nur im Säulenverfahren mit allen Schaltvarianten	im Säulen- und Batchverfahren (bei entsprechender Korngöße)

Bei der Aufreinigung von Rohprodukten durch Adsorption bieten sich folgende Verfahren an:

Bei hoher Produkt-Konzentrationen in der Rohlösung werden im ersten Schritt die Verunreinigungen adsorbiert, das Adsorbens schließlich wieder regeneriert. Bei niedriger Produkt-Konzentration wird es zunächst durch Adsorption angereichert, in einem nachfolgenden Schritt dann desorbiert.

2.4.4 Adsorptionstheorie

Zur Beschreibung der Auftrennung von Stoffen durch Zeolithe kann man sich verschiedener Ansätze aus der Adsorptionstheorie bedienen, die in Lehrbüchern

eingehend abgehandelt werden [68 ,69]. Zum besseren Verständnis werden die verwendeten Größen hier nochmals kurz erläutert.

Das Adsorptionsgleichgewicht der Adsorption einer Komponente i aus einem flüssigem Gemisch mit N Komponenten ($i=1,2,..N$) wird durch die Exzeßgröße n_i^e beschrieben [70]:

$$n_i^e = n^0 (x_{i,0} - x_i) \quad \text{Gleichung 2-1}$$

Da die direkte Bestimmung einer Konzentration an der Oberfläche des Adsorbens nicht möglich ist, wird n_i^e durch die Bestimmung der Konzentration c oder des Molenbruchs (x) der Komponente i in der Außenlösung vor dem Kontakt mit dem festen Adsorbens ($c_{i,0}$ oder $x_{i,0}$) und nach der Einstellung des Gleichgewichtes (c_i oder x_i) gemessen.

n^0 gibt die auf die Adsorbensmasse m_{Ad} bezogene Stoffmenge aller Komponenten in mol/g zum Zeitpunkt $t = 0$ an. Die Exzeßgröße n_i^e ist die Gleichgewichtsbeladung des Adsorbens mit der Komponente i in mol/g und kann sowohl positive als auch negative Werte aufweisen. Des weiteren ist n_i^e eine Funktion von x_i sowie der Adsorptionstemperatur und nur geringfügig vom Systemdruck abhängig. Für die Adsorption einer reinen Flüssigkeit ($N = 1$) kann (definitionsgemäß) keine Exzeßadsorption auftreten:

$$n_i^e = 0 \quad \text{Gleichung 2-2}$$

Bei der Adsorption aus einer binären Mischung ($N = 2$) ist:

$$n_1^e = n_2^e \quad \text{Gleichung 2-3}$$

und

$$\sum n_i^e = n_1^e + n_2^e = 0 \quad \text{Gleichung 2-4}$$

Sind die Werte für n_1^e und n_2^e gleich Null, bedeutet dies, dass keine der Komponenten bevorzugt adsorbiert wird und es zu keiner Trennung kommt.

Zur Beschreibung der Adsorption der Aminosäuren wird in dieser Arbeit die dimensionslose Adsorbensbeladung q_i (Gramm Adsorptiv/Gramm Adsorbens) verwendet.

Durch die Bestimmung der Konzentration der untersuchten Komponente in der Lösung vor der Adsorption ($c_{i,0}$) und nach Einstellung des

Adsorptionsgleichgewichtes ($c_{i,G}$) kann die dimensionslose Adsorbensbeladung q_i (Masse Adsorptiv durch Masse Adsorbens) nach Gleichung 2-5 berechnet werden [70]:

$$q_i = \frac{(c_{i,0} - c_{i,G})V_L}{m_{Ad}} M_i \quad \text{Gleichung 2-5}$$

Die Größe V_L gibt das zu dem Adsorbens hinzugegebene Flüssigkeitsvolumen an. Das Adsorptionsgleichgewicht wird sowohl von der Temperatur, den Komponenten als auch dem Adsorptionsmittel beeinflusst, wobei bei den zu erreichenden Adsorptionsmengen auch die Art der Herstellung und die Geschichte (Anzahl der geleisteten Zyklen, Art der Regeneration) eine Rolle spielen kann. Bei Adsorptionen aus Flüssigkeiten spielt der Druck nur eine untergeordnete Rolle.

Zum Vergleich der Adsorptionen auf verschiedenen Materialien werden die Gleichgewichtsdaten einer Adsorptionsmessung mit Hilfe bekannter Adsorptionsmodelle korreliert. Bei der Adsorption an den mikroporösen Zeolithen ist es sinnvoller, statt von einer Adsorptionsoberfläche von einem Adsorptionsvolumen zu sprechen. Mit wachsender Belegung strebt q einem Grenzwert q_s zu. Dieser entspricht der vollständigen Füllung der Poren. Die Langmuirsche Adsorptionsisotherme [71] beschreibt diesen Verlauf durch die Gleichung 2-6:

$$\Theta = \frac{q_i}{q_{i,S}} = \frac{c_{i,G}}{a_i + c_{i,G}} = \frac{b_i \cdot c_{i,G}}{1 + b_i \cdot c_{i,G}} \quad \text{Gleichung 2-6}$$

Mit $a_i = 1/b_i$ und $i = 1$

Diese Beziehung entspricht der Langmuirschen Adsorptionsisotherme für molekulare Adsorption. Sind mehrere Komponenten auf der Oberfläche reversibel adsorbiert, ergibt sich:

$$\Theta_i = \frac{b_i \cdot c_{i,G}}{1 + \sum_0^i (b_i \cdot c_{i,G})} \quad \text{Gleichung 2-7}$$

Θ ist der Belegungsgrad der Oberfläche, Θ_i ist der relative Belegungsgrad der Komponente i . Für kleine Werte von c ($c \ll a$) steigt die Adsorptionsisotherme

proportional zu c . Für große Werte von c nähert sie sich asymptotisch der Porenfüllung. In einer Näherung kann man für kleine Konzentrationen das *Henry-Daltonsche-Gesetz* ansetzen:

Gleichung 2-8

$$q_i = \frac{q_{i,S}}{a_i} c_{i,G} = K_i c_{i,G}$$

Zur Auswertung von Langmuirschen Adsorptionsisothermen und Bestimmung der Koeffizienten wird die Gleichung 2-6 linearisiert. Die Gleichungen sind analog der aus dem Bereich der Enzymtechnik bekannten Linearisierungen zur Michaelis-Menten-Kinetik [1] und werden zur Unterscheidung entsprechend benannt:

- Analog zu Lineweaver-Burk

Gleichung 2-9

$$\frac{1}{q_i} = \frac{a_i}{q_{i,S}} \frac{1}{c_{i,G}} + \frac{1}{q_{i,S}}$$

- Analog zu Hanes-Wilkinson

Gleichung 2-10

$$\frac{c_{i,G}}{q_i} = \frac{a_i}{q_{i,S}} + \frac{1}{q_{i,S}} c_{i,G}$$

- Analog zu Eadie-Hofstee

Gleichung 2-11

$$q_i = q_{i,S} - a_i \frac{q_i}{c_{i,G}}$$

Die Werte für $c_{i,G}$ und q lassen sich experimentell ermitteln, bezogen auf die Adsorption von Aminosäuren aus einer Lösung an Zeolithen ist $c_{i,g}$ die Konzentration einer Aminosäure i im Überstand über dem Zeolithen nach Einstellung des Gleichgewichts, q_i ist die Beladung des Adorbens, $q_{i,S}$ ist der Grenzwert der Beladung, welcher sich aus einer Auftragung der Isothermen der Adsorption ablesen lässt.

2.4.5 Aminosäuren und Zeolithe

Da sich isomere Verbindungen unter anderem in ihrer räumlichen Struktur unterscheiden, sollen die besonderen Eigenschaften der Zeolithe zur Trennung der Aminosäuren Leucin und Isoleucin benutzt werden. Dabei treten folgende Effekte auf:

- Aminosäuren können in wässrigen Lösungen unterhalb ihres isoelektrischen Punktes an Zeolithen adsorbiert werden.
- Die Desorption der Aminosäuren ist bei pH-Werten oberhalb des isoelektrischen Punktes möglich.
- Die Adsorptionskapazität steigt mit Zunahme des Molekulargewichts der Aminosäure (vorausgesetzt die Porengröße des Zeolithen ist nicht limitierend).
- Bei gleichem Zeolithtyp steigt die Adsorptionskapazität für Aminosäuren mit sinkendem Modul, d.h. steigendem Al-Gehalt im Zeolithgerüst.
- Je kleiner die Aminosäure, desto größer ist die Abnahme der Adsorptionskapazität bei steigendem Modul. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die kleinen Aminosäuren zur Adsorption an Zeolithen stärker auf den Kationenaustausch angewiesen sind, wohingegen zwischenmolekulare Anziehungskräfte bei der Adsorption größerer Aminosäuren in den Vordergrund treten.
- Die Adsorption zeichnet sich durch eine schnelle Adsorptionskinetik und steile Adsorptionsisothermen aus, d.h. auch geringe Konzentrationen können effektiv entfernt werden.
- Neben der Ladung der Aminosäure kann die Molekülgröße als Trennfaktor genutzt werden (Molekularsiebeffekt).

Generell werden große Aminosäuren besser an hydrophobe Zeolithen adsorbiert. Bei kleinen Aminosäuremolekülen beträgt die Adsorptionszeit ca. eine Stunde, bei großen werden nach 2 Stunden ca. 80% adsorbiert.

2.5 Polymerisationen

Im Rahmen der Arbeit werden unterschiedliche Polymere zur Immobilisierung des Zeolithpulvers untersucht. Ihre Eigenschaften sind nachfolgend kurz beschrieben.

2.5.1 Polystyrol

Polystyrol (PS) ist ein gängiger Grundkörper für Ionenaustauscherharze. Es bildet sich durch radikalische Vinylpolymerisation aus Styrol (Abbildung 2-8) [72].

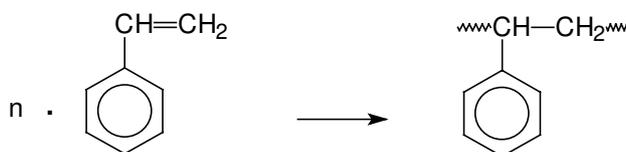


Abbildung 2-8: Bildung von Polystyrol aus Styrol

Die Polymerisationsreaktion wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, es wurde lediglich eine Lösung des Polymers in Xylol verwendet.

2.5.2 Polyurethan

Polyurethane (PU) sind Additionspolymere aus Isocyanaten und Alkoholkomponenten, die Reaktion wird durch einen Radikalstarter induziert [73, 74]. PU wird bereits zur Immobilisierung von Zellen in der Biotechnologie verwendet [75]. Die hohe Porosität des Materials sorgt hierbei für einen schnellen Stoffaustausch mit dem Medium.

Die Isocyanate addieren leicht an alle Verbindungen mit acidem Wasserstoff. Mit Alkoholen oder Wasser erfolgt die Reaktion entsprechend Abbildung 2-9 und Abbildung 2-10.

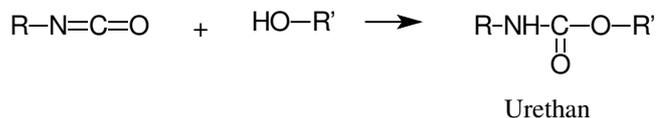


Abbildung 2-9: Reaktion von Isocyanaten mit Alkoholen

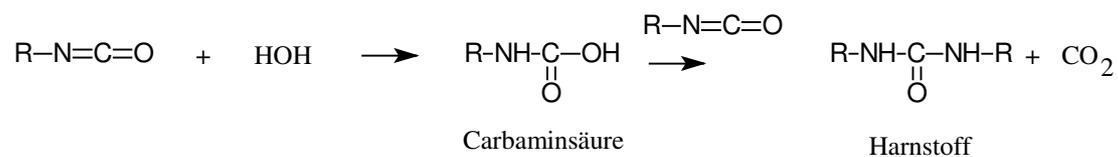


Abbildung 2-10: Reaktion von Isocyanaten mit Wasser

Die Reaktion bifunktionaler Isocyanate mit Polyhydroxyverbindungen führt schließlich zu einem Polyurethan (Abbildung 2-11).

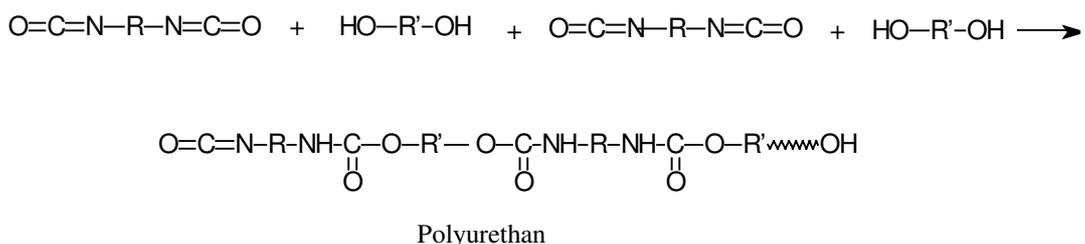


Abbildung 2-11: allgemeines Reaktionsschema der Polyurethane

Meist sind die Polyharnstoffe und in geringem Umfang auch die durch Diisocyanataddition hergestellten Polyamide und Polyurethane vernetzt, weil die CO-NH-Gruppen in der Polymerkette ebenfalls mit Isocyanatgruppen reagieren können.

Bei der Reaktion von Isocyanaten mit COOH-Gruppen oder Wasser wird CO₂ frei. Im ersten Fall entstehen Carbonsäuramidgruppen, im zweiten Falle

Harnstoffgruppen. Das dabei entbundene Kohlendioxid bläht das ganze Reaktionsgemisch auf, da die CO₂ Bläschen aufgrund der rasch zunehmenden Viskosität des Mediums nicht mehr entweichen können. Daher können diese Reaktionen zur Herstellung kautschukartiger und fester Schaumstoffe benutzt werden.

Die Reaktion mit Polyethern führt bei einem Überschuss an Isocyanaten zu einem Präpolymer (Abbildung 2-12), welches mit den noch freien Isocyanatresten unter Zugabe von Wasser weiter reagieren kann [76].

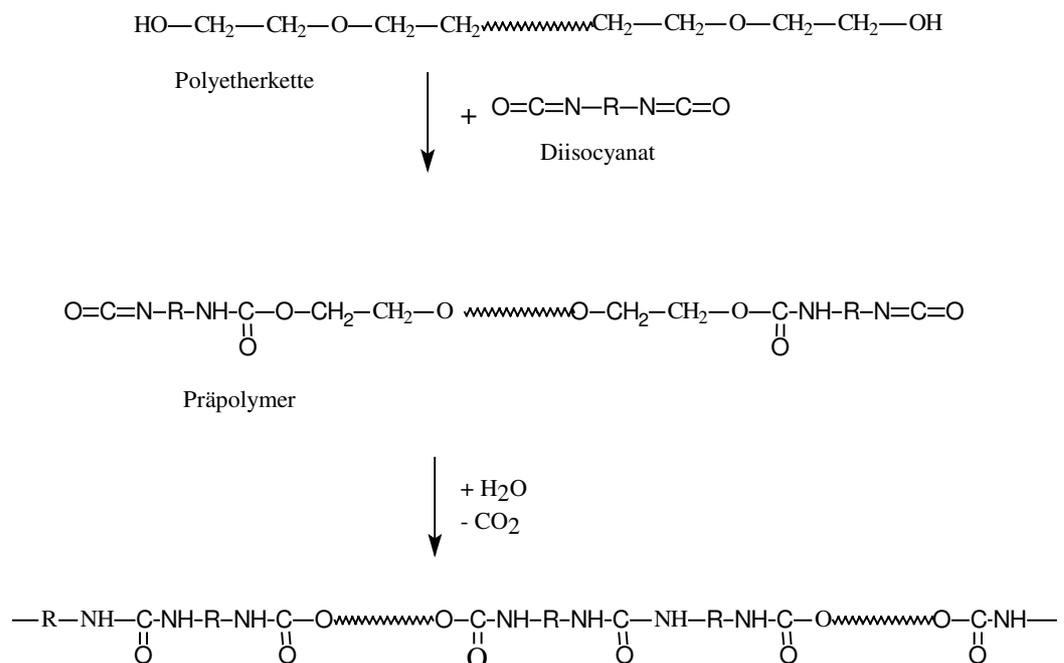


Abbildung 2-12: Copolymerbildung aus Polyethern und Isocyanaten

Als Isocyanatkomponente wurde in dieser Arbeit TDI (2,4 und 2,6 Tolyldiisocyanat) verwendet, als Copolymer wurden die Polyole Polyethylenglykol (PEG) und Polypropylenglykol (PPG) mit unterschiedlichen Molekülmassen untersucht.

2.5.3 Polyacrylamid

Polyacrylamid (PAA) entsteht bei der radikalischen Vinylpolymerisation in einer wässrigen Lösung des monomeren Acrylamid (AA).

Während reines PAA in Wasser unter Erhöhung der Viskosität löslich ist, ist ein mit N,N-Dimethylacrylamid (NDA) vernetztes Copolymer zwar unlöslich, kann jedoch große Mengen an Wasser und anderen Lösemitteln aufnehmen und

weiterhin das Aussehen eines Feststoffes behalten. Stark gequollenes PAA wird in der Biochemie für die Gelelektrophorese zur Trennung von Proteinen benutzt, da sich die Porengröße des Netzwerkes durch Einstellung des Verhältnisses von Acrylamid zum Vernetzer sehr gut einstellen läßt. In Abbildung 2-13 ist die Copolymerisation mit NDA dargestellt.

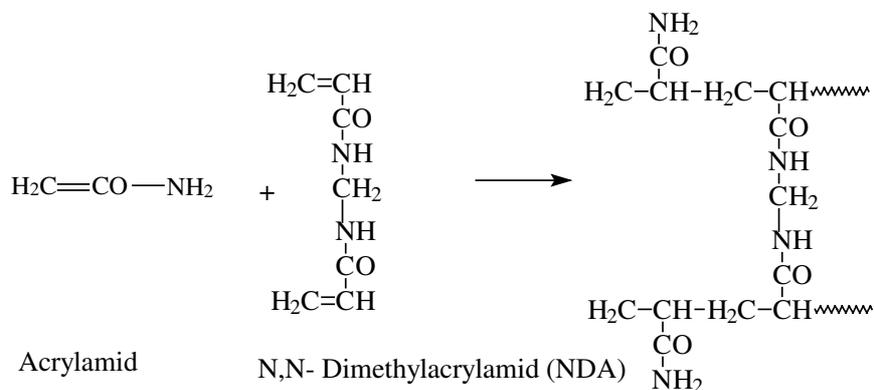


Abbildung 2-13: PAA / NDA Copolymerisation

Die Verwendung von PAA / NDA zur Immobilisierung von Mikroorganismen bzw. Enzymen ist bereits in der Literatur beschrieben [77, 78]. Der entstehende Polymer-Körper wird hierbei zur weiteren Verwendung zerkleinert.

Die zum Teil beobachteten toxischen Effekte des Acrylamids auf Mikroorganismen [79] führen bei der Immobilisierung der anorganischen Zeolithe zu keinem Nachteil.

Die zwei Vernetzer Hydroxymethylacrylamid (HMA) und N,N'- Dimethylacrylamid (NDA) wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht.



Abbildung 2-14: N,N'- Dimethylacrylamid (NDA)



Abbildung 2-15: Hydroxymethylacrylamid (HMA)

2.5.4 Perlpolymerisation (Suspensionspolymerisation)

Verrührt man wasserunlösliche Monomere wie Styrol oder Methylmethacrylat intensiv mit der drei- bis vierfachen Menge Wasser, so erhält man ein System, in dem das Monomer in Form kleiner Kügelchen von 1 - 0,1 mm Durchmesser in der wässrigen Phase suspendiert ist. Setzt man einen Initiator zu, der in der organischen Phase löslich ist, und erwärmt, so kommt die Polymerisation in Gang. Mit zunehmendem Umsatz werden die Monomertröpfchen sehr klebrig und würden zusammenhaften, wenn nicht dem Ansatz von Beginn an Schutzkolloide zugesetzt werden, die an der Phasengrenzfläche einen dünnen Schutzfilm ausbilden. Auf diese Weise wird ein Koagulieren vermieden und nach beendeter Polymerisation werden die Perlen durch Zentrifugation oder Filtration abgetrennt und durch intensives Waschen mit Wasser von den Schutzkolloiden befreit.

Es gibt zwei Gruppen von Schutzkolloiden, die bei der Perlpolymerisation wirksam sind:

- wasserlösliche makromolekulare Verbindungen wie Gelatine, Agar, Pektine, Alginate, Methylcellulosen, Polyvinylalkohol, Polyacrylate und -methacrylate, Polyvinylpyrrolidon, Polymethacrylamid;
- fein verteilte, wasserunlösliche Mineralien wie Tonerde, Kieselgur, Calciumphosphate, Bariumsulfat.

Außer den Schutzkolloiden setzt man meist noch wasserlösliche Phosphate (Na-Diphosphat, Na-Polyphosphat) zur Herabsetzung der Oberflächenspannung und zur pH- Stabilisierung zu.

2.5.5 Emulsionspolymerisation

Emulsion bedeutet Heterophasigkeit des Systems und ist die Bezeichnung für das Zweiphasensystem Öl / Wasser (Emulsionen Wasser in Öl sind weniger häufig) mit hoher Langzeitstabilität. Um die Emulsion stabil zu halten, ist die emulgierte organische Phase durch grenzflächenaktive Substanzen gegenüber der wässrigen Phase abgegrenzt. Üblicherweise ist für Polymerisationen das organische Monomer in Wasser emulgiert, im Falle des wasserlöslichen Acrylamids wird allerdings eine wässrige Monomerlösung in einem organischen Lösemittel emulgiert (die sogenannte inverse Emulsion) [80].

3 Material und Methoden

3.1 *Betamino BC*

Bei der Auftrennung der Melasse (über Ionen Ausschluß Chromatographie) durch die Firma „Amino“ tritt als ein chromatographischer Schnitt eine Lösung der drei verzweigt-kettigen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin auf. Diese wird getrocknet und unter dem Handelsnamen „Betamino BC/K“ vertrieben.

Die Zusammensetzung dieses Betamino BC /K ist wie folgt:

Gesamt AA:	92%
Gesamt BCAA:	80%
Isoleucin:	34%
Leucin:	20%
Valin:	26%

Verhältnis Leucin / Isoleucin = 0,588

Eine Lösung dieses Gemisches wird in einigen Versuchen als Modell für reale Trennprobleme benutzt.

3.2 *Die SCCO₂-Anlage*

In den Versuchen werden zwei unterschiedliche Reaktorgrößen verwendet, welche ein Volumen von 61 ml und 35 ml besitzen. Für den kleinen Reaktor ist ein Deckel mit Borosilikatglas vorhanden, der eine visuelle Verfolgung der Vorgänge unter den überkritischen Bedingungen ermöglicht. Die maximale Belastbarkeit der Reaktoren beträgt 200 bar, sie wurden in der institutseigenen Werkstatt hergestellt.

Im Reaktor befindet sich ein Rührfisch, welcher für die Durchmischung des SCCO₂ sorgen soll. Rührfische befinden sich ebenfalls in den Gläsern mit Extraktionsgut, so dass auch dort keine Konzentrationsgradienten auftreten.

Das flüssige CO₂ aus der Gasflasche wird durch eine Hochdruckpumpe in den Reaktor gepumpt. Die Pumpenköpfe werden durch einen Thermostaten auf ca. -10 °C gekühlt, da sonst durch die Bewegung der Pumpkolben das CO₂ nur komprimiert und expandiert würde, ohne dass es gefördert wird. Sobald das an der Apparatur angebrachte Manometer den gewünschten Betriebsdruck anzeigt, wird zunächst das Ventil zur Pumpe hin geschlossen und danach die Pumpe

ausgeschaltet. Bevor das CO₂ in den Reaktor gelangt, durchfließt es in einer gewendelten Kapillare ein Wasserbad, das sich wie der Reaktor in einem thermostatisierten Ofen befindet. Dieses Wasserbad verringert weitgehend die Probleme der Druckeinstellung, welche durch die Aufheizung des kalt einströmenden CO₂ entstehen. Durch ein Entlastungsventil kann das CO₂ nach dem Ende des Versuches abgelassen werden.

Die verwendeten Stahlkapillaren sind, ebenso wie Ventile und Anschluss-Stücke, gebräuchliche HPLC-Bauteile und daher auch bei Drücken über 100 bar anwendbar. Durch die Benutzung von Standardkomponenten der HPLC-Analytik sind keine hohen Ausgaben für Spezialanfertigungen nötig. Außerdem sind die Komponenten leicht austauschbar und flexibel zu kombinieren.

Die Extraktionen werden in einem thermostatisierbaren Ofen durchgeführt, um die Temperatur aller Bauteile über der für überkritische Bedingungen nötigen 31 °C zu halten. Um Temperaturschwankungen abzupuffern, die bei manuellen Eingriffen durch Öffnen des Ofens hervorgerufen werden, wird die Betriebstemperatur auf 45 °C eingeregelt. Der Druck kann am Manometer auf 3 bar genau abgelesen werden, aber die Einstellung des Enddruckes ist davon abhängig, ob der Reaktor lange genug thermostatisiert wurde. Wenn sich dieser nach dem Abschalten der Hochdruckpumpe noch auf die Temperatur der Umgebung erwärmt, steigt daher der Druck weiter an. Die Verwendung eines Thermostatisierbades zum Vorwärmen des CO₂ verhindert noch größere Ungenauigkeiten (siehe Abbildung 3-1).

In den Löslichkeitsexperimenten wird entweder feste Aminosäure oder eine wässrige Lösung in einem Gläschen in der Reaktor gestellt. Um das Versprühen des Inhalts durch die Druckschwankungen während dem Befüllen und Entspannen der Apparatur zu vermeiden, wird der Deckel des Gläschens mit Filterpapier abgedeckt.

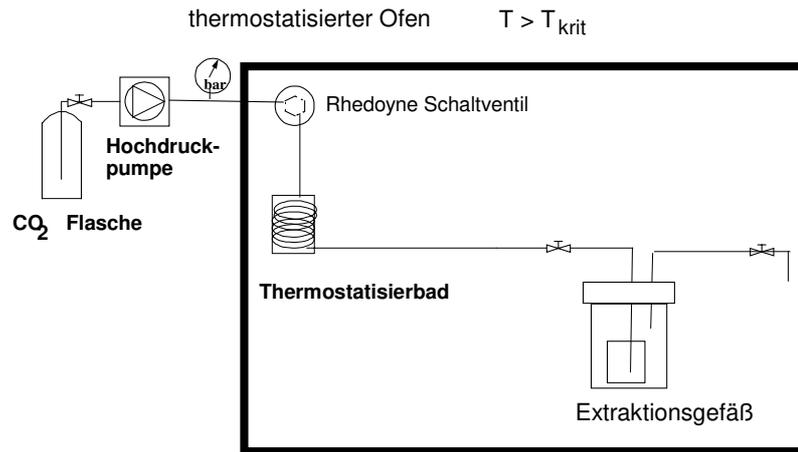


Abbildung 3-1: Versuchsaufbau für die Extraktionsversuche

Die Probe kann sehr einfach durch Expansion des Kohlendioxids entweder in Substanz oder einfacher durch Einleiten in geeignete Lösungsmittel aufgefangen und anschließend mittels HPLC analysiert werden. Indem das ausströmende Gas einen möglichst langen Weg durch das Lösemittel geführt und dieses zusätzlich gekühlt wird, kann die Wiederfindungsrate gelöster Substanzen erhöht werden. Eine Übersicht über diese Thematik sowie neue Methoden zur Extraktion mit überkritischen Fluiden findet sich unter [81]. Als Vorlage dient in dieser Arbeit ein mit Lösemitteln gefülltes hohes Analysenglas. Die Expansion erfolgt über einen Restriktor hinter dem Auslassventil, die Abmessungen des Restriktors bestimmen dabei die Ausströmgeschwindigkeit.

3.2.1 Kontinuierliche Extraktion

Zur kontinuierlichen Extraktion werden die Aminosäuren in einem Reaktor vorgelegt, der unter konstanten Bedingungen von SCCO₂ durchströmt wird.

Um einen bestimmten Volumenstrom einzustellen, muss zum einen die Leistung der Pumpe geregelt werden, gleichzeitig muss allerdings auch das Auslassventil vor dem Restriktor so eingestellt werden, dass der vorgesehene Betriebsdruck eingehalten wird. Die Menge an ausströmendem CO₂ muss also der Menge des von der Pumpe geförderten CO₂ entsprechen.

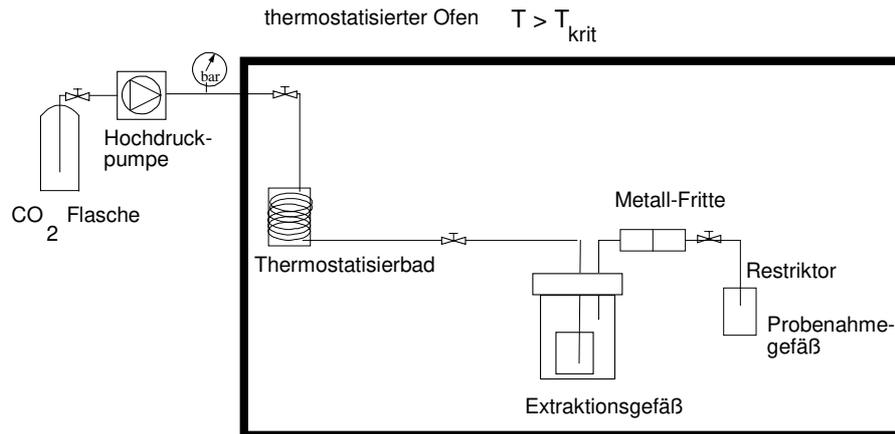


Abbildung 3-2: Extraktion aus einer Flüssigkeit

In Abbildung 3-2 ist der Aufbau einer kontinuierlichen Extraktion dargestellt. Eine Metallfritte vor dem Auslassventil soll den Austrag nicht gelöster fester Substanzen aus dem Extraktor verhindern. Die nachfolgende Abscheidung aus der CO₂-Phase kann entweder durch Druckerniedrigung (Expansion über Restriktor oder Ventil) oder durch Temperaturabsenkung unter die kritische Temperatur (in einem nachgeschalteten gekühlten Reaktor) erfolgen.

Um bei der kontinuierlichen Extraktion dem CO₂-Strom Modifier zuzudosieren, wird ein zweiter Reaktor vor den Extraktor geschaltet (Abbildung 3-3). Durch ein angeschlossenes 6-Port-2 Wege Ventil kann Flüssigkeit in den Hochdruckbereich eingeschleust werden. Durch Umschalten des Ventils wird eine 200 µl Probenschleife in einer Stellung mit dem Hochdrucksystem verbunden, in der anderen Ventilstellung kann sie mit neuem Modifier befüllt werden. Der SCCO₂-Strom wird durch dieses Schaltventil geführt, so dass der Inhalt der Probenschleife zunächst in eine Mischkammer gedrückt wird, diese besteht aus einem 35 ml Reaktor. Ein Magnetrührer sorgt hier für eine Durchmischung mit dem SCCO₂, bevor das Fluid schließlich in den Extraktor mit einem Volumen von 61 ml gelangt.

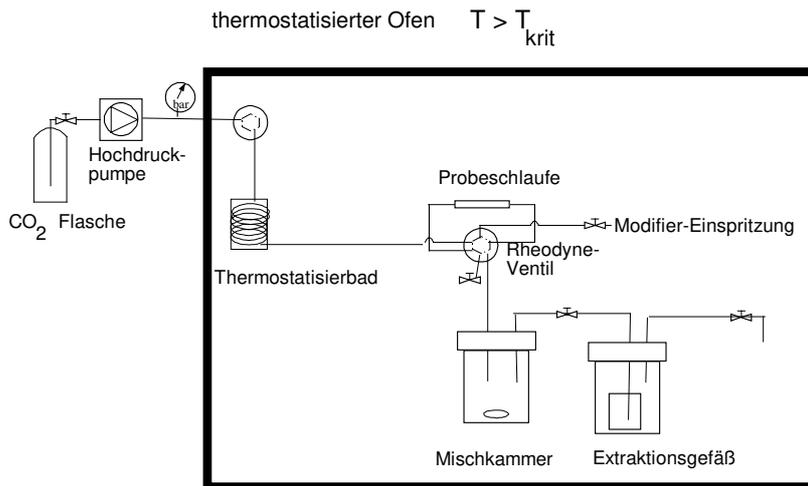


Abbildung 3-3: Kontinuierliche Extraktion mit Zudosierung von Modifiern

Mit einer Injektionsspritze wird der Modifier in die Schlaufe gefüllt, Ein- und Ausgangsventil sind hierbei geöffnet. Nachdem die Probeschleife gefüllt ist, werden diese Ventile geschlossen, damit das unter hohem Druck stehende CO₂, welches sich in den kurzen Leitungen innerhalb des Rheodyneventil befindet, beim Umschalten in die zweite Stellung nicht den Kolben der Spritze zurückdrückt.

Die Probeschleife ist nun wieder mit dem Hochdrucksystem verbunden, der Inhalt wird durch die Pumpe in den nachfolgenden Reaktor gefördert.

Beim Zurückschalten ist die Probeschleife mit SCCO₂ unter hohem Druck gefüllt, das Ablassventil wird daher vorsichtig geöffnet und das Ventil zur Spritze hin muss fest verschlossen sein.

Im Rahmen dieser Arbeit werden außerdem Methoden zur kontinuierlichen Extraktion mit einer Abscheidung des Extraktes in einem zweitem Reaktor erprobt, dabei wird in diesem Teil der Anlage entweder die Temperatur verändert (durch Kühlen oder Heizen), oder der Druck über ein Ventil erniedrigt. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 3-4 und Abbildung 3-5 dargestellt. Der Vorteil dieses Verfahrens ist, dass sich die Produkte an den Reaktorwänden niederschlagen können, und nicht bei der Expansion hinter dem Restriktor in ein Lösemittel geleitet werden müssen, dies verspricht höhere Wiederfindungsraten.

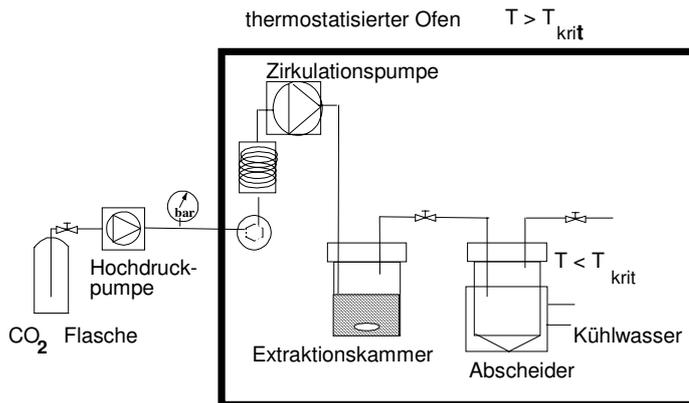


Abbildung 3-4: Extraktabscheidung durch Temperaturniedrigung

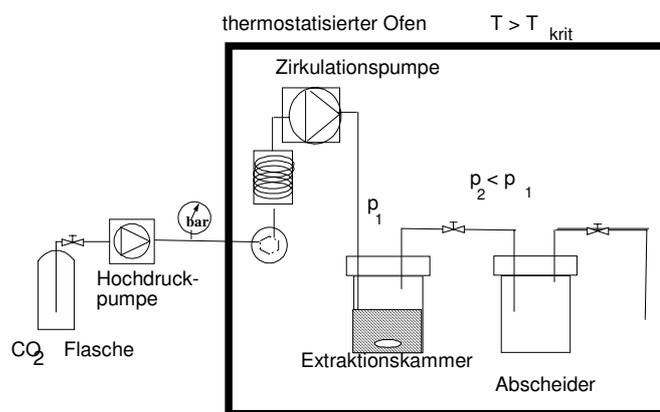


Abbildung 3-5: Extraktabscheidung durch Druckerniedrigung

3.2.2 L-Leucinmethylester-HCl

In den Löslichkeitsversuchen N-acetylierter Aminosäuren wird L-Leucinmethylester als Modellsubstanz gewählt. Das käuflich erhältliche Hydrochlorid ist in unpolaren Solventien nicht löslich, daher muss der Ester nach folgendem Verfahren freigesetzt werden:

500 mg L-Leucinmethylester-HCl werden in 3 ml Wasser gelöst und die Lösung mit Natriumcarbonat gesättigt. In dieser Carbonatlösung (pH = 10) liegt der Aminosäureester fast vollständig in neutraler Form vor (die Aminogruppe ist nicht protoniert), kann also in ein unpolares organisches Lösemittel überwechseln. Der pH-Wert der Lösung darf gleichzeitig nicht zu hoch sein, um eine alkalisch katalysierte Hydrolyse der Esterfunktion zu vermeiden. Im Schüttelkolben wird der Ester mit Dimethylether ausgeschüttelt, die organische Phase wird über $MgSO_4$ 10 Minuten getrocknet, abfiltriert und der Ether in einem Analysengläschen abgedampft. Eine viskose Flüssigkeit bleibt im Gefäß zurück.

3.2.3 N-Acetyl-Aminosäure

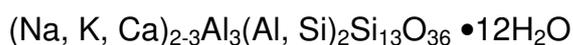
Für die Versuche zur Löslichkeit N-acetylierter Aminosäuren wird N-Acetylleucin als Modellsubstanz eingesetzt und muss zuvor synthetisiert werden. Dazu wird Essigsäureanhydrid verwendet, welches auch in industriellem Maßstab für Acetylierungsreaktionen Verwendung findet.

1,5 g Leucin und 0,75 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$ werden in 25 ml Wasser bei RT gerührt. Zu der Emulsion wird über einen Zeitraum von 1,5-2 h 1,25 g Essigsäureanhydrid zugetropft und es entsteht eine klare Lösung. Danach wird 1,8 ml konzentrierte Schwefelsäure zugegeben, um das Calcium auszufällen und den pH-Wert abzusenken. Die Lösung wird filtriert, auf 10 ml eingeeengt und mit Diethylether extrahiert. Der Ether wird mit Magnesiumsulfat getrocknet und schließlich eingedampft, zurück bleibt ein weißer, leicht gelblicher Feststoff.

3.3 Zeolithe

Im Rahmen dieser Arbeit werden synthetische Zeolithe des Typs ZSM5 mit den Modulen 28, 40 und 45 der Firma DEGUSSA AG, Hanau untersucht. Deren Selektivität gegenüber Leucin ist bereits in der Literatur beschrieben [82]. Eingesetzt werden pulverförmige Zeolithe ZSM5M40 und ZSM5M28 sowie ZSM5M28 und ZSM5M45 auf Aluminiumoxid Formkörper. Die Partikelgröße der ZSM5-Zeolithe wurde mit Hilfe eines Durchflussscytometers gemessen. Sie besitzen eine Partikelgröße um 2 μm , welches die Abtrennung von wässrigen Lösungen erschwert. Der Porendurchmesser von Zeolithen des ZSM-Typs beträgt 5-5,5 Å.

Außerdem wird Klino 80 der Dr. Fritz Kücke GmbH, Hannover, untersucht. Es handelt sich dabei um ein natürliches Zeolith vom Typ Klinoptilolit, welches eine hohe Affinität zu Ammoniak hat. Die Partikelgröße beträgt laut Herstellerfirma 80 μm , die drei verschiedenen Kanäle der Struktur besitzen Abmessungen von 4,4 x 7,2Å; 4,1 x 4,7 Å und 4,0 x 5,5 Å [83]. Die allgemeine Strukturformel lautet:



3.3.1 Aktivitätsbestimmung

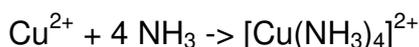
Die Aktivität immobilisierter Zeolithe zur Adsorption von Aminosäuren wird durch Inkubation mit Leu/Ile Lösung (je 1 g/L) und Bestimmung der verbliebenen Konzentrationen im Überstand getestet. Wenn sich das Verhältnis von Leucin zu

Isoleucin verändert, besitzt das Immobilisat eine stärkere Affinität zu einer der beiden Aminosäuren und ist zur Trennung geeignet.

3.4 Analytik

3.4.1 Kupfer-Analytik

Zur Bestimmung der Kupfer-Konzentration in Lösungen wird die starke Adsorption des dunkelblauen Tetraamminkupfer(II)-Komplexes benutzt [84], der sich bei hohen Ammoniakkonzentrationen in wässriger Lösung bildet.



Dafür werden zu 800 µl Probe 200 µl konzentrierte Ammoniaklösung pipettiert und im Photometer die Adsorption bei 600 nm gegen eine Blindlösung bestehend aus 800 µl Wasser und 200 µl Ammoniak gemessen.

3.4.2 Kobalt-Analytik

Die Bestimmung der Co-Konzentrationen erfolgt nach zwei unterschiedlichen Methoden, die je nach Kobalt-Konzentration der Lösung angewendet werden.

3.4.2.1 Photometrische Bestimmung von Co(II)sulfat

Bei hohen Kobalt-Konzentrationen kann in wässriger Lösung direkt die Adsorption des Co^{2+} gemessen werden [85].

In einer Küvette werden 0,8 ml 3 n H_2SO_4 und 0,2 ml der Probe gemischt und die Adsorption bei 510 nm in einem Photometer gegen eine Blindlösung aus 200 µl H_2O in 800 µl H_2SO_4 gemessen. Die Konzentration ergibt sich dann durch eine vorher aufgenommene Kalibrationsgerade.

Da diese Methode Co^{2+} -Ionen nachweist, muss vor der Oxidation mit Wasserstoffperoxid gemessen werden, ansonsten wird die nachfolgende Methode verwendet.

3.4.2.2 Photometrische Bestimmung von $(\text{NH}_4)_2[\text{Co}(\text{SCN})_4]$

Für niedrige Kobaltkonzentrationen wird die Absorption eines farbigen Thiocyanat-Komplexes $(\text{NH}_4)_2[\text{Co}(\text{SCN})_4]$ ausgenutzt [86].

0,5 ml der Probe werden mit 0,5 ml Amylalkohol, 0,5 ml Natriumacetat-Puffer und einer Spatelspitze NH_4SCN vermischt. Die obere organische Phase (welche bei Anwesenheit von Kobalt durch den Thiocyanatkomplex dunkelblau gefärbt ist)

wird mit einer Pipette abgenommen und in eine Küvette überführt. Die wässrige Lösung wird erneut mit 0,5 ml Amylalkohol ausgeschüttelt und die organische Phase ebenfalls in die Küvette pipettiert. Im Photometer wird die Absorption des blauen Komplexes bei 620 nm gemessen. Die Konzentration lässt sich ebenfalls mit Hilfe einer Kalibrationsgerade berechnen.

Die Absorption des Komplexes ist sehr stark, so dass auch geringe Kobaltkonzentrationen bestimmt werden können und häufig sogar eine Verdünnung notwendig ist. Da Thiocyanat ein Reduktionsmittel ist, wird durch den Überschuss an NH_4SCN , eventuell vorhandenes dreiwertiges Kobalt reduziert, diese Analysenmethode liefert also die Gesamtkonzentration an Kobaltionen in der Lösung.

3.4.3 Photometer

Die Absorptionen der gezogenen Proben werden mit einem Photometer UVIKON 860 der Firma Kontron gemessen. Die Verdünnungen werden so gewählt, dass die Extinktion im Messbereich des Gerätes liegt.

3.4.4 Aminosäure-Analytik

Die Aminosäuren werden nach Derivatisierung mit OPA auf einer C_{18} - Säule (Länge = 150 mm, 5 μm Korngröße) mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography) in einem Methanol / Wasser- Gradienten getrennt. Die Detektion erfolgt durch Fluoreszenz bei 330 nm / 420 nm. Die Empfindlichkeit dieser Methoden erfasst bis ca. 25 $\mu\text{mol/L}$ Aminosäuren. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden die Konzentrationen allerdings nicht in mol/L angegeben, sondern in g/L.

4 Experimenteller Teil

4.1 Extraktionen mit SCCO₂

Die Verwendung von SCCO₂ zur Extraktion und nachfolgenden Auftrennung von Aminosäuren soll die bisher verwendeten organische Lösemittel ersetzen. Die in Kapitel 2.3 genannten Eigenschaften machen überkritisches Kohlendioxid zu einem idealen Extraktionsmittel für die pharmazeutische- und Lebensmittelindustrie.

Die Löslichkeiten der Aminosäuren in SCCO₂ sind aufgrund ihrer hohen Polarität allerdings erwartungsgemäß gering; sie nehmen generell für alle Aminosäuren mit steigendem Druck zu, wobei sie sich im Verhalten stark ähneln. Der Anstieg der Löslichkeitskurven wird mit zunehmendem Druck flacher, d.h. das Lösevermögen des überkritischen Gases strebt einem Grenzwert zu. Da das Dipolmoment des linearen CO₂ Moleküls (und damit die Polarität des SCCO₂) mit zunehmendem Druck wächst, können bei genügend hohen Drücken selbst polare Substanzen in SCCO₂ gelöst werden. Modellrechnungen mit Hilfe des modifizierten Hildebrandschen Löslichkeitsparameters [87, 88] lassen auf ein mit Isopropanol vergleichbares Lösungsvermögen von überkritischem Kohlendioxid bei flüssigkeitsähnlicher Dichte schließen.

Bei Untersuchungen erwies sich Glycin mit max. 0,4 µg/l_N bei 2000 bar als die am wenigsten lösliche Aminosäure, während L-Leucin mit max. 0,55 µg/l_N bei 2000 bar und 40 °C am besten löslich war [89].

Für großtechnische Anwendungen sind sowohl die notwendigen hohen Drücke als auch die dabei erzielten Löslichkeiten ökonomisch nicht sinnvoll. Daher soll durch Derivatisierung der Aminosäuren (d.h. die Verringerung der Polarität des Moleküls, Kapitel 4.1.2) bzw. den Zusatz von Modifiern zum SCCO₂ (also eine Erhöhung der Polarität des Lösemittels, Kapitel 4.1.1) eine Verbesserung der Löslichkeit von Aminosäuren erzielt werden.

4.1.1 Modifier

Als Modifier für die Verbesserung der Löslichkeit von Aminosäuren in SCCO₂ werden polare Lösemittel wie Wasser, Butanol und organische Säuren untersucht.

4.1.1.1 Wasser

Wasser wird bereits als Modifier zur Extraktion von Coffein aus grünem Kaffee mit SCCO₂ eingesetzt [37]. Die Fähigkeit von Wasser, als Modifier die Löslichkeit von Aminosäuren in SCCO₂ zu erhöhen, wird in den folgenden Versuchen getestet. Zunächst wird dabei die Extraktion aus einer Aminosäurelösung betrachtet, dies wäre das direkteste Vorgehen bei einer Aufarbeitung von z.B. Proteinhydrolysaten.

Um die direkte Extraktion von Aminosäuren aus einer wässrigen Lösung (z.B. Fermentationsbrühen, Hydrolysate) zu untersuchen, wird eine Modellösung der Aminosäuren Leucin und Isoleucin (je 1 g/L) unter SCCO₂ einem Extraktionsprozess unterworfen. 2 ml der Lösung werden in einem Gläschen im Reaktor mit 35 ml Volumen für 6 Stunden bei T = 45 °C und p = 100 bar gerührt. In destilliertem Wasser stellt sich unter diesen Reaktionsbedingungen ein pH-Wert von ca. 3 Einheiten ein, in einer Pufferlösung (0,5 M NaHPO₄, pH = 8) stellt sich unter den Reaktionsbedingungen ein pH von ca. 5 ein [90].

Um auch geringe Mengen an gelösten Aminosäuren nachweisen zu können, wird SCCO₂ 1,5 Stunden lang mit einem Volumenstrom von 0,072 L/h (bezogen auf Versuchsbedingungen) durch die wässrige Phase gepumpt. Die in den Reaktor führende Kapillare wird dazu soweit verlängert, dass sie in die Lösung eintaucht (Abbildung 3-2). Eine optimale Durchmischung von überkritischem Fluid und wässriger Phase wird hierdurch noch nicht erreicht, ließe sich aber in weiteren Versuchen durch einen feinporigen Aufsatz auf die Kapillaröffnung erreichen. Ein Magnetrührer soll für eine bessere Durchmischung der Phasen sorgen. Das hinter dem Restriktor expandierende CO₂ wird schließlich zur Probenahme durch Wasser geleitet.

Nach Expansion des CO₂ werden die Auffanglösungen per HPLC analysiert, dabei lassen sich aber keine Aminosäure nachweisen. Nach Versuchsende wird ebenfalls die eingesetzte Lösung analysiert, die dabei festgestellte Zunahme der Aminosäurekonzentration lässt sich leicht durch die Löslichkeit von Wasser in SCCO₂ und den dadurch entstehenden Aufkonzentrierungsprozess erklären; die Volumenabnahme der Lösung ist nach dem Versuch deutlich zu erkennen.

Bei dieser Art der Versuchsdurchführung hat die Aminosäure zum einen die Phasengrenze überkritisch / wässrig zu überschreiten, zum anderen wird der

Verteilungskoeffizient zwischen beiden Phasen einen Einfluss auf die Menge an gelöster Aminosäure in SCCO₂ haben. In einem nachfolgenden Versuch wird daher die Aminosäure in ungelöster Form eingesetzt.

Zur Untersuchung der Löslichkeit fester Aminosäuren wird außerhalb eines Glasgefäßes mit Aminosäuren Wasser in den Reaktor gefüllt, dadurch entsteht unter überkritischen Bedingungen eine mit Wasser gesättigte SCCO₂ Phase, die Aminosäuren müssen jedoch nicht aus einer wässrigen Phase extrahiert werden. Neben diskontinuierlichen Versuchen werden ebenfalls kontinuierliche Versuche durchgeführt.

1 g festes Leucin wird in einem mit Filterpapier verschlossenen Gläschen mit Rührfisch im 30 ml Reaktor vorgelegt, 1 ml destilliertes Wasser auf den Reaktorboden gefüllt und unter Standardbedingungen (T = 45 °C und p = 100 bar) mit SCCO₂ 6 Stunden lang gerührt. Durch diesen Aufbau soll zum einen ein direkter Kontakt des Wassers mit der Aminosäure verhindert, zum anderen eine gute Verteilung des Modifiers in der überkritischen Phase erreicht werden. Die Bestimmung der gelösten Aminosäure erfolgt gravimetrisch durch Differenzbestimmung der Masse des Gläschens vor und nach dem Versuch. Nach Abbruch des Versuchs wird das Glas im Trockenschrank bei 70 °C 2 Stunden getrocknet, um eventuelle Wasserspuren zu beseitigen, welche das Gewicht verfälschen würden.

Das ausströmende SCCO₂ wird durch destilliertes Wasser geleitet und die Analyse ergibt keine Aminosäuren, woraus zu schließen ist, dass Wasser als Modifier in diesem Fall nicht geeignet ist.

4.1.1.2 *Butanol*

In technischen Verfahren wird Leucin (neben anderen Aminosäuren) aus einer salzsauren Lösung (pH 1 bis 3) durch wasserhaltige organische Lösemittel extrahiert (vor allem Alkohole mit 3-4 C-Atomen z.B. Isopropanol, n-Propanol, n-Butanol, sek-Butanol etc. [91]).

Ein Gemisch aus SCCO₂ und n-Butanol wird daher auf seine Fähigkeit zur Extraktion von Leucin untersucht. Die Verwendung eines Gemisches aus SCCO₂ und organischem Lösemittel würde gegenüber dem reinen organischen Lösemittel folgende Vorteile bieten:

- es wird eine geringere Menge des organischen Lösemittels benötigt (daher niedrigere Kosten in Anschaffung und Entsorgung)
- die Brandgefahr wird verringert: das meist leicht entzündliche organische Lösemittel wird durch inertes und Verbrennungen erstickendes CO₂ verdünnt (O₂ - Verdrängung durch hohe Dichte).
- einfachere Gewinnung des Extrakts durch Druck- / Temperaturerniedrigung

CO₂ besitzt bei 45 °C und 100 bar eine Dichte $\rho = 11,4 \text{ mol/l}$ [92], in einem 35 ml Reaktor befinden sich unter den gewählten Versuchsbedingungen somit 17,5 g CO₂. Für eine 4 %ige Lösung von Butanol in SCCO₂ wurden 0,9 ml Butanol ($\rho = 0,81 \text{ g/ml}$) in einem 35 ml Reaktor vorgelegt. 2 ml Leucin / Isoleucin- Lösung (pH = 1, je 2 g/L) wird in einem Gläschen in den Reaktor eingebracht, danach ein Druck von 100 bar eingestellt. Nach 6 Stunden wird der Reaktor entspannt, die HPLC-Analytik der Auffanglösung und der eingesetzten Lösung ergaben keine messbare Löslichkeit der Aminosäuren unter den gewählten Bedingungen.

In einem nachfolgenden Versuch wird feste Aminosäure eingesetzt, 2 ml reines n-Butanol dazugegeben und dieselben Bedingungen wie im vorherigen Versuch eingestellt. Die Gewichtskontrolle zeigt jedoch ebenfalls keine Löslichkeit von Aminosäuren.

4.1.1.3 organische Säuren (Ameisensäure, Essigsäure)

Da sich Aminosäuren in organischen Säuren lösen und diese unbegrenzt mit flüssigem CO₂ mischbar sind [93], werden Ameisen- und Essigsäure als Modifier untersucht.

0,5 ml Eisessig werden in einem 37 ml Reaktor auf ein Gemisch aus 50 mg Leucin und 50 mg Isoleucin in einem Gläschen gegeben, die Aminosäuren lösen sich auf. Danach wird SCCO₂ in den Reaktor gefüllt und zwei Stunden gerührt. Nach Abbruch des Versuchs sind kaum noch Aminosäuren im Glas vorhanden, ein weißer Feststoff hat sich dafür am Boden des Reaktors abgesetzt.

Erklären ließe sich dieser Befund dadurch, dass sich die Aminosäure zunächst in der Essigsäure auflöste, welche dann durch das SCCO₂ aus dem Glas gespült

wurde. Durch die Verdünnung mit dem überkritischen CO₂ fällt die Aminosäure jedoch schließlich wieder aus.

Um zu klären, ob die Aminosäure auch im Gemisch SCCO₂ / organische Säure löslich ist, wird in den nachfolgenden Versuchen die Aminosäure in einem Gefäß getrennt von der organischen Säure in den Reaktor gestellt.

100 µl und 200 µl Ameisensäure sowie 200 µl Essigsäure werden mit jeweils 100 mg Leucin unter SCCO₂ gerührt. Die Gewichtsdiﬀerenzmessung ergibt keine Abnahme der Aminosäure im Glas, unter den gewählten Bedingungen löst sich die Aminosäuren in einem Gemisch aus SCCO₂ und einer organische Säure nicht auf.

Auch bei höherem Druck (p= 150 bar bei T=50 °C) bei gleicher Ameisensäurekonzentration (350 µl auf 61 ml) löst sich die Aminosäure nicht.

In einem weiteren Versuch sollen die Aminosäuren aus einer Lösung extrahiert werden, das vorhandene Wasser müsste zu einer weiteren Erhöhung der Polarität der überkritischen Phase führen. Die Lösung wird angesäuert, damit sich die Ameisensäure nicht in der wässrigen Phase löst.

2 ml Leucin / Isoleucinlösung (je 5 g/L) werden mit HCl bis zu einem pH-Wert von 2 angesäuert, in einem Gläschen im Reaktor gerührt. In den Reaktor werden 0,5 ml Ameisensäure pipettiert und 12 Stunden bei T = 45 °C und p = 100 bar gerührt. Eine anschließende Konzentrationsbestimmung ergibt eine Abnahme der Konzentration der Aminosäuren auf je 3 g/L. Durch die Löslichkeit von Wasser in SCCO₂ kann sich die Konzentration einer Lösung erhöhen, durch den Transport von Ameisensäure in die wässrige Phase allerdings kann die Konzentration erniedrigt werden (maximale Vergrößerung des Volumens von 2 ml auf 2,5 ml, also einer Konzentrationsabnahme um 25%). Die beobachtete Konzentrationserniedrigung um 40% lässt sich durch diesen Effekt jedoch nicht erklären.

Um die Möglichkeit der Zersetzung der Aminosäure auszuschließen, wird ein entsprechender Versuch ohne SCCO₂ durchgeführt. Die Konzentration der Aminosäuren sinkt hierbei ebenfalls von ca. 6 g/L auf eine Konzentration von 4,4 g/L. Im vorhergehenden Versuch wurde also nicht Aminosäure extrahiert, statt dessen wurden die Konzentrationen durch eine Reaktion verringert.

Kontinuierliche Extraktion

Um auch geringe Löslichkeiten an Aminosäuren bestimmen zu können, wird in weiteren Versuchen der Extraktor kontinuierlich mit SCCO₂ durchströmt.

Dazu wird zunächst ein Gemisch aus je 50 mg Leucin und Isoleucin zusammen mit 200 µl Ameisensäure im 60 ml Reaktor unter überkritischen Bedingungen 12 Stunden gerührt, danach mit 0,072 L/h 4 Stunden lang mit SCCO₂ durchströmt. Der Restriktor taucht in 1,5 ml Wasser, um die vorher im CO₂ gelöste Aminosäure aufzufangen, in der Auffanglösung ließen sich nach Beendigung des Versuchs allerdings keine Aminosäuren nachweisen.

In einem weiteren Versuch mit kontinuierlicher Extraktion wird der Modifier mehrmals in den SCCO₂-Strom injiziert, um während der gesamten Dauer des Extraktionsversuches eine erhöhte Polarität der überkritischen Phase zu erlangen (Abbildung 3-3). Durch ein größeres Volumen an vorgelegter Aminosäurelösung soll eine längere Kontaktzeit der überkritischen Phase mit der wässrigen Phase erreicht werden. Bei einer Pumpleistung von 0,05 L/h und einem Druck von 100 bar wird SCCO₂ durch 11 ml einer Lösung von je 50 mg Leucin/Isoleucin gepumpt. Alle 10 Minuten werden 200 µl Ameisensäure in die Mischkammer eingespritzt: die durchschnittliche Konzentration an Modifier beträgt also 2,4 %. Die Analyse der Auffanglösung zeigte allerdings ebenfalls keine Aminosäurelöslichkeit in der überkritischen Phase.

4.1.1.4 Zusammenfassung

Abschließend lässt sich feststellen, dass die untersuchten Modifier Wasser, Butanol, Ameisen- und Essigsäure keine erkennbare Verbesserung der Löslichkeit von Aminosäuren in SCCO₂ im Druckbereich von 100-150 bar bei 45 °C bewirken. In weiteren Versuchen wird daher eine Erhöhung der Polarität der Aminosäuren durch Derivatisierungsreaktionen angestrebt.

4.1.2 Derivatisierungen

In der SFC (Supercritical Fluid Chromatography) wird die Derivatisierung von Aminosäuren zur Erhöhung ihrer Löslichkeit bereits erfolgreich mit unterschiedlichen Reagenzien durchgeführt. Dargestellt wurden die Phenylthiohydantoinaminosäuren [94, 95], sowie die 9-Fluoro-

enylalkylchloroformat- [96] bzw. N-4-nitrobenzoylaminosäurepropylester [97]. Diese relativ komplizierten und kostenintensiven Derivatisierungsreaktionen sind für die Analytik mit ihren geringen Konzentrationen praktikabel, für die großtechnische Anwendung zur Extraktion aber ökonomisch nicht vertretbar.

Um die Polarität der Aminosäure zu erniedrigen, müssen die funktionellen Gruppen durch eine Reaktion zu unpolare Gruppen transformiert werden. Als einfachste Reaktion zur Maskierung einer Carbonsäurefunktion bietet sich die Veresterung an, Aminogruppen lassen sich wiederum durch Acylierungen modifizieren. In der Literatur sind bereits Methoden zur Trennung von Leucin und Isoleucin über den Umweg der Derivatisierung (N-Acyl-Verbindung bzw. Ester) und nachfolgende selektive Spaltung bzw. selektive Kristallisation beschrieben [28, 29]. Dieses Vorgehen wird ebenfalls zur Racematspaltung bei anderen Aminosäuren eingesetzt. In den nachfolgenden Versuchen sollen die Derivatisierungen zunächst nur zur Verbesserung der Löslichkeit im unpolaren SCCO₂ verwendet werden. Eine nachfolgende enantioselektive Spaltung der Derivate könnte aber sicherlich einen Teil der höheren Kosten des zusätzlichen Reaktionsschrittes wieder kompensieren. Die enantioselektive, enzymatisch katalysierte Hydrolyse von Hydroxyestern im Zweiphasensystem SCCO₂ / Wasser ist bereits Ziel von wissenschaftlichen Untersuchungen am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover [98].

4.1.2.1 Aminosäure-Methylester

100 µl L-Leucinmethylester (95 mg) werden in einen 35 ml Reaktor mit Sichtglas gefüllt, um die Löslichkeit in SCCO₂ zu testen. Sobald ein Druck von ca. 60 bar erreicht wird, bildet sich ein Feststoff. Dieser löst sich auch unter überkritischen Bedingungen nicht auf. Dieses Verhalten ließe sich durch die Bildung eines Carbamats unter den hohen Drücken erklären. Eine Stunde lang wird SCCO₂ bei einer Pumpleistung von 0,072 L/h durch den Reaktor geleitet, im ausströmenden SCCO₂ lässt sich allerdings keine Aminosäure nachweisen. Als Auffanglösung hinter dem Restriktor dient Isopropanol.

Die Zugabe von Isopropanol, in dem der Methylester löslich ist, als Modifier zum SCCO₂ wird anschließend in einem kontinuierlichen Versuch erprobt.

2 ml Isopropanol werden hierzu in einen 37 ml Reaktor auf L-Leucinmethylester gegeben, dann eine Stunde bei $p = 100$ bar und $T = 45$ °C mit einer Pumpleistung von 0,072 L/h kontinuierlich extrahiert. Am Restriktorausgang lassen sich weiße Kristalle beobachten, welche sich jedoch schnell in Isopropanol auflösen. Nach Versuchsende wird das Isopropanol im Auffanggefäß im Trockenschrank bei 70 °C abgedampft, zurück bleibt nur eine sehr geringe Menge an Substanz, die nicht analysiert werden kann. Die Löslichkeit von L- Leucinmethylester in SCCO₂ ist offensichtlich zu gering.

4.1.2.2 *N-Acetyl-Leucin / Isoleucin*

40 mg N-Acetylleucin werden in einem 35 ml Reaktor vorgelegt und die Löslichkeit in SCCO₂ unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Dafür wird das N-Acetyl-Leucin gemeinsam mit dem Modifier 12 Stunden unter überkritischen Bedingungen gerührt und schließlich über den Restriktor in eine Auffanglösung mit Isopropanol expandiert. Die extrahierte Menge wird durch Verdampfen der Auffanglösung und Wiegen des Rückstandes bestimmt. In mehreren Versuchen wird zum einen der Druck, zum anderen die Art und Menge des zugesetzten Modifiers variiert. Die Temperatur beträgt immer 45 °C. Während der Dauer der Expansion ist ein deutlicher Aminosäuregeruch wahrnehmbar.

In Tabelle 4-1 sind die Ergebnisse dieser Versuche dargestellt. Danach löst sich im beobachteten Druckbereich von 100-140 bar N-Acetyl-Leucin mit steigendem Druck besser in SCCO₂. Der Einfluss des Modifiers ist nicht genau zu klären. Während bei einem Druck von 140 bar kein nennenswerter Unterschied zwischen einer Extraktion mit und ohne Ethanolzusatz besteht, wird bei der höchsten eingesetzten Ethanolmenge von 1 ml bei 120 bar Druck scheinbar auch die höchste Extraktmenge erzielt. Bedingt durch die niedrigen Mengen im Milligrammbereich sind allerdings sicherlich auch die Messfehler sehr hoch. N-Acetyl-Leucin löst sich in SCCO₂, allerdings nur in geringen Mengen (maximal 0,2 g/L bei 120 bar, 3 % Ethanol). Der Fehler der Wiederfindung des Extrakts ist nicht zu quantifizieren, die tatsächlich gelöste Menge dürfte aber größer sein.

Tabelle 4-1: Extraktion von N-Acetyl-Leucin

Druck	Modifier	Menge Modifier [%]	Menge Extrakt [mg]
100	Ethanol	1,4	1
120	Aceton	1,4	1
120	Ethanol	3	7
140	-	0	3,9
140	Ethanol	1,4	4,4

Um eine Kombination aus Reaktion und Extraktion zu erproben, werden 375 mg Betamino BC (Leu/Ile/Val) in einem Gläschen mit Rührfisch in einen 35 ml Reaktor gestellt, auf den Boden des Reaktors werden 0,5 ml Essigsäureanhydrid gegeben, als Modifier wird 1 ml Aceton und dazupipettiert. Bei $p = 90$ bar, $T = 45$ °C wird zunächst 4 Stunden unter SCCO₂ gerührt, um eine möglichst vollständige Umsetzung zu erzielen. Danach wird eine Stunde lang mit 0,072 L/h SCCO₂ durch die Anlage gepumpt. Hinter dem Reaktor befindet sich vor dem Expansionsventil eine Metallfritte, die den Austrag von festen ungelösten Aminosäuren verhindern soll. Als Auffanglösung dienen 2 ml Isopropanol. Nach dem Abdampfen des Isopropanols verbleiben jedoch nur wenige Tropfen Rückstand.

Der Versuch wird mit einer Mischung aus 150 mg Leucin und 150 mg Isoleucin wiederholt, das Extrakt mit 200 µl 6 N HCl aufgenommen, um die Acetyl-Derivate zu spalten. Die Analyse ergibt 0,05 mg Leucin und 0,04 mg Isoleucin als Menge an aufgefangenem Extrakt.

4.1.2.3 Zusammenfassung

Der Einsatz der untersuchten Modifier (Wasser, Butanol, Ameisen- und Essigsäure) brachte keine Verbesserung der Löslichkeit von Aminosäuren in SCCO₂.

Bei den Aminosäurederivaten konnte keine Löslichkeit des L-Leucinmethylesters nachgewiesen werden. Dagegen zeigen N-Acetyl-derivate zwar in mehreren Versuchen eine Löslichkeit in SCCO₂, diese bleibt jedoch mit maximal 0,2 g/L SCCO₂ bei 120 bar und 3 % Ethanol-Zusatz sehr gering. Eine wirtschaftliche Nutzung zur Extraktion der relativ niedrigpreisigen Aminosäuren scheint daher

undenkbar. Einzig eine Anwendung zur Trennung von enantiomeren Aminosäuren mit einer enzymatischen Deacylierung in der überkritischen Phase könnte Vorteile gegenüber konventionellen Systemen bieten.

In den weiteren Versuchen wird daher wieder die Trennung im konventionellen Lösemittel Wasser durchgeführt, die darin möglichen Trennoperationen für Leucin und Isoleucin (Bildung von Schwermetallkomplexen bzw. Adsorption an Zeolithen) sollen aber soweit optimiert werden, dass eine möglichst ökonomische und ökologische Anwendung möglich ist.

4.2 Ligandenaustausch an Schwermetallionen

Ausgehend von der bekannten Eigenschaft einiger Schwermetallionen, unterschiedlich stabile Komplexe mit Aminosäure zu bilden (Kapitel 2.2.3), soll die Bindung der Metallionen auf verschiedenen Austauschermaterialien derart verbessert werden, dass möglichst kein weiterer Schritt zur Entfernung des Metalls nach der Trennoperation mehr nötig ist. Untersucht wird die Möglichkeit, die beiden Aminosäuren Leucin und Isoleucin auf Kupfer- bzw. Kobalt beladenen Säulen mittels Verdrängungschromatographie zu trennen. Leucin bildet stabilere Metallkomplexe und wird daher auf metallbeladenen Materialien stärker zurückgehalten als Isoleucin.

4.2.1 Sephadex / $\text{Cu}(\text{OH})_2$

Bei niedrigen pH-Werten lässt sich Kupferhydroxid in den Körnern von Sephadex Gelfiltrationsmedium abscheiden, um daran selektiv Aminosäuren zu binden [99]. Die Darstellung des Trägers ist in Kapitel 0 beschrieben.

In der Literatur werden die Aminosäuren durch Absenken des pH-Wertes (0,2 N HCl) gemeinsam mit dem Kupfer von der Säule gelöst. Dies führt zum einen zur notwendigen Abtrennung des Kupfers aus dem Eluat, zum anderen muss das Säulenmaterial zur erneuten Verwendung zunächst regeneriert werden. Im Gegensatz dazu wird hier die Elution mit 0,1 M Ammoniaklösung durchgeführt. Bei dieser Konzentration sollte das $\text{Cu}(\text{OH})_2$ noch nicht durch Bildung eines Kupfertetramin-Komplexes aufgelöst werden, allerdings sollte es möglich sein, die Aminosäuren aus der Bindung zum Cu^{2+} zu verdrängen. Da Leucin einen stabileren Cu - Komplex bildet, sollte bei ansteigender NH_3 - Konzentration zunächst Isoleucin von der Säule gelöst werden.

Sowohl die Beladung als auch das Spülen des Materials finden bei hohen pH-Werten statt, da sonst sowohl das Cu^{2+} abgelöst, als auch die Aminogruppen der Aminosäuren protoniert werden. Eine Bindung an das immobilisierte Kupfer des Säulenmaterials ist dann erschwert.

Eine Mobitec-Kartusche wird mit Sephadex / $\text{Cu}(\text{OH})_2$ befüllt. Um die Affinität für Aminosäuren zu erhöhen [20] wird mit 5 ml 1 M Ammoniaklösung und nachfolgend mit weiteren 5 ml Borat-Puffer (0,05 M, pH = 11) gespült. Danach werden zunächst 10 ml einer Lösung der beiden Aminosäuren (je 5 g/l) in

Pufferlösung aufgegeben und schließlich mit 5 ml weiterem Puffer gewaschen. Eine Schlauchquetschpumpe fördert hierbei die Lösungen mit einem Volumenstrom von 0,2 ml/min. Zur Elution werden Ammoniaklösungen mit steigender Konzentration verwendet, so dass die Aminosäuren entsprechend der Stabilität ihres Cu^{2+} -Komplexes bei unterschiedlichen Konzentrationen von der Säule gespült werden. Die steigende Ammoniakkonzentration wird durch einen Gradientenmischer erzeugt, der eine Ammoniak-Konzentration im Bereich von 0 bis 0,1 M liefert. Das Säulenmaterial ließ sich mit beiden Aminosäuren beladen, und die Elution mit Ammoniaklösung zeigt deutliche Konzentrationsunterschiede, es wurde mehr Leucin als Isoleucin komplex auf der Säule gebunden. Das Verhältnis von Leucin zu Isoleucin im Eluat beträgt maximal 9,2. Bei der Aufgabe der Aminosäurelösung auf die Säule fällt in den Fraktionen ein Leucin-Kupferkomplex kristallin aus. Dies führt zu einer Erhöhung des Strömungswiderstandes. Obwohl eine peristaltische Pumpe zur Förderung der Lösungen verwendet wurde, kam es in einigen Fällen zum Erliegen des Durchflusses. Dies lässt sich durch die geringe Porengröße des Packungsmaterials begründen. Eine Vorbehandlung des Packungsmaterials mit Ammoniaklösung führt zu einer Verstärkung des Ausfalls. Während der Elution wird ebenfalls etwas Kupfer ausgewaschen. In den weiteren Versuchen wird auf den Einsatz des Gradientenmischers verzichtet, da kein Effekt auf die Selektivität der Desorption festgestellt wurde.

4.2.2 Kupferoxid

Als kostengünstige Alternative zu Cu^{2+} -beladenen Säulenmaterialien bieten sich wasserunlösliche Kupfer(II)-Salze an. Als System wurde hierbei Kupfer(II)oxid untersucht. Die Handhabung des gepulverten Kupferoxids erfolgte dabei entsprechend den vorher benutzten Trägersystemen. In einem Versuch wird gepulvertes Kupferoxid in einer Mobitec-Kartusche mit 2 ml Aminosäurelösung (je 5 g/L Leucin und Isoleucin), beladen und danach mit 40 ml Wasser gespült. Zur Elution wird schließlich 1 M NH_3 -Lösung durch die Säule gepumpt. Da das selbe Bindungsprinzip wie bei der kupferbeladenen Sephadex-Säule vorliegt, sollte sich das Oxid zur Trennung nutzen lassen. Allerdings tritt ebenfalls eine Ablösung von Kupfer auf, sobald die Säule mit der Ammoniaklösung gespült wird, der Austritt aus der Säule ist leicht blau gefärbt. Bei Verwendung von Kupferoxid-Pulver tritt

bedingt durch die größeren Zwischenkornvolumen im Packungsmaterial kein Erliegen des Durchflusses durch ausgefällte Kupfer-Aminosäurekomplexe auf. Das Elutionsprofil ist in Abbildung 4-1 wiedergegeben. Die Säule lässt sich mit beiden Aminosäuren beladen, welche ebenfalls durch Ammoniaklösung wieder eluiert werden. Die Elution des CuO-Trägers ergibt zum Zeitpunkt der höchsten Aminosäurekonzentrationen ein Leucin - Isoleucinverhältnis von 14 : 1, es finden sich bis zu 0,0086 g/L Isoleucin und 0,12885 g/L Leucin im Eluat.

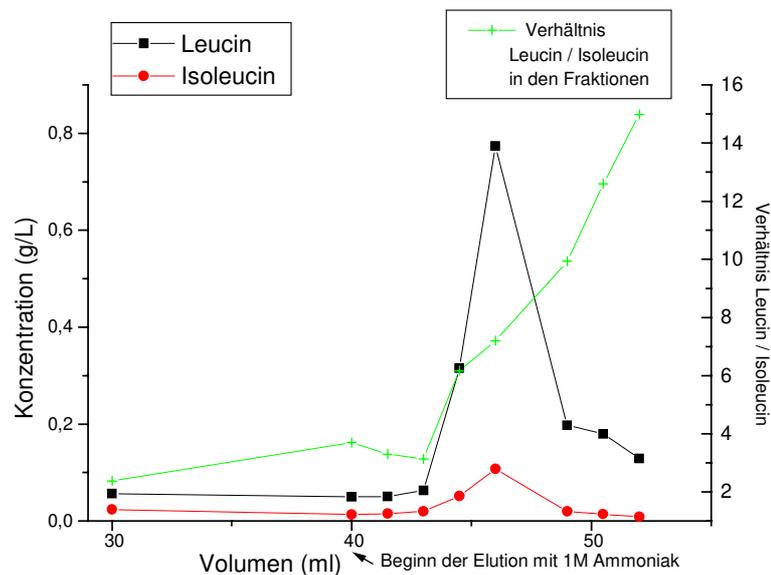


Abbildung 4-1: Elutionsprofil einer CuO-Säule

Beim Spülen der beiden beladenen Träger mit Wasser werden Leucin und Isoleucin kontinuierlich in geringen Konzentrationen abgespült. Dabei lässt sich Leucin in einer größeren Konzentration als Isoleucin im Washwasser nachweisen, längeres Spülen vermindert also die Ausbeute an Leucin.

Nach Angaben der Firma Sartorius lässt sich die Ablösung der Kupferionen von Membranen mit Imminodiessigsäuregruppen durch Spülungen mit 5-10 mM Imidazol in Acetatpuffer verhindern. Imidazol kann durch seine chelatisierende Wirkung das gebundene Kupfer zusätzlich stabilisieren. Der Effekt einer Spülung des Packungsmaterials mit Imidazol zur Verringerung des Kupferaustrags wird in einem weiteren Versuch kontrolliert.

Je 50 mg Kupferoxid werden mit folgenden Lösungen behandelt:

- 500 µl Wasser

- 500 µl NH₃-Lösung (1 M), danach wird mit 2 x 1 ml Wasser gespült
- 500 µl Imidazol 15 mM in 1 M Acetatpuffer, danach wird zweimal mit 1 ml Wasser gespült

Nun werden die Ansätze mit 1ml Aminosäurelösung (je 2g/L) 12 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und die Überstände abpipettiert. In jedem Fall hat sich die Lösung blau gefärbt, es wird also Kupfer abgelöst und eine Imidazol-Behandlung des Materials konnte dies nicht verhindern. Eine Elution mit 1 ml 1 M Ammoniaklösung erbrachte keine Aminosäure-desorption.

In einem Versuch zur Beladung von Kationenaustauschern soll ebenfalls die Wirkung von Imidazol auf den Kupferaustrag geprüft werden. Dafür werden 10 ml Lewatit TP 208 entsprechend der Beladung mit Kobalt vorbereitet: zunächst mit 1 M Natronlauge inkubiert, mit Wasser gespült und schließlich mit 1 g Kupfersulfat behandelt und anschließend mit 50 ml Wasser gewaschen. Nun wird das Harz mit 10 mM Imidazol in 0,1 M Acetatpuffer behandelt und mit weiteren 10 ml Wasser gewaschen.

Die Adsorption von Aminosäuren wird nun durch Inkubation von ca. 0,5 ml des behandelten Harzes mit 1 ml einer Aminosäurelösung mit Leucin und Isoleucin (in Konzentrationen von je 2 g/L) durchgeführt. Nach 24 Stunden im Schüttler wird der Überstand abpipettiert, das Harz zweimal mit 0,5 ml Wasser gewaschen und mit 1 ml 0,1 M Ammoniaklösung eluiert. Die Analyse des Überstandes und des Eluats zeigte zwar kein Kupfer in den Lösungen (die Analytik erfolgte entsprechend Kapitel 3.4.1), allerdings auch keine Veränderung des Leucin/Isoleucin-Verhältnisses in den Lösungen sowie eine nur geringe Aminosäurekonzentration im Eluat. Imidazol kann zwar die Ablösung von Kupfer aus dem Harz unterbinden, erniedrigt dabei aber gleichzeitig die Kapazität für die Aminosäurebindung.

4.2.3 Chelatisierende Sepharose

Eine Mobitec-Kartusche mit Kupfer-beladener chelatisierender Sepharose wird ebenfalls auf die Fähigkeit zur Adsorption von Aminosäuren untersucht. Das Vorgehen entspricht dabei Kapitel 4.2.1. Die Verwendung von chelatisierender Sepharose und Cu²⁺ als Säulenmaterial zeigte jedoch keine Bindung von Aminosäuren.

Da bei allen untersuchten Materialien ein Abspülen von Kupferionen beobachtet wurde, wird in den nächsten Versuchen Kobalt auf seine Fähigkeit zur Trennung der Aminosäuren und die Stärke der Bindung auf dem Säulenmaterial untersucht. Vor allem die Oxidation zum dreiwertigen Kobalt sollte eine starke Affinität zu Kationenaustauscherharzen bewirken.

4.2.4 Kobalt beladene Materialien

In einem Versuch wird zunächst die Eignung von Co^{2+} / Sephadex für die Aminosäuretrennung untersucht. Die Darstellung des Trägermaterials sowie die weitere Versuchsdurchführung erfolgt entsprechend dem Versuch mit $\text{Cu}(\text{OH})_2$ / Sephadex. Auch hierbei konnte jedoch keine Adsorption von Aminosäuren beobachtet werden.

Als alternativer Träger wurde die Membran Sartobind[®] IDA (Gruppen: Imminodiessigsäure) der Firma Sartorius untersucht, welche sich ebenfalls mit Metallionen beladen lässt. Die Membran wird in eine Mobitec-Kartusche eingesetzt, 2 ml 0,5 M CoSO_4 -Lösung wird 30 Minuten über die Membran im Kreis gepumpt. Danach wird über 10 Minuten 10 ml einer 1 % H_2O_2 Lösung aufgegeben, um das Co^{2+} zu oxidieren. Anschließend wird mit 10 ml 1 M NH_3 Lösung vorbehandelt, mit 50 ml Wasser nachgespült.

Mit 2 ml 10 g/L Betamino wird inkubiert, und mit 3 ml Wasser gewaschen. Die Elution erfolgt schließlich mit 3 ml 1 M NH_3 Lösung.

Das Verhältnis von Leucin zu Isoleucin in den Proben entspricht der Zusammensetzung der eingesetzten Lösung, außerdem werden nur sehr geringe Mengen an Aminosäuren gebunden. Um auszuschließen, dass die schlechte Beladung mit Kobaltionen für diese Ergebnisse verantwortlich ist, werden im folgenden klassische Ionenaustauschermaterialien mit Kobalt beladen und die Affinität von Leucin und Isoleucin zu Co^{3+} untersucht. Die Kapazität der Harze für Kobalt wurde bestimmt und ist in Kapitel 6.1.3 angegeben.

Der Träger Lewatit CNP-80 wird entsprechend Kapitel 6.1.3 vorbereitet, danach sind 4,2 mmol Kobalt auf 10 ml des Trägers gebunden, der dadurch eine violette Farbe bekommt. Nach der Behandlung mit 10 ml Ammoniaklösung wird mit 100 ml Wasser nachgespült. Mit 5 ml 10g/L Betamino BC Lösung wird sodann mit

einer Flussrate von 4 ml/min inkubiert (der Träger färbte sich heller), dann mit 50 ml Wasser gespült und nachfolgend mit 28 ml 1 M NH_3 Lösung eluiert (die Farbe des Trägermaterials verdunkelt sich wieder). Die Analyse per HPLC ergab keine Veränderung des Verhältnisses von Leucin zu Isoleucin, im Eluat finden sich nur sehr geringe Konzentrationen der beiden Aminosäuren wieder (Abbildung 4-2). Betamino BC enthält bereits mehr Isoleucin als Leucin (Verhältnis Leucin / Isoleucin = 0,588), die höheren Konzentrationen im Beladungspeak haben also nichts mit einer guten Adsorption von Leucin auf dem Säulenmaterial zu tun.

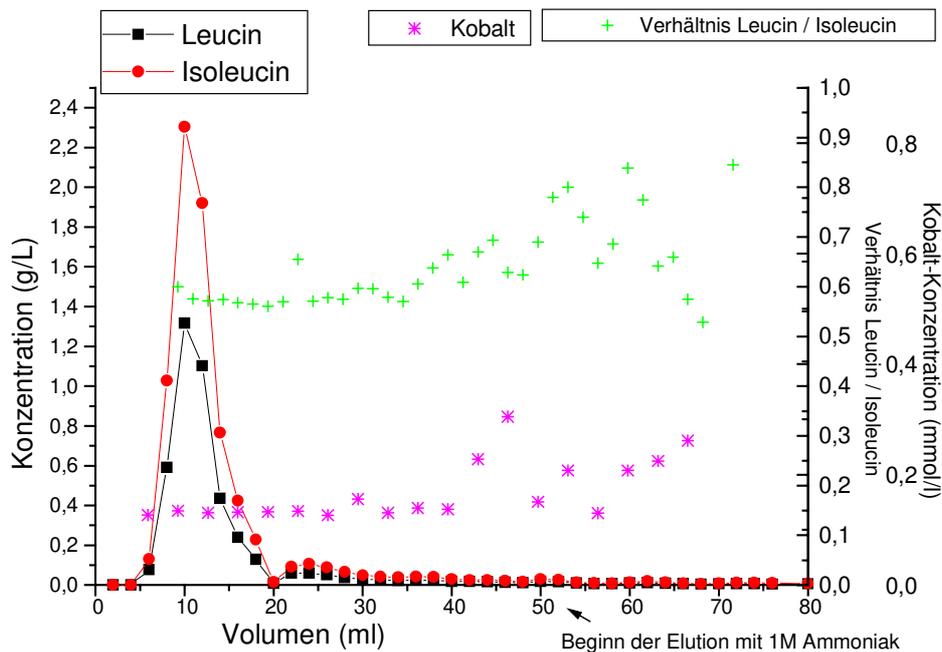


Abbildung 4-2: Lewatit CNP-80 / Co^{3+}

Die starken Schwankungen im Verhältnis der beiden Aminosäuren am Ende der Elution lassen sich durch die geringen Konzentrationen und die dadurch auftretenden Fehler erklären. Die Proben wurden zusätzlich nach Kapitel 0 auf den Co-Gehalt untersucht, in allen Proben fanden sich mindestens 0,1 mmol/L, mit Beginn der Elution stiegen die Konzentrationen auf 0,3 mmol/L an. Entweder wird das Kobalt also trotz der hohen Oxidationsstufe noch von der Säule gewaschen, oder von der Ammoniaklösung wieder zu Co^{2+} reduziert.

Um auszuschließen, dass die Aminosäuren bereits im Spülschritt nach der Elution wieder ausgewaschen werden, wird im nächsten Versuch mit weniger Volumen gespült. Zur Vorbereitung wird das Säulenmaterial vor der Inkubation mit 35 ml Ammoniaklösung und mit 100 ml Wasser gespült. Danach erfolgt die Beladung

mit 10 ml 10 g/L Betamino, anschließend wird mit 20 ml Wasser gespült (statt 50 ml im Vorversuch), schließlich mit 20 ml 1 M Ammoniaklösung eluiert. Die Messwerte sind in Abbildung 4-3 dargestellt.

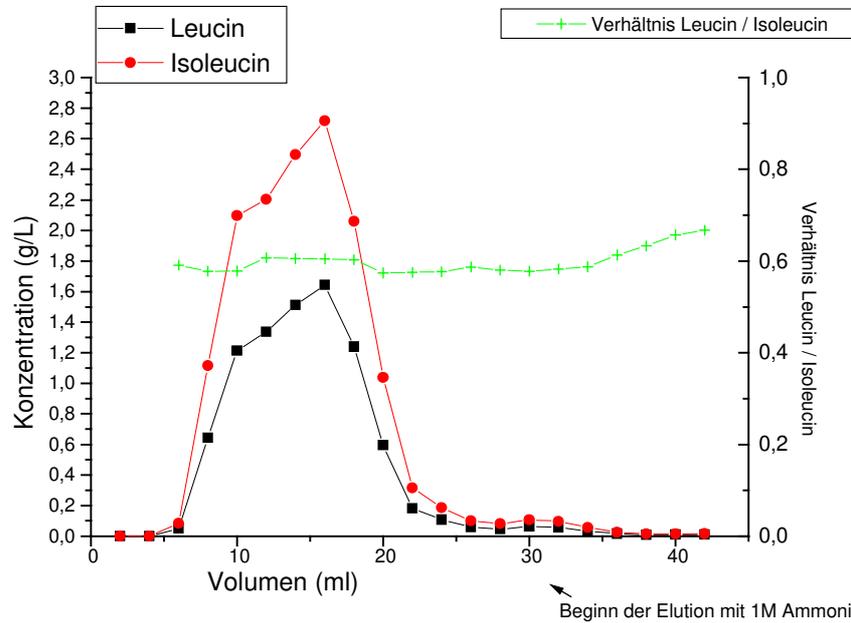


Abbildung 4-3: Elutionsprofil von Lewatit CNP-80 / Co^{3+} nach Vorbehandlung

Wie in der Abbildung zu erkennen ist, ergibt sich ebenfalls keine Anreicherung einer der beiden Aminosäuren, wiederum werden nur geringe Mengen auf der Säule gebunden.

Um den Einfluss einer eventuellen Reduktion des Kobalt durch Ammoniak zu überprüfen, wird der Träger aus dem Vorversuch 12 Stunden in 1M NH_3 aufbewahrt. Die Farbe des Trägers verändert sich dadurch zu rosa (wahrscheinlich wird Co^{3+} zu Co^{2+} reduziert). Zur Vorbereitung wird zunächst mit 10 ml Ammoniaklösung, danach mit 10 ml Wasser gespült. Die Beladung erfolgt mit 10 ml Leu/Ile (je 5 g/L), der Durchbruch ist eine leicht rosa gefärbte Lösung (Kobalt wird von der Säule gewaschen). Nun wird mit 15 ml Wasser gespült, schließlich mit 2,3 M Ammoniaklösung eluiert.

Das Verhältnis von Leu / Ile verändert sich deutlich, allerdings ist die Kapazität des Kobalt-beladenen Trägers nur sehr gering, außerdem wird Kobalt mit den Aminosäuren von der Säule gespült (Abbildung 4-4). Durch die Reduktion des Kobalt in die zweiwertige Form ist also offensichtlich die Selektivität gegenüber

Leucin gesteigert worden, die Mengen an adsorbierten Aminosäuren bleiben aber gering, außerdem wird Co^{2+} wieder leichter von der Säule gespült.

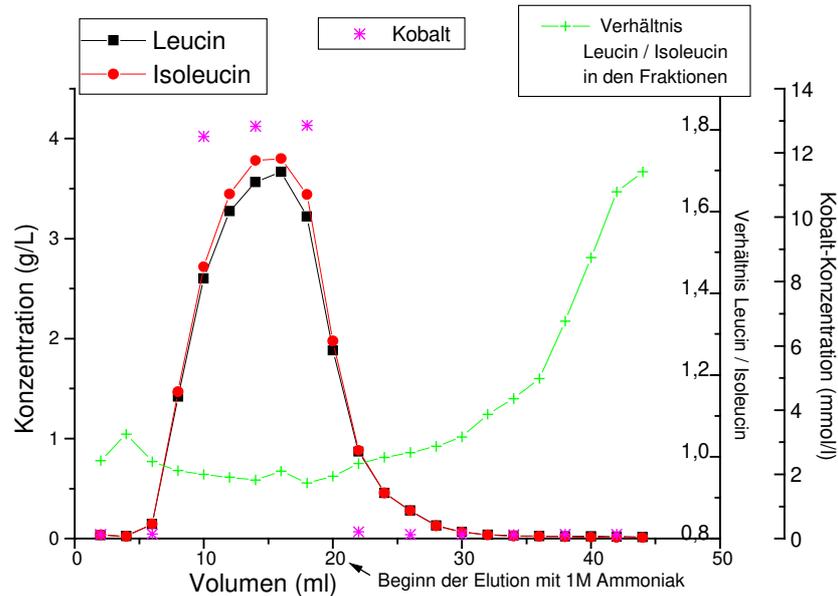


Abbildung 4-4: Elutionsprofil von Lewatit CNP-80 / Co^{2+}

In weiteren Versuchen mit unterschiedlichen Trägern ergaben sich keine neuen Erkenntnisse, auf Co^{3+} werden weder Leucin noch Isoleucin gebunden. Co^{3+} wird scheinbar durch Ammoniaklösungen wieder reduziert und von der Säule gespült.

4.2.5 Zusammenfassung

Kupferionen werden von allen untersuchten Materialien ausgewaschen, die Behandlung mit Imidazol führte bei einigen untersuchten Kupfer-Systemen zu einer Verringerung des Kupfer-Blutens, beeinträchtigen aber die Adsorption der Aminosäuren.

Die Verwendung von Co^{3+} führte zu keiner deutlich stärkeren Bindung des Metalls auf Säulenmaterialien, es wird von NH_3 wieder zu Co^{2+} reduziert und schließlich ausgewaschen. Die geringe Adsorption von Aminosäuren auf Co^{3+} beladenen Säulen ist möglicherweise nur die Adsorption auf geringen Mengen noch vorhandener zweiwertiger Ionen, während Co^{3+} überhaupt keine Aminosäuren adsorbiert. Vor allem im Zusammenhang mit der Giftigkeit von Kobalt ist ein Auswaschen des Metalls von der Säule ein deutlicher Nachteil gegenüber Kupfer. Die nächsten Untersuchungen sollen daher synthetische Zeolithe als ein alternatives Adsorbens für die Trennung von Leucin und Isoleucin erproben und ihre Anwendung optimieren.

4.3 Zeolithe

Im folgenden werden die besonderen Eigenschaften von Zeolithen zur selektiven Adsorption auf das Trennproblem Leucin/Isoleucin angewendet und unterschiedliche Immobilisierungsmethoden zur Optimierung der Anwendung erprobt.

Auf den in dieser Arbeit untersuchten Zeolithen des ZSM5 Typs wird Leucin besser adsorbiert als Isoleucin [31, 101]. Die Trennung der Isomere besteht also aus einer möglichst selektiven Adsorption des Leucin aus der Lösung, das Verhältnis der beiden Aminosäuren verschiebt sich zugunsten des Isoleucin. Im nächsten Schritt werden durch Elution bei hohen pH-Werten die adsorbierten Aminosäuren wieder desorbiert und das Eluat enthält nun mehr Leucin.

4.3.1 Adsorption von Aminosäuren auf Zeolithen

In einem einfachen Versuch soll zunächst ein auf Formkörpern gebundener Zeolith in einer Säule Verwendung finden. Die Adsorption erfolgt durch einfache Aufgabe einer Aminosäurelösung; da Aminosäuren bei pH-Werten unterhalb ihres Isoelektrischen Punktes am besten an Zeolithen adsorbieren, werden die verwendeten Lösungen mit Salzsäure angesäuert. Die Desorption wird durch eine Erhöhung des pH-Werts durch Zugabe einer Ammoniaklösung erreicht.

10 ml Zeolith vom Typ ZSM5M45 auf Formkörpern wird zunächst in 100 ml Wasser (pH mit HCl auf 2 eingestellt) zwei Stunden gewässert, danach in eine Glassäule mit einem Durchmesser von 1,5 cm gefüllt. Mit einem Volumenstrom von 220 BV/h (Bettvolumen pro Stunde) werden die nachfolgenden Lösungen auf die Säule gegeben. Zunächst wird mit 10 ml einer Lösung von Leucin und Isoleucin (je 5g/L) gespült, danach wird in einem Waschschrift 15 ml Wasser (HCl-sauer: pH=2) aufgetragen. Die Elution erfolgt schließlich mit 30 ml 1M NH₃ Lösung. Es werden Proben zu je 4 ml genommen und analysiert. In den Proben setzt sich Zeolith-Pulver ab, der Träger ist also im wässrigen System nicht stabil. Die Messwerte sind Abbildung 4-5 dargestellt.

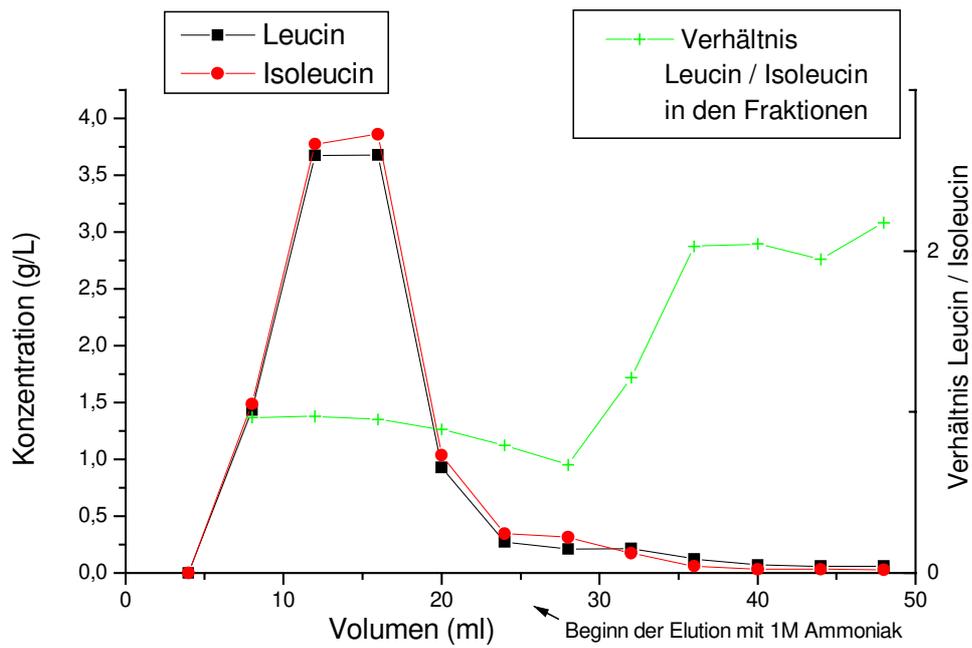


Abbildung 4-5: Elutionsprofil einer Zeolith-Formkörpersäule, Volumenstrom = 220 BV/h

Da wahrscheinlich die Durchflussgeschwindigkeit zu hoch war, wird der Versuch mit einem deutlich geringeren Volumenstrom von nur 2 BV pro Stunde wiederholt (Abbildung 4-6).

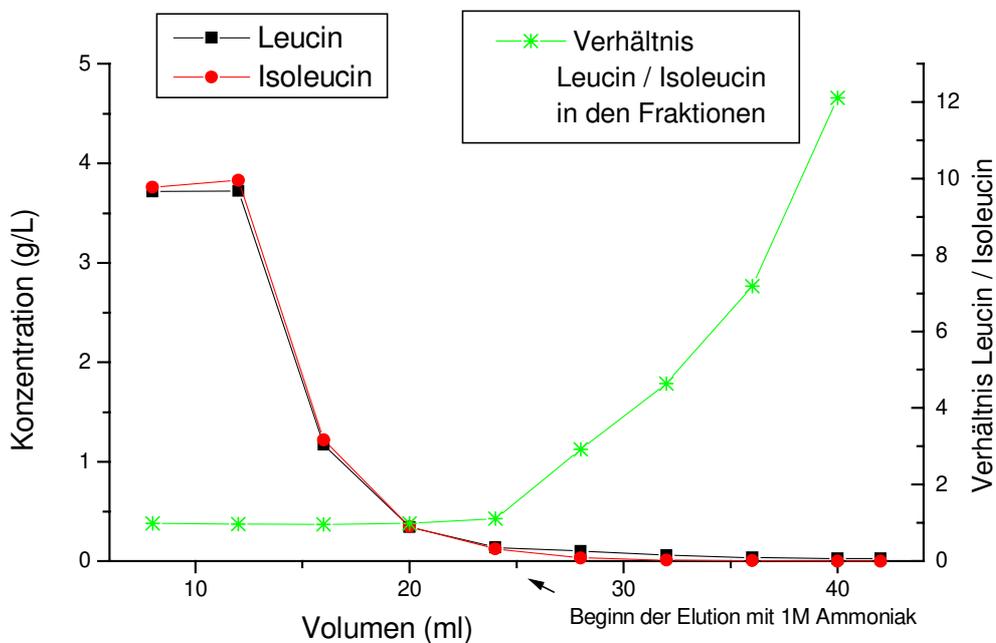


Abbildung 4-6: Elutionsprofil einer Zeolith-Formkörpersäule, Volumenstrom = 2 B V/h

Im Vergleich der beiden Abbildungen (Abbildung 4-5 und Abbildung 4-6) ist deutlich erkennbar, dass bei zu hohen Durchflussraten die Selektivität des Zeolithen geringer ist. Die Einstellung des Gleichgewichts dauert länger als die mittlere Verweilzeit.

Demnach ist die Menge an adsorbiertem Leucin gering, im Eluat wird maximal eine Konzentration von 0,1 g/L erreicht, möglicherweise weil beladener Zeolith bereits während der Inkubation von der Säule gespült wurde. Um die Kapazität sowie das Ad- und Desorptionsverhalten genauer zu verfolgen, werden in den folgenden Versuchen die Isothermen der Zeolithe aufgenommen sowie die Einflüsse von Eluent, pH-Wert Temperatur sowie Dauer der Inkubation auf die Selektivität der Adsorption betrachtet. Eingesetzt wird dabei eine Lösung, welche alle drei verzweigtkettigen essentiellen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin sowie Tryptophan, Phenylalanin und Asparagin enthält.

4.3.1.1 Einfluss des pH-Werts auf die Adsorption

Die Abhängigkeit der Adsorption vom pH-Wert der Inkubationslösung wird für ZSM5M40 untersucht. Je 20 mg des Zeolithen werden mit 1 ml einer Aminosäurelösung bei pH-Werten von 3, 5, 7 und 10 in Eppendorfreaktionsgefäßen 24 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt, danach abzentrifugiert und der Überstand analysiert. Dabei enthält die Inkubationslösung Leucin, Isoleucin, Tryptophan, Asparagin, Valin und Phenylalanin in derselben Konzentration von je 1g/L. Wegen der relativ hohen Aminosäurekonzentration (insgesamt 6g/L) wird auf die Verwendung eines zusätzlichen Puffers verzichtet, da Aminosäuren selbst als Puffer wirken können. Theoretisch sollte eine Adsorption bei pH-Werten kleiner als dem isoelektrischen Punkt der Aminosäure stattfinden, eine Desorption dagegen bei größeren pH-Werten.

In Abbildung 4-7 ist die Beladung des Zeolithen (= (eingesetzte Menge Aminosäure - adsorbierte Menge)[mg] / Menge an Zeolith [g]) gegen den pH-Wert der Inkubationslösung aufgetragen. Als adsorbierte Aminosäuremenge wird die Differenz aus eingesetzter Aminosäure - Konzentration im Überstand nach Ende der Inkubationszeit in 1 ml (dem Volumen der eingesetzten Inkubationslösung) angenommen.

Leucin und Asparagin zeigen dabei eine deutlich geringere Adsorption bei einem pH- Wert größer 7, während die anderen Aminosäuren in diesem Versuch keine

deutliche Abhängigkeit vom pH-Wert besitzen. Theoretisch sollten alle Aminosäuren oberhalb ihres isoelektrischer Punktes schlechter adsorbiert werden, Eine Erklärung dafür könnte sein, dass Aminosäuren, die sowieso nicht gut adsorbieren, weniger auf den Kationenaustausch angewiesen sind, dafür eher treten die zwischenmolekularen Anziehungskräfte bei der Adsorption in den Vordergrund. Leucin hat dabei den höchsten, Asparagin den niedrigsten pI-Wert der untersuchten Aminosäuren (siehe Tabelle 4-2). Trotz höherer Molmasse scheint der sterische Anspruch der Amidfunktion des Asparagin geringer zu sein als bei den verzweigten aliphatischen Resten von Isoleucin oder Valin.

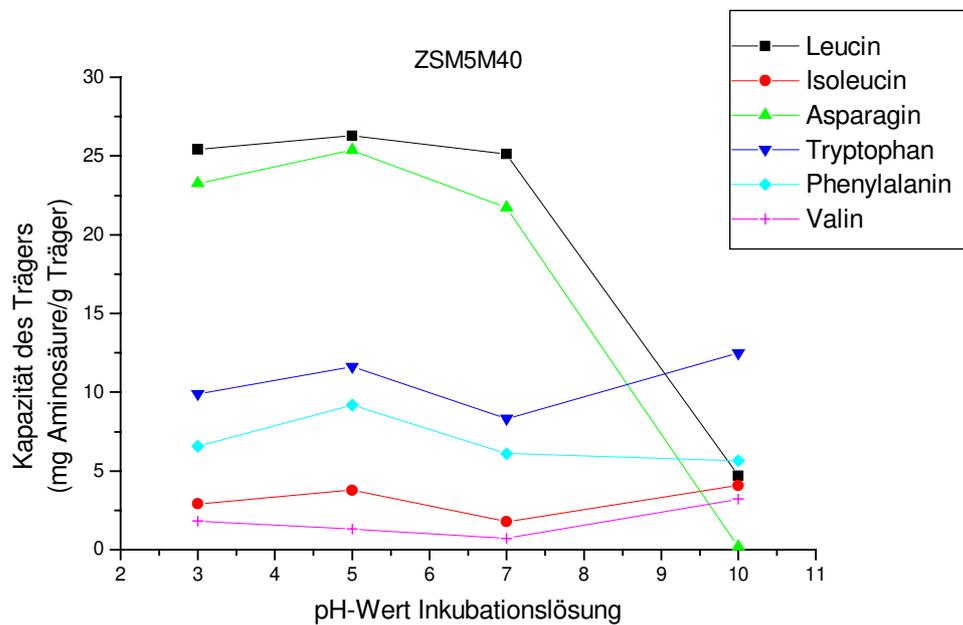


Abbildung 4-7: pH-Abhängigkeit der Adsorption

4.3.1.2 Einfluss der Inkubationszeit auf die Adsorption

Um die Zeit bis zur Gleichgewichtseinstellung der Adsorption bestimmen zu können, wird in einem Versuch in bestimmten Zeitabständen die Konzentration einer Aminosäurelösung über einem Zeolithen gemessen. Je 50 mg ZSM5M45FK werden dafür mit einem Milliliter einer Aminosäurelösung (siehe Kapitel 4.3.1.1) geschüttelt, die Konzentrationen im Überstand werden zu unterschiedlichen Zeiten bestimmt.

Eine Untersuchung der Bindung der Aminosäuren auf ZSM5M45FK in Abhängigkeit von der Inkubationszeit ergibt, dass sich nach 2 Stunden keine Veränderung der Konzentration im Überstand mehr zeigt, der Gleichgewichtszustand ist also erreicht (Abbildung 4-8).

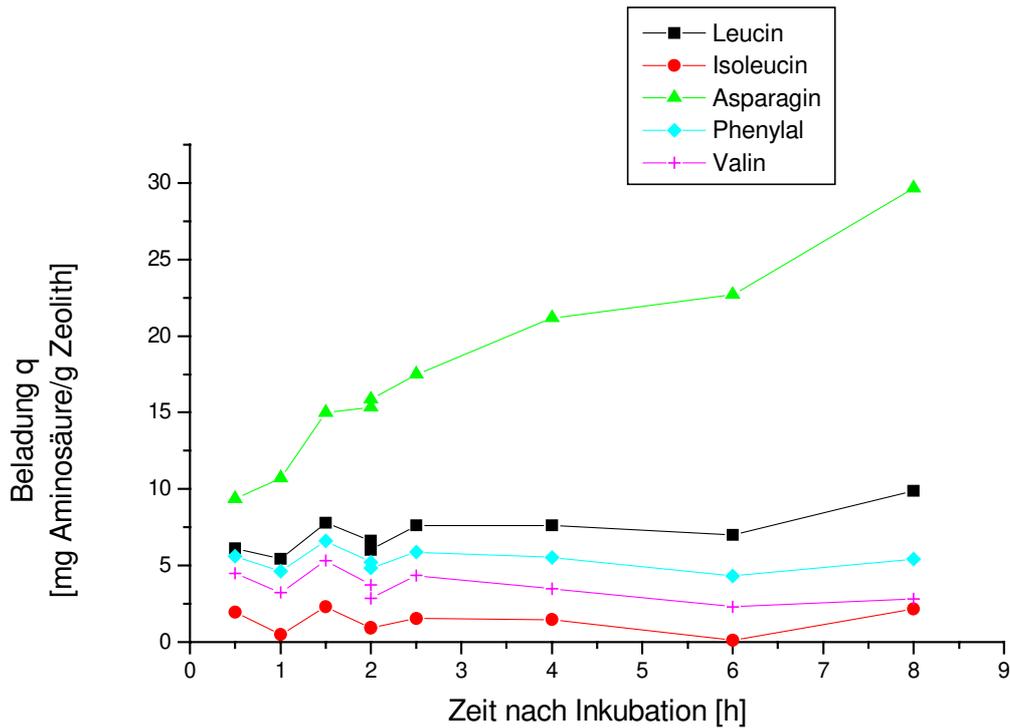


Abbildung 4-8: Beladung von ZSM5M45FK in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

Eine Ausnahme stellt die Aminosäure Asparagin dar, welche eine deutliche Zunahme der Adsorption über den beobachteten Zeitraum von 0,5-8 Stunden zeigt. Dies ließe sich durch eine saure Hydrolyse des Asparagin zu Asparaginsäure erklären. Dafür spricht, dass im Überstand der Inkubation Asparaginsäure nachgewiesen wurde, allerdings sind diese Konzentrationen sehr klein, außerdem lässt sich Asparagin bei einer Elution in derselbe Menge wie Leucin vom Zeolith desorbieren.

Da die Formkörper-gebundenen Zeolithe eine geringere spezifische Kapazität besitzen als die reinen Zeolithe, wird in den folgenden Versuchen zum Einfluss des Eluenten und der Temperatur das reine Zeolithpulver eingesetzt.

Tabelle 4-2: pI-Werte und Molmassen der Aminosäuren [100]

Aminosäure	Isoelektrischer Punkt pI	Molmasse (g/Mol)
Leucin	5,98	131,18
Isoleucin	6,02	131,18
Phenylalanin	5,48	165,19
Asparagin	5,41	132,13
Valin	5,96	117,15
Tryptophan	5,88	204,23

4.3.1.3 Einfluss des Eluenten auf die Desorption

Um den Einfluss des Eluenten auf die Desorption der Aminosäuren von Zeolithen und deren Selektivität zu untersuchen, werden die Konzentrationen an Aminosäuren nach der Elution mit unterschiedlichen Lösungen gemessen. Dafür wird je 20 mg ZSM5M28 mit 1 ml Leucin / Isoleucinlösung (je 1g/L) 1,5 Stunden inkubiert, 2 mal mit 0,5 ml Wasser gewaschen und danach mit 1 ml Eluent behandelt.

Tabelle 4-3: Aminosäurekonzentrationen in unterschiedlichen Eluenten

Eluent	Leucin [g/L]	Isoleucin [g/L]	Verhältnis Leucin/Isoleucin
1M NH ₃	0,8738	0,0934	9,4
0,1M NH ₃	0,7649	0,0719	10,6
0,01M NH ₃	0,0074	0	-
0,01M NaOH	0,1008	0,0095	10,6

Die Verwendung einer 1 M Ammoniaklösung führt im Vergleich zur 0,1 M Lösung zu einer geringfügig verbesserten Desorption der Aminosäuren. Das Verhältnis von Leucin zu Isoleucin ist bei einer hohen Ammoniakkonzentration geringfügig schlechter (9,4 im Gegensatz zu 10,6 bei 0,1M Ammoniaklösung und 0,1M Natronlauge), dabei könnte es sich allerdings auch um eine Auswirkung der Messfehler handeln. Im folgenden wird die 0,1 M Ammoniaklösung benutzt, da die zu hohen pH-Werte einer Natronlauge die Zeolithstruktur beschädigen könnten.

4.3.1.4 Temperaturabhängigkeit der Adsorption

Die Temperaturabhängigkeit der Adsorption von Aminosäuren auf Zeolithen des ZSM5 Typs wird am Beispiel von ZSM5M40 untersucht. Je 20 mg Zeolithpulver werden in Eppendorfhütchen 1,5 Stunden bei Temperaturen von 0, 20 und 40°C mit einer Lösung von 6 Aminosäuren (siehe Kapitel 4.3.1.1) inkubiert. Danach wird der Überstand abzentrifugiert und analysiert. In Abbildung 4-9 ist die Beladung des Trägers gegen die Inkubationstemperatur aufgetragen.

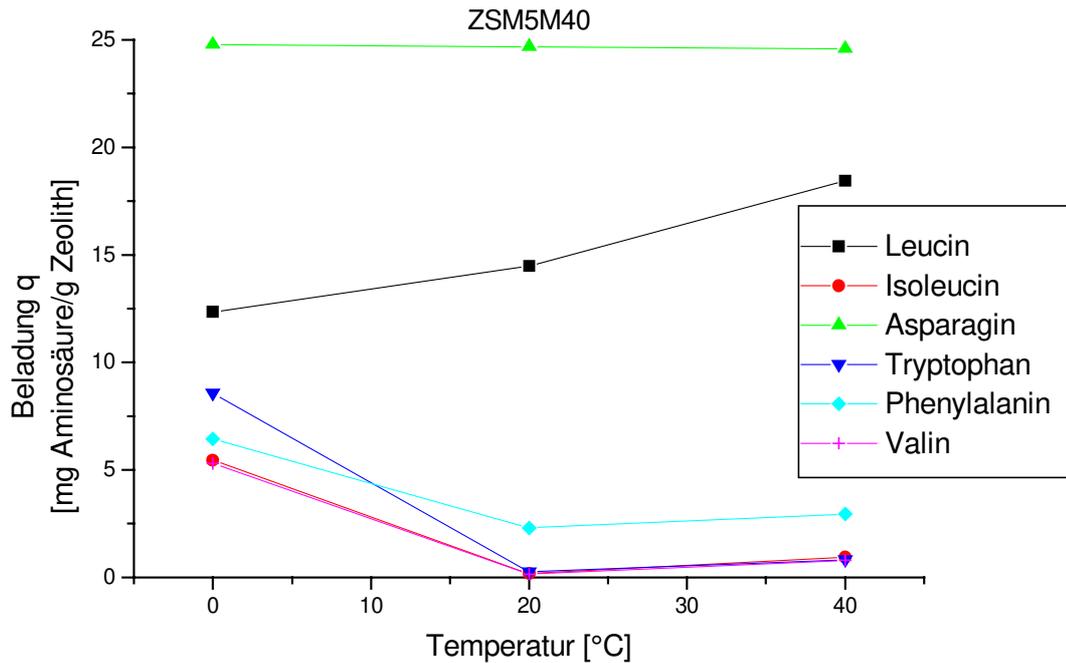


Abbildung 4-9: Temperaturabhängigkeit der Adsorption

Mit Ausnahme von Leucin und Asparagin adsorbieren alle untersuchten Aminosäuren mit höherer Temperatur schlechter auf dem Zeolithen. Möglicherweise finden bei höherer Temperatur die Adsorptions- / Desorptionsprozesse schneller statt, so dass das stärker adsorbierende Leucin die anderen Aminosäuren, bis auf das ebenfalls gut adsorbierende Asparagin, aus den Poren verdrängen kann.

4.3.1.5 Isothermen

Die Zeolithe vom Typ ZSM5 mit den Modulen 28, 40 und 45 sowie ein Zeolith vom Klinoptilolit-Typ werden mit Lösungen der Aminosäuren Leucin, Isoleucin, Tryptophan, Asparagin, Valin und Phenylalanin in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert, um die maximalen Beladungskapazitäten und die Selektivität zu bestimmen. Dabei enthält die Inkubationslösung alle Aminosäuren in derselben Konzentration, der pH-Wert der Inkubationslösung beträgt 5,3. Im Gegensatz zu Lösungen, die nur eine Aminosäure enthalten, wird bei dieser Art der Versuchsführung die Konkurrenz um die Adsorptionsstellen auf dem Zeolithen betrachtet.

1 ml der Aminosäurelösung werden mit 20 mg (pulverförmiger Zeolith) bzw. 50 mg (Zeolith auf Formkörper und Klino80) in Eppendorfreaktionsgefäßen 24 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Der Überstand wird nach Zentrifugation

abpipettiert und analysiert. Danach wird der Zeolith mit 1 ml Wasser 1 Stunde geschüttelt, der Überstand abpipettiert, erneut mit 1 ml Wasser nun 10 Stunden geschüttelt und wiederum abpipettiert. Die vereinigten Waschlösungen werden ebenfalls analysiert. Zur Elution werden die Zeolithe mit 1 ml 0,1M Ammoniaklösung 5 Stunden geschüttelt, dann zentrifugiert und die Konzentrationen im Zentrifugat bestimmt. Die pH-Werte in den Inkubationslösungen über den Zeolithen werden bestimmt und sind in Tabelle 4-4 aufgeführt.

Tabelle 4-4: pH-Wert im Inkubationsüberstand

Zeolith	pH-Wert des Inkubationsüberstandes
ZSM5M40	5,8-6
ZSM5M28	4,3-4,8
ZSM5M28FK	5,5
ZSM5M45FK	5
Klino 80	7

Durch die unterschiedlichen Verhältnisse von Aluminium- zu Siliziumionen im Zeolith-Gerüst stellen sich verschiedene pH-Werte in der Lösung über den Zeolithen ein. Wie in Kapitel 4.3.1.1 gezeigt wurde, zeigen sich jedoch keine starken Einflüsse des pH-Wertes auf die Adsorption der Aminosäuren, solange der pH-Wert niedriger als 7 ist.

In den folgenden Abbildungen sind die spezifischen Beladungen gegen die Konzentration der Inkubationslösung für die einzelnen Zeolithe aufgetragen. Die Beladung q sollte gegen einen Grenzwert q_s streben, wenn die Menge an Aminosäure in der Inkubationslösung größer als die maximale Beladungskapazität des Zeolithen ist. Da hier die Beladung mit mehreren Aminosäuren betrachtet wird, ist dieser Grenzwert durch die Summe der Beladungen bestimmt, da die Adsorptionsstellen (Poren) für alle Aminosäuren gleich angeboten werden.

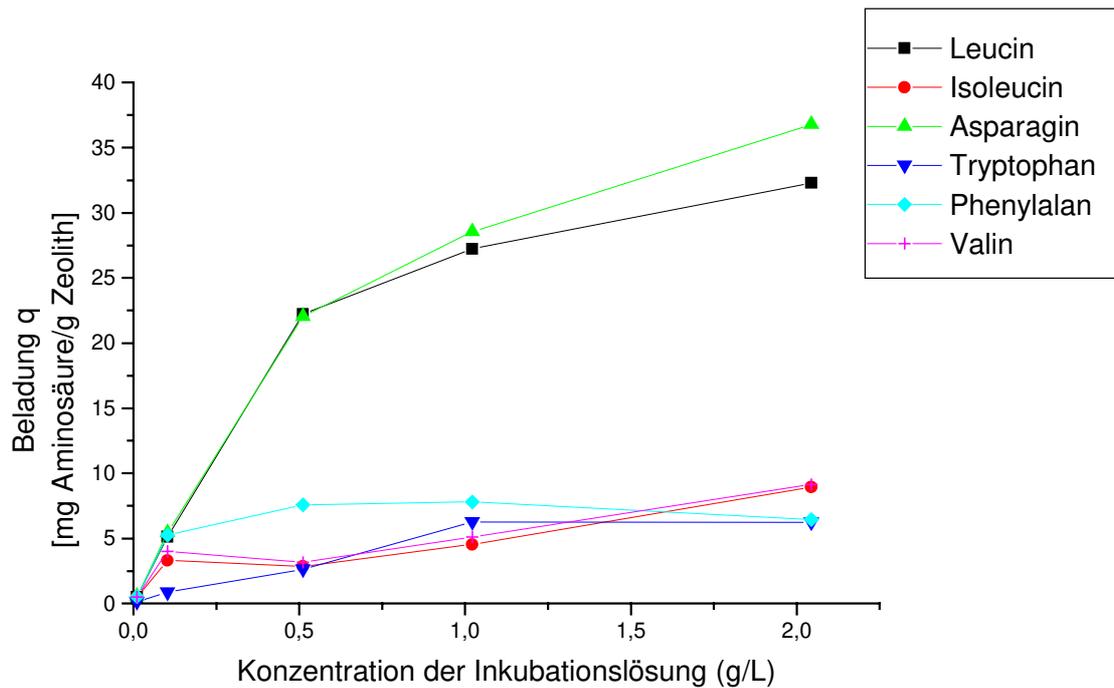


Abbildung 4-10: Isotherme von ZSM5M40

Wie sich in Abbildung 4-10 zeigt, ist die maximale Beladungskapazität für die Aminosäuren Leucin und Asparagin auf ZSM5M40 noch nicht erreicht, beide werden außerdem deutlich stärker als die anderen Aminosäuren gebunden. Es wird eine maximale Beladung von 32 mg Leucin pro Gramm Zeolith erreicht, während Isoleucin nur eine Beladung von 8 mg/g erreicht. In den weiteren Abbildungen wird deutlich, dass Asparagin auf allen untersuchten Zeolithen sehr stark gebunden wird. Die starke Adsorption von Asparagin ist durch den niedrigen isoelektrischen Punkt $pI = 5,41$ bei relativ geringer Molmasse begründet (Tabelle 4-2). In geringem Maße tritt darüber hinaus noch eine Hydrolyse zu Asparaginsäure auf, die sich im Überstand nachweisen lässt.

In Abbildung 4-11 sind die Isothermen des ZSM5 mit Modul 28 dargestellt.

Auch bei einem Modul von 28 werden Leucin und Asparagin deutlich besser als die anderen Aminosäuren adsorbiert, die maximale Beladung erreicht hier 24 mg Leucin pro Gramm Zeolith, sowie 8,8 mg/g Isoleucin, Asparagin wird sogar mit bis zu 50mg/g adsorbiert.

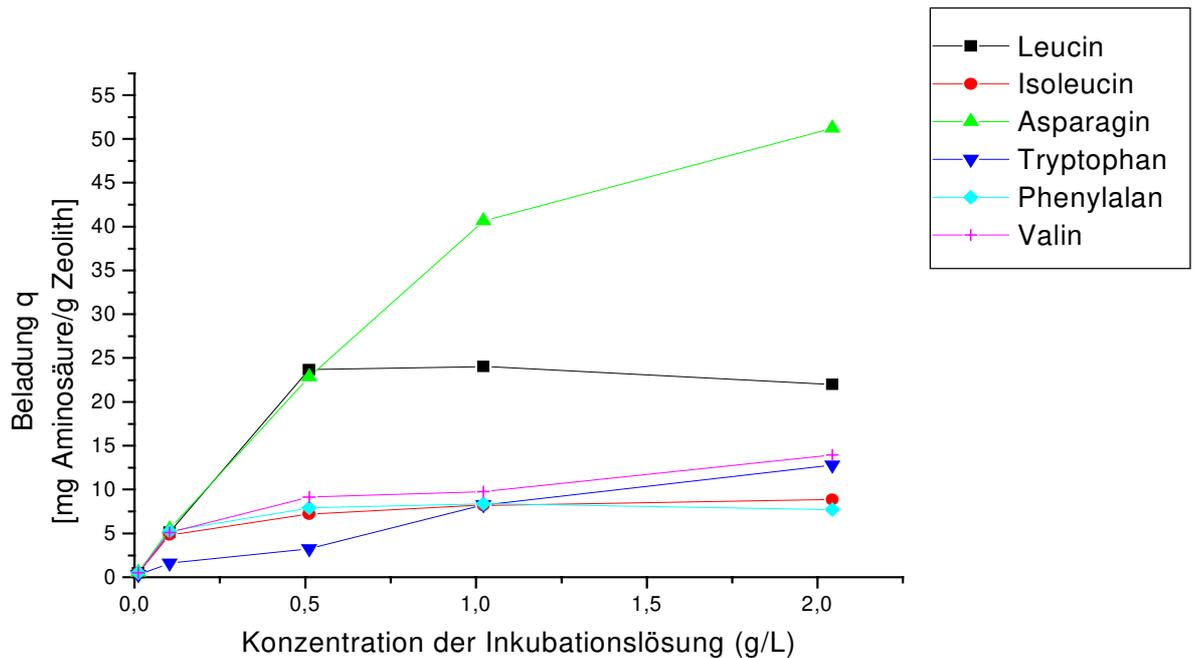


Abbildung 4-11: Isotherme von ZSM5M28

In Abbildung 4-12 sind die Isothermen für ZSM5 Modul 28 auf Formkörpern eingezeichnet. Die maximalen Beladungskapazitäten scheinen hier noch nicht erreicht zu sein, da die Beladungen aller Aminosäuren mit höheren Konzentrationen in der Inkubationslösung noch weiter ansteigen. Die erreichten Beladungen sind allerdings mit 20 mg/g für Leucin und 4 mg/g für Isoleucin geringer als bei dem ungebundenen Zeolithpulver (vergl. Abbildung 4-11). Die spezifische Kapazität der beiden auf Formkörpern gebundenen Zeolithen ist naturgemäß geringer als die Kapazität der reinen Zeolithe. Da sich die Formkörper aber in wässrigen Systemen zersetzen, ist kein Vorteil in der Handhabung gegenüber dem ungebundenen Zeolithen zu erkennen.

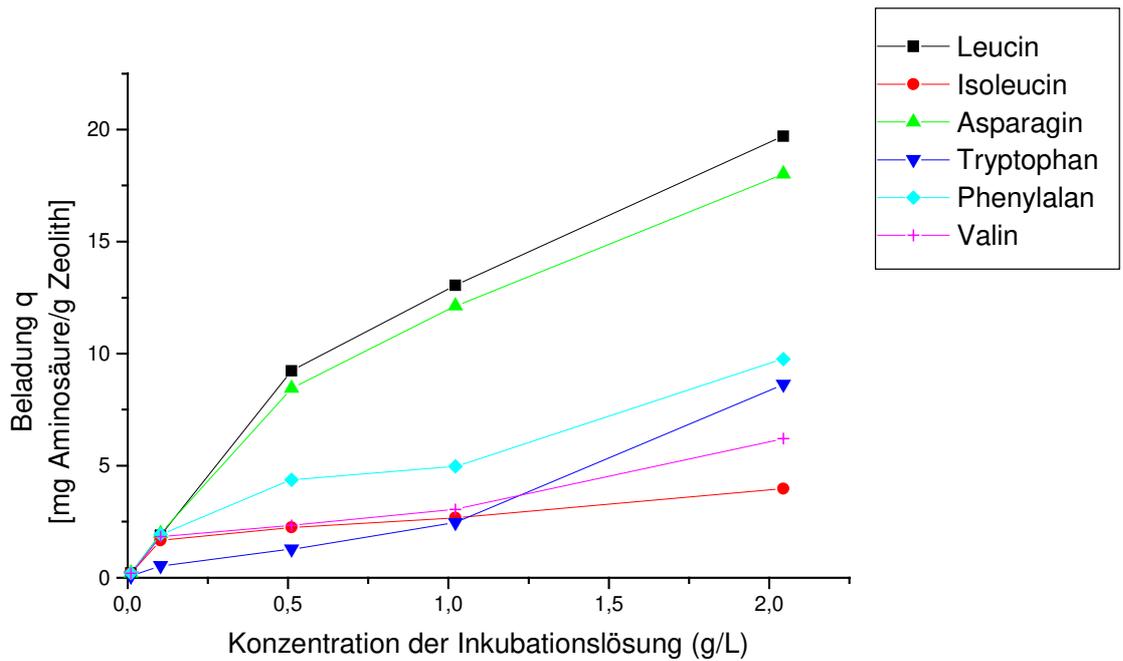


Abbildung 4-12: Isotherme von ZSM5M28FK

In Abbildung 4-13 ist die Beladung von ZSM5M45FK gegen die Konzentration der Inkubationslösung aufgetragen. Erneut zeigt sich eine Bevorzugung für Leucin, maximal wird ein Beladung von 10 mg/g erreicht gegenüber 3,9 mg/g für Isoleucin. Die starke Adsorption des Asparagin tritt hier noch deutlicher zu Tage.

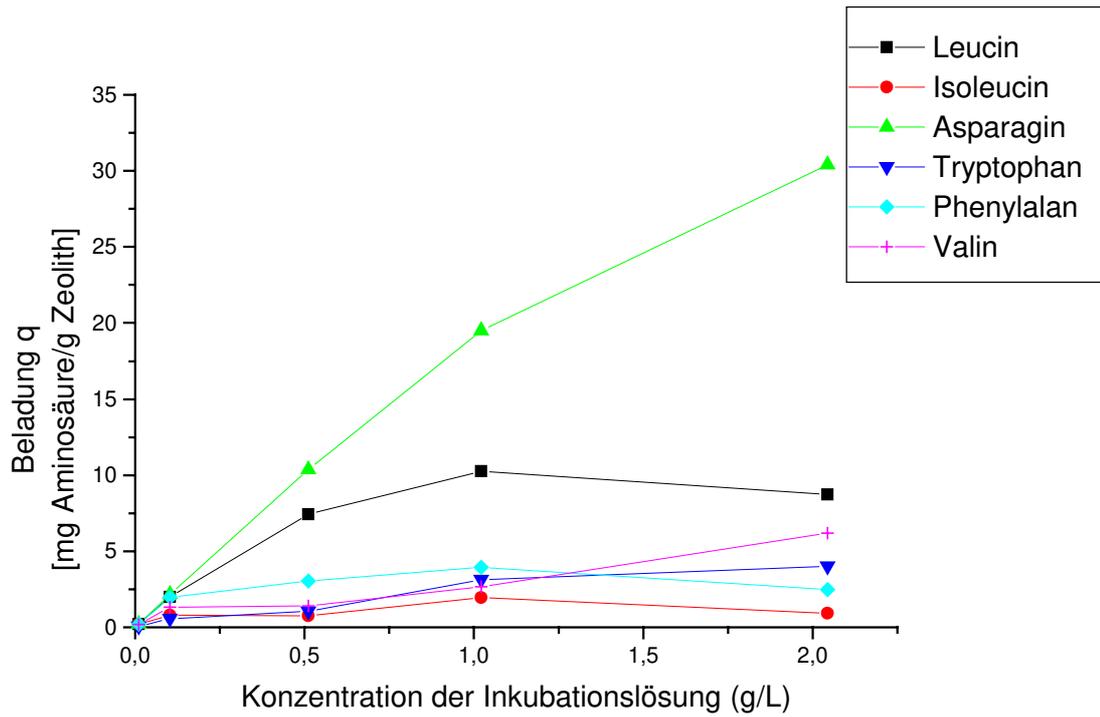


Abbildung 4-13: Isotherme von ZSM5M45FK

Abbildung 4-14 zeigt schließlich die Isothermen des Zeolithen Klino80.

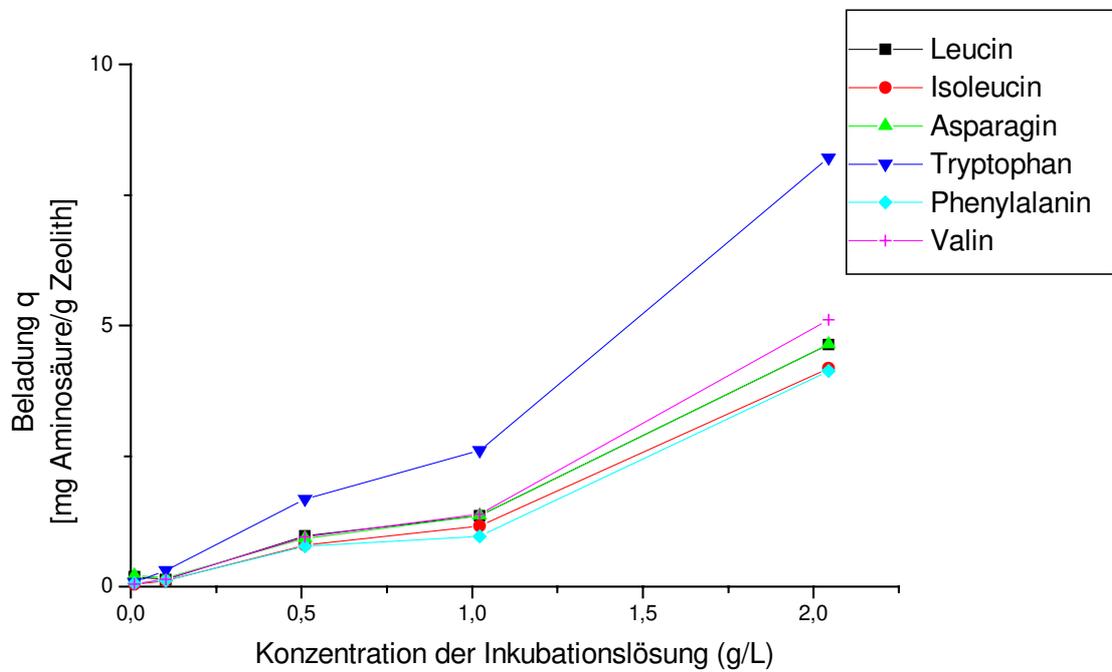


Abbildung 4-14: Isotherme von Klino80

Klino80 hat nur eine geringe Beladungskapazität für Aminosäuren. Die Poren sind mit 4-5 Å zu klein für die vergleichsweise großen Aminosäuremoleküle.

Tryptophan wird hier (im Gegensatz zu den anderen untersuchten Zeolithen) trotz seiner Größe stärker als die übrigen Aminosäuren gebunden. Möglicherweise spielen hier nur noch Effekte an der Oberfläche des Zeolithen eine Rolle, ein Eindringen in die Poren ist für Tryptophan aufgrund seiner großen Molmasse nicht möglich.

Die maximalen Beladungen der Zeolithe, die in den Versuchen erreicht wurden, sind in Tabelle 4-5 zusammengefasst. Für Asparagin wurde offensichtlich in keinem Fall die maximale Beladungskapazität erreicht. Die Porenweite von ca. 5,5 Å (ZSM5) ist für die größeren Aminosäuren Phenylalanin und Tryptophan zu eng. Valin und Isoleucin werden aufgrund sterischer Hinderung (Verzweigung am β -C) schlechter gebunden als Leucin [101].

Tabelle 4-5: maximale Beladung der Zeolithe (24 Stunden Inkubationszeit)

Zeolith	maximale Beladung [mg/g Zeolith]					
	Leucin	Isoleucin	Asparagin	Tryptophan	Phenylalanin	Valin
ZSM5M40	32	9	36	6	7,8	9,1
ZSM5M28	24	8,8	51	12	8,4	13
ZSM5M28FK	19	3,9	18	8	3,9	6
ZSM5M45FK	10	1,9	30	4	4	6
Klino 80	4,6	4	4	8	4	5

Die Kapazität für die jeweilige Aminosäure wäre in Abwesenheit der anderen Aminosäuren höher, da gebundene Moleküle Adsorptionsstellen des Zeolithen besetzen.

4.3.1.5.1 Berechnung der maximalen Beladung und Affinität

Bei Adsorption mehrerer Komponenten an einer Oberfläche ergibt sich der relative Bedeckungsgrad nach Gleichung 2-7, S. 27 am Beispiel des Leucins zu:

$$\Theta_{\text{Leu}} = \frac{q_{\text{Leu}}}{q_{\text{Leu,S}}} = \frac{\frac{c_{G,\text{Leu}}}{a_{\text{Leu}}}}{1 + \frac{c_{G,\text{Leu}}}{a_{\text{Leu}}} + \frac{c_{G,\text{Ile}}}{a_{\text{Ile}}} + \frac{c_{G,\text{Asp}}}{a_{\text{Asp}}} + \frac{c_{G,\text{Trp}}}{a_{\text{Trp}}} + \frac{c_{G,\text{Phe}}}{a_{\text{Phe}}} + \frac{c_{G,\text{Val}}}{a_{\text{Val}}}} \quad \text{Gleichung 4-1}$$

Die Affinitäten a_i der einzelnen Aminosäuren sind also nicht berechenbar, der Grenzwert der Adsorbensbeladung $q_{i,s}$ sollte allerdings unabhängig von der Anwesenheit anderer Adsorbate sein, da bei ausreichend hoher Konzentration die konkurrierenden Moleküle verdrängt werden können. Vielmehr bewirkt die Anwesenheit der konkurrierenden Aminosäuren eine Hemmung der Adsorption, die -analog der kompetitiven Hemmung der Enzymkinetik- zu einer größeren Steigung im Lineweaver-Burke- und Hanes-Wilkinson- Diagramm (bzw. einer kleineren Steigung bei der Auftragung nach Eadie Hofstee), aber zu keiner Verschiebung des Achsenabschnittes führt.

Durch Annahme einer Unabhängigkeit von der Adsorption der anderen Aminosäuren kann vereinfachend mit Gleichung 2-6 gerechnet werden, die Bestimmung der Parameter $q_{i,s}$ und a_i erfolgt dann durch Linearisierung der Langmuirschen Gleichung, wobei natürlich die hierdurch errechneten Affinitäten keinerlei Aussagekraft mehr haben. Da bei kleineren Konzentrationen der Inkubationslösung die Konzentrationen im Überstand teilweise unter der Nachweisgrenze der HPLC-Analytik sinken, sind die Linearisierungen nach Lineweaver-Burke und Eadie-Hofstee stark fehlerbehaftet (beide benutzen eine Auftragung gegen die reziproke Konzentration). Beispielhaft sind die Auftragungen der Ergebnisse für die Aminosäure Leucin und die Adsorption auf ZSM5M40 in Abbildung 4-15 wiedergegeben. Da die Auftragung nach Hanes-Wilkinson die besten Ergebnisse liefert, werden die Werte für die Zeolithe ZSM5M28 und ZSM5M40 hiernach berechnet und sind in Tabelle 4-6 wiedergegeben. Die Werte für Klino80 sowie die beiden formkörpergebundenen Zeolithe wurden wegen ihrer geringen Adsorptionen und den daraus resultierenden Fehlern nicht berechnet.

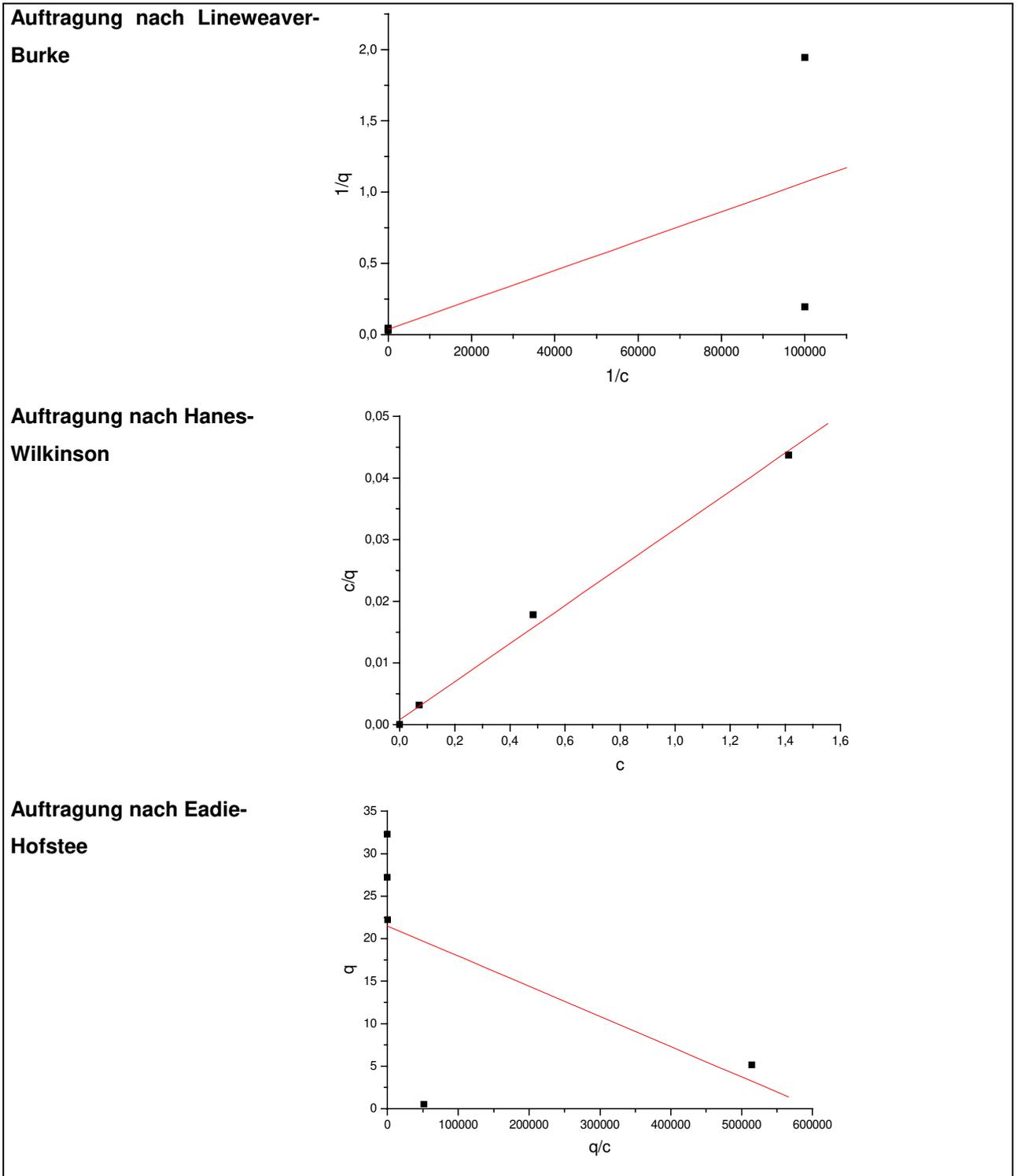


Abbildung 4-15: Leucin auf ZSM5M40: Berechnung von Affinität und maximaler Beladung

Tabelle 4-6: Grenzwert der Beladung $q_{i,s}$ und Affinität a_i , ermittelt durch Auftragung nach Hanes-Wilkinson

Zeolith-Typ	Aminosäure	$q_{i,s}$ [mg AS./ g Zeolith]	rel. Fehler [%]	a_i	rel. Fehler [%]
ZSM5M40	Leu	32,3	7,1	0,025	103
	Ile	8,9	3,0	0,355	131
	Asp	45,2	8,8	-0,049	122
	Phe	8,6	0,7	0,90	51
	Trp	6,5	6,5	-0,037	121
	Val	9,1	3,2	0,31	126
ZSM5M28	Leu	22,0	11,4	-0,009	144
	Ile	8,9	5,2	0,03	93
	Asp	53,1	4,0	0,059	65
	Phe	17,8	1,2	1,33	96
	Trp	7,8	11,0	-0,012	169
	Val	13,7	5,7	0,09	126

Die Affinitäten sind wie erwartet stark fehlerbehaftet, die Hanes-Wilkinson-Linearisierung errechnet teilweise eine negative Affinität zum Zeolithen, welches physikalisch unmöglich ist. Es ist jedoch zu bemerken, dass die Werte nahe dem Nullpunkt liegen und gleichzeitig die relativen Abweichungen größer als 100% sind.

Von den hier untersuchten Zeolithen lagen ungefähre Angaben des Herstellers nur für ZSM5 mit einem Modul von 28 vor (Tabelle 4-7). Die ermittelten maximalen Beladungen stimmen dagegen gut mit den gemessenen Werten überein, die in Tabelle 4-5 zusammengefasst sind.

Tabelle 4-7: maximale Beladungskapazität bei Adsorption aus reiner Aminosäurelösung (ZSM5M28) [101]

Aminosäure	($q_{i,s}$) [mg AS./ g Zeolith]
Leu	55
Ile	30
Phe	45
Trp	0
Val	55

Beim Vergleich der Werte aus Tabelle 4-6 und Tabelle 4-7 fallen die großen Unterschiede in der maximalen Beladungskapazität auf, so liegt diese z.B. für Leucin laut Hersteller bei ca. 55 mg/g Zeolith, aus den Ergebnissen der durchgeführten Versuche ergibt sich aber nur ein Wert von 32 mg/g. Dagegen wurde eine Tryptophan-Adsorption gemessen, während dieser Zeolith nach Herstellerangaben überhaupt nicht adsorbieren sollte.

Dabei ist zu beachten, dass in den durchgeführten Experimenten eine Mischung aus mehreren Aminosäuren als Inkubationslösung eingesetzt wird, welche um dieselben Bindungsstellen konkurrieren. Offensichtlich lieferte der einfache Ansatz zur Linearisierung nicht die maximale Kapazität, wie sie bei der Lösung einer reinen Aminosäure zu erwarten wären. Die Konzentrationen der konkurrierenden Aminosäuren sind auch insgesamt in fünffach höherer Konzentration anwesend und stören daher sicherlich deutlich.

4.3.1.5.2 Elution

Das Verhältnis von Leucin zu Isoleucin im Eluat erreicht die höchsten Werte (28 mal soviel Leucin wie Isoleucin bei einer Konzentration der Inkubationslösung von 0,4g/L) bei Verwendung von ZSM5M45. Das Verhältnis von Leucin zu Isoleucin in Abhängigkeit von den Konzentrationen der Inkubationslösung ist in Abbildung 4-16 und Abbildung 4-17 dargestellt. Asparagin wird in ebenso großen Konzentrationen wie Leucin von den ZSM5-Trägern eluiert. In technischen Aufarbeitungsgängen kann Asparagin durch seinen niedrigen Isoelektrischen Punkt allerdings sehr leicht von Leucin, Isoleucin und Valin getrennt werden, so dass es tatsächlich keine Nachteile für die Aufreinigung von Leucin und Isoleucin auf Zeolithen hat.

Da bei höherer Aminosäurekonzentration die Kapazität überschritten wird, führt die geringe Menge adsorbierten Leucins nicht mehr zu einer deutlichen Abnahme der Konzentration in der Inkubationslösung, das Verhältnis nähert sich 1. Für niedrige Konzentrationen der Inkubationslösung wurden im Überstand keine Aminosäuren mehr nachgewiesen, daher lässt sich auch kein Verhältnis berechnen. Die größere Selektivität bei höheren Konzentrationen (Abbildung 4-17) lässt sich durch eine größere Konkurrenz um vorhandene Bindungsstellen erklären. Da die Kapazität von Klino80 für Aminosäuren zu gering ist, wird im Eluat keine Aminosäure gefunden, die Selektivität kann daher auch nicht berechnet werden.

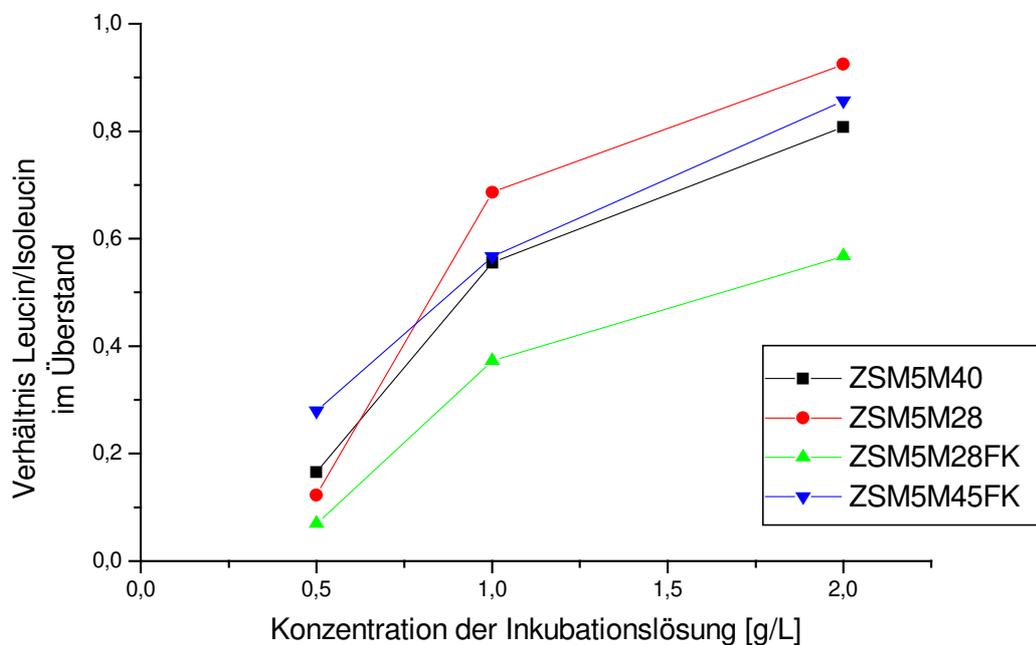


Abbildung 4-16: Verhältnis von Leucin zu Isoleucin im Überstand der Inkubation

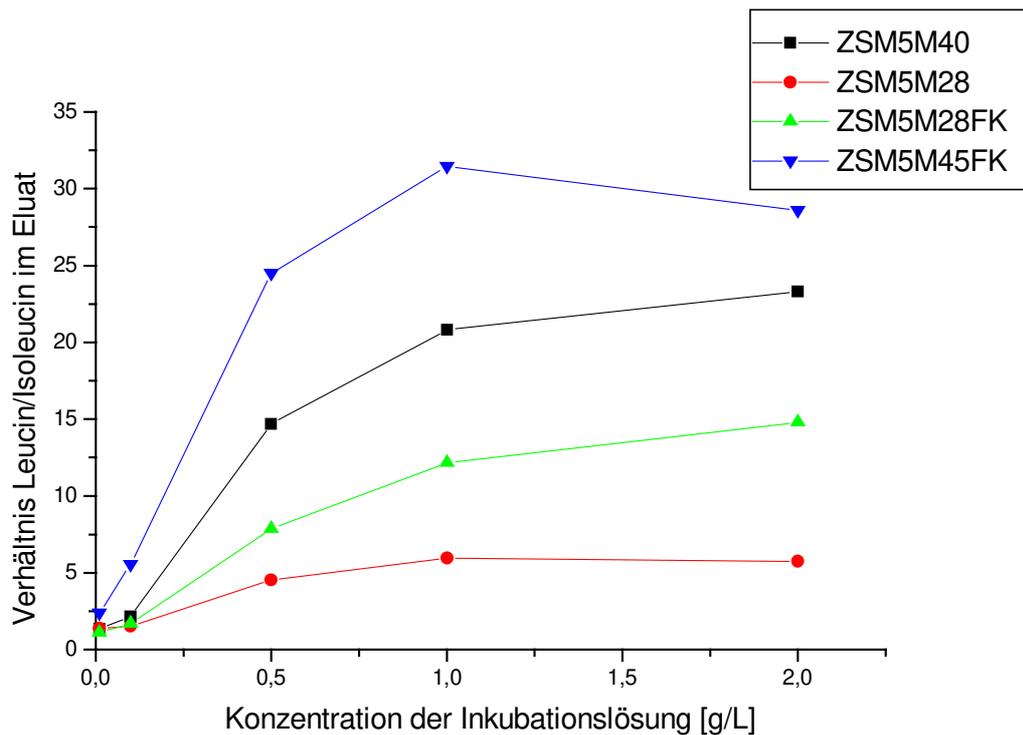


Abbildung 4-17: Verhältnis von Leucin zu Isoleucin im Eluat

Durch Spülen des inkubierten Zeolithen mit Wasser über einen kürzeren Zeitraum wäre eine geringere Menge bereits gebundener Aminosäure wieder eluiert worden, die nachfolgende alkalische Elution hätte daher eine bessere Ausbeute ergeben.

4.3.1.5.3 Bilanz

Eine Bilanzierung der Aminosäuren ergibt sich durch die Differenz der eingesetzten Aminosäuremenge und der Summe der wiedergefundenen Aminosäure (Überstand + Waschlösung + Elution). Da der Fehler der Konzentrationsbestimmung durch HPLC 10 % beträgt, kann man den maximalen Gesamtfehler der Bilanzierung (3 Lösungen) auf 30 % berechnen.

Für sehr geringe eingesetzte Aminosäurekonzentrationen (0,01g/L) weichen die gemessenen Konzentrationen um mehr als 40 % ab, da sie zu nahe an der Nachweisgrenze liegen. Die Abweichungen bewegen sich für höhere Konzentrationen innerhalb der Fehlergrenze, so dass die Analytik als akzeptabel angesehen werden kann. Bei 2g/L je eingesetzter Aminosäure beträgt die größte Abweichung 10,9 %.

Die Verluste in der Bilanzierung lassen sich durch eine unvollständige Elution der Aminosäure vom Zeolithen erklären. Dafür sprechen auch die zunehmenden Abweichungen mit kleineren Aminosäurekonzentration.

In einem zweiten Elutionsschritt mit 1 M Ammoniaklösung konnten von ZSM5M28FK noch geringe Mengen Aminosäuren eluiert werden. Dies wurde jedoch nur für die höchste eingesetzte Menge (2 g/L) untersucht. Die Abweichungen der Bilanzen für diesen Zeolith lassen sich also durch eine stärkere Bindung der Aminosäuren und daraus resultierende unvollständige Elution erklären.

4.3.1.5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Eine Trennung der Aminosäuren Leucin und Isoleucin lässt sich durch Adsorption und nachfolgende Desorption an Zeolithen der Typen ZSM5 erreichen. Bei einem Modul von 45 wird ein Verhältnis von Leucin zu Isoleucin im Eluat von ca. 30 erreicht (Abbildung 4-17), entsprechend einer Reinheit von 97 %.

Wie sich aus den Ergebnissen in Kapitel 4.3.1.1 erkennen lässt, ist ein pH-Wert unter 7 für Beladungen der Zeolithen zu verwenden.

Ein Gleichgewicht zwischen Ad- und Desorption hat sich spätestens nach 2 Stunden eingestellt (Kapitel 4.3.1.2), allerdings sind bereits nach einer halben Stunde keine großen Konzentrationsveränderungen mehr zu beobachten.

Eine 0,1M Ammoniaklösung ist ausreichend für die Elution der Aminosäuren (Kapitel 4.3.1.3), eine höhere Konzentration bringt allerdings eine noch vollständigere Desorption.

Bei 40°C ist scheinbar die Selektivität der Beladung erhöht und Leucin wird auf Kosten der anderen Aminosäuren besser gebunden (Kapitel 4.3.1.4).

Ein Nachteil der untersuchten Zeolithe ist die geringe Korngröße, welche eine Verwendung in gängigen Chromatographiesäulen verhindert. Die angebotenen Formkörper-Zeolithe erwiesen sich als nicht belastbar genug für eine dauerhafte Anwendung. Die pulverförmigen Zeolithe sollten sich jedoch in Membranreaktoren verwenden lassen [101], wobei der Zeolith aus einer Emulsion mit Hilfe der Membran zurückgehalten wird.

4.4 Immobilisierungen

Das Zeolithpulver ist wegen des kleinen Partikeldurchmessers (bis zu 2 μm) und der breiten Korngrößenverteilung schlecht von wässrigen Lösungen zu trennen. In den nachfolgenden Versuchen werden daher unterschiedliche Methoden der Immobilisierung untersucht.

4.4.1 Membranreaktor

Ausgehend vom Aufbau des Degussa-Membranreaktors (Kapitel 2.4.2) soll eine kontinuierliche Aufarbeitung eines Gemisches aus Leucin und Isoleucin in wässriger Lösung simuliert werden.

0,2 g ZSM5M40 werden in einem gerührten Membranreaktor Omegacell der Firma „Filtron“ mit Membranporen von 30 K Dalton Ausschlussvolumen (maximal für einen Druck von 3,7 bar geeignet) in 10 ml HCl suspendiert.

Nacheinander werden folgende Lösungen mittels einer Schlauchquetschpumpe mit einem Volumenstrom von 10 ml/h (= 1BV/h) durch den Reaktor gepumpt:

10 ml Leu/Ile (je 5g/L), angesäuert auf pH2

15 ml HCl pH=2

30 ml 1M NH_3 -Lösung

Die gemessenen Konzentrationsverläufe sind in Abbildung 4-18 wiedergegeben.

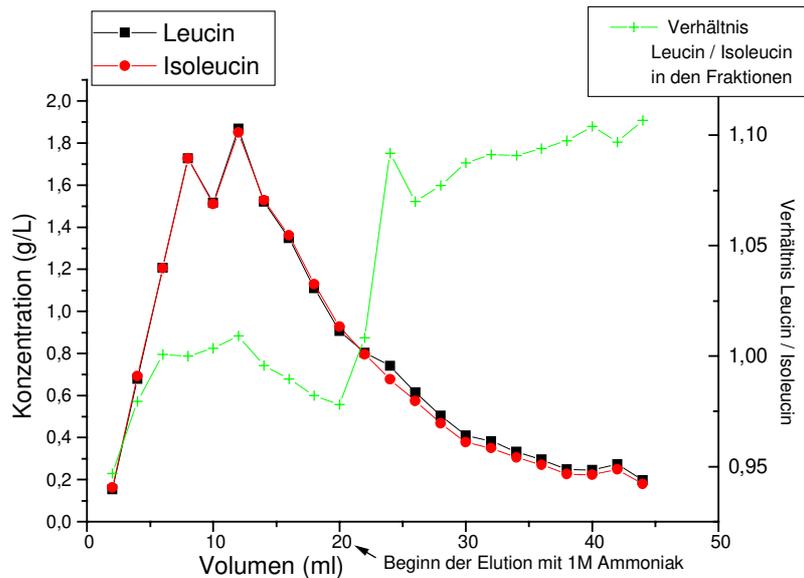


Abbildung 4-18: Elutionsprofil eines Zeolith-Membranreaktors

Durch die Rückvermischung ähnlich der eines Rührkesselreaktors sinken die Aminosäurekonzentrationen im Spülschritt nur langsam ab, die Selektivität ist ebenfalls schlecht.

Die feinen Zeolithpartikel setzen sich an der Membran fest und führen zu einem hohen Druckabfall. Obwohl im verwendeten Reaktor der Magnetrührer direkt auf der Membran rührt und daher die Deckschicht nicht sehr stark werden kann, steigt der Druck schließlich soweit an, dass Flüssigkeit aus den Dichtungen des Reaktors austritt.

4.4.2 Wirbelschicht

Dem Problem des hohen Strömungswiderstandes durch ein zu geringes Zwischenkornvolumen kann mit der Verwendung einer Wirbelschicht entgegengetreten werden. Das Zeolithpulver wird hier ebenfalls in eine senkrecht stehende Säule eingefüllt, die Lösungen zur Ad- und Desorption werden dann aber vom Fußende her aufwärts durch die Säule gepumpt.

50 mg ZSM5M40 werden in eine Glassäule gefüllt ($d = 1,5 \text{ cm}$; $h = 10 \text{ cm}$). Die Lösungen werden von unten durch die Säule gepumpt, eine Fritte (Mobicol Säule mit $35 \mu\text{m}$ Porendurchmesser Filter) soll die Austragung von Zeolithpartikeln verhindern.

Mit einem Volumenstrom von $0,6 \text{ ml/min}$ werden folgende Lösungen von unten durch die Säule geleitet:

100 ml Aminosäurelösung (Leu und Ile je 0,1g/L) werden 4 Stunden im Kreis durch die Säule gepumpt. Eine geringe Menge an Zeolithpulver wird dabei ausgetragen. Das gesamte Zeolithpulver wird am Ende aus der Säule gespült, abzentrifugiert, zwei mal mit 1 ml Wasser gespült und mit 1 ml 0,1 M Ammoniaklösung 1,5 Stunden geschüttelt.

Die Analyse der Lösung ergibt:

0,73g/L Leucin und 0,024g/L Isoleucin im Eluat.

Daraus folgt, dass das Leucin aus der Ausgangslösung auf das siebenfache angereichert wird. Das Verhältnis von Leucin zu Isoleucin beträgt 29,8, entsprechend einer Reinheit 96,8 %.

Von den eingesetzten 10 mg Leucin werden 0,73 mg im Eluat gewonnen. Auf 50 mg ZSM5M40 beträgt die Beladung 14,4 mg Leucin/g Zeolith. In Kapitel 4.3.1.5 werden bei entsprechenden Konzentrationen der Ausgangslösung Beladungen von 5 mg/g Zeolith gemessen (allerdings werden dort nur 1 ml Lösung auf 20 mg Zeolith eingesetzt, nicht 100 ml Lösung auf 50 mg Zeolith im Kreis gepumpt), das Verhältnis von Leucin zu Isoleucin ist mit 28,6 jedoch praktisch gleich.

In einem weiteren Versuch wird eine andere Säule verwendet („C Column“, h = 12 cm; Hersteller: Pharmacia Biotech), bei der Ein- und Ausgang mit einer 0,8 µm Hydrosart Membran (Sartorius) verschlossen werden können, um den Zeolith-Austrag effektiv zu verhindern. 0,5g ZSM5M40 Pulver werden in die Säule gefüllt, mit einem Volumenstrom von 0,8 ml/min werden nun folgende Lösungen mit einer Schlauchquetschpumpe vom unteren Ende der senkrecht aufgehängten Säule gepumpt:

100 ml (je 0,1 g/L) Leucin / Isoleucin -Lösung

50 ml destilliertes Wasser

20 ml 0,1M NH₃.

Nach dem Wirbelschicht-Prinzip sollte die Strömung und die entgegengesetzt wirkende Schwerkraft zu einer Durchmischung der Suspension führen. Trotz geringer Volumenströme sammelt sich nach längerer Zeit jedoch das Zeolithpulver am oberen Säulenausgang, führt an der Membran zu einem Druckanstieg und schließlich zum Austritt von Lösung an den Dichtungen der Säule. Der Versuch wurde daraufhin abgebrochen. Die Senkung der Durchflussrate würde zu einer geringen Raum-Zeit-Ausbeute führen, die Verwendung einer längeren Säule hätte

ein größeres Totvolumen zur Folge. Um die Probleme mit der geringen Partikelgröße des Zeolithen zu umgehen, wird daher im folgenden Versuch die Aufbringung auf einem Träger erprobt.

4.4.3 Immobilisierung auf Glas mittels Epoxydklebstoff

Als einfache Immobilisierungsmethode wird die chemische Bindung auf einem inerten Träger untersucht. Dafür soll Zeolithpulver mittels Epoxyd-Harz auf Glas „geklebt“ werden. Um eine große Oberfläche zu erreichen, werden Kugeln als Träger ausgewählt, die sich in eine Säule füllen lassen. Ein poröser Körper wird aus Gründen der Vereinfachung zunächst vermieden.

EPO-TEK 301 Epoxyd-Harz wird entsprechend der Anleitung aus zwei Komponenten angerührt. Je 20 µl der stark viskosen Mischung werden mit 0, 20 und 500 µl Aceton verdünnt und auf Glaskugeln ($\varnothing = 3,5\text{mm}$) aufgetragen.

Die benetzten Glaskugeln werden mit ZSM5M40-Pulver im Eppendorfreaktionsgefäß 20h geschüttelt, danach 3 Tage bei 45°C im Trockenschrank gelagert. Unverdünntes Epoxydharz führte zur Bindung der größten Masse auf den Glaskugeln, allerdings löst sich bei allen Versuchen die Zeolithschicht bei mechanischer Belastung (Eppendorf-Mixer) wieder ab.

Je Kugel werden ca. 10 mg Zeolith und Epoxid gebunden. In einem Versuch zur Aktivitätsbestimmung werden 10 Kugeln mit 1 ml Leucin/Isoleucinlösung (je 1g/L) 1 Stunde ohne Schütteln inkubiert. Das Verhältnis von Leucin zu Isoleucin im Überstand bleibt unverändert, der immobilisierte Zeolith zeigt also keine Adsorptionsfähigkeit. Wahrscheinlich sind die Poren des Zeolithen durch das Harz verklebt, so dass aus der wässrigen Lösung keine Aminosäuren mehr aufgenommen werden können.

In den nachfolgenden Versuchen wird die Immobilisierung durch Einbettung in unterschiedliche Polymer-Matrizes ausprobiert.

4.4.4 Polymer-Träger

Die Einbettung von Zeolithen in eine Polymermatrix wird durchgeführt, um die Handhabbarkeit dadurch zu verbessern, dass eine präparativen Säulen-Flüssig-Chromatographie zur Lösung des Trennproblems verwendet werden kann. Dabei werden sowohl biologische als auch synthetische Polymere untersucht, wobei die

synthetischen eine höhere Belastbarkeit versprechen. Die untersuchten Polymere sind in Tabelle 4-8 aufgezählt.

Tabelle 4-8: Zur Immobilisation von Zeolithen untersuchte Polymere

Polymer	Copolymer	weitere Variationen
Alginat	-	-
Polystyrol	-	Konzentrationen an Zeolith, Lösemittel, Polymer
Polyurethan	PEG (1000, 2000) PPG 1000	Konzentrationen an Zeolith, Lösemittel, Polymer
Polyacrylamid	Hydroxymethylacrylamid N,N-dimethylacrylamid (NDA)	Konzentrationen an Zeolith, Lösemittel, Radikalstarter

4.4.4.1 Alginat

ZSM5 Zeolith wurde in Alginat-Kugeln eingebettet, das Verfahren ist in Kapitel 6.2.1 beschrieben.

In Adsorptionsexperimenten wird die Aktivität des immobilisierten Zeolithen bestimmt. Im Eluat wurde dreimal mehr Leucin als Isoleucin nachgewiesen, in Alginat eingebettete Zeolithe behalten also ihre Aktivität bei. Diese Form der Immobilisierung ist besonders einfach durchzuführen und bietet die Möglichkeit, schnell und in großen Mengen sphärische Zeolith-Körper ausreichender Größe zu erzeugen.

Da von synthetischen Polymeren eine höhere Langzeitstabilität und eine größere chemische Resistenz erwartet wird, werden drei davon nachfolgend untersucht.

4.4.4.2 Polystyrol

Polystyrol (PS) wird häufig als Grundbaustein für Ionenaustauscherharze verwendet. In diesem Fall wird meistens die Suspensionspolymerisation zur Erzeugung von gleichmäßig geformten Kugeln verwendet. In den Versuchen wird jedoch eine Lösung des Polymers in einem organischen Lösemittel für Immobilisie-

rungsversuche verwendet. Polystyrol-Schaum wird in Xylol aufgelöst, Zeolithpulver darin suspendiert und das entstehende Gemisch für Immobilisierungsexperimente verwendet (Kapitel 6.2.2).

Bei keinem der untersuchten Verfahren wird dabei ein brauchbares Immobilisat erhalten, daher wird in Versuchen mit den anderen Polymeren der Zeolith bereits zum Polymerisationsansatz hinzugefügt, um ihn in das entstehende Netzwerk einzubetten.

4.4.4.3 Polyurethan

Zunächst wird Polyurethan (PU) verwendet, welches wegen seiner hohen Porosität bereits erfolgreich zur Immobilisierung lebender Zellen eingesetzt wird.

Die Polymerisationsansätze sind im Anhang, Kapitel 6.2.3, beschrieben.

Auf PU / Zeolith konnte keine Adsorption aus einer wässrigen Leucin / Isoleucin-Lösung beobachtet werden, wahrscheinlich werden die Poren des Zeolithen während der Polymerisation verstopft.

4.4.4.4 LentiKat[®]

Das zur Immobilisierung von Zellen kommerziell erhältliche System LentiKat[®] wird auf Zeolithpulver vom Typ ZSM5M28 angewendet, bei LentiKat[®] handelt es sich um ein Polyvinylacetat (PVA). Das Zeolithpulver wurde dazu von der Firma genia-Lab, Braunschweig, nach einem eigenen Verfahren in die plättchenförmigen Polymerkörper eingebettet, bezogen auf das Trockengewicht enthielten diese 50 % Zeolith. Auf 94,26 mg des Polymers konnte keine Adsorption aus einer wässrigen Leucin / Isoleucin-Lösung beobachtet werden, wahrscheinlich sind die Zeolithporen ebenfalls während der Polymerisation verstopft worden.

4.4.4.5 Polyacrylamid

Polyacrylamid (PA) wird zur Gelelektrophorese eingesetzt, da sich seine Porosität durch die Konzentration eines Vernetzers gut einstellen lässt und es darüber hinaus eine hohe Aufnahmefähigkeit für Lösemittel besitzt.

Unterschiedliche Ansätze zur Acrylamid-Polymerisation werden untersucht. (siehe Anhang Kapitel 6.2.4). Als Vernetzer werden N,N-Dimethylacrylamid (NDA) oder N-Hydroxymethylacrylamid (NHA) benutzt, dabei zeigt das Copolymer PAA / NDA eine bessere mechanische Belastbarkeit als PAA / NHA.

Die Immobilisate von ZSM5 in PAA behalten weiterhin ihre Aktivität zur Adsorption von Aminosäuren und werden daher in weiteren Versuchen eingesetzt. Die Produkte der Polymerisationen werden mehrmals mit Wasser gewaschen und für die Adsorptionsexperimente mit einem Messer in kleine Stücke mit ca. 5 mm Durchmesser zerteilt.

4.4.4.5.1 Stabilität

Um die Stabilität des Systems PAA / NDA / Zeolith zu überprüfen, werden ca. 60 mg des Materials nach Ansatz 11, Tabelle 6-2 jeweils 12 Stunden lang mit folgenden Lösemitteln geschüttelt:

- 1M Ammoniaklösung
- 1 ml destilliertes Wasser
- 1 ml Isopropanol

Nach dieser Zeit konnte eine leichte Trübung in der Ammoniaklösung sowie in der Isopropanol-Lösung festgestellt werden. Die mechanische und chemische Stabilität (pH, organische Lösemittel) des Polymers ist damit zufriedenstellend.

4.4.4.5.2 Einsatz von PAA / NDA / ZSM5 in einer Chromatographiesäule

In einem Versuch zur Anwendung des erzeugten Zeolith-Polymers wird ein Material eingesetzt, das nach Tabelle 6-2, Ansatz 10 hergestellt wurde. Dieses ist sehr quellfähig, in Wasser beträgt das Volumen 30 ml, getrocknet ca. 8 ml. Ansatz 6 hätte eventuell bei gleicher Stabilität eine höhere spezifische Kapazität bei geringerem Aufquellen des Materials ergeben. Das Polymer wird in eine Säule gefüllt, die Lösungen mit einem Volumenstrom von 4,6 BV/h auf die Säule aufgetragen. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 4-19 dargestellt.

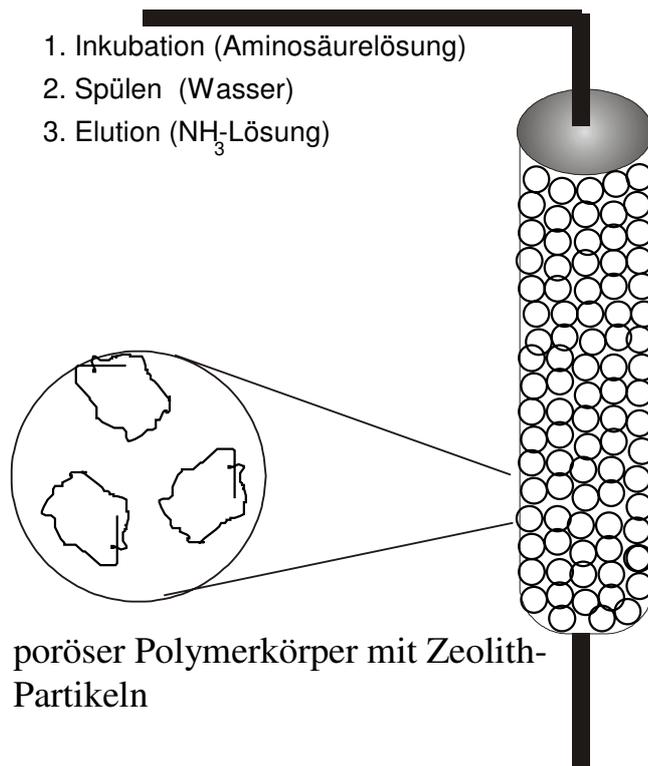


Abbildung 4-19: Aufbau einer Zeolith / Polymer-Säule

Zur Beladung wird die Säule zunächst mit 100 ml Aminosäurelösung (je 0,1 g/L Leucin / Isoleucin) und in einem nachfolgenden Waschschritt mit 100 ml destilliertem Wasser gespült. Mit Beginn des Spülschrittes werden Proben zu je 7 ml aufgefangen, die Analyse erfolgte mit Hilfe der Aminosäure HPLC. Die Elution der adsorbierten Aminosäuren erfolgt durch Aufgabe von 100 ml 0,1M NH_3 -Lösung. Die Ergebnisse der Analytik sind in Abbildung 4-20 dargestellt.

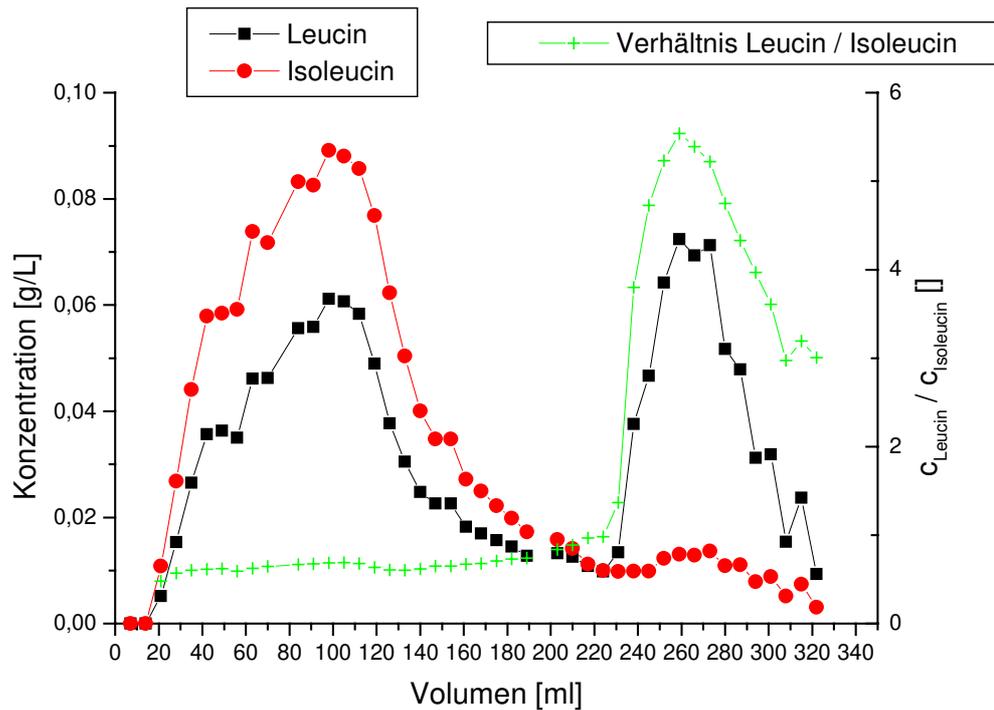


Abbildung 4-20: PAA / ZSM5 Säule

Die Konzentrationen steigen anfangs nur langsam an, weil durch die Größe der Partikel zunächst die Aminosäure in den Innenraum diffundieren muss. Die Aufgabe der Inkubationslösung fand nicht lange genug statt, um die Kapazität des Trägers zu erschöpfen. Dies lässt sich daran erkennen, dass das Verhältnis von Leucin zu Isoleucin den Wert der Inkubationslösung noch nicht erreicht hat, wenn die Konzentrationen durch das Nachspülen mit Wasser bereits wieder sinken.

Im Eluat wird ein maximales Verhältnis Leucin / Isoleucin von 5,5 erreicht, entsprechend einer Reinheit des Leucins von 85 %. Eine Bilanzierung der eingesetzten und gemessenen Aminosäuren ergab, dass von 10 mg Isoleucin 9,3 mg wiedergefunden werden, von 10 mg Leucin 10,2 mg, also verläuft die Elution mit 0,1 M Ammoniaklösung vollständig. In den ersten 200 ml (Inkubation und Spülen der Säule) werden 4,4 mg Leucin und 8,2 mg Isoleucin in den Proben gefunden, es werden also 5,6 mg Leucin und 1,8 mg Isoleucin auf dem Säulenmaterial adsorbiert.

Die Größe der Polymerkörper und die daraus bedingten Diffusionswege führen zu der beobachteten Breite der Peaks. Diese ist sicherlich auch in der ungleichmäßigen Form der Polymerkörper begründet, welche zu Bypassbildung in der Schüttung führt.

Ziel einiger Untersuchungen ist daher auch die Erzeugung von Polymerkörpern definierter Dimension und Abmessung. Die Beschreibungen der Versuchsführungen finden sich in Kapitel 6.2.4.2. Untersucht wurden die Perlpolymerisation, die Suspensionspolymerisation und die Einbettung des Polymeransatzes in Alginatkugeln. Die angewandten Methoden zur Erzeugung gleichförmiger PAA / NDA / ZSM5-Polymerkörper führten jedoch zu keinen brauchbaren Resultaten.

4.4.4.5.2.1 Zusammenfassung

Leucin und Isoleucin lassen sich auf Zeolithen vom Typ ZSM5 durch selektive Adsorption des Leucin in den Poren des Zeolithen trennen. Durch Adsorption und Desorption aus wässrige Lösung ließ sich Leucin gegenüber Isoleucin bei Verwendung von ZSM5M45 auf das 28fache Verhältnis anreichern.

Kugeln aus Alginat mit eingeschlossenem Zeolithe zeigten eine Aktivität zur selektiven Adsorption von Leucin, wurden aus Gründen der geringeren Langzeitstabilität biologischer Polymere aber nicht weiter untersucht.

Immobilisierungen mit Polystyrol führten bei keinem der untersuchten Verfahren zu einem stabilen Produkt.

Sowohl auf Polyurethan-Zeolith Polymeren als auch auf dem System Lentikat[®] konnte keine Adsorption aus einer wässrigen Leucin / Isoleucin- Lösung beobachtet werden, wahrscheinlich wurden die Poren des Zeolithen während der Polymerisation verstopft.

Copolymere aus Acrylamid und N,N-Dimethylacrylamid (NDA) bzw. N-Hydroxymethylacrylamid konnten zur Immobilisierung von ZSM5-Zeolithen benutzt werden, die danach weiterhin Aktivität zur Adsorption von Aminosäuren zeigten.

Die untersuchten Methoden zur Erzeugung gleichförmiger PAA / NDA / ZSM5-Polymerkörper führen zu keinen brauchbaren Produkten, zur Durchführung der Perlpolymerisation müsste zunächst ein geeignetes Schutzkolloid für eine Polymerisation in der wässrigen Phase gefunden werden, die bekannten Verfahren arbeiten alle mit hydrophoben Monomeren. Die Mikroemulsionspolymerisation wurde entweder durch die zu lange Reaktionsführung oder die Anwesenheit des Zeolithpulvers gestört.

Am vielversprechendsten scheint daher zur Zeit noch eine mechanische Zerkleinerung des Polymers durch entsprechende Maschinen, wie sie in der Kunststoffverarbeitung zur Erzeugung von Granulaten verwendet werden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der Untersuchungen war die Anwendung neuer Methoden in den bisher verwendeten Verfahren zur Trennung der isomeren Aminosäuren Leucin und Isoleucin.

In Versuchen zur Extraktion von Aminosäuren mit SCCO_2 führten die untersuchten Modifier Wasser, Butanol, Ameisen- und Essigsäure zu keiner deutlichen Verbesserung der Löslichkeit der reinen Substanzen. Die Untersuchung von Aminosäurederivaten zeigte keine Löslichkeit des Leucinmethylester in SCCO_2 .

N-Acetyl-Leucin löst sich dagegen in geringen Konzentrationen in SCCO_2 , dabei konnte die Löslichkeit durch Zusatz von Modifiern weiter erhöht werden. Bei 120 bar und 45 °C beträgt die Löslichkeit bei 3 % Ethanol-Zusatz 0,2 g N-Acetyl-Leucin pro Liter SCCO_2 . Eine Kombination aus Reaktion, Extraktion und enzymatischer Spaltung der N-acetylierten Aminosäuren in SCCO_2 könnte trotz dieser relativ geringen Löslichkeit zur Racematspaltung benutzt werden, da hierbei größere Gewinnspannen als bei der Isomerentrennung erzielt werden.

Der Einsatz auf Ionenaustauscherharzen gebundener Schwermetallionen konnte zwar die bereits in der Literatur beschriebene Trennung von Leucin und Isoleucin bewirken, eine Verringerung des Metallaustrags während der Beladung und Elution konnte jedoch weder durch eine Variation des Säulenmaterials noch durch Wahl einer anderen Wertigkeit der Metallionen erreicht werden. Dabei zeigte sich, dass Co^{3+} keine Affinität zu Aminosäuren besitzt und leicht wieder in die Oxidationsstufe +2 reduziert wird, wodurch ebenfalls wieder eine Abspülung vom Säulenmaterial erfolgt. Insgesamt ist die Bindung der Aminosäuren zu Metallionen sehr stark und erschwert dadurch die Anwendung dieses Trennprinzips in der Säulenchromatographie. Erst ein System, das eine stärkere Bindung zu den Metallionen als der Aminosäuren ausbildet, könnte hier Abhilfe schaffen.

Zeolithe des ZSM5-Typs ließen sich zur Trennung von Leucin und Isoleucin benutzen, dabei wird zunächst Leucin aus einer Lösung beider Aminosäuren adsorbiert und schließlich wieder desorbiert.

Unterschiedliche Immobilisierungsmethoden für Zeolithe wurden untersucht, dabei erwies sich eine Einbettung in Polymere als praktikabel. Die Verwendung von

Wirbelschicht- und Membranreaktoren scheiterte an der geringen Partikelgröße der untersuchten ZSM5-Zeolithe.

Kugeln aus Alginat mit eingeschlossenem Zeolith zeigten eine selektive Adsorption von Leucin, wurden aber aus Gründen der geringeren Langzeitstabilität biologischer Polymere nicht weiter untersucht. Diese Methode würde allerdings die kostengünstige Produktion großer Mengen an Immobilisat erlauben.

Immobilisierungen mit Polystyrol führten bei keinem der untersuchten Verfahren zu einem stabilen Produkt. Sowohl auf Polyurethan-Zeolith Polymeren als auch auf dem System Lentikat[®] konnte keine Adsorption aus einer wässrigen Leucin / Isoleucin- Lösung beobachtet werden, wahrscheinlich wurden die Poren des Zeolithen während der Polymerisation verstopft.

Copolymere aus Acrylamid und N,N-Dimethylacrylamid (NDA) bzw. N-Hydroxymethylacrylamid konnten zur Immobilisierung von ZSM5-Zeolithen benutzt werden, die auch danach weiter Aminosäuren adsorbierten. Ein Copolymer aus PAA / NDA mit eingebettetem Zeolith zeigte dabei hohe Stabilitäten sowohl gegen mechanische als auch gegen chemische Belastung. Dieses Copolymer ließ sich zur Trennung von Leucin und Isoleucin in einem präparativen Säulen-Flüssig-Chromatographieverfahren einsetzen. In einem einfachen Aufbau wurde eine Reinheit des Leucin von 85 % erreicht, indem aus einer Rohlösung mit beiden Aminosäuren Leucin stärker auf dem immobilisierten Zeolithen gebunden und anschließend wieder eluiert wurde. Im Gegensatz zu bisher gängigen Immobilisierungsmethoden für Zeolithe bietet dies eine kostengünstige, einfach anzuwendende Alternative für wässrige Systeme mit hohen Durchsatzraten.

Durch Darstellung symmetrischer Polymerkörper mit definierten Formen ließe sich sicherlich der Trenneffekt noch verbessern, die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Methoden zur Erzeugung gleichförmiger PAA / NDA / ZSM5-Polymerkörper führten aber zu keinen brauchbaren Resultaten.

Zur Durchführung der Perlpolymerisation müsste zunächst ein geeignetes Schutzkolloid für eine Polymerisation in der wässrigen Phase gefunden werden, die bekannten Verfahren arbeiten jedoch alle mit hydrophoben Monomeren, sodass ein

Transfer der bekannten Verfahren nicht ohne weiteres auf das Acrylamid-System möglich ist.

Die Mikroemulsionspolymerisation wurde entweder durch die zu lange Reaktionsführung oder die Anwesenheit des Zeolithpulvers gestört, es wurden nur wenige Konglomerate aus Zeolith und Polymer gebildet.

Am vielversprechendsten scheint daher zur Zeit noch eine mechanische Zerkleinerung des Polymers durch entsprechende Maschinen, wie sie in der Kunststoffverarbeitung zur Erzeugung von Granulaten verwendet werden.

6 Anhang

6.1 *Behandlung der Ionenaustauscherharze*

6.1.1 Sephadex - $\text{Cu}(\text{OH})_2$

10 ml 0,16 M Kupferchlorid -Lösung wird mit 5,3 g Sephadex 200 (Pharmacia Biotechnica) gerührt [99]. Durch Zugabe von 20 ml 0,5 M Natronlauge wird der pH-Wert auf 11 eingestellt; es bildet sich ein blauer Feststoff aus $\text{Cu}(\text{OH})_2$ -Sephadex. Nach Zugabe von 20 ml 0,05 n Boratpuffer (pH = 11) lässt man den Feststoff absetzen, dekantiert den Überstand ab und wäscht noch zweimal mit derselben Menge an Pufferlösung, um überschüssige Kupferionen zu entfernen.

6.1.2 Chelatisierende Sepharose

Chelatisierende Sepharose besitzt wegen ihrer Iminodiacetat-Gruppen ebenfalls die Fähigkeit, Kupferionen zu binden. Eine Mobitec-Kartusche wird mit dem Material befüllt, danach mit 5 ml 0,5 g/L Kupfer(II)chlorid eine halbe Stunde gespült, die Lösung wird dabei von einer Ismatec-Schlauchquetschpumpe mit 0,5 ml/min im Kreis gefördert. Das Material färbt sich blau. Zum Auswaschen nichtgebundener Kupferionen wird nun 15 Minuten mit dest. Wasser gespült, danach kann das System zur Aminosäureadsorption genutzt werden.

6.1.3 Beladung der Austauscherharze mit Kobalt

In der Literatur ist bereits die Benutzung von Co^{2+} zur Trennung von Aminosäuren beschrieben [102]. In Versuchen soll ein Ionenaustauscherharz mit möglichst fester Co-Bindung gefunden werden. Da dreifach geladene Ionen stärker an das Harz gebunden werden und daher ein Auswaschen minimiert wird, soll untersucht werden, ob Co^{3+} ebenfalls zur Adsorption von Aminosäuren geeignet ist.

Die Vorgehensweise bei der Beladung der Kationenaustauscher mit Kobalt ist folgendermaßen:

10 ml des Austauschermaterials werden mit 50 ml 1 Mol/L NaOH-Lösung 12 Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit wird der Träger mehrmals mit destilliertem Wasser gespült (insgesamt 100 ml), um Natronlauge Reste zu entfernen, das Kobalt würde sonst im nachfolgenden Schritt als Hydroxid ausgefällt. Zu den vorbereiteten Trägern wird 2 g $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in 10 ml Wasser gegeben. Dadurch werden Na^+ Ionen gegen Co^{2+} -Ionen ausgetauscht und das Kobalt auf dem

Träger gebunden, die Farbe der Träger wird durch die Beladung rötlich. Nach 2 Stunden wird erneut mehrmals mit Wasser gewaschen und der Kobalt-Gehalt des Waschwassers bestimmt. Aus der Differenz zwischen der Menge in den Spüllösungen und der eingesetzten Menge lässt sich berechnen, wie viel Kobalt auf dem Harz gebunden bleibt. Die Analytik ist in Kapitel 3.4.2 beschrieben. Ungebundenes Kobalt muss abgespült werden, da es die Zersetzung von Wasserstoffperoxid katalysiert und somit im nachfolgenden Oxidationsschritt stören würde. Das Harz wird 20 Minuten mit 10 ml 3%igem Wasserstoffperoxid behandelt, um das Co^{2+} zu Co^{3+} zu oxidieren. Die Farbe der beladenen Harze verändert sich dadurch zu violett. In Tabelle 6-1 sind die erzielten Kapazitäten der untersuchten Träger aufgelistet.

Tabelle 6-1: Kapazitäten der Träger für Co^{2+} -Ionen

Träger	Chelatbildende Gruppe	Gebundene Menge Co^{2+} [mmol] auf 10 ml Träger
Lewatit TP-208	Iminodiessigsäure	6,9
Amberlite IRC-718	Iminodiessigsäure	5,6
Duolite C 476	Carboxylgruppe	0,616
Diaion WK 10	Carboxylgruppe	0,08
Diaion WK 11	Carboxylgruppe	0,05
Diaion WK 100	Carboxylgruppe	0,08
Amberlite IRC-50	Carboxylgruppe	1,4232
Lewatit CNP-80	Carboxylgruppe	4,2
Duolite C 467	Aminophosphonsäure	6,437
Lewatit VP OC 1060 WS	Aminomethylphosphonsäure	6,71

Die höchsten Kapazitäten wurden an Trägern mit Aminophosphonsäure- und Iminodiessigsäuregruppen erzielt. Für die Stärke der Bindung von Metallionen auf den Ionenaustauscherharzen ist allein die verwendete Gruppe (Iminodiacetat etc.) und deren pKs-Wert verantwortlich. Das Fabrikat dagegen bestimmt die Dichte der Gruppen (damit die Menge an gebundenem Metall) sowie die Porosität und Stabilität.

6.2 Durchführung der Polymerisationen

6.2.1 Alginat

Die Immobilisierung mit Alginat wird entsprechend einem für Mikroorganismen verwendeten Verfahren nach Bettemann (1984) durchgeführt [103]:

1,5 ml 1,5 %ige Alginatlösung wird mit 100 mg Zeolith ZSM5M28 in einem Analysenglas mittels Magnetrührer gut durchmischt, um eine homogene Suspension zu erhalten. Die entstandene Suspension wird in 15 ml 2 %ige CaCl_2 - Lösung eingetropft, es bildeten sich Kugeln mit eingeschlossenem Zeolithpulver. Die Verwendung höherer Alginat-Konzentrationen führt dazu, dass sich die Zeolithsuspension nicht mehr verarbeiten lässt, da die Viskosität zu hoch wird. Die Verwendung eines Eppendorf-Mixers zur Homogenisierung ist ebenfalls durch die hohe Viskosität der Alginatlösung nicht möglich.

6.2.2 Polystyrol

Um ein poröses Material zu erhalten, werden 50 mg NaCl und 50 mg ZSM5M28 in einer Lösung von 100 mg PS in 700 μl Xylol suspendiert. Das Gemisch wird sodann auf eine erhitzte Aluminiumfolie getropft, das Lösungsmittel verdampft. Bei zu hohen Temperaturen ($>100^\circ\text{C}$) färbt sich das Gemisch durch Oxidation dunkel. Die bei 50°C entstehenden Plättchen werden mit Wasser gespült, um NaCl zu lösen und dadurch Poren im Polystyrol-Partikel zu erzeugen. Aminosäuren werden vom entstehenden Produkt nicht adsorbiert, die Poren des Zeolithen sind wahrscheinlich verstopft.

Durch Vermischen des Xylols mit einer polareren Flüssigkeit wird Polystyrol ausgefällt. Erwartet wird bei diesem Vorgehen ein Produkt mit höherer Porosität. Untersucht werden hierbei folgende Methoden:

- Schütteln (= schnelles Vermischen) mit unterschiedlichen Lösemitteln: Isopropanol, Methanol, Wasser, Glykol, dabei entsteht ein milchiges instabiles Produkt, aus dem das Zeolith - Pulver ausfällt.
- Einspritzen in Methanol oder Glykol, um Kugeln bzw. tropfenförmige Partikel zu erhalten, die Produkte zerfallen jedoch bei geringer mechanischer Belastung
- Einspritzen in siedendes Wasser, das schnell verdampfende Xylol führt zu einer Entmischung und einem unbrauchbaren Immobilisat.

6.2.3 Polyurethan

Das ungiftige Präpolymer Polycarbamoylsulfonat kann lange aufbewahrt werden und lässt sich schnell verarbeiten, deswegen soll dieses für die späteren Anwendungen synthetisiert werden. Bei Reaktion mit Wasser entsteht in einer schnellen Reaktion ein Polyurethan.

6.2.3.1.1 Polycarbamoylsulfonat

Polycarbamoylsulfonat (PCS) soll nach Muscat et al. [104] hergestellt werden, allerdings wird ein anderer Polyether als in der Literatur verwendet.

2 g PEG 2000 (ein Polyethylenglykol mit durchschnittlicher Molekülmasse von 2000 g/mol) wird dafür in einem Analysengläschen im Ölbad auf 70 °C bis zum Schmelzen erhitzt, TDI (ein Isomerengemisch aus 2,4 und 2,6 Tolyldiisocyanat im Verhältnis 80 : 20) dann unter Rühren langsam dazugetropft. Es lässt sich eine starke Blasenbildung und Gelbfärbung des Gemisches beobachten, die Viskosität nimmt soweit zu, bis der Rührfisch in einem honiggelben festen Schaum stecken bleibt. Weiteres zweistündiges Erhitzen führt schließlich wieder zu einer Verflüssigung des Gemisches, dieses wird mit 3,2 ml Isopropanol gerührt und bei Raumtemperatur werden dann 3 ml einer Lösung von 0,25 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ -Lösung dazugetropft. Nach 15 Minuten Rühren wird die Reaktion durch Zugabe von HCl bis zum pH von 1-2 abgebrochen. Isopropanol wird mit einer Wasserstrahlpumpe abgezogen, das zurückbleibende Produkt (eine hellgelbe, leicht viskose Flüssigkeit) reagiert nicht wie erwartet mit einer Puffer-Lösung (pH9) zu einem festen Polymer. Das Zwischenprodukt (PEG + TDI) reagiert ebenfalls nicht mit Wasser, deswegen wurde in einem folgenden Ansatz ein anderes Verhältnis von PEG zu TDI gewählt, da dieses bestimmend für die Reaktivität ist. Bei 2 g PEG und 256 μl TDI ist das Verhältnis von Isocyanat- / Alkoholgruppe 1,8, das entstehende Produkt reagiert aber ebenfalls nicht. Ein Grund dafür könnte ein Unterschied in der Reaktivität vom in der Literatur verwendeten Lupranol[®] zu PEG 2000 sein. Da die Bildung des PCS nicht wie erwartet stattfindet, wird im folgenden die direkte Reaktion ohne Umweg über das Polycarbamoylsulfonat angestrebt.

6.2.3.1.2 PU / PEG Copolymer

Zu 0,5 g PEG 2000 werden bei 70 °C 0,2 g ZSM5M28 zugegeben und unter Rühren suspendiert. 128 µl TDI werden langsam zugetropft, bis die Viskosität so hoch ist, dass der Magnetrührer anhält. Das Produkt, eine gelbliche Masse, wird in einem Überschuss Wasser 12 Stunden aufbewahrt, die Farbe ist unter leichtem Aufquellen heller geworden. Nach demselben Verfahren wurde 0,5 g PEG 1500 mit 190 µl TDI umgesetzt. Nach einer Inkubation mit Leu/Ile Lösung konnte in allen PU / Zeolith Ansätzen keine Aktivität gegenüber den Aminosäuren festgestellt werden, daher wird ein anderes Polyol als Copolymer eingesetzt.

6.2.3.1.3 PU / PPG Copolymer

Zu 0,25 g Polypropylenglykol werden 64 µl TDI und 200 mg ZSM5M28 gegeben und dieses Gemisch 4 Stunden bei 40°C geschüttelt, bis die Viskosität soweit zugenommen hat, dass sich das Zeolithpulver nicht mehr absetzen kann. Danach weitere 12 Stunden bei RT stehen gelassen. Unter Zusatz von Wasser wird dieses Produkt 24 Stunden bei 70°C im Trockenschrank aufbewahrt, verfestigt sich aber nicht. Möglicherweise müsste ein Katalysator zugesetzt werden, da die Anwesenheit des Zeolithen die Polymerisation stört.

6.2.4 Polyacrylamid

In Versuchen zur Polymerisation von PAA werden zum einen das Verhältnis von Kettenbilder Acrylamid (AA) und Vernetzer, zum anderen auch die Art des verwendeten Vernetzers sowie das Verhältnis von Feststoff (= Zeolith) zur Polymerlösung variiert. Als Vernetzer dienen entweder N,N'-Dimethylacrylamid (NDA) oder N-Hydroxymethylacrylamid (NHA). Als Initiator der radikalischen Polymerisation wird Ammoniumpersulfat verwendet. Die Konzentration an Initiator-Radikalen ist bestimmend für die Kettenlänge des Polymers, wird in den Ansätzen jedoch nicht variiert, statt dessen werden die Konzentrationen der anderen beteiligten Substanzen variiert.

Die Quervernetzung und der Zeolithgehalt müssen eingestellt werden, um ein stabiles Produkt mit mechanischer Belastbarkeit zu erhalten. Es sollte möglichst viel Zeolith enthalten, um eine hohe spezifische Aktivität zu erreichen. Gleichzeitig führt dies jedoch zu einer erhöhten Sprödigkeit und das Produkt bricht unter mechanischer Belastung. Hohe Quellfähigkeit (= geringe Quervernetzung) erhöht

die Diffusionsrate im Polymer, führt gleichzeitig aber auch zu leichter Verformbarkeit. Daher verschwinden im unteren Bereich einer Säule die Zwischenkornvolumina durch das Eigengewicht des Füllmaterials, der Druckabfall über die Säule nimmt rapide zu.

Die Polymerisationen werden wie folgt durchgeführt:

Acrylamid wird in Wasser aufgelöst, die Lösung des Vernetzer (NDA oder NHA) zu Ammoniumpersulfat pipettiert und beide Lösungen vereinigt. Die Polymerisation ist langsam genug, so dass der Polymerisationsansatz nun auf Zeolithpulver getropft und in einem Vortexer gut homogenisiert werden kann. Danach wird in einem Thermomixer bei 70°C geschüttelt, bis das Gemisch fest ist, um ein Absetzen des Zeolithpulvers und Inhomogenität im Produkt zu verhindern. In den meisten Fällen dauerte dies maximal zwei Stunden, teilweise aber auch deutlich länger. Dann wird der Ansatz in einem Trockenschrank noch weitere 12 Stunden bei 70°C erhitzt, um einen möglichst vollständigen Umsatz zu erhalten. Die untersuchten Ansätze sind in Tabelle 6-2 und Tabelle 6-3 wiedergegeben.

Tabelle 6-2: AA / NDA / ZSM5M40-Polymerisationsansätze

Ansatz	ZSM5 M40 [g]	% der Gesamtmasse	Acrylamid [g]	Ammonium-persulfat [mg]	NDA (3 gew% in H ₂ O) [ml]	Wasser (bidest) [ml]	Molverhältnis AA / NDA
1	0,15	13,0	0,1	5	0,2	0,695	36,15
2	0,2	16,7	0,1	5	0,1	0,795	72,3
3	0,15	23,1	0,05	2,5	0,15	0,298	24,1
4	0,15	23,1	0,05	2,5	0,1	0,348	36,15
5	0,2	28,6	0,05	2,5	0,15	0,298	24,1
6	0,2	28,6	0,05	2,5	0,3	0,148	12,05
7	0,3	37,5	0,05	2,5	0,3	0,148	12,05
8	0,2	28,6	0,05	2,5	0,4	0,048	9,04
9	0,3	37,5	0,05	2,5	0,4	0,048	9,04
10	0,15	7,0	0,2	10	0,2	1,59	72,3
11	0,2	28,6	0,05	2,5	0,448	0	8,1
12	0,2	26,6	0,05	2,5	0,5	0	7,23

Ansätze mit einem Molverhältnis von AA zu NDA größer als 24 werden zunehmend weich, während bei Verhältnissen kleiner als 12 das Produkt zu spröde wird. Alle Produkte zeigen eine selektive Adsorption von Leucin, d.h. der Zeolith behält seine Aktivität auch nach Einbettung in die Polymermatrix bei.

Bezogen auf die Trockenmasse ist der Zeolithanteil höher, so hat z.B. Ansatz 10 im wasserfreien Zustand einen Zeolithanteil von 27%, während es im Polymerisationsansatz 7% der Gesamtmasse sind. Das stark quellende Material zerbricht bei wiederholtem Trocknen und Einweichen, während das Polymer nach Ansatz 6 Veränderungen des Wassergehaltes unbeschadet übersteht.

Um zunächst ein mechanisch stabiles Polymer zu erhalten, wurde in einem Teil der AA/NHA Polymerisationsansätze auf Zeolithpulver verzichtet, die Ansätze sind in Tabelle 6-3 gezeigt.

Tabelle 6-3: AA / NHA - Polymerisationsansätze

Ansatz	ZSM5 M40 [g]	% der Ge- samt- masse	Acryl- amid [g]	Ammoni- umpersulfat [g]	NHA (48 gew% in H ₂ O) [ml]	Wasser (bidest) [ml]	Molverhältnis AA / NHA
1	0,2	26,6	0,05	0,0025	0,5	0	0,296
2	0	0,0	0,05	0,0025	0,05	0,45	2,96
3	0	0,0	0,05	0,0025	0,01	0,49	14,8
4	0	0,0	0,05	0,0025	0,1	0,4	1,48
5	0,2	26,6	0,05	0,0025	0,2	0,3	0,74
6	0	0,0	0,05	0,0025	0,148	0,352	1,00
7	0	0,0	0,05	0,0025	0,013	0,486	11,4

Ansatz 5 ergibt das einzig relativ stabile Produkt der untersuchten AA / NHA-Polymerisationen. Die Aktivität wird wie folgt untersucht: 0,3312 g trockenes Produkt werden mit 1 ml Leu / Ile-Lösung (je 1 g/L) inkubiert (dabei tritt ein teilweiser Zerfall ein), die Aminosäurekonzentrationen sanken auf 0,71 g/L Leu und 0,90 g/L Ile (Verhältnis von 0,795). Die Beladungen errechnen sich zu 0,86 mg/g für Leu und 0,31 mg/g für Ile, das Verhältnis der beiden Aminosäuren auf dem Träger beträgt daher 2,8.

Die Stabilität des Copolymers PAA / NHA ist schlechter als bei PAA /NDA.

6.2.4.1.1 Vorbehandlung des Zeolithen auf die Polymerisation

Um den Einfluss der Vorbehandlung des Zeolithen auf die Adsorptionskapazität zu untersuchen, wird 1 g ZSM5M28 12 Stunden lang mit 10 ml 1 M Ammoniaklösung inkubiert, danach abzentrifugiert, drei mal mit je 10 ml Wasser gespült und danach 12 Stunden bei 70°C getrocknet. Ein Ansatz der

Immobilisierung mit PAA / NDA zeigt keine Aktivität (das Verhältnis von Leucin zu Isoleucin im Überstand über dem Polymer bleibt unverändert).

6.2.4.2 Erzeugung definierter Polymerkörper

Um kleinere und vor allen Dingen gleichmäßig geformte Polymerkörper zu erzeugen, werden drei unterschiedliche Formen der Reaktionsführung während der Polymerisation getestet.

6.2.4.2.1.1 Acrylamid-Polymerisation in Alginat-Kugeln

Um gleichförmige Kugeln aus Polymer zu erhalten, soll das Eintropfen eines Ca^{2+} -haltigen Polymeransatzes in Alginat untersucht werden. Die sich bildende Hülle aus Kalziumalginat sollte hierbei die reagierenden Komponenten in einer Kugel einschließen. Diese Form der Reaktionsführung ist eine Variation eines Ansatzes mit Polyurethan, wie er von Vorlop et al. [105] zur Herstellung von PU-Kugeln zur Immobilisierung von Mikroorganismen verwendet wurde.

Dazu werden folgende Komponenten in einem Schüttler miteinander vermischt:

0,2 g Zeolith vom Typ ZSM5M28; 0,05 g Acrylamid; 2,5 mg Ammoniumpersulfat; 0,3 ml 3 % NDA; 0,148 ml Wasser und 4,2 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Das Gemisch wird mit Salzsäure auf pH 5 angesäuert und anschließend in 0,75 % Alginat-Lösung (mit NaOH eingestellt; pH = 8) eingetropt. Die entstehenden Kugeln werden vorsichtig mit wenig Wasser gewaschen und im Ofen (70°C) zur Polymerisation des Acrylamids aufbewahrt. Auch nach mehreren Tagen wird das Produkt nicht fest, verfärbt sich aber langsam dunkel.

Das Monomer (Acrylamid) diffundiert wahrscheinlich beim Eintropfen in die Alginatlösung zu schnell aus dem Tropfen in die umgebende Lösung, es entsteht kein festes Polymer. Das in der Literatur verwendete PU wird dagegen aus wasserunlöslichen Monomeren gebildet, dadurch wird die Auslösung aus der Kugel vermieden.

In den nächsten Versuchen wird versucht, durch Heterophasenreaktionen die Bildung von Polymertröpfchen zu erzwingen.

6.2.4.2.1.2 *Perlpolymerisation*

Eine PAA-Ansatz nach Tabelle 6-2, Nr. 6 wird mit einer Heptanphase stark gerührt, dabei sollen sich Kugeln aus der wässrigen Monomerlösung in der organischen Phase bilden, welche nach Abschluss der Reaktion feste Polymerperlen ergeben sollten. Im Gegensatz zu den gängigen Verfahren ist im Falle der Acrylamid-Polymerisation das Monomer in der wässrigen Phase anstatt in einer organischen Phase löslich. Auf die Zugabe von Schutzkolloiden (Kapitel 2.5.4) wird verzichtet, das hinzugefügte Zeolith-Pulver soll diese Aufgabe übernehmen. Indem das Zeolithpulver zuerst in die wässrige Phase suspendiert wird und dabei an der Oberfläche polare Moleküle adsorbiert, sollten die Partikel auch in der entstehenden Suspension nicht in die unpolare organische Phase überwechseln können. Ein Versuch, bei dem das Zeolithpulver zuerst in die organische Phase gegeben wurde, führte zu keinem Kontakt mehr mit der wässrigen Phase.

1,5 ml Heptan (Sdp. ca. 100°C) werden in einem 5 ml Rundkolben unter starkem Rühren auf den Polymeransatz gefüllt, danach bei 90°C weiter unter Rückfluss gerührt. Das Polymer setzt sich jedoch an den Wandungen des Kolbens ab, anstatt in der organischen Phase Kugeln zu bilden, dieser Ansatz führt also zu keinem brauchbaren Produkt. Wahrscheinlich müsste dem Ansatz doch ein Schutzkolloid zugesetzt werden, das Zeolith-Pulver verhindert jedenfalls nicht das Koagulieren der Polymertröpfchen. Anstatt umfangreiche Untersuchungen der möglichen Kolloide durchzuführen, wird zunächst eine andere Form der Reaktionsführung erprobt: die Emulsionspolymerisation.

6.2.4.2.1.3 *Emulsionspolymerisation*

Die Darstellung von PAA / NDA-Partikeln in einer inversen Mikroemulsion ist bei Juranicova et al. [106] beschrieben. Dabei sind Größen bis zu 70 nm möglich, was ca. 10 mal so groß wie die ZSM5-Partikel ist. Ein Einsatz in HPLC-Systemen wäre damit möglich. Ein entsprechender Versuch wird hier durchgeführt, allerdings wird noch zusätzlich Zeolithpulver hinzugefügt, welches sich in den entstehenden PAA-Kugeln einlagern soll.

Eine Lösung von 1,5 mg Ammoniumpersulfat in 10 µl Wasser wird zu einer Lösung von 9 mg BIS und 50 mg Acrylamid in 201 µl Wasser gegeben. Im Vortexer wird die Lösung mit 200 mg ZSM5M28 gut vermischt und die

entstandene Suspension bei Raumtemperatur unter Rühren in einem 5 ml Kolben zu einer Lösung von 0,53g AOT (= Natriumdioctylsulfosuccinat) in 2,5 ml Xylol getropft. Das AOT wirkt als grenzflächenaktive Substanz und verhindert die Phasentrennung.

Die entstandene klare Lösung wird nun 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, danach die Temperatur auf 60°C erhöht. Nach einer halben Stunde trübt sich die Lösung ein, es wird noch weitere 4 Stunden bei gleicher Temperatur gerührt, um einen möglichst vollständigen Umsatz zu erreichen.

Durch Eintropfen der Lösung in Ethanol wird das Polymer aus der Emulsion ausgefällt, abfiltriert und mit weiterem Ethanol gewaschen. Die entstandenen Partikel sind sehr klein, nur wenige nadelförmige Kristalle entstehen. Eine Beobachtung mit 800facher Vergrößerung unter einem Olympus IX50-Mikroskop zeigt neben ungebundenen Zeolith-Partikeln nur wenige Konglomerate (Abbildung 6-22 und Abbildung 6-21). Die Bildung der stabilen Micellen, in denen die Polymerisation stattfindet, wird wahrscheinlich durch die Anwesenheit der Zeolithpartikel behindert.

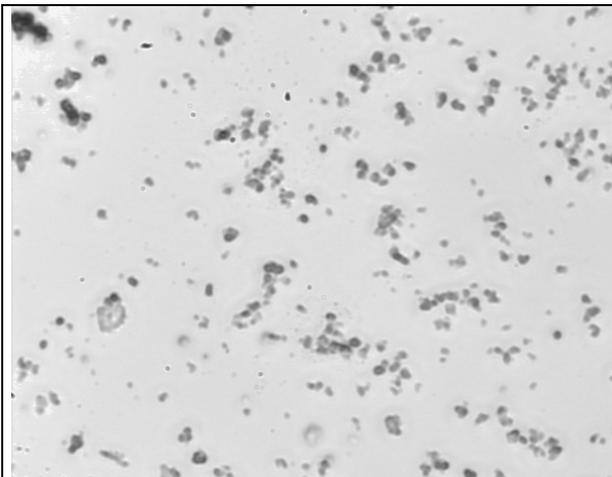


Abbildung 6-21: ZSM5M28 Pulver

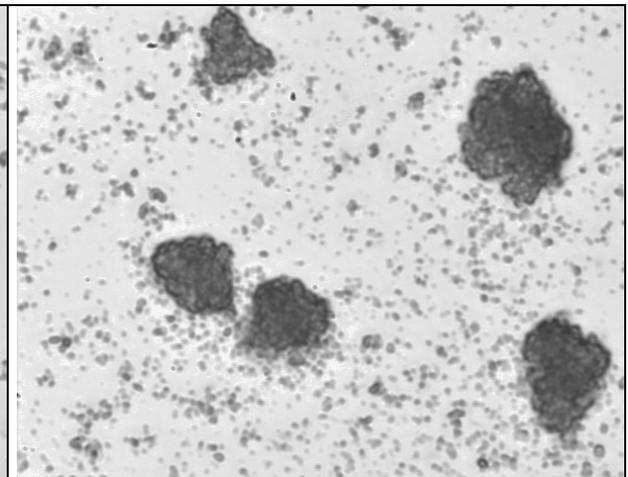


Abbildung 6-22: Emulsions-Polymerisat
PAA / NDA / ZSM5M28

6.3 *Verwendete Materialien*

Chemikalien

Acrylamid

Ammoniumpersulfat

Ammoniumthiocyanat

Asparagin

CO₂,

Lieferant

Sigma

Sigma

Sigma

Sigma

Reinheit 4,5 Linde AG

CuSO ₄	Merck
CoSO ₄ x 7 H ₂ O	Merck
CuO auf Cu ₂ O z. Elementaran.	Merck
CuCl ₂	Merck
Diethylether	Riedel-de Haen
EPO-TEK 301 Epoxyd-Harz	Epoxy-Technology, Vertrieb: Polytec, Heilbronn
Essigsäureanhydrid	Riedel-de Haen
Hexan	Fluka
Heptan	Fluka
Imidazol	Sigma
Isoleucin	Riedel-de Haen
Leucin	Riedel-de Haen
Leucinmethylester HCl	Fluka
Natriumdioctylsulfosuccinat	Sigma
Natriumacetat	Merck
Natriumborat	Merck
NDA	Fluka
NDH	Fluka
NH ₃ -Lösung, konz.	Fluka
PEG 1000, 2000	Merck
Phenylalanin	Fluka
PPG	Merck
TDI (Isomerengemisch)	Merck
Tryptophan	Merck
Valin	Merck
Wasserstoffperoxid, 30%	Aldrich
Xylol	Merck

Pufferlösungen

Natriumacetat-Puffer wurde durch Vermischen von 1 ml Eisessig mit einer Lösung aus 8g Natriumacetat in 100 ml Wasser erzeugt.

Zur Säulenfüllung wurden folgende Materialien verwendet:

Chelating Sepharose Fast Flow: (cross linked agarose Matrix mit Iminodiacetat-Gruppen)	Pharmacia Biotech
Sephadex 200, Sephadex 50: (cross linked Dextran)	Sigma
Lewatit	Bayer AG, Leverkusen
Diaion	Mitsubishi Chemical Corporation
Duolite, Amberlite	Rohm and Haas Deutschland GmbH, Frankfurt

Säulen

1 ml Säule Mobicol	MoBiTec GmbH Göttingen
„C Column“, h=12cm	Pharmacia Biotech Freiburg

Polymerisationen sowie Ad- und Desorptionen

Thermomixer5432	Eppendorf
Vortexer Riax 1DR	Heidolph
LentiKat [®]	geniaLab Biotechnologie, Braunschweig
Schlauchquetschpumpe IPS-4	Ismatec

SCCO₂-Anlage

Hochdruckpumpe Milroyal D	Milton-Roy
Kryostat MGW RM6	Lauda
Trockenschrank	Memmert

6.4 Abkürzungen

AOT	Natriumdioctylsulfosuccinat
BV	<u>B</u> ett <u>v</u> olumen
HPLC	<u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid

Ile	<u>C</u> hromatography
Leu	Isoleucin
Leu	Leucin
NDA	<u>N,N'</u> - <u>D</u> imethylacrylamid
NHA	<u>N</u> - <u>H</u> ydroxymethylacrylamid
PAA	<u>P</u> olyacrylamid
pI	isoelektrischen Punkt
PEG	<u>P</u> olyethylenglykol
PPG	<u>P</u> olyproylenglykol
PS	<u>P</u> olystyrol
PU	<u>P</u> olyurethan
SCCO ₂	<u>S</u> upercritical <u>C</u> O ₂
TDI	<u>T</u> olylendiisocyanat

7 Literaturverzeichnis

- 1 Stryer, L.: Biochemie; Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg 1994
- 2 Jakubke, H.D.; Jeschkeit, H.: Aminosäuren, Peptide, Proteine; Verl. Chemie Weinheim (1982)
- 3 Breuer; Kowalewski: Aminosäuren; Thieme Verl. Stuttgart (1981)
- 4 Enei, Hitoshi; Yokozeki, Kenzo; Akashi, Kunihiko: recent progress in microbial production of amino acids; Japanese technology reviews; Gordon and Breach science publishers 1989
- 5 Dechow, F. J.(edt.): Separation & Purification Techniques in Biotechnology (1989), Noyes Publications - New Jersey
- 6 Barrett, G.C. (edt.): Chemistry & Biochemistry of the Amino Acids (1985), Chapman and Hall - New York
- 7 Christen, HR.; Vögtle, F.: Grundlagen der organischen Chemie; Otto Salle Verlag, Frankfurt a.M. 1989; S. 509
- 8 Aida, K. et al.: biotechnology of amino acid production, in: progress in industrial microbiology; Elsevier 1986
- 9 Akashi, T.: Amino acid production and use to improve nutrition of foods and feeds; chemrawn II conference Manila 1982
- 10 Leuchtenberger, W.: amino acids-technical production and use, in: Biotechnology 6 (Hrsg: H.J. Rehm, G. Reed) VCH 1996; S. 455-502
- 11 Izumi, Y.; Chibata, I.; Itoh, T.: Herstellung und Verwendung von Aminosäuren; Angewandte Chemie, **90** ,3 (1978); S. 187-194
- 12 Baessler, K.H.: The therapeutic use of essential amino acids and their analogues : papers presented at the Illrd International Symposium "Balanced Nutrition in Therapy" in close coop. with the International Society of Parenteral Nutrition; Darmstadt; Steinkopff (1977)
- 13 Adibi, S. A. et al. [Hrsg.]: Branched chain amino and keto acids in health and disease : Kongr.: International symposium on branched chain amino and keto acids in health and disease ; Basel (1984)
- 14 Amino acids in parenteral nutrition : a symposium arranged by the Norwegian Gastroenterological Society, October 4, 1968 in Oslo, Norway

-
- 15 Bregmann, M.; Stein, W.H.: Naphtalene β -sulfonic acid as a reagent for amino acids; *Journal of biological chemistry*, **129** (1939); S. 608-618
- 16 Stein, W.H.; Moore, S.; Stamm, G.; Chou, Chi-Yuan; Bergmann, M.: Aromatic Sulfonic acids as a reagent for amino acids; *Journal of biological chemistry*, **143** (1942); S. 121-129
- 17 Dudley, W.T.; Niemann, C.: The preparation of L-Leucine and its behavior in some non aqueous solvents; *Journal of biological chemistry*, **175** (1948); S. 241-248
- 18 Hongo, Chikara; Yoshioka, Ryuzo; Yamada, Shigeki; Chibata, Ichiro: The preparation of pure L-Leucine. Separation of L-Leucin and L-Isoleucin; *Journal of chemical technology and biotechnology*, **29** (1979); S. 145-148
- 19 JP 6176(1953)
- 20 Kücke, F.: Verfahren zur Anreicherung von L-Isoleucin aus Proteinhydrolysaten; Dissertation; Universität Hannover 1992
- 21 JP 6175(1953)
- 22 EP 0 022 880 B1
- 23 EP 0 274 135 B1
- 24 Orella, C.J.; Kirwan, D.J.: Löslichkeiten von Aminosäuren in Mischungen aus Wasser und aliphatischen Alkoholen; *Biotechnology Progress* **5** (1989) Nr, 3; S. 89
- 25 EP 0 251 852 B1
- 26 Teramoto, M. et. al.: Extraction of amino acid with organophosphorous extractant; proceeding of ISEC 1990, Kyoto
- 27 Ehrlich, Felix: Ueber das natürliche Isomere des Leucins; *Berichte* **37** (1904); S.1809-1840
- 28 EP 0241 094 B1
- 29 DE 3,318,933 C1
- 30 Hemmasi, B.; Bayer, E.: Ligand exchange chromatography of amino acids on copper-, cobalt- and zinc-chelex 100; *Journal of chromatography* **109** (1975); S. 513-522
- 31 EP 645 371 A1
- 32 Luque de Castro, M.D.; Valcarcel, M.; Tena, M.T.: *Analytical Supercritical Fluid Extraction*, Springer Verlag, Berlin (1994);

- 33 Dean, J.R.: Applications of Supercritical Fluids in Industrial Analysis Blackie Academic & Professional, Glasgow (1993)
- 34 Levy, J.M.; Storozynsky, E.; Ashraf-Khorassani, M.: Use of modifiers in supercritical fluid extraction (in: Eds.F.V. Bright, M.E.P. Mc Nally, *ACS Symposium series* **488** (1992) ; S. 336-362
- 35 Bornscheuer, U.: Reaktionstechnische Untersuchungen zur enzymatischen Racematspaltung verschiedener 3-Hydroxyester in unkonventionellen Lösungsmittelsystemen; Fortschrittberichte VDI 17 (87), Düsseldorf, VDI Verlag (1993)
- 36 Capewell, A.: Untersuchungen zu enantioselektiven enzymatischen Reaktionen in überkritischem Kohlendioxid, Fortschrittberichte VDI 17 (118); Düsseldorf, VDI Verlag (1994)
- 37 Lack, E.; Seidlitz, H.; Commercial scale decaffination of coffee and tea using supercritical CO₂ (in: King, M.B.; Bott, T.R.; Extraktion of natural products using near-critical solvents, Blackie Academic & Professional 1993)
- 38 Gardner, D.S.J.: Industrial Scale Hops Extraction; presented at the Soc. Chem. Ind. Food Engineering Panel Symposium, CO₂ in Solvent Extraction, London, 1982
- 39 Recerchon, E.; Ambruosi, A.; Senatore, E.: *Flavour and Fragrance J.* **9** (1994); S.19-23
- 40 Fantozzi, P.; Rossi, M.; Schiraldi, A.; Montanari, L.: *Ital. J. Food Sci.* **4** (1993); S. 333-339
- 41 Wong, J.M.; Johnston, K.P.: *Biotech. Prog.* **2** (1986); S. 29
- 42 King, M.B.; Bott, T.R.: *Extraction of Natural Product using Near-critical Solvents*; Blackie Academic & Professional, Glasgow (1993)
- 43 Brogle, H.: CO₂ as a solvent: its properties and applications, *Chem. Ind.* **6** (1982); S. 385-396
- 44 Giddings, J.C.; Meyers, M.N.; McLaren, L.; Keller, R.A.: *Science* **162**(1968); S. 67
- 45 Valle, J.M.; Aguilera, J.M.: *Ind. Eng. Chem. Res.* **27** (1988); S. 1551-1553
- 46 King, J.W.; Friedrich, J.P.: *J. Chromatogr. Sci.* **517** (1990); S. 449-458
- 47 Peng, D.Y.; Robinson, D.B.: *Ind. Eng. Chem. Fundam.* **15** (1976); S. 59

-
- 48 Marty, A.; Condoret, J.S.; Combes, D.: Fatty acid esterification in supercritical carbon dioxide. In: Biocatalysis in non-conventional media (Ed.: Tramper et al., Elsevier Science Publisher), Amsterdam, **8** (1992); S. 425-432
- 49 Birgith, A.; Brunner, G.; *Chem. Ing. Tech.* **7**(1995); S. 829-835
- 50 Knittel, D.; Schollmeyer, E.; Farbstoffe in überkritischem CO₂ und supramolekulare Chemie. *GIT Fachz. Lab.*, **10** (1992); S. 993-996
- 51 Clifford, T.; Bartle, K.: Chemistry goes supercritical. *Chemistry in Britain*, **29** (1993); S. 499- 502
- 52 Modell, M.; Sobczynski, S.; Larson, H.: Supercritical Water Oxidation of pulp mill sludges. Tappi Engineering Conference, 30.9.-3.10.91, Nashville (1991), TN
- 53 Dean, J.R.: Applications of Supercritical Fluids in Industrial Analysis Blackie Academic & Professional, Glasgow (1993)
- 54 Mengel, M.: "Molekularsieb - Zeolithe"; **10** *Chemie Technik* (1981); S. 1135-1140
- 55 Mengel, M.: "Molekularsieb - Zeolithe" *Fortschritte der Verfahrenstechnik* **23c** (1985); S. 271-292
- 56 Meier, W.M. u. Olson, D.H.: Atlas of zeolite structure types; Zürich: Structure Commission of the Internat. Zeolithe Assoc. 1978
- 57 Robson, H.: Synthesizing zeolites; *CHEMTECH* Bd.8 (1978) Nr.3; S. 176-180
- 58 van Bekkum, H.; Flanigen, E.M.; Jansen, J. C.: Introduction to zeolite science and practice in: *Studies in Surface Science and Catalysis*, Vol 58, Elsevier, Amsterdam 1991
- 59 Tavorlo, A.; Drioli, E.: Zeolite Membranes; *Adv. Mater.* **11** (1999) Nr.12; S. 975-996
- 60 Reiss, G.: Die Verwendung von Molekularsieben in der Adsorptionstechnik; *Periodica Polytechnica*; **19** (1975) Nr. 1-2, S. 137-164
- 61 Puppe, L.: Molekularsiebe. In: *Ullmanns Enzykl. der technischen Chemie* Bd. 17 (1979)
- 62 Knoll, H.: Molekularsiebe - moderne Adsorbentien; *Chem. Tech.* **26** (1974) Nr.7; S. 391-396

-
- 63 Breck, D.W.: Advances in adsorption; Chem. Eng. Progr. **73** (1977) Nr.10; S. 44-48
- 64 Barrer, R.M.: Zeolites and clay minerals as sorbents and molecular sieves; London: Academic Press 1978
- 65 Unger, K.: Handbuch der HPLC, Teil2: Präparative Säulenflüssig-Chromatographie; GIT Verlag Gmbh, Darmstadt 1994
- 66 Subramanian, G.: Preparative and Process-Scale Liquid Chromatography; Ellis Horwood Ltd., Chichester 1991
- 67 Marmé, Stefan; Unger, Klaus: Zeolithe als Adsorbentien für die Trennung, Reinigung und Konzentrierung von organischen Wertprodukten in der präparativen Säulen-Flüssig-Chromatographie; Chem. Ing. Techn. (1995) Nr. 5; S. 580-582
- 68 Grassmann, P.: Physikalische Grundlagen der Verfahrenstechnik; Salle + Sauerländer, Aarau 1983
- 69 Robel, H.: Lehrbuch der chemischen Verfahrenstechnik; Dt. Verl. für Grundstoffindustrie Leipzig 1983
- 70 Sircar, S.; Myers, A.I.: liquid adsorption operations: equilibrium, kinetics, column dynamics and applications; sep. sci. techn. **21** (1986), S. 535-562
- 71 Langmuir, I.L.: am. chem. soc. **195** (1918); S. 120-123
- 72 Becker, H.G.O. et al.: Organikum; Dt. Verlag der Wiss. Leipzig, Berlin (1993); S. 290
- 73 Vollmert, Bruno; Grundriss der makromolekularen Chemie, Band 2; E. Vollmert Verlag, Karlsruhe 1985; S. 41 ff.
- 74 Rodriguez, F; Principles of Polymer Systems; Taylor & Francis 1996; S. 642 ff.
- 75 Wang, X.; Ruckenstein, E.: Preparation of porous polyurethane particles and their use in enzyme immobilisation; Biotechnol. Prog. **9** (1993); S. 661-665
- 76 Gum, Riese, Ulrich (Edit.): Reaction Polymers; Hanser Verlag München 1992; S. 271
- 77 Chibata, I.; Tosa, T.; Sato, T.: Preparation of immobilized enzymes and microbial cells; in: Chibata, I. (Hrsg.): Immobilized enzymes; Wiley, New York 1978; S. 9-108

-
- 78 Starostina, NG.; Lusta, KA.; Fikhte, BA: Entrapment; in: Rosevear, A.; Kenedy, J.F.; Cabral, J.M.S. (Hrsg.): Immobilised enzymes and cells; Hilger, Bristol 1987; S. 51-82
- 79 Manohar, S.; Karegoudar, T.B.: Degradation of naphthalene by cells of *Pseudomonas sp.* strain NGK 1 immobilized in alginate, agar and polyacrylamide; Appl. Microbiol. Biotechnol. **49** (1998); S. 785-792
- 80 Lovell, P.A.; El-Aasser, M.S.: Emulsion polymerisation and emulsion polymers; Wiley&Sons 1997
- 81 Reighard, T.S.; Olesik, S.V.: Bridging the gap between supercritical fluid extraction and liquid extraktion techniques; critical rev. in anal. chem. **26** (2&3) (1996)
- 82 EP 645371 A1
- 83 Arcoya, A.; Seoane, X.L.; Soria, J: Effect of Iron on the Deactivation of Ni/Clinoptilolite Catalysts by Thiophene Poisoning; J. Chem. Tech. Biotechnol. **68** (1997); S. 171-176
- 84 Wünsch, G.: Optische Analysenmethoden zur Bestimmung anorganischer Stoffe; De Gruyter 1975; S. 166
- 85 Komar, P.; Z. Anal. Chem; **244** (1969); S. 340
- 86 Ziegler, M.; Glemser, O.; Preisler, E.: Angew. Chemie **68**, (1956); S. 436
- 87 McLaren, L.; Myers, M.N.; Giddings, J.C.: Science **159** (1968); S. 197
- 88 Giddings, J.C.; Myers, M.N.; McLaren, L.; Keller, R.A.: Science **162** (1968); S. 67
- 89 Stahl, E.; Schilz, W.: Löslichkeitsverhalten polarer Naturstoffe in überkritischen Gasen im Druckbereich bis 2500 bar; Chem. Ing.- Tech. **50** (1978) Nr.7; S. 535-537
- 90 Tservistas, M.: Untersuchungen zum Einsatz von überkritischem Kohlendioxid als Medium für biokatalytische Reaktionen; Dissertation; Fachbereich Chemie der Universität Hannover 1997; S.67
- 91 EP 0274135B1
- 92 Bruno, T.J.; Svoronos, P.D.N.: CRC Handbook of Basic Tables for Chemical Analysis; CRC Press, Boca Raton, Florida 1989
- 93 Francis, A.W.: Ternary Systems of Liquid Carbon Dioxide; Journal of Physical Chemistry **58** (1954); S. 1099-1114

-
- 94 Ashraf-Khorassani, M.; Fessahaie, M.G.; Taylor, L.T.; Berger, T.A.; Deye, J.F.: HRC & CC; J. High Resolut. Chromatogr. Commun., **11** (1988); S. 352
- 95 Berger, T.A.; Deye, J.F.; Ashraf-Khorassani, M.; Taylor, L.T.: J. Chromatogr. Sci., **27** (1989); S. 105
- 96 Veuthey, J.L.; Caude, M.; Rosset, R.: Chromatographia; **27** (1989); S. 105
- 97 Dobashi, A.; Dobashi, Y.; Ono, T.; Hara, S.; Saito, M.; Higashidate, S.; Yamauchi, Y.: J. Chromatogr. **461** (1989); S. 121
- 98 Hartmann, T.: Überkritische Kohlendioxid als Reaktionsmedium für die Naturstoffsynthese- die enantioselektive Hydrolyse von 3-Hydroxysäureester; vorgelegte Dissertation am Inst. f.; Techn. Chem. Hannover 1999
- 99 Fazakerley, S.; Best, D.R.: Separation of Amino Acids as Copper Chelates from Amino Acid, Protein and Peptide Mixtures; Analytical Biochemistry **12** (1965); S. 290-295
- 100 Ullmanns Encyclopedia of industrial chemistry, Vol a2 1985
- 101 Schäfer- Treffenfeldt, W.: Verfahren zur Trennung von Aminosäuren und Peptiden durch Adsoption an Zeolithpulver; Dechema Tagung „Verfahrenstechnische Grundlagen und Modellierung von Bioprozessen“ 5.-6.5.1997
- 102 Hemmasi, Bahram; Bayer, Ernst: ligand-exchange chromatography of amino acids on copper-, cobalt- and Zinc-Chelex 100, Journal of chromatography, **109** (1975); S. 49-55
- 103 Bettemann, H.; Rehm, H.J.: Degradation of phenol by polymer entrapped microorganisms; Appl. Microbiol. Biotechnol. **20** (1984); S. 285-290
- 104 Muscat, A.; Beyersdorf, J.; Vorlop, K.D.: Poly(carbamoylsulfonate), a material for immobilisation: synthesis, diffusion- and mechanical properties; Biotechnol. Techniques **7**, Nr.8 (1993); S. 591-596
- 105 Vorlop, K.D.; Muscat, A.; Beyersdorf, J.: Entrapment of microbial cells within polyurethane hydrogel beads with the advantage of low toxicity; Biotechnol. Techniques **6** No.6 (1992); S. 483-488
- 106 Juranicova, V.; Kawamoto, S.; Fujimoto, K.; Kawaguchi, H.; Barton, J.: Inverse microemulsion polymerisation of acrylamide in the presence of N,N-dimethylacrylamide; D. Angew. Makrom. Chem. **258** (1998); S. 27-31

