

Forschungsverbund der Deutschen Bundesstiftung Umwelt

„ChemBioTec“

Gesamtkoordination: Prof. Dr. Andreas Schmid, ChemBioTec, Universität Dortmund

Abschlussbericht für das Verbundvorhaben:

Biokatalytische Funktionalisierung alkylsubstituierter Polysiloxane

Az: 13166

Vom 01. September 2006 bis 30. Juni 2009

Verbundpartner:

Institut für Technische Chemie TU Bergakademie Freiberg
Jülich Chiral Solutions GmbH / Codexis
Wacker Chemie AG

Freiberg, München und Jülich 2009

Projektpartner:

TU Bergakademie Freiberg (Projektkoordination)

Wacker Chemie AG (Projektteilnehmer)

Julich Chiral Solutions / Codexis (Projektteilnehmer)

Zeitlicher Verlauf, Veranstaltungen:

- 01.07.2006 Beginn der Projektbearbeitung
Institut für Biochemie, Dresden
Consortium für elektrochemische Industrie GmbH, München
Julich Chiral Solutions GmbH, Jülich
- 28.09.2006 1. Status-Meeting der Projektpartner, Dresden
- 20.11.2006 Kick-Off-Meeting ChemBioTec, Osnabrück
- 16.08.2007 2. Status-Meeting der Projektpartner, München
- 22.08.2007 Meilenstein-Bericht ChemBioTec, Dresden
- 12.09.2007 Vortrag zum Thema „Ökoeffizienzsysteme“, Herr Fröhlich, Osnabrück
- 20.11.2007 Status-Seminar 1. Antragsrunde, ChemBioTec, Dortmund
- 01.03.2008 Fortführung des Projektes an der TU Bergakademie Freiberg
- 29.05.2008 3. Status-Meeting der Projektpartner, Freiberg
- 08.10.2008 Vortrag zum Thema „Funktionalisierung von Polysiloxanen“,
European Bioperspectives 2008, Herr Fröhlich, Hannover
- 25.11.2008 4. Status-Meeting der Projektpartner, Freiberg
- 31.03.2009 Projektende

Publikationen:

P. Fröhlich, M. Bertau, Polysiloxanes, enzymatic functionalization, applications (2009), *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, John Wiley&Sons.

E. Fritz-Langhals, Aldehyde and Carboxy Functional Polysiloxanes (2008), *Silicon Based Polymers*, Springer-Verlag, 39-50.

Vorträge:

P. Fröhlich, Biocatalytic Functionalisation of Alkyl Substituted Polysiloxanes (2008), Biotechnica and European Bioperspectives, Hannover.

P. Fröhlich, Quantifizierung und Nachhaltigkeit – Methoden und Tools, Ökoeffizienzsysteme (2007), Osnabrück.

E. Fritz-Langhals, J. Stohrer, Enzymatic Transformations Towards Functional Polysiloxanes (2009), Silicon Days, Wien.

Zusammenfassung:

Das Projekt zur Funktionalisierung von Polysiloxanen unter Einsatz von Enzymen erfasst die Grundlagen, sowie eine breite Methodenentwicklung zur Aktivierung schutzgruppenfunktionalisierter Siloxane unterschiedlicher Kettenlänge vor dem Hintergrund eines industriellen Produktionsverfahrens. Dafür wurden im Vorfeld, durch Synthese zahlreicher strukturähnlicher Modellverbindungen, eine Vielzahl an Enzymen getestet und für den Einsatz in der Siloxanchemie lokalisiert. Für den Einsatz in den wässrig-organischen Systemen sind die Hydrolasen sehr robust und zeigten gute Umsatzeigenschaften. Neben der Optimierung der Biokatalysatoren wurden auch zahlreiche analytische Methoden getestet und auf ihre Eignung zur Identifizierung von Polymeren untersucht. Für die bedeutende Gruppe der Carbamatosiloxane konnte erstmals die Umsetzungen dimerer, oligomerer und polymerer Siloxane gezeigt werden, wobei die enzymatische Funktionalisierung höherer Carbamatosiloxane noch nicht vollständig gelöst ist. Die Ursachen lassen sich auf ein Grenzflächenproblem zwischen der wässrigen Phase mit dem darin befindlichen Enzym und der siloxanhaltigen, unpolaren Phasen zurückführen. Die Ausrichtung der geschützten Gruppen am hydrophoben Siloxangrundgerüst zum aktiven Zentrum des Enzyms sinkt mit zunehmender Kettenlänge. Eine Vergrößerung der Kontaktfläche wurde durch mehrere experimentelle Ansätze untersucht. Neben der Veränderung der Rührgeschwindigkeit und den Zusatz grenzflächenaktiver Substanzen kamen hochleistungsfähige Mikroreaktoren zum Einsatz. Damit konnte die Ausbeute an funktionalisierten Siloxanen um den Faktor von bis zu 300 gesteigert werden. Neben den Carbamatosiloxanen besitzen die hydroxyfunktionalisierten Siloxane eine große industrielle Bedeutung. Die Polymerisierung dieser Substanzklasse ist äußerst schwierig und durch die Einführung der Formoxyschutzgruppe konnte die Polymerisation erfolgreich

durchgeführt werden. Die milde Hydrolyse der Verbindungen konnte ebenfalls erfolgreich unter Einsatz von Hydrolasen demonstriert werden. Eine Veränderung der Estergruppe zu länger-kettigen Einheiten erhöht die Umsatzrate um durchschnittlich 10 – 15 %. Des Weiteren wurde der Einfluss der Spacerlänge auf die enzymatische Hydrolyse im Bereich von C₁ – C₃ untersucht, und mit zunehmender Spacerlänge s der Umsatz um durchschnittlich 20 %. Die im Verlauf des Projektes kondensierten Rohdaten wurden aufgearbeitet und in Zusammenarbeit mit der IFU Hamburg eine Ökoeffizienzanalyse mit dem Programm Sabento[®] angefertigt. Der biotechnologische Prozess zur Herstellung von Aminopropyl-disiloxan besitzt im Vergleich zu dem etablierten chemischen Verfahren in der ökologischen Bewertung leichte Vorteile, trotz höherem Materialeinsatz. Die Edukte des chemischen Verfahrens besitzen ein hohes Umweltwirkungspotential und schneiden damit in der Gesamtumweltbewertungszahl etwas schlechter als das biokatalytische Verfahren ab. Aussagen zur ökonomischen Bewertung gestalten sich schwierig, da Angaben zu den Einkaufspreisen der Edukte für beide Verfahren nur schwer zugänglich waren. Daher liegen die Materialkosten bei etwa 90 % der Gesamtkosten und damit doppelt so hoch wie für übliche industrielle Verfahren. Die Ökoeffizienzanalyse konnte die wesentlichen Vorteile und Nachteile des biotechnologischen Prozesses im Vergleich zu dem marktfähigem industriellen Prozess mit belastbaren Kennzahlen und Energiediagrammen herausheben. Im wesentlichen sind beide Verfahren von ihrer Ökoeffizienz sehr ähnlich, wobei für das biotechnologische Verfahren noch erhebliches Optimierungspotential gesehen wird.

1. Anlass und Zielsetzung des Projektes

Polysiloxane haben aufgrund zahlreicher positiver Eigenschaften, wie chemische und physiologische Inertheit enorme wirtschaftliche Bedeutung erlangt. Sie finden sich in zahlreichen Produkten, wie Dichtmaterialien, Lacken sowie in Pharmaka wieder. Diese Vielfalt beruht letztlich auf der großen Anzahl von Funktionalisierungsmöglichkeiten am Siloxangrundgerüst. Besondere Bedeutung haben dabei amino- und hydroxyfunktionalisierte Polysiloxane, die vorwiegend in der Haarkosmetik, in Autopolituren und zur Behandlung von Textilien und als Vernetzer zur Herstellung organischer Elastomere eingesetzt werden. Herkömmliche, großindustrielle Hochdruckverfahren zur Herstellung aminofunktionalisierter Polysiloxane beruht auf der Umsetzung von Chloralkylsilanen mit Ammoniak und anschließender Polymerisierung durch Silanole mit definierter Kettenlänge. Die Hochdrucksynthese ist ein relativ unselektiver Prozess, bei dem neben zahlreichen anorganischen Salzabfällen auch Siloxannebenprodukte infolge von Kettenabbrüchen auftreten.

Tabelle 1: Überblick zu den organofunktionellen Siloxanen und den Zielfunktionen.

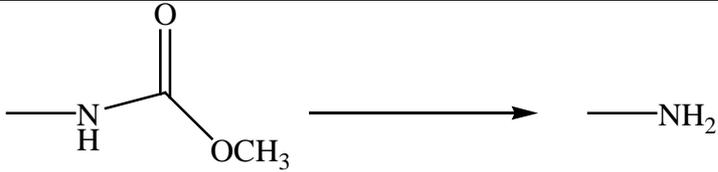
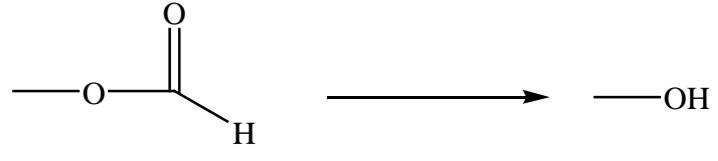
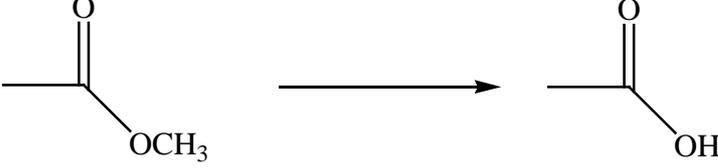
Geschützte Funktionalität → organofunktionelle Gruppe	Kettenlänge
	Dimer (n=1), Oligomer (n=14), Polymer (n>100)
	Dimer (n=1), Oligomer (n=14), Polymer (n>100)
	Dimer (n=1), Oligomer (n=14), Polymer (n>100)
	Dimer (n=1), Oligomer (n=14), Polymer (n>100)

Tabelle 1 gibt einen Überblick zu den in diesem Projekt geforderten organofunktionellen Zielprodukten. Eine herausragende wirtschaftliche Bedeutung haben die hochpolymeren Verbindungen ($n > 100$). Bisherige klassisch-chemische Verfahren zu Polymerisation scheitern häufig an den harten Reaktionsbedingungen, die zum Kettenabbruch führen. Hochselektive Biokatalysatoren sollen den Polymerisationsprozess unter physiologischen Bedingungen besser steuern und Spaltungsreaktionen am Siloxangrundgerüst verhindern. Die Entschützung der funktionalisierten Alkylketten erfolgt mittels Hydrolasen und ausgewählten Mikroorganismen. Nachdem ein umfassendes Methodenspektrum entwickelt wurde, muss das Laborverfahren in den technischen Maßstab überführt werden. Hierbei zeigt die Industrie besonderes Interesse an einer kontinuierlichen Reaktionsführung. Eine extern angefertigte Ökoeffizienzanalyse soll ökonomische und ökologische Vor- und Nachteile des entwickelten Bioprozesses beurteilen.

2. Material und Vorgehensweise

Material

Die geleisteten Beiträge der drei einzelnen Projektteilnehmer gliedert sich gemäß des Projektantrages folgendermaßen:

Durch Wacker Chemie AG wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Substanzen synthetisiert und im Bereich von 100 – 1000 mL bereitgestellt.

Tabelle 2: Durch Wacker Chemie AG bereitgestellte Substrate.

<i>Substanz</i>	<i>Dimer</i>	<i>Oligomer</i>	<i>Polymer</i>
Bis(carbamatopropyl)siloxan	X	X	X
Bis(aminopropyl)siloxan	X	X	X
Bis(formoxymethyl)siloxan	X	-	X
Bis(hydroxymethyl)siloxan	X	-	X
Bis(hydroxypropyl)siloxan	X	X	X
Bis(chlormethyl)dimethylsilan			
Decamethylcyclopentasiloxan D5			
Octamethylcyclotetrasiloxan D4			
Trimethylsilylchlorid			
Chlormethyl-methoxydimethylsilan			
Polydimethylsiloxan	mit		X

Hydroxyendgruppen

Chlor(3-chlorpropyl)dimethylsilan

Acetoxymethyldimethylmethoxysilan

Phosphornitrilchlorid PNCl_2

Die Bestimmung der Umsätze konnte vorrangig durch quantitative $^1\text{H-NMR}$ mit einem Bruker Avance 300 MHz mit deuteriertem Chloroform (CDCl_3) als Lösungsmittel und Tetramethylsilan als interner Kalibrierstandard bestimmt werden.

Durch den Projektpartner Julich Chiral Solutions GmbH (Julich) erfolgte die Produktion und Bereitstellung von Enzymen, die für die Aktivierung der schutzgruppenfunktionalisierten Siloxane eingesetzt werden sollten. Die Tabelle 3 gibt einen Überblick zu den gelieferten Enzymen. Es handelt sich hierbei zum einen um Enzyme, die von Julich hergestellt und vermarktet werden. Zum anderen stellte Julich verschiedene Enzyme zur Verfügung, welche von anderen Firmen erhältlich sind. Darüber hinaus wurde dem Kooperationspartner auch ein Set an Hydrolasen überlassen, welches von der Firma Codexis Inc. stammt. Die Firma Codexis ist die Muttergesellschaft von Julich und befasst sich mit der Enzymoptimierung mittels Gene-Shuffling.

Tabelle 3 Von Julich Chiral Solutions GmbH bereitgestelltes Enzymspektrum zur Aktivierung von geschützten Siloxanen.

Enzym/Bezeichnung	Stamm	Enzymklasse
Acylase	<i>Penicillium spec.</i>	3.5.1.14
Acylase 001	-	3.5.1.14
Acylase CLEA	-	3.5.1.14
Alcalase CLEA	-	3.4.21.14
Alkoholdehydrogenase 001 (NAD)	<i>E.coli</i>	1.1.1.2
Alkoholdehydrogenase 002	<i>E.coli</i>	1.1.1.2
Alkoholdehydrogenase 005	-	
Alkoholoxidase 001	-	1.1.3.13
Amidase 001	-	3.5.1.4
Amidase BS	-	3.5.1.4
D-Carbamoylase	-	3.5.1.77
Esterase BS1	<i>E.coli</i>	3.1.1.1
Esterase BS2	<i>E.coli</i>	3.1.1.1
Esterase BS3	<i>E.coli</i>	3.1.1.1
Esterase 002	<i>E.coli</i>	3.1.1.1
Esterase 004	<i>E.coli</i>	3.1.1.1
Esterase 006, PPL	<i>E.coli</i>	3.1.1.1
Esterase 008	<i>E.coli</i>	3.1.1.1
Esterase CLEA 002	<i>E.coli</i>	3.1.1.1
Esterase P2	-	3.1.1.1
Esterase PF1	<i>Pseudomonas fluorescens/E.coli</i>	3.1.1.1

Esterase PF2	<i>Pseudomonas fluorescens/E.coli</i>	3.1.1.1
Esterase RO	-	3.1.1.1
Esterase SD	<i>Streptomyces diastatochromogenes</i>	3.1.1.1
Esterase TL	<i>Aspergillus oryzae</i>	3.1.1.1
Formiatdehydrogenase CB, EC	-	1.2.1.2
Formiatdehydrogenase NADP-abhängig 001	<i>E.coli</i>	1.2.1.2
Formiatdehydrogenase NAD-abhängig 002	-	1.2.1.2
Formiatdehydrogenase NAD-abhängig 001	<i>E.coli</i>	1.2.1.2
Hydrolase-Kit IMB-1500	-	-
Lipase A (Kit, einzel)	<i>Achromobacter spp.</i>	3.1.1.3
Lipase AN (Kit, einzel)	<i>Aspergillus niger</i>	3.1.1.3
Lipase AS1 (Kit, einzel)	<i>Alcaligenes spp.</i>	3.1.1.3
Lipase AS2 (Kit, einzel)	<i>Alcaligenes spp.</i>	3.1.1.3
Lipase C1 (Kit, einzel)	<i>Candida cyclindracea</i>	3.1.1.3
Lipase C2 (Kit, einzel)	<i>Candida cyclindracea</i>	3.1.1.3
Lipase CA CLEA	<i>Candida antarctica</i>	3.1.1.1
Lipase CA Isoform A (Kit, einzel)	<i>Candida antarctica</i>	3.1.1.3
Lipase CA Isoform B bzw. 001 (Kit, einzel)	<i>Candida antarctica</i>	3.1.1.3
Lipase MM (Kit, einzel)	<i>Mucor miehei</i>	3.1.1.3
Lipase Novozym 388	-	3.1.1.3
Lipase Novozym 435	-	3.1.1.3
Lipase Novozym 735	-	3.1.1.3
Lipase P1 (Kit, einzel)	<i>Pseudomonas cepacia</i>	3.1.1.3
Lipase P2 (Kit, einzel)	<i>Pseudomonas cepacia</i>	3.1.1.3
Lipase PC (Kit, einzel)	<i>Penicillium cambertii</i>	3.1.1.3
Lipase PF (Kit, einzel)	<i>Pseudomonas fluorescens/E.coli</i>	3.1.1.3
Lipase PF	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3.1.1.3
Lipase PF_2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3.1.1.3
Lipase PS (Kit, einzel)	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	3.1.1.3
Lipase RN	<i>Rhizopus niveus</i>	3.1.1.3
Lipase RS (Kit, einzel)	<i>Rhizopus spp.</i>	3.1.1.3
Lipase TL IM	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	3.1.1.3
Nitrilase JFC 2131	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3.5.5.1
Nitrilase RR	-	3.5.5.1
Nitrilase CDX 202	<i>E.coli</i>	3.5.5.1
Nitrile Hydratase RR	-	4.2.1.84
Peptid-Amidase 002	-	3.5.1.4
Penicillin G Amidase	-	3.5.1.11

Auch wurden die, für die verschiedenen cofaktorabhängigen Enzyme notwendigen, entsprechenden Cofaktoren NAD⁺, NADP⁺, NADH, NADPH bereitgestellt.

Im Rahmen dieses Projektes wurden der TU Freiberg einige Enzyme oder Enzympräparationen überlassen, welche nicht zum üblichen Enzym-Portfolio der

Firma gehören. Nachfolgend wird die Synthese dieser Enzyme oder Präparationen deshalb eingehender beschrieben.

Generelle Grundlagen zur Enzymproduktion

Zur Herstellung ihrer Enzyme verwendet Julich die folgenden grundlegenden Schritte:

a) Das Gen, das für das gewünschte Enzym kodiert, muss synthetisiert und in einen Expressionsvektor kloniert werden. Dazu wird ein Vektor mit einer hohen Kopienzahl und einem starken Promotor verwendet, um eine möglichst hohe Expression des Gens zu gewährleisten. Dieser Schritt wird nur einmal durchgeführt und ist bei nachfolgenden Produktionen nicht mehr notwendig. Die folgenden Schritte erfolgen bei jeder Produktion.

b) Das Plasmid wird in einen *E. coli* Stamm transformiert und mittels eines Antibiotikamarkers auf einer Platte angezogen. Von dieser Platte wird eine Einzelkolonie in 5 mL Medium überführt und dort angezogen.

c) Je nach der gewünschten Enzymmenge wird der erhaltene Stamm in einem Schüttelkolben (0,25-0,5L) oder in einem Fermenter (1L oder 16L) angezogen.

Die Anzucht im Schüttelkolben erfolgt im Batch-Verfahren bzw. im Fermenter im Fed-batch Verfahren. Beim Fed-batch erfolgt zunächst das Wachstum der Zellen unter Beobachtung des Sauerstoffverbrauchs und des pH-Wertes. Wenn zu beobachten ist, dass die Zellen in eine stoffliche Limitierung geraten, werden sie wieder durch das Starten des "Feeds" gefüttert. Durch diese Hochzelldichtefermentation kann eine sehr hohe optische Dichte der Zellen und somit eine optimale Produktion der Biomasse erfolgen.

d) Die gewonnenen Zellen werden abzentrifugiert, resuspendiert und anschließend in einem Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen.

e) Durch eine erneute Zentrifugation wird das Flüssigpräparat mit dem gewünschten Enzym gewonnen. Dieses wird nun entweder mit Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert oder lyophilisiert (f).

f) Bei der Lyophilisation wird das Flüssigpräparat zunächst bei -80°C eingefroren und anschließend wird in der Gefriertrocknungsanlage das Wasser entzogen. Das entstehende Pulver kann in der Regel sehr lange bei -20°C gelagert werden.

g) Sowohl bei den Flüssigpräparaten als auch beim Lyophilisat wird die spezifische Aktivität (Units) des Enzyms bestimmt.

Expression und Reinigung einer Formiatdehydrogenase

Die Formiatdehydrogenase (FDH) wurde durch Fermentation der Hefe *Candida boidinii* hergestellt. Die Fermentation erfolgte unter Verwendung von Methanol als einziger C-Quelle. Das dabei gewonnene Enzym lag anschließend als Flüssigpräparat vor, in dem sich noch viele andere Enzyme befanden. Da für weitergehende Arbeiten des Kooperationspartners ein möglichst reines Enzym benötigt wurde, erfolgte eine Reinigung der produzierten Präparation.

Die Reinigung erfolgte mittels eines chromatographischen Säulentrennverfahrens:

Säule: Q-Sepharose FF

Bettvolumen: 200 mL

Fluß: 1,27 cm/min

Laufpuffer: 10 mM KPi, pH 7,5

Elutionspuffer: 10 mM KPi, pH 7,5 + 150 mM NaCl

Spülpuffer: 10 mM KPi, pH 7,5 + 2 M NaCl

Nach dem Auftragen der Enzymlösung wurde zunächst mit 600 mL Laufpuffer gespült und anschließend 200 mL Elutionspuffer aufgetragen. Am Ende der Reinigung wurde die Säule mit Spülpuffer gereinigt, so dass sie wieder für weitere Reinigungen zur Verfügung stand.

Das Enzym befand sich nach der Reinigung im Elutionspuffer, der mit 50% Glycerin versetzt wurde. Die Lagerung erfolgte aus Stabilitätsgründen bei -20°C. Die Aktivität dieser Präparation betrug 16 Units/mL mit Formiat als Substrat.

Expression einer Peptidamidase

Die Synthese des Gens der Peptidamidase aus *Stenotrophomonas maltophilia* wurde zunächst von Julich in Auftrag gegeben. Anschließend wurde dieses Gen in den Expressionsvektor pET24 kloniert und das entstandene Konstrukt zur Überprüfung der richtigen DNA-Sequenz sequenziert. Dieses Plasmid wurde in den *E. coli* Stamm BL21(DE3) transformiert und die Zellen im Schüttelkolben angezogen.

Zur optimalen Expression des Enzyms wurden verschiedene Faktoren, wie Medienzusammensetzung, Temperatur, Induktionslänge und Konzentration des Induktors untersucht. Es stellte sich heraus, dass die Induktionslänge einen großen Einfluss auf die Ausbeute an Enzym hat, da durch eine Verkürzung der Zeit eine 5-fach höhere Menge an aktivem Enzym gewonnen werden konnte. Die Zellen wurden

in TRIS-HCl-Puffer aufgeschlossen und die Aktivität des gewonnenen Flüssigpräparats wurde mit dem Substrat Benzyloxycarbonyl-Gly-Tyr-NH₂ nachgewiesen. Es konnten Aktivitäten von 20-100 Units/mL erreicht werden.

Expression einer Nitrilase

Die Nitrilase 002 aus *Rhodococcus rhodocrous* lag bereits kloniert in dem Vektor pCK110900 vor. Dieses Plasmid wurde rekombinant in dem *E. coli* Stamm BL21(DE3) exprimiert. Bei einer Hochzellichtefermentation in einem 1L-Fermenter entstand 73 g Biomasse mit einer Aktivität von 314 Units/g Biofeuchtmasse. Diese Biomasse wurde in Phosphatpuffer aufgenommen, die Zellen aufgeschlossen und anschließend zentrifugiert. Der entstandene Rohextrakt wurde lyophilisiert, so dass ein Lyophilisat mit einer Aktivität von 1,2 Units/mg entstand. Diese Messung erfolgt mit 10 mM Benzonitril als Substrat. Bei einer Messung mit 10 mM Phenylpropionsäurenitril konnten 0,023 U/mg gemessen werden.

Da das Enzym bei der Lyophilisation an Aktivität verlor, wurde ebenfalls untersucht, ob das Enzym als Flüssigpräparat bei -20°C gelagert werden kann. Diese Untersuchung verlief positiv, so dass eine Produktion dieses Enzyms auch ohne Aktivitätsverlust möglich ist.

Nomenklatur organofunktioneller Siloxane

Die Abbildung 1 zeigt das methylierte Siloxangrundgerüst mit α,ω -substituierten Alkylketten. Der Polymerisationsgrad reicht von $n=1$ bis $n\sim 150$. Die Spacerlänge x besteht aus Methyleneinheiten, deren Anzahl zwischen 1-3 liegt (s. Tabelle 2). Es wurden ausschließlich endständig funktionalisierte Siloxane untersucht.

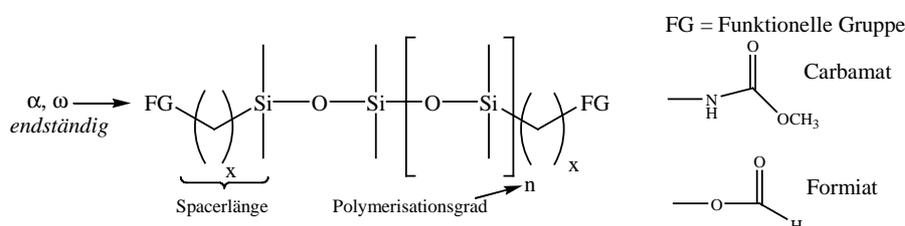


Abbildung 1: Siloxangrundgerüst mit substituierten Alkylseitenketten.

Vorgehensweise

Die funktionalisierten Siloxane wurden vor der biokatalytischen Umsetzung mit den gängigen Analysemethoden, wie ¹H-NMR, ¹³C-NMR, Infrarotspektroskopie,

Gelpermeationschromatographie und GC und HPLC charakterisiert und die chromatographische Trennung optimiert. Um eine große Anzahl an Vorversuchen zu bewältigen, wurden siloxanähnliche Modellverbindungen synthetisiert und in einem speziell dafür entwickelten Screening-Verfahren mit einer großen Anzahl an Enzymen hinsichtlich ihrer Hydrolyseeigenschaften getestet. Weiterhin wurde eine aus der Literatur bekannte Methode zur Dimerisierung von Alkoxysilanen durch Trypsin getestet und durch zusätzliche Hydrolasen erweitert. Die Umsetzung der ausgewählten Enzyme mit dimeren Carbamatosiloxanen erfolgte im Batch-Ansatz im 100 mL-Maßstab. Cosolventien, wie Wasser oder diverse organische Lösungsmittel, sowie der Einfluss des pH-Wertes wurden eingehend untersucht und variiert. Die dabei ermittelten Parameter fließen in die Methodenentwicklung zur Hydrolyse der höheren Siloxane mit ein. Die höhermolekularen funktionellen Siloxane besitzen im Vergleich zu den dimeren Verbindungen, teilweise völlig verschiedene Eigenschaften, wie z.B. eine höhere Viskosität, Unlöslichkeit in wässrigen Systemen, geringere Funktionsdichte und eine daraus resultierende geringere analytische Empfindlichkeit. Die zunehmende Kettenlänge erschwert die eindeutige Bestimmung der funktionellen Einheit mit den gängigen analytischen Methoden. Neben den carbamatofunktionalisierten Siloxanen wurden formiatgeschützte Oligo- und Polysiloxane auf ihre Aktivierung durch Hydrolasen untersucht. Der Einfluss verschiedenkettiger Estergruppen auf die enzymatische Aktivität und den Umsetzungsgrad wurde anhand selbst synthetisierter Siloxanverbindungen eingehend untersucht. Projektbegleitend wurde in enger Verbindung mit der IFU Hamburg aufgrund des Datenmaterials für den biotechnologischen Weg und das klassisch chemische Verfahren eine Ökoeffizienzanalyse mit den Programmen Sabento[®] und Umberto[®] durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der Siloxane

3.1.1 Wassergehalt

Enzymatische Reaktionen laufen überwiegend in gepufferten wässrigen Medien ab, wobei durch die Unlöslichkeit der Siloxane in Wasser auch Umsetzungen in organischen Lösungsmitteln mit Wasseranteilen <1% möglich sind. Der Wassergehalt in den funktionellen Siloxanen wurde mit Karl-Fischer-Titration bestimmt.

3.1.1 $^1\text{H-NMR}$

Die Protonenspektroskopie kann zur Charakterisierung der funktionellen Gruppen an niedermolekularen und höhermolekularen Siloxanverbindungen eingesetzt werden. Die Abbildung 2 zeigt das Protonenspektrum von Bis-(carbamatopropyl)-siloxan mit den typischen Aufspaltungsmustern und in Abbildung 3 das Protonenspektrum des Zielproduktes Bis-(aminopropyl)-siloxan. Die direkt am Silicium gebundenen Methylprotonen (6 bzw. 5) erzeugen ein sehr intensives Signal oberhalb von 0 ppm, welches auch als Bezugspunkt in der NMR-Spektroskopie z.B. mit Tetramethylsilan verwendet wird. Die Signale der Methylengruppen des Propylspacers sind für die beiden vom Silicium ausgehenden Methylengruppen gleich.

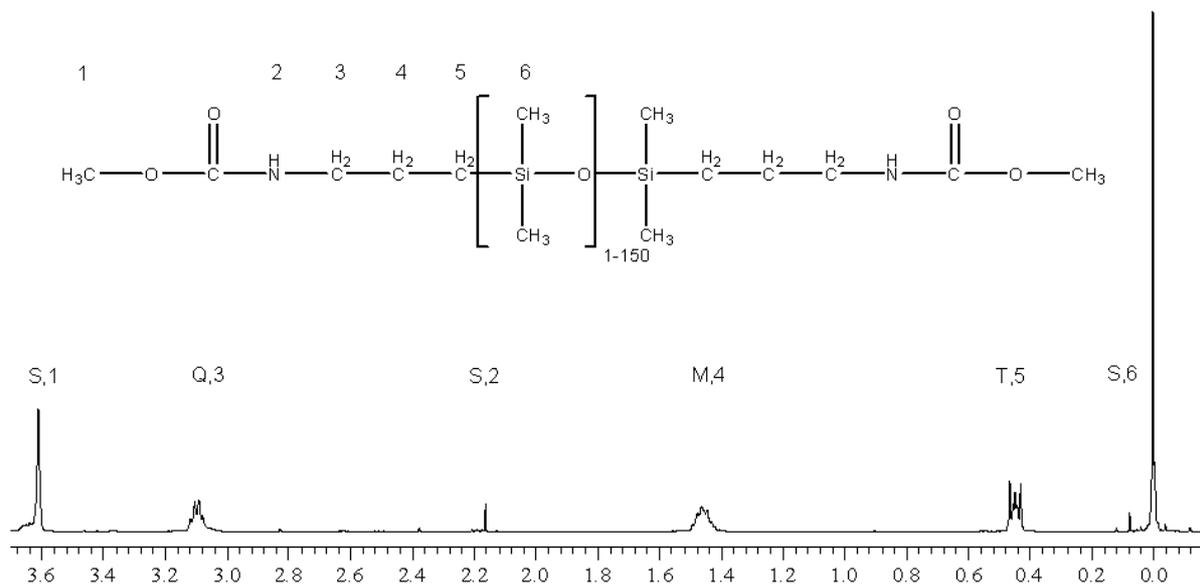


Abbildung 2 $^1\text{H-NMR}$ von Bis-(carbamatopropyl)-siloxan ($n=1-150$).

Die CH_2 -Gruppe am Stickstoff besitzt, wie in Tabelle 4 dargestellt unterschiedliche chemische Verschiebung (δ) und wird zur eindeutigen Identifizierung zwischen Amin und Carbamat herangezogen.

Tabelle 4 Chemische Verschiebung der Methylengruppe zur Unterscheidung zwischen Carbamato- und Aminosiloxanen.

Siloxan	δ (CH_2-Gruppe)
Carbamat	3,1 ppm
Amin	2,6 ppm

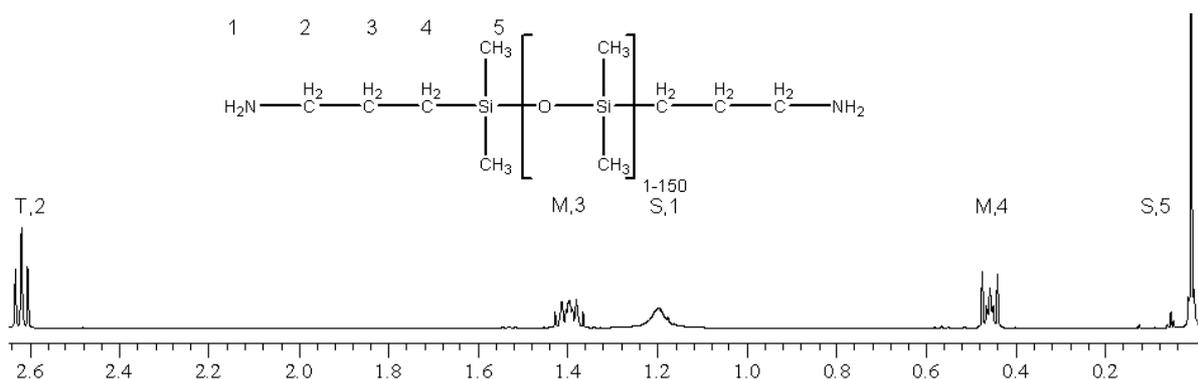


Abbildung 3 $^1\text{H-NMR}$ von Bis-(aminopropyl)-siloxan ($n=1-150$).

Die überproportionale Abnahme der Funktionsdichte mit zunehmender Anzahl an Si-O-Einheiten ($n=1-150$) verringert die Empfindlichkeit dieser spektroskopischen Methode, so dass eine genaue Auswertung für quantitative Umsätze für die oligomeren und polymeren Verbindungen nicht mehr möglich ist. Eine Erhöhung der Probenmenge für die NMR-Spektroskopie von 50 μL (dimere Siloxane) auf 200 μL erhöht das Signal um lediglich 1-3 %.

Eine alternative direkte Messung des Umsatzverhaltens verläuft über die Bestimmung von Methanol, welches bei der hydrolytischen Spaltung der carbamatgeschützten Siloxane entsteht. Die Quantifizierung von Methanol bedarf eines geeigneten internen Standards. Die untersuchten Standards sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5 Chemische Verschiebung von internen Standards für die $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie, in Anlehnung an [1,2].

Verbindung	Chemische Formel	δ in ppm ($^1\text{H NMR}$)
Tetramethylsilan (TMS)	$(\text{CH}_3)_4\text{Si}$	0
Hexamethyldisiloxan (HMDS)	$[(\text{CH}_3)_3\text{Si}]_2\text{O}$	0,065
Octamethyltetrasiloxan (OMTS)	$[(\text{CH}_3)_2\text{SiO}]_4$	0,093
1,4-Dioxan	$[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_2$	3,764
Cyclohexan	C_6H_{12}	1,42

Die siloxanhaltigen Standards konnten aufgrund gleicher bzw. ähnlicher chemischer Verschiebung, wie die in der Untersuchungslösung enthaltenen funktionellen Siloxanen, nicht eingesetzt werden. 1,4-Dioxan erzeugt ein Signal bei 3,764 ppm,

welches mit dem Signal der Methylgruppe vom Methanol zusammenfällt. Cyclohexan als interner Standard hat den Vorteil, dass es als symmetrisches Molekül nur ein Signal erzeugt, welches hinreichend getrennt vom Methanolsignal auftritt und auch mit den Siloxanen keine Überlagerungen auftreten. Der interne Standard wird in einer definierten Menge mit deuteriertem Benzol als Locksubstanz in einem Insert eingewogen und in das äußere NMR-Röhrchen mit der siloxanhaltigen Probe überführt. Die Abbildung 4 zeigt ein Spektrum, indem Methanol zur aus der Umsetzung von Bis-(carbamatopropyl)-oligosiloxan mit Lipase CA umgesetzt wurde.

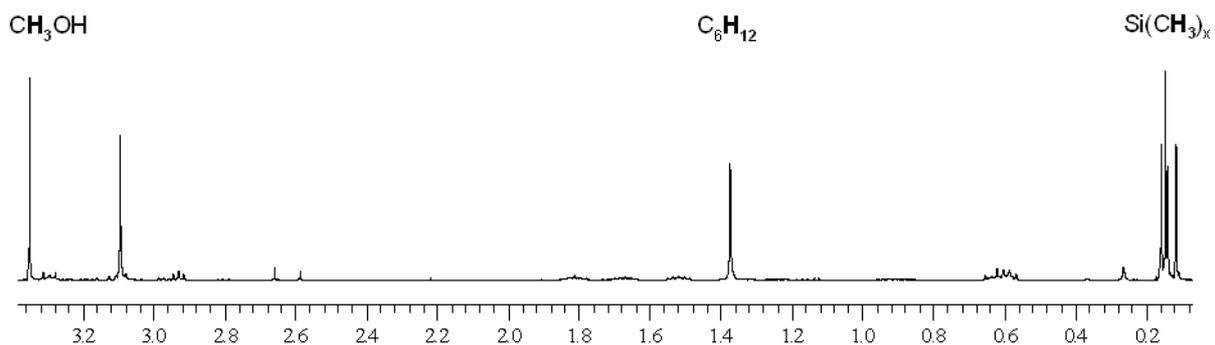


Abbildung 4 ¹H-NMR zur Umsatzbestimmung der enzymatischen Hydrolyse von Carbamatopropylsiloxan.

3.1.2 Gaschromatographie und Infrarotspektroskopie

Alle Ausgangsverbindungen und dimeren Siloxane wurden vor ihrem Einsatz mittels Gaschromatographie auf ihre Reinheit überprüft. Die dimeren funktionellen Siloxane besitzen noch einen ausreichend hohen Dampfdruck und thermische Stabilität, um im GC verdampft und aufgetrennt zu werden. Dabei zeigt die Ausgangsverbindung (Carbamatosiloxan) eine vom Aminosiloxan verschiedene Retentionszeit, so dass darüber eine Quantifizierung möglich ist (Abbildung 5). Die Messparameter sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6 Messparameter für die gaschromatographische Trennung der funktionellen Disiloxane.

Parameter	Einstellung
Säule	DB5 ms, factor four, Varian
Fluss	1 mL/min He als Trägergas
Injektor	250°C, Split 1:50
Temperaturprogramm	70°C (2 min) →10 K/min→270°C (2 min)
Detektor	Ionenfalle 150°C, Transferline: 250°C
Lösungsmittel	<i>tert</i> -Butyl methylether

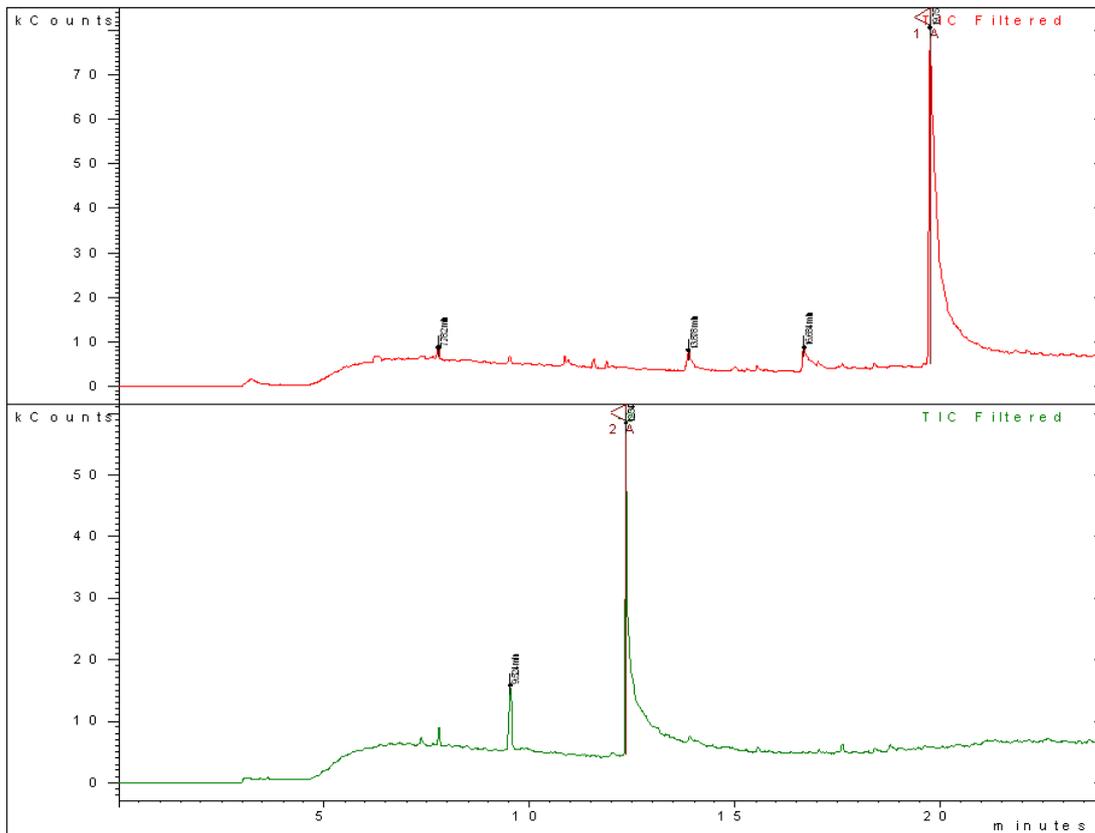


Abbildung 5 Gaschromatographische Trennung von carbamat- (oben) und aminofunktionalisierten (unten) Disiloxanen.

Durch Kopplung des Gaschromatographen mit einem Massenspektrometer mit Ionenfalle sind die Edukte und Produkte anhand ihrer Masse-zu-Ladungszahlen eindeutig identifizierbar Abbildung 6. Das Massenspektrum zeigt auch die beidseitige, endständige Substitution am Siloxangrundgerüst. Die Spaltungsmuster sind in Tabelle 7 und Tabelle 8 aufgeführt.

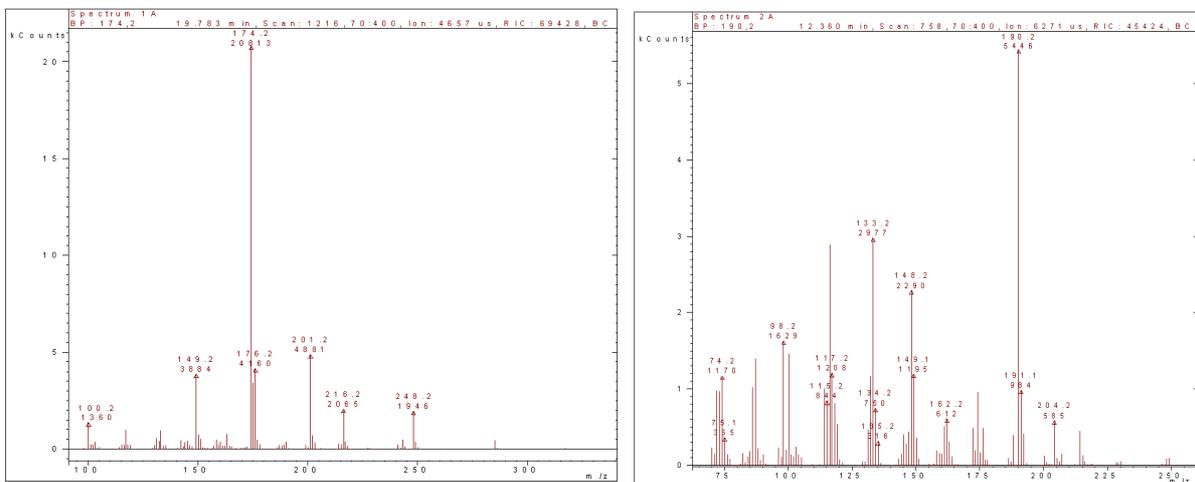


Abbildung 6 Massenspektrum von Carbamatodisiloxan (links) und Aminodisiloxan (rechts).

Tabelle 7 Fragmentierungsmuster von Bis-(carbamatopropyl) tetramethyldisiloxan.

<i>Fragment</i>	<i>m/z</i>
-Si(CH ₃) ₂ -O-Si(CH ₃) ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -NHCOOCH ₃	248
-Si(CH ₃) ₂ -O-Si(CH ₃) ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -NH ₂	190

Tabelle 8 Fragmentierungsmuster von Bis-(aminopropyl) tetramethyldisiloxan.

<i>Fragment</i>	<i>m/z</i>
M ⁺	248
-Si(CH ₃) ₂ -O-Si(CH ₃) ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -NH ₂	190
-Si(CH ₃) ₂ -O-Si(CH ₃) ₂ ≡	133
-Si(CH ₃) ₂ -O ⁺	74

Mit der Infrarotspektroskopie sind sowohl Aussagen zur Funktionalität am Siloxangrundgerüst, sowie quantitative Umsatzbestimmungen für die höhermolekularen Siloxane möglich. Zur Identifikation eignet sich sowohl die breite Aminbande im Bereich von 3500 – 3000 cm⁻¹, die jedoch häufig nur sehr schwach ausgeprägt ist (Abbildung 7).

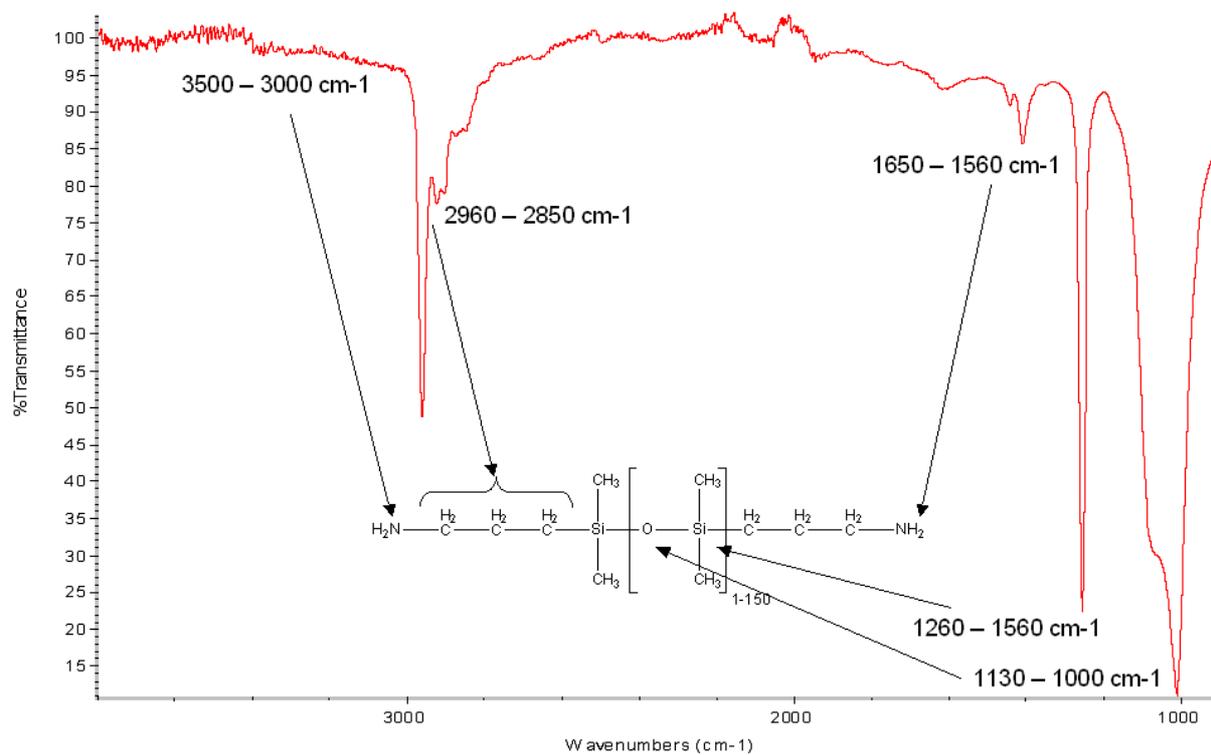


Abbildung 7 FT-IR-Spektrum von Bis-(aminopropyl) siloxan.

Das Spektrum der Carbamtosiloxane ist durch die intensitätsstarke Carbonylbande bei 1750 – 1735 cm⁻¹ gekennzeichnet, die hervorragend für die Quantifizierung des Umsatzes geeignet ist (Abbildung 8). Im Bereich von 1700 – 1670 cm⁻¹ liegt die Amid I Valenzschwingung und von 1550 – 1510 cm⁻¹ die Amid II-Schwingung.

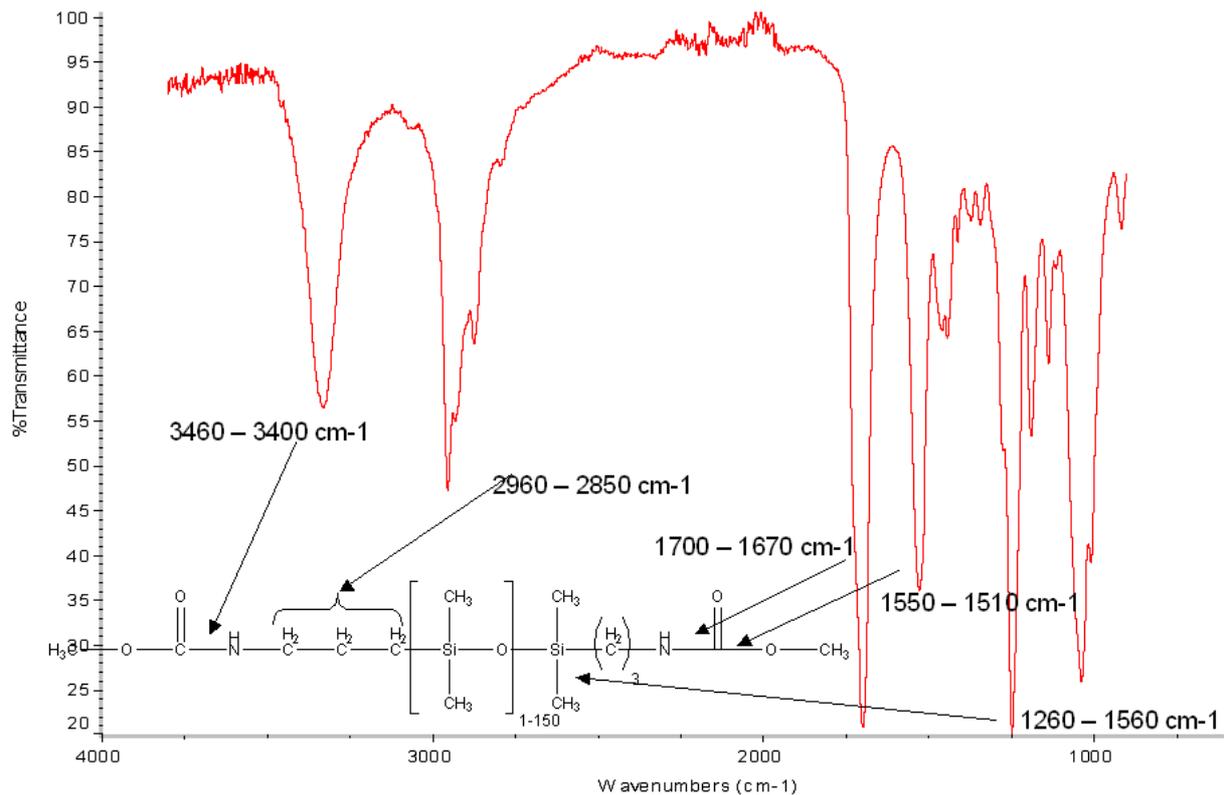


Abbildung 8 FT-IR-Spektrum von Bis-(carbamatepropyl) siloxan.

3.1.3 Gelpermeationschromatographie

Die Charakterisierung von funktionellen Polysiloxanen hinsichtlich der Molmassenverteilung, wie Gewichtsmittel, Zahlmittel und Polydispersität wurden durch Gelpermeationschromatographie (GPC) unter den in Tabelle 9 aufgeführten Bedingungen durchgeführt. Aus den Verteilungen der Molmassen sind Aussagen zum Einfluss von Enzymen auf das Siloxanrückgrat möglich. Die eingesetzten Lipasen und Esterasen zeigen unter neutralen Reaktionsbedingungen keine Veränderung der mittleren molaren Masse (M_w).

Tabelle 9: Parameter für die Gelpermeationschromatographie von funktionellen Polysiloxanen.

Parameter	Bedingungen
Säule	GPC-Säule, Styren-Divinylbenzol Copolymer, ID: 8 mm, Länge: 300 mm, Porengröße 800 Å, Partikelgröße: 6 µm, KF 803 L, Shodex
Temperatur in °C	23,0
Elutionsmittel	Tetrahydrofuran (THF), isokratisch

Fluss in mL/min	0,3
Konzentration Probe in mg/mL	1.0 – 10.0
Detektor	Brechungsindex (RF), Verdampfungsleichtstredetektor (ELSD)
Kalibrierstandard	Polymer Standards, Polydimethylsiloxan ($M_w=300-15000$ Da) mit je 10 mg/mL
Injektionsvolumen in μL	10,0
Interner Standard	0,4 % Toluol in THF
Auswertung	Flächenprozent

3.2 Charakterisierung der Enzyme

Die vom Projektpartner Julich Chiral Solutions GmbH – a Codexis Company bereitgestellten technischen Enzympräparationen wurden vollständig auf ihre Aktivität ausgearbeiteten Aktivitätstest charakterisiert. Die hydrolytische Aktivität der Esterasen wurde photometrisch in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7.5) mit *p*-Nitrophenylacetat (10 mM gelöst in DMSO) als Substrat bestimmt. Die Produktmenge an *p*-Nitrophenol wird bei 348 nm ($\epsilon_{348} = 5,65 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bei 25 °C ermittelt. Für die Lipasen kam die Säure-Base-Titration mit einem Titrimo zum Einsatz. Als Substrat wurde eine 2 %ige Tributyrinlösung bzw. Triacetinlösung, die in 50 mM TRIS Puffer bei pH 7,4 gelöst ist, eingesetzt und die entstehende Säure bei 40°C mit 5 mM Natronlauge titriert.

Um ein möglichst breites Spektrum an Enzymen zu untersuchen sowie verschiedene Reaktionsmedien testen zu können, wurden Screening-Tests in 96 well Mikrotiterplatten durchgeführt. Durch Zugabe aminoselektiver Reagenzien, wie *o*-Phthalaldehyd, 4-Chlor-nitrobenzofurazan oder Ninhydrin kann die Bildung des Produktes photometrisch verfolgt werden. Da Enzyme ebenfalls aminoselektive Reaktionen eingehen, wurde jeweils ein Blindversuch, der kein Substrat enthielt, durchgeführt. Von den in Tabelle 3 aufgeführten Hydrolasen zeigen fünf eine spontane positive Färbung. Aus Tabelle 10 wird ersichtlich, dass die einzelnen Nachweismethoden nicht immer zum gleichen Ergebnis führen, was sicherlich auch auf die unterschiedlichen Nachweisgrenzen und spezifischen Reaktionsbedingungen zurück zu führen ist. Für eine sichere Aussage ermöglicht erst die Kombination

dieser Tests mit den bereits erwähnten spektroskopischen bzw. chromatographischen Methoden.

Tabelle 10: Enzyme zur Hydrolyse von Carbamatosiloxane zu Aminosiloxanen und deren optische Nachweismöglichkeiten.

Enzym	Nitrobenzofurazan	Ninhydrin	Phthalaldehyd
Lipase CA CLEA	-	X	-
Novozym 388	-	X	X
Esterase 004	X	X	X
Lipase MM	-	X	X
Novozym 435	X	-	X

3.3 Synthese und Umsetzung von Modellverbindungen

Die Synthese der Carbamatosiloxane ist sehr zeitaufwendig und daher wurden, zur Untersuchung des enzymatischen Verhaltens gegenüber Carbamaten und in organischen Lösungsmitteln, strukturähnliche Verbindungen die in Abbildung 9 aufgeführt sind, synthetisiert. Für jedes Enzym wurden 1 mmol Carbamatester in 5 mL Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7.0) gelöst. Teilweise sind die Substanzen in rein wässrigen Systemen unlöslich und durch Zugabe von maximal 10 % DMSO bzw. Acetonitril kann die Löslichkeit erhöht werden. Die Reaktion startet durch Zugabe von 50 mg Enzym bei einer Temperatur von 30°C und wird für 48 h im Thermoschüttler. Der Einsatz eines Magnetrührers ist zu vermeiden, da es zur Zerstörung der Immobilisate führen kann. Durch Zugabe von 4-Chlornitrobenzofurazan konnten die Umsetzungen mit einem Fluoreszenzspektrometer erfasst werden, als Blindwert diente die Ausgangslösung mit Enzym. Die Vorversuche haben gezeigt, dass die Esterbindung der Carbamate vorwiegend durch Lipasen hydrolysierbar sind.

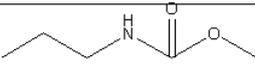
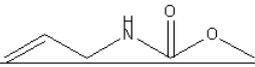
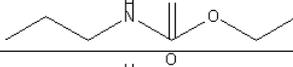
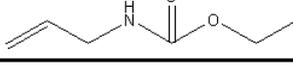
Substanz	Formel
Methyl, N-propylcarbammat	
Methyl, N-allylcarbammat	
Propyl, N-ethylcarbammat	
Allyl, N-ethylcarbammat	

Abbildung 9 Synthese verschiedenkettiger Modellsubstanzen.

Neben den biochemischen Untersuchungen zur Spaltung von Carbamaten kamen auch klassisch chemische Spaltungsreaktionen, wie die Pyrolyse zum Einsatz. N-Propylethylcarbammat wurde in einer Hochtemperaturapparatur bei einer inneren Reaktortemperatur von 600°C pyrolysiert. Die thermische Aktivierung des Carbamats führt in einer der Tschugajew-Reaktion zur Abspaltung von Kohlenstoffdioxid, welches durch Einleiten in Bariumhydroxid-Lösung eine weiße Trübung ergibt. Durch Kontrolle des pH-Wertes der Auffanglösung wurde eine starke Erhöhung festgestellt, was auf die Bildung von Aminen während der Pyrolyse zurück zu führen ist. Die gaschromatographische Analyse konnte Anteile von Propylamin identifizieren. Dies zeigt, dass auch eine thermische Aktivierung der Carbamatfunktionalität möglich ist, jedoch bei sehr hohen Temperaturen und Ausbeuten an Amin von unter 1%.

3.4. Untersuchung von Carbamatosiloxanen

3.4.1 Darstellung der Carbamatosiloxane

Die Carbamatosiloxane werden durch klassisch-chemische Synthesen ausgehend von den verschiedenkettigen Aminosiloxanen hergestellt. Die Umsetzung erfolgt dabei mit Dimethylcarbonat und Natriummethanolat als Katalysator in einer Inertgasatmosphäre. Die Edukte müssen vorher trocken und sauber sein. Die Produktbildung wird über ¹H-NMR verfolgt. Nach beendeter Reaktion erfolgt die Abtrennung von überschüssigem Dimethylcarbonat über einen Vakuumverdampfer und durch mehrmaliges Waschen mit Wasser kann freies Natriummethanolat entfernt werden. Feststoffabscheidungen während der Reaktion sind über Kieselgel abzutrennen. Das Produkt ist ein farbloses Öl mit einer Ausbeute von 95-100%.

3.4.2 Löslichkeit der funktionellen Siloxane

Die Aminofunktion der Siloxane besitzt eine höhere Polarität als die Carbamatfunktionalität und zeigt daher mit polaren Medien eine bessere Löslichkeit. Die Tabelle 11 gibt einen Überblick zu den Löslichkeiten der Siloxane in verschiedenen Solventien.

Tabelle 11 Löslichkeitsverhalten der alkylsubstituierten Siloxane.

Substanz	H ₂ O	CH ₃ CN	CH ₃ OH	<i>tert</i> -BuOH (<i>t</i> -Butanol)	C ₄ H ₈ O ₂ (Dioxan)	C ₄ H ₈ O ₂ (Ethylester)	CH ₂ Cl ₂	C ₆ H ₁₄
Amin1	milchig, Emulsion	löslich	löslich, milchig		löslich	löslich	löslich	löslich
Amin2	unlöslich	unlöslich	milchig		löslich	löslich	löslich	löslich
Amin3	unlöslich	unlöslich	milchig, schwerlösl		unlöslich	löslich	löslich	löslich
BPC1	unlöslich	löslich	löslich		löslich	löslich	löslich	löslich
BPC2	unlöslich	unlöslich	löslich		löslich	löslich	löslich	löslich
BPC3	unlöslich	unlöslich	schwerlösl		löslich	löslich	löslich	löslich

Legende:

Amin1 = Aminodisiloxan

BPC1 = Carbamatodisiloxan

Amin2 = Aminooligosiloxan

BPC2 = Carbamatooligosiloxan

Amin3 = Aminipolysiloxan

BPC3 = Carbamatopolysiloxan

Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass die höhermolekularen Siloxane ($n > 1$) in Wasser nicht mehr löslich sind und durch die zunehmende Viskosität die gleichmäßige Durchmischung des Reaktionsmediums erschwert wird. Verschiedene Cosolventien, wie Ethylacetat und 1,4-Dioxan zeigen gute Lösungseigenschaften, wirken jedoch auf die eingesetzten Hydrolasen inhibierend. Wasser ist für die enzymatische Aktivität essentiell und Untersuchungen in organischen Solventien haben gezeigt, dass mindestens 1 Vol.-% Wasseranteil pro Reaktionsmischung notwendig ist. Neben der direkten Zugabe von Wasser wurden zwei weitere alternative Methoden untersucht. Die Wasseraktivität ist ein exakteres Maß, als die Angabe von Wassermengen in einem Reaktionsvolumen. Die Wasseraktivität wurde durch Äquilibrieren der Enzym- und Substratlösung über übersättigten Salzlösungen bei 25 °C eingestellt [3]. Als Salze wurden verwendet: LiCl ($a_w = 0.75$), MgCl₂ ($a_w = 0.33$) und KNO₃ ($a_w = 0.94$). Nach etwa 24 h ist der Wassergehalt, der über Karl-Fischer-Titration bestimmt wurde, konstant.

3.4.3 Enzymatische Umsetzung der Carbamatosiloxane

Die Abbildung 10 zeigt den Umsatz an dimeren Carbamatosiloxanen bei einer Reaktionsdauer von 96 Stunden bei 30°C und 1400 rpm .

Die Ansätze wurden ohne weitere Cosolventien durchgeführt. Da der größte Teil der untersuchten Hydrolasen das pH-Optimum bei 7.0 haben, wurde ein 100 mM Kaliumphosphatpuffer eingesetzt. Die Umsätze an dimeren Carbamatosiloxan liegen durchschnittlich bei 10%. Die immobilisierten Lipasen, Novozym 388, 435 und 735 zeigen das stärkste Umsatzverhalten, was auf den Schutz durch Immobilisierung der Lipasen vor Desaktivierung durch die funktionellen Siloxane zurückzuführen ist.

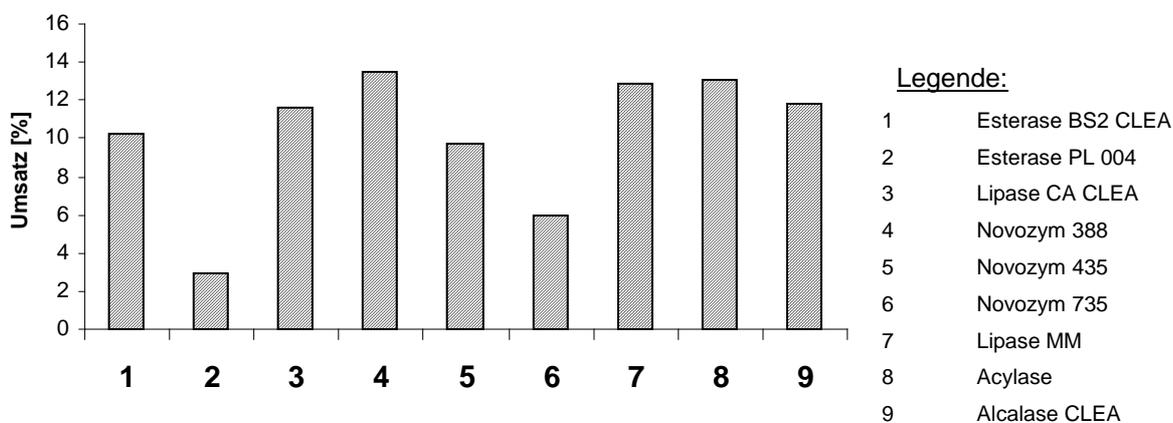


Abbildung 10: Umsetzung des dimeren Carbamatosiloxans mit Hydrolasen im wässrigen System.

Als Ursache für die niedrigen Umsätze ist die Inhibierung der Serinhydrolasen bei Substratkonzentrationen >10 mM, was durch einfache Aktivitätstest bereits festgestellt wurde. Jedoch wirkt die Inhibierung nicht auf alle Hydrolasen und die Lipasen bleiben weitestgehend aktiv. Einen wesentlich größeren Einfluss auf den Umsatz hat der Massentransfer infolge der Zweiphasigkeit des Systems. Der limitierende Faktor ist der Transfer des Substratmoleküls von der siloxanhaltigen organischen Phase an die Grenzfläche, in der das hydrolytische Enzym die Spaltung des Carbamats durchführt. Neben der Rührgeschwindigkeit wurde zusätzlich der Einfluss von Tensiden auf das Umsatzverhalten getestet. Polyethylenglykol und Triton X-100 zeigen im Bereich von 0,1 – 5 Vol.-% eine Erhöhung der Substratkonzentration, wirken jedoch bereits oberhalb von 1 Vol.-% inhibierend auf das Enzym. Durch die grenzflächenaktiven Substanzen steigt die Konzentration z.B. an dimeren Carbamatosiloxanmolekülen von 0,5 mg/mL auf 5 mg/mL. Das Optimum zwischen maximaler Eduktkonzentration in der wässrigen Phase und maximaler

Enzymkonzentration ist für jedes Enzym individuell zu ermitteln. Die Kombination aus Tensidzugabe und Erhöhung der Rühr-, bzw. Schüttelgeschwindigkeit führt neben der Erhöhung der Substratlöslichkeit auch zur Vergrößerung der Grenzfläche. Die Tabelle 12 gibt einen Überblick zu den Umsätzen für die dimeren, oligomeren und polymeren Carbamatosiloxanen.

Tabelle 12 Hydrolasekatalysierte Spaltung von Carbamatosiloxanen im Rührreaktor nach 96 h unter Zugabe von 1 Vol.-% Triton X-100.

<i>Carbamatosiloxan</i>	<i>Umsatz in %</i>
Dimer ($n = 1$)	30 – 45
Oligomer ($2 \leq n \leq 10$)	20 – 25
Polymer ($10 \leq n \leq 150$)	16 – 20

Eine neuere und schonende Methode zur Maximierung der Phasengrenze zwischen gepufferter Enzymlösung und Siloxanphase liegt im Einsatz von Mikroreaktoren. Der verwendete Mikromischer der Fa. Ehrfeld besitzt ein Reaktorvolumen von 200 μ l und besteht aus mehreren parallel angeordneten Platten, die für ausreichend Durchmischung sorgen und die Verweilzeit der Komponenten erhöhen. Durch mehrere Messreihen konnte gezeigt werden, dass die Umsetzung an Carbamatodisiloxan mit Enzym infolge der intensiven Vermischung zunimmt. Die Ausbeute an Aminodisiloxan konnte bereits nach einer Stunde um den Faktor 300 gesteigert werden (Abbildung 11). Es konnte gezeigt werden, dass nach ≤ 6 Stunden ein Umsatz bis zu 95 % erreicht werden konnte, das entspricht im Vergleich zu der Variante im Rührreaktor einer Steigerung um den Faktor von bis zu 117. Weitere Optimierungsarbeiten sind erforderlich, um den Umsatz an 99 % zu treiben. Die enzymatische Umsetzung der oligomeren und polymeren Carbamatosiloxane konnte ebenfalls erfolgreich gezeigt werden, jedoch liegen die Ausbeuten für das Oligomer, je nach Hydrolase bei 20 – 30% und für die Polymere bei 15 – 25%. Ein wesentliches Problem ist die hohe Molmasse in Verbindung mit der Anzahl steigender Kettenglieder, was den Zugang der geschützten organofunktionellen Gruppe zum aktiven Zentrum erschwert. Die hohe Viskosität polymerer Lösung kann durch Zugabe organischer Lösungsmittel, wie n-Hexan oder MTBE verringert werden,

erniedrigt aber gleichzeitig die enzymatische Aktivität.

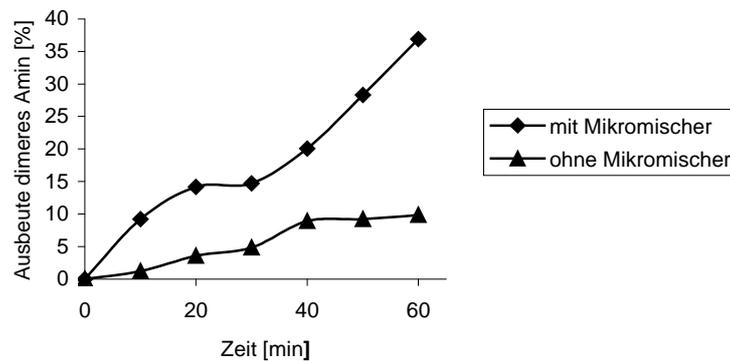


Abbildung 11: Umsetzung des dimeren Carbamatosiloxans im Mikromischer (Fa. Ehrfeld) durch Lipase Novozym 388 (50 U/mmol Siloxan).

3.5 Untersuchung von Formoxysiloxanen

3.5.1 Batch-Fahrweise

Dimere und polymere Formoxysiloxane lassen sich auf enzymatischem Wege mit guten Ausbeuten hydrolysieren. Abbildung 12 gibt das Reaktionsschema der hydrolytischen Spaltungsreaktion wieder. Die Erfahrungen und das breite Methodenspektrum aus der Umsetzung der Carbamatosiloxane konnten erfolgreich auf die Formoxysiloxane übertragen werden. Die Analyse der dimeren Verbindungen ist mittels Gaschromatographie durchführbar, für Polysiloxane bewährte sich eine

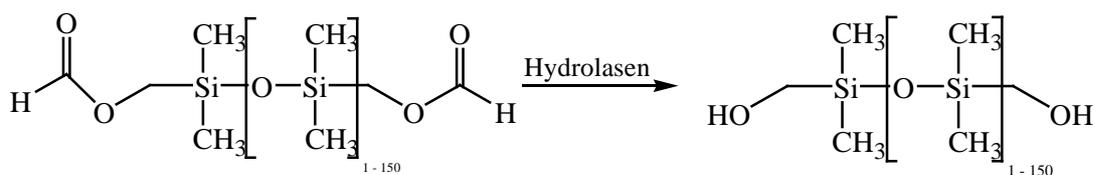


Abbildung 12: Enzymkatalysierte Hydrolyse von Formoxysiloxanen zu Hydroxysiloxanen.

Trennung über HPLC. Die Reaktionen wurden in 2 ml Eppendorfgefäßen bei 30 °C durchgeführt. Als Lösungsmittel diente DMSO, welches mit Phosphatpuffer gesättigt wurde. Bei den dimeren Siloxanen variieren die Umsätze zwischen Esterasen und Lipasen. Nach einer Reaktionsdauer von 48 h erreichten die Esterasen nur maximale Umsätze von 20%, während bei den Lipasen eine Verdopplung des Umsatzes stattfand (Abbildung 13). Ein Ursache dafür liegt im strukturellen Aufbau der Enzyme. Im organischen Medium entwickeln Lipasen ihre Aktivität durch Öffnen des

hydrophoben Deckels (lid), während Esterasen vorwiegend im wässrigen Medium aktiv sind. Die Ausbeuten fallen im Vergleich zu den Umsätzen geringer aus, da die Ausgangssubstanzen oft nicht als reine Verbindungen, sondern als Verteilungen mit unterschiedlicher Molmasse vorliegen. Das Produkt besitzt nur eine Methylengruppe in der Seitenkette und ist daher extrem reaktiv, so dass Folgereaktionen die Ausbeute zusätzlich vermindern.

Enzym	Siloxan	Umsatz [%]	Ausbeute [%]
Esterasen	Formoxydisiloxan	~20	~12
Lipasen	Formoxydisiloxan	~40	~19
Esterasen	Formoxypolysiloxan	~21	~8
Lipasen	Formoxypolysiloxan	~11	~5

Abbildung 13: Umsetzung von Formoxysiloxanen durch Lipasen und Esterasen im Batch-Verfahren.

3.5.2 Kontinuierliches Verfahren (Kreislaufprozess)

Um höhere Produktausbeuten zu erzielen, wurde ein Enzym-Membran-Reaktor eingesetzt. Eine Ultrafiltrationsmembran hält das Enzym zurück, während die Edukte und Produkte diese frei passieren. Das anfallende Nebenprodukt Ameisensäure wird durch einfaches Auswaschen in schwach alkalischer Lösung beseitigt. Durch die Kreislauffahrweise und intensiven Kontakt zwischen dem an der Filtrationsmembran gehaltenem Enzym und dem vorbeiströmenden Substrat, sind bereits nach 48 h Umsätze von über 60% möglich. Die Abbildung 14 zeigt für einige ausgewählte Enzyme das Umsatzverhalten. Aus den Daten geht eindeutig hervor, dass die Kreislaufführung im Vergleich zur Batch-Fahrweise eine Verdreifachung des Umsatzes erzielt. Dies ist ein entscheidender Faktor für die Übertragung des Laborverfahrens in den technischen Maßstab.

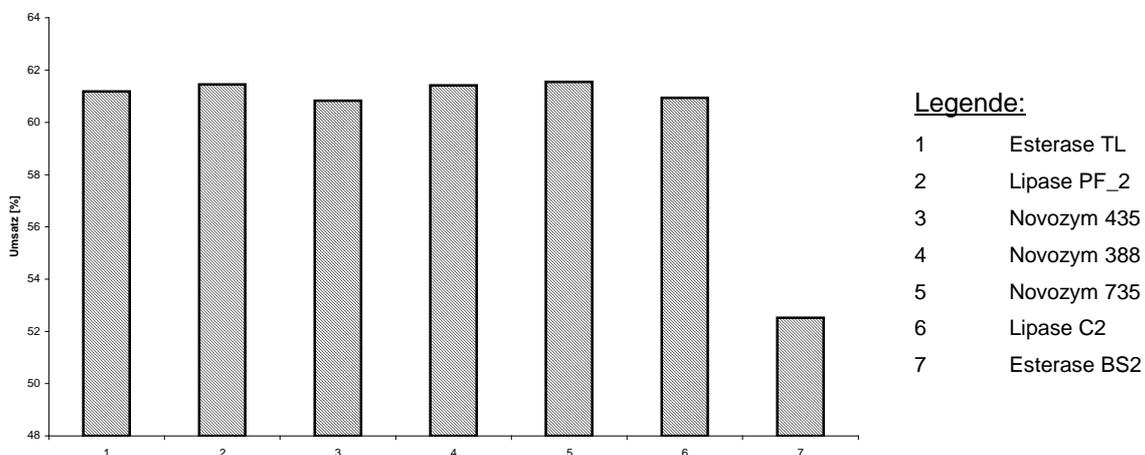


Abbildung 14: Umsetzung des dimeren Formoxysiloxans im Enzym-Membran-Reaktor.

Um den Einfluss der Esterkettenlänge und des Spacers auf die enzymatische Hydrolyse zu untersuchen, wurden methyl- und propylgespacerte Acetoxysiloxane synthetisiert. Der Zugang zu den Acetoxysiloxanen erfolgt über die Umsetzung der entsprechenden carbinolfunktionalisierten Siloxane mit Acetylchlorid, Triethylamin und Pyridin als Säurefänger. Die Reaktion verläuft unter ständigem Kühlen über 12 h. Das ausgefallene Pyridiniumhydrochlorid wird abfiltriert und die wässrige Phase mehrmals mit Diethylether extrahiert. Das Lösungsmittel der vereinigten organischen Phasen kann mittels Vakuumdestillation entfernt werden. Die dimeren Produkte sind mit Dünnschichtchromatographie, IR-Spektroskopie und $^1\text{H-NMR}$ nachweisbar. Ausgehend vom Formoxymethylsiloxan führt eine Erweiterung der Kettenlänge um eine Methyleneinheit zur Steigerung des Umsatzes um den Faktor 2. Propylgespacerte Siloxane sind für die enzymatische Umsetzung infolge der besseren sterischen Zugänglichkeit leichter zu hydrolysieren, als methylgespacerte Siloxane. Allgemein verlaufen die Umsätze zu längeren Estergruppen, was die Abbildung 15 verdeutlicht.

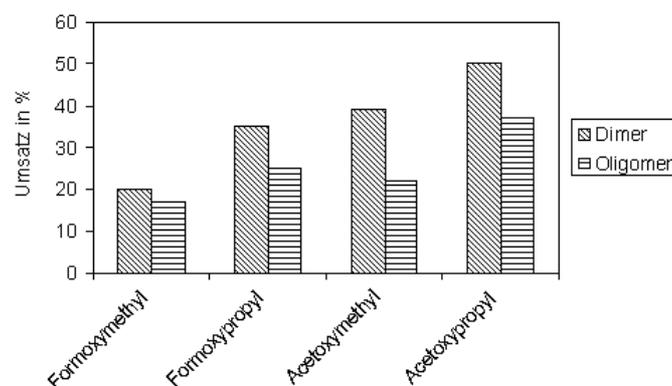
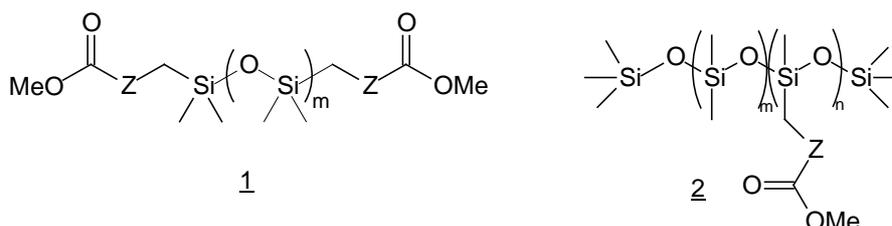


Abbildung 15 Einfluss der Kettenlänge des Esters und der Spacereinheit für Formoxy- und Acetoxysiloxane.

3.6 Enzymatische Hydrolyse von Polysiloxancarbonsäuremethylestern

Die folgenden Arbeiten wurden durch den Projektpartner Wacker Chemie AG angefertigt.

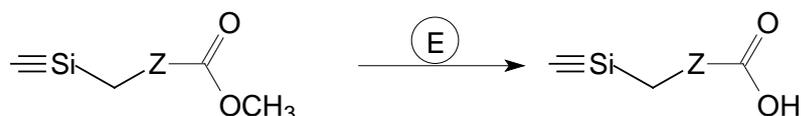


Die enzymatische Hydrolyse von Polysiloxancarbonsäuremethylestern des Typs 1 oder 2 eröffnet prinzipiell die Möglichkeit der Darstellung von Polysiloxancarbonsäuren unter milden, pH-neutralen Bedingungen ohne die hydrolytische Spaltung der Polymerkette, die bei der säure- oder basenkatalysierten Hydrolyse auftritt.

3.6.1 Darstellung der verwendeten Methylester 1 und 2

Verbindungen 1 mit $Z = (\text{CH}_2)_2\text{OCH}_2$, $(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2$ und $(\text{CH}_2)_9$ wurden durch Hydrosilylierung von olefinischen Carbonsäureestern mit H-Siloxanen dargestellt. Die Synthese der Ester 1 mit $Z = \text{CH}_2$ und OCH_2 , die als Modellsubstanzen zur Ermittlung von Struktur-Reaktivitätsbeziehungen dienten, erfolgte durch Oxidation der entsprechenden Carbinole zu den Carbonsäuren [4,5] und nachträgliche Veresterung mit Methanol.

3.6.2 Enzymatische Umsetzungen



Alle untersuchten löslichen Enzyme erwiesen sich als deutlich weniger reaktiv als die immobilisierte Lipase Novozym 435 (*Candida antarctica* B, Hersteller Novozymes Deutschland GmbH). Daher wurden alle weiteren Versuche mit diesem Enzym durchgeführt. Weitere Vorteile dieses geträgerten Enzyms sind seine leichte Abtrennbarkeit und Wiedereinsetzbarkeit. Die enzymatischen Umsetzungen wurden bei 40°C in Phosphatpuffer mit ca. 1000 bis 2000 U Enzym pro mmol Estergruppe durchgeführt. Für die Umsatzbestimmung wurde die Absolutmenge an gebildetem Methanol ¹H-NMR-spektroskopisch mit Gewichtsstandard bestimmt.

Der Zusatz von Cosolventien führte bei den Versuchen in Schüttlern nicht zu einer Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit, bei stärkerer Durchmischung des zweiphasigen Systems (Verwendung eines KPG-Rührers) konnte durch Zusatz von Cosolventien etwas höhere Umsatzraten erzielt werden.

Vergleicht man die Reaktionsgeschwindigkeiten der enzymatischen Hydrolyse des Disiloxans 1 mit $Z = \text{CH}_2$ und $m = 1$ und des entsprechenden Oligomeren 1 mit $m = 10$ ($M_W \sim 1200$) in MTBE, so stellt man eine starke Verlangsamung der Reaktion fest (Abbildung 16, Versuche in Schüttlern). Im Gegensatz zum Disiloxan ist das

Oligomer in Wasser unlöslich, die Esterfunktionalität wird folglich von der *active site* des Enzyms über die Phasengrenze hinweg nicht erreicht. Eine weitere Erhöhung des Molekulargewichts hat keine ausgeprägte Reaktivitätsabnahme zur Folge. Ein deutlicher Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit des polymeren Esters um einen Faktor von mindestens 20 kann jedoch durch Einführung eines Sauerstoffs in α -Position zur Estergruppe (Abbildung 16) oder ebenso durch Verlängerung der Spacergruppe Z erzielt werden.

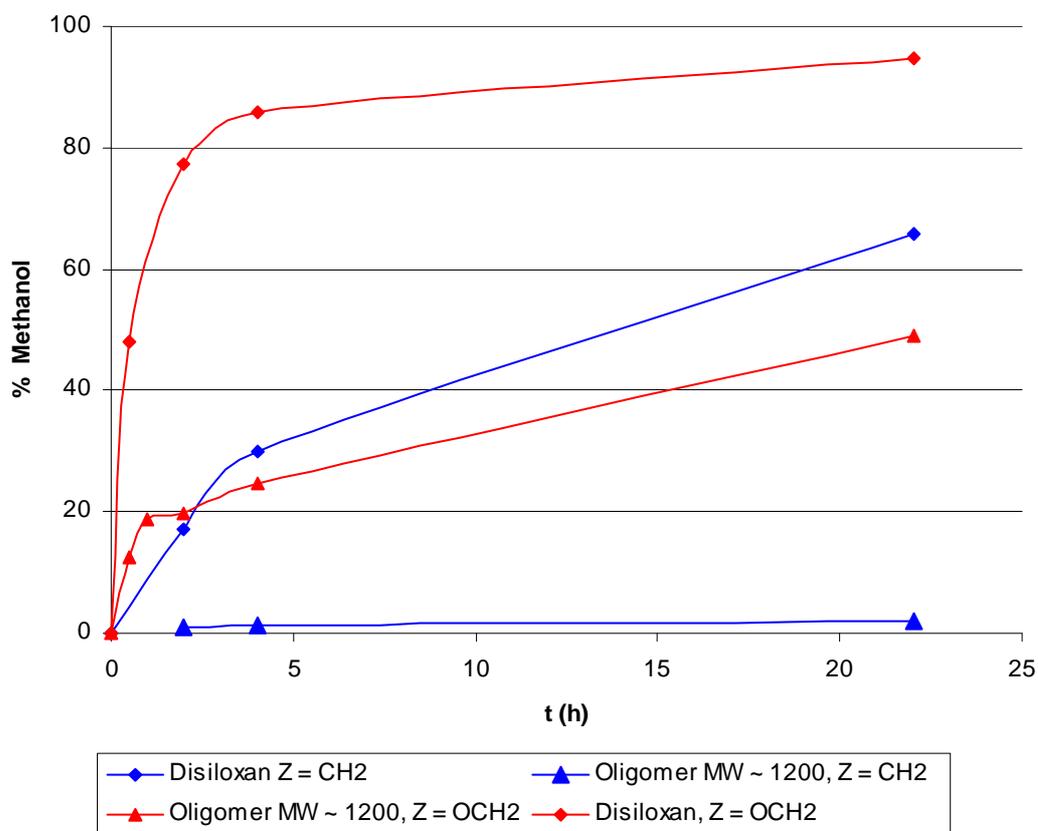


Abbildung 16 Vergleich der Reaktivitäten von Disiloxanen und Oligosiloxanen ($M_w = 1200$) mit $Z = CH_2$ und $Z = OCH_2$, $c_{COOMe} = 0,17$ M in MTBE; Enzymmenge jeweils ca. 1500 U / mmol COOMe.

Die enzymatische Hydrolyse der Polymeren ist nur ab einer „Mindest-Spacerlänge“ möglich, ab welcher die funktionelle Estergruppe nicht mehr durch das Polysiloxan abgeschirmt wird. Bei den Polymeren 1 werden unter optimierten Bedingungen nach 20 Std. im Batch-Verfahren bei Enzymmengen von ca. 1000 U / mmol COOMe Umsätze bis maximal 90 % erzielt, jedoch tritt im Bereich noch höherer Umsätze eine starke Verlangsamung der Reaktion ein, sodass die für die technische Nutzung

unabdingbare vollständige Entschützung nur sehr schwer zu erreichen ist. Eine Desaktivierung des Enzyms ist hierfür jedoch nicht verantwortlich. Dies belegen Langzeitversuche, bei denen auch nach Reaktionszeiten von ca. 70 Std. keine nennenswerte Enzymdesaktivierung oder Hemmung festzustellen war. Auch nach 142 Stunden (~ 6 Tagen) ist noch eine deutliche Aktivität des Enzyms vorhanden. In Abhängigkeit von der Spacerlänge entstehen bei der enzymatischen Hydrolyse von 1 auch die entsprechenden Silanole 3. Wie bereits in [4] beschrieben, hängt die Geschwindigkeit der Spaltungsreaktion der Polysiloxancarbonsäuren in die Silanole 3 von der Spacerlänge ab. Kann sich intermediär ein 5- oder 6-Ring bilden, erfolgt die Spaltungsreaktion sehr rasch, da diese Konstellation thermodynamisch besonders günstig ist (Abbildung 17). Jedoch wurde auch bei längeren Spacern in geringem Umfang (2 bis 10 % je nach Reaktionsdauer) die Bildung von Silanolen beobachtet.

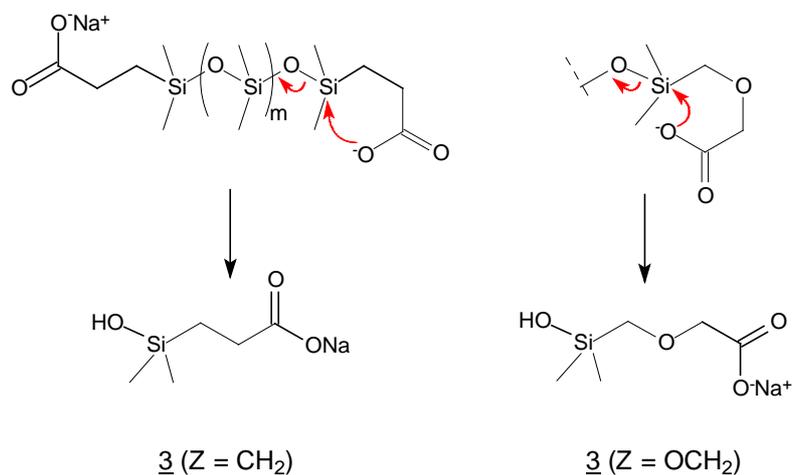


Abbildung 17 Bildung von Silanolen 3 durch thermodynamisch begünstigten Angriff der Carboxylatgruppe am Si-Atom unter Bildung eines intermediären 5-bzw. 6-Rings.

3.6.3. Schlussfolgerungen

Die Versuche zeigen, dass die enzymatische Hydrolyse von Polysiloxancarbonsäuremethylestern prinzipiell möglich ist. Eine vollständige Entschützung, die für den technischen Einsatz der Polysiloxancarbonsäuren notwendig ist, ist unter dem Gesichtspunkt der Wirtschaftlichkeit jedoch nicht realisierbar.

4. Ökoeffizienzanalyse

Im Rahmen des Projektes wurde versuchsbegleitend eine Ökoeffizienzanalyse in Zusammenarbeit mit der IFU Hamburg GmbH angefertigt. Das Aufbereitungsprogramm Sabento® umfasst eine Ökologische und Ökonomische Bewertung, um Aussagen zur Ökoeffizienz für den Prozess zur Herstellung von dimeren Aminosiloxanen zu machen. Durch die erfolgreiche Entwicklung eines biotechnologischen Verfahrens zur Herstellung dimerer Aminosiloxane über die schutzgruppenfunktionalisierten Carbamatosiloxane, konnte erstmalig ein Vergleich, zu dem von der Wacker Chemie AG betriebenen klassisch-chemischen Verfahren, durchgeführt werden. In das zugrundeliegende Ökologische Bewertungssystem fließen verschiedene Kennzahlen, wie z. B. der Massen- und Energieindex mit ein. Die einzelnen Kategorien werden mit unterschiedlicher Wichtigkeit belegt und resultieren in Zusammenhang mit der Stoffbilanz in einer Ökobilanz, deren Ermittlung in Abbildung 18 aufgeführt ist.

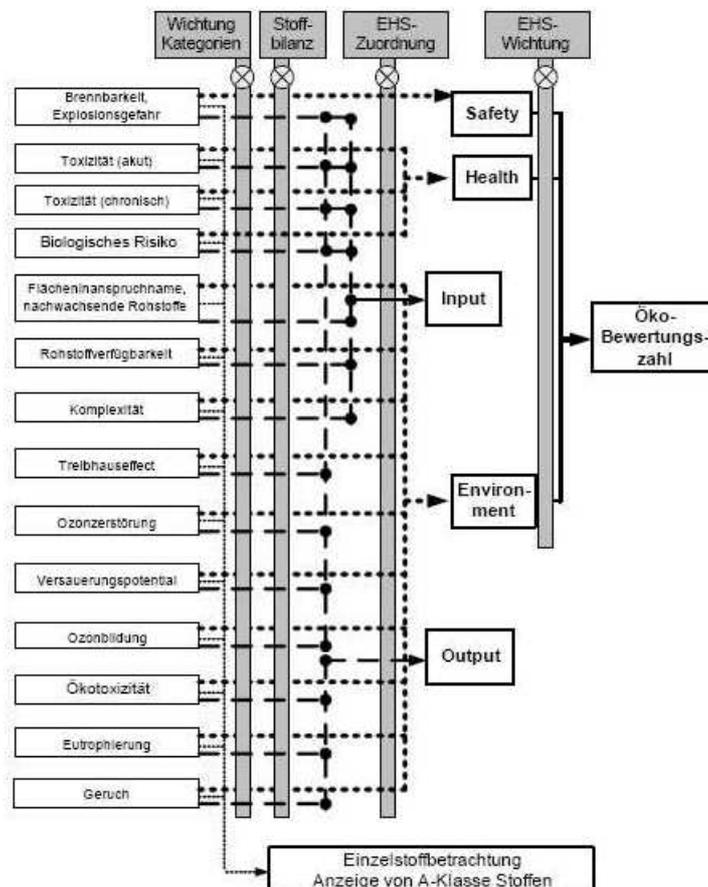


Abbildung 18 Zusammensetzung des ökologischen Bewertungssystems im Programm Sabento® zur Erstellung einer Ökoeffizienzanalyse [6].

Die strukturelle Veranschaulichung beider Prozesse ist in der Abbildung 19 und Abbildung 20, sowie in Abbildung 21 dargestellt. Die verwendeten Daten für die Bilanzierung der Stoffströme wurden der gegenwärtigen Patentliteratur entnommen [7,8].

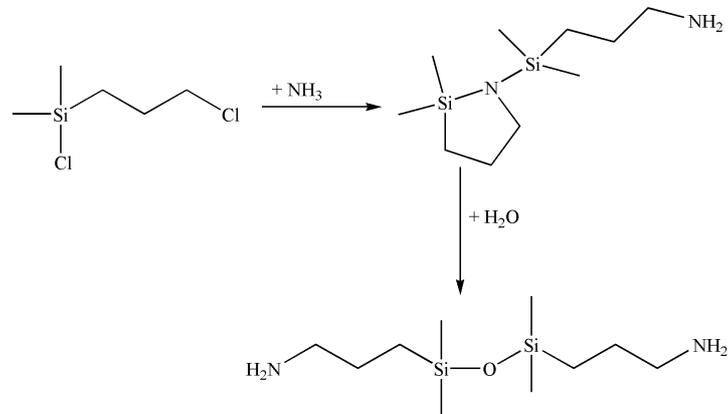


Abbildung 19 Hochdruckaminierung von 3-Chlorpropyl-dimethylchlorosilan zu Bis-(aminopropyl) tetramethyldisiloxan.

Allgemein verschlechtert sich die Ökoeffizienz eines Prozesses mit zunehmender Anzahl an Synthesestufen. Die Verfahrensschritte für das klassisch-chemische Verfahren gehen von der Umsetzung von 3-Chlorpropyl-dimethylchlorosilan mit überstöchiometrischen Mengen an Ammoniak zu Bis-(aminopropyl) tetramethyldisiloxan. Zur Bilanzierung des enzymatischen Verfahrens muss die Herstellung der Ausgangsverbindung Carbamatosiloxan, auch dessen Herstellung einbezogen werden. Die Synthese geht vom 3-Chlorpropyl-dimethyl-methoxysilan, welches mit Isocyanat in methanolischer Lösung zu dem Bis-(carbamatopropyl) tetramethyldisiloxan reagiert.

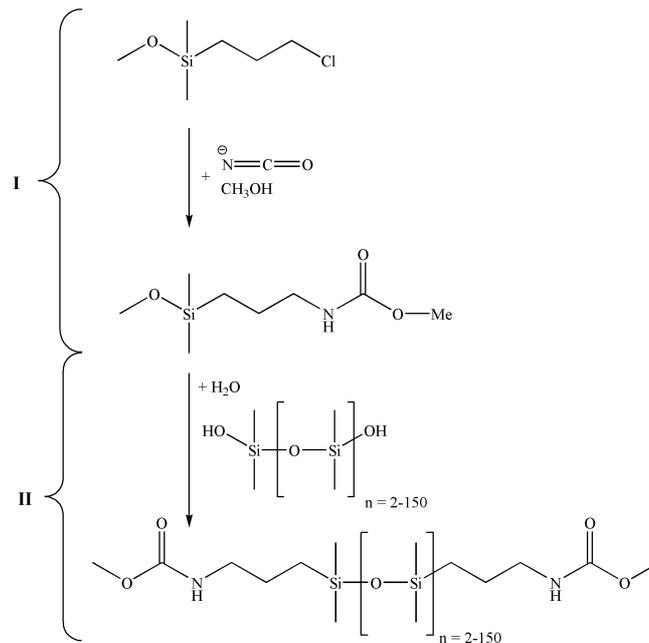


Abbildung 20 Biotechnologischer Zugang zu den Carbamatosiloxanen als Vorstufe für die enzymatische Hydrolyse zu den Aminosiloxanen.

Zu dem hergestellten Carbamatosiloxan gibt es noch keine Veröffentlichungen von Stoffdaten, so dass auf strukturell ähnliche Verbindungen zurückgegriffen wurde. Dabei konnte auf die in diesem Projekt synthetisierten Modellverbindungen und auf die Daten zur Synthese des Aminosiloxans zurückgegriffen werden.

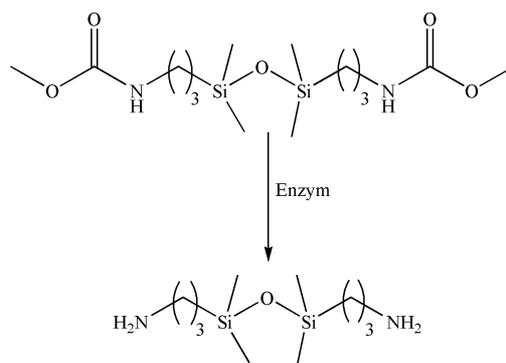


Abbildung 21 Enzymatische Aktivierung von Carbamatodisiloxan zu Aminodisiloxan.

Die Produktkennzahlen für das biotechnologische und das chemische Verfahren sind nachfolgend gegenübergestellt, und sämtliche Prozessdaten und Simulationsergebnisse sind im Anhang beigefügt. Die Bewertung basiert auf der Sachbilanz des Modells und der von den Projektpartnern zugetragenen Daten, sowie auf den Materialeigenschaften aus der Materialdatenbank mit Sabento®:

Allgemeine Kennzahlen

		Chemischer Prozess	Biotechn. Prozess
Produktstrom	=	1000	1000 kg / Jahr
Inputstrom	=	13615	21538 kg / Jahr
Abfallstrom	=	12605	17460 kg / Jahr
Energiestrom	=	17937815	29339599 kJ / Jahr
Inputindex	=	14	22 kg / kg
Abfallindex	=	13	17 kg / kg
Energieindex	=	17938	29340 kJ / kg

Nach Ermittlung der allgemeinen Kennzahlen, erfolgt die Betrachtung von kritischen Stoffen, sowie Einzelstoffbetrachtungen und Bilanzierungen der Input- und Outputströme. Die Einteilung der kritischen Stoffe beruht auf dem ABC-Klassifizierungssystem, wobei für Stoffe der Klasse A mehr als 10 Synthesestufen, Klasse B mit 3 bis 10 Synthesestufen, Klasse C kleiner als 3 und Klasse D keine Synthesestufen notwendig sind. Die kritischen Stoffe sind nachfolgend für beide Verfahren tabellarisch (Tabelle 13) zusammengefasst.

Tabelle 13 Identifizierung und Einteilung der kritischen Stoffe.

Chemisches Verfahren	Wirkungskategorie	Biotechnologisches Verfahren	Wirkungskategorie
n-Pentan	Thermisches Risiko	Isopropanol	Thermisches Risiko
Salpetersäure	Thermisches Risiko, Toxizität (akut)	Salpetersäure	Thermisches Risiko, Toxizität (akut)
Tetrahydrofuran	Thermisches Risiko	<i>tert</i> -Butylmethylether	Thermisches Risiko
Ammoniak	Thermisches Risiko, Toxizität (akut), Toxizität (chronisch), Versauerungspotential, Ökotoxizität, Eutrophierung	Toluol	Thermisches Risiko
Kaliumhydroxid	Toxizität (akut)	Lipase	Toxizität (akut)

Cyclosilan	Ökotoxizität	Kaliumhydroxid	Toxizität (akut)
Ammoniumchlorid	Eutrophierung	Salzsäure	Toxizität (akut)

Mit Hilfe der Einzelstoffbetrachtung wurden die Stoffe mit einem sehr hohen Wirkungspotential identifiziert. Eine Optimierung bzw. Ersetzen dieser Stoffe kann die ökologische Bewertung, bei der sowohl die Inputströme als auch die Outputströme beachtet werden, verbessern. Bei der Einzelstoffbetrachtung für die Input-Materialien des chemischen Prozesses sind hauptsächlich die Lösungsmittel Tetrahydrofuran, n-Pentan, sowie Ammoniak als Aminierungsreagenz von hoher Wichtigung. Ähnlich verhalten sich die Lösungsmittel *tert*-Butyl methylether, Toluol und Isopropanol im biochemischen Prozess. Auf der Outputseite stehen die wichtigsten Abfallprodukte wie Ammoniumchlorid, n-Pentan und überschüssiges Ammoniakgas, welches größtenteils im Kreislauf gefahren wird. Durch die Entwicklung des alternativen biotechnologischen Verfahrens konnte das bereits im Projektantrag aufgeführte Umweltentlastungspotential durch die Ökoeffizienzanalyse mit dem Programm Sabento[®] bestätigt werden. Bei dem Hochdruckverfahren unter Überschuss an Ammoniak fallen im ersten Schritt erhebliche Mengen an Abfällen an:

- Salze 80 g/kg Aminöl
- Ammoniak 20 g/kg Aminöl
- Organ. Abfälle 30 g/kg Aminöl
- Verbrennungsrückstände 7 g/kg Aminöl

Für das alternative Verfahren über die enzymatische Hydrolyse der geschützten Aminöle fallen keine Ammoniumabfälle an und durch die selektivere Synthese reduzieren sich die organ. Abfälle. Der Gesamtanfall beträgt etwa:

- Salze 30 g/kg Aminöl
- Methanol 30 g/kg Aminöl
- Organ. Abfälle 10 g/kg Aminöl
- Verbrennungsrückstände 3 g/kg Aminöl

Die Umweltbewertungszahl stellt das Ergebnis der ökologischen Bewertung der Ökoeffizienzanalyse dar und dient zum Vergleich von verschiedenen Produktionsszenarien. Je höher die Umweltbewertungszahl, desto stärker ist die Ausbildung von Umweltwirkungspotentialen. Die Ergebnisse für die Input-Umweltbewertungszahl (Input-UBZ) und die Output-Umweltbewertungszahl (Output-UBZ), sowie die Gesamtumweltbewertungszahl (Gesamt-UBZ) mit den in Sabento angepassten Standardwichtungsfaktoren sind in Abbildung 22 dargestellt. Die Wichtungsfaktoren sind dem Anhang zu entnehmen. Für das chemische Verfahren

liegt die Gesamtumweltbewertungszahl bei 317 und für das biotechnologische Verfahren ohne chemische Vorstufe bei 164. Die chemische Vorstufe im biochemischen Verfahren erhöht die Gesamt-UBZ nochmals um 44. Damit sind die Unterschiede beider Verfahren relativ gering.

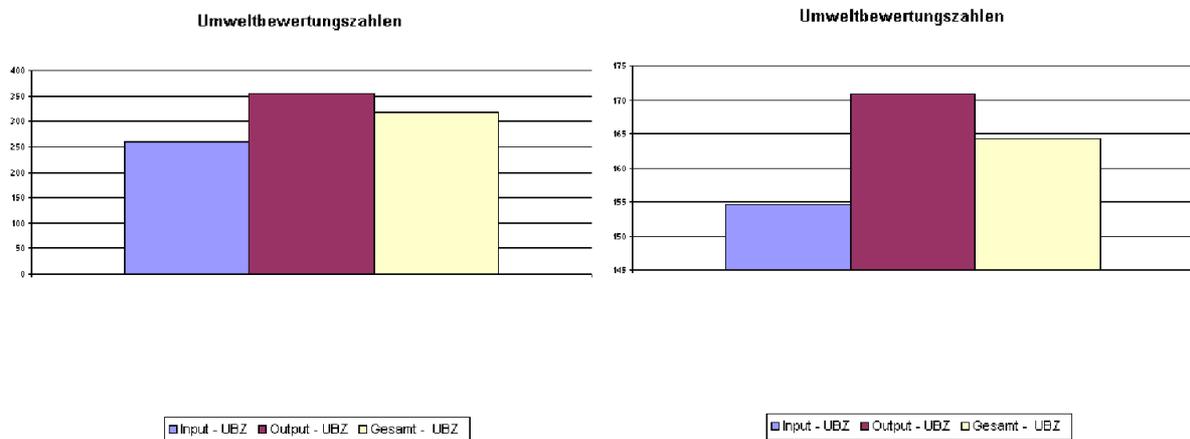


Abbildung 22 Darstellung der ökologischen Bewertung des chemischen Verfahrens (links) und des neuentwickelten biotechnologischen Verfahrens (rechts) durch die Umweltbewertungskennzahlen.

Die ökonomische Bewertung basiert auf einer fiktiven Verkaufszahl für beide Verfahren von je 1.000 kg pro Jahr und einem Umsatz, der auf den Daten des chemischen Prozesses, der von der Wacker Chemie AG betrieben wird, von 620.000 €. Der größte Kostenfaktor für beide Verfahren liegt in den Materialkosten, der für das biotechnologische Verfahren bei 311.000 € und für das chemische Verfahren bei 344.000 € liegt. Die Zusammensetzung der Material- und Energiekosten ist in Abbildung 23 aufgestellt.

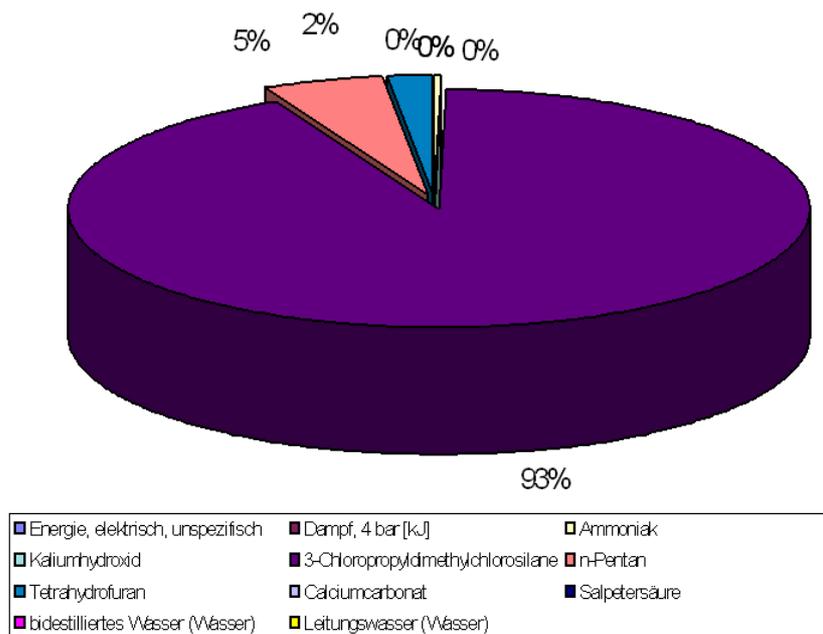


Abbildung 23 Material- und Energiekosten für das chemische Produktionsverfahren.

Das Kosten für das Ausgangsprodukt 3-Chlorpropyl-dimethylchlorosilan umfassen 93 % der Materialkosten und sind damit überproportional hoch. Die Daten für diesen Stoff konnten lediglich aus den gängigen Katalogen der Chemikalienanbieter erhalten werden und liegen damit höher als beim direkten Kauf vom Großhersteller. Die Kostenstruktur im verarbeitenden Gewerbe verteilt sich zu 40 % auf die Materialkosten, 21 % auf die Personalkosten und die restlichen 39 % teilen sich auf die Energiekosten, Miete und Pacht und Sonstiges auf [9]. Die Verteilungsstruktur im biotechnologischen Verfahren sieht ähnlich aus und ist in Abbildung 24 als Kreisdiagramm dargestellt. Die Materialkosten für das Einsatzmaterial liegen bei 89 % und damit fast 50 % über den üblichen Werten eines industriellen Verfahrens. Da genaue Preisangaben zu dem Edukt aufgrund seiner Neuheit und bisher nur kleintonnaigen Produktion (100 kg/a) fehlen, mussten die Preise aus größtenteils abgeschätzt werden bzw. mit denen des Aminosiloxans gleichgesetzt. Für beide Verfahren zeichnen sich noch durch einen hohen Verbrauch an Lösungsmitteln, wie n-Pentan oder tert-Butylmethylether aus. Optimierungen bis hin zu völligem Ersatz dieser Lösungsmittel können die Energiekosten noch erheblich reduzieren.

etablierte chemische Verfahren technisch bereits ausgereift ist, birgt das neue Verfahren noch große Optimierungspotentiale. Hierbei sollte sich die Entwicklung auf eine Minimierung der eingesetzten Massen und eine Reduktion des Energiebedarfs konzentrieren [10].

6. Literaturverzeichnis

- [1] K. Hatada, T. Kitayama, NMR-Spectroscopy of Polymers (2004), Springer-Verlag, 24-25.
- [2] H. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie (2005), Thieme-Verlag, 105.
- [3] M. Eckstein, M. Sesing, U. Kragl, P. Adlercreutz, At low water activity α -chymotrypsin is more active in an ionic liquid than in non-ionic organic solvents (2002), *Biotechnology Letters* **24**, 867-872.
- [4] E. Fritz-Langhals, Aldehyde and Carboxy Functional Polysiloxanes, *Silicon Based Polymers* (2008), Springer 2008, 39-50.
- [5] EP Pat. 1737872 A1 (2007), C. Ochs, E. Fritz-Langhals (zu Wacker Chemie AG).
- [6] E. Heinzle, Bewertung ökologischer Aspekte der Nachhaltigkeit biotechnischer Prozesse (2003), unveröffentlichter Bericht, Universität Saarbrücken.
- [7] DE Pat. 10049183 C1 (2002), O. Schäfer, A. Bauer, L. Brader, B. Pachaly, V. Frey (zu Consortium für elektrochemische Industrie GmbH).
- [8] DE Pat. 3546376 A1 (1985), J.L. Webb, C.E. Olsen (zu General Electric Co.).
- [9] Deutsche Materialeffizienzagentur DEMA, Studie zur Kostenstruktur im verarbeitenden Gewerbe (2003).
- [10] T. Brinkmann, H. Rubbeling, Ökoeffizienter Vergleich eines neuen biokatalytischen Verfahrens zur Herstellung von Silikonen mit dem etablierten chemischen Verfahren (2009), IFU Hamburg.