



Institut für Biotechnologie

**Fermentative Produktion von L-Phenylalanin
mit *Escherichia coli*
und integrierter Produktabtrennung**

Nicole Rüffer

Fermentative Produktion von L-Phenylalanin mit *Escherichia coli* und integrierter Produktabtrennung

Von der Gemeinsamen Fakultät für Maschinenbau und Elektrotechnik
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung der Würde
einer Doktor-Ingenieurin (Dr.-Ing.)
genehmigte Dissertation

von Nicole Rüffer
aus Hannover

Eingereicht am:	20. 11. 2003
Mündliche Prüfung am:	22. 06. 2004
Referenten:	Prof. Dr.-Ing. D. C. Hempel Prof. Dr. rer. nat. C. Wandrey
Vorsitzender:	Prof. em. Dr.-Ing. M. Bohnet

2004

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 4145

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie Jül-4145

D 84 (Diss., Braunschweig, TU, 2004)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461 61-5220 · Telefax: 02461 61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Fermentative Produktion von L-Phenylalanin mit *Escherichia coli* und integrierter Produktabtrennung

In dieser Arbeit wurde ein Fermentationsprozess mit integrierter Produktabtrennung zur Produktion von L-Phenylalanin mit rekombinanten *Escherichia coli* Zellen entwickelt. Die aromatische Aminosäure L-Phenylalanin wird zur Herstellung des Süßstoffs Aspartam verwendet und ist damit eine der wichtigsten kommerziell produzierten Aminosäuren. Im Gegensatz zu chemo-enzymatischen Verfahren kann fermentativ enantiomerenreines L-Phenylalanin aus Glucose hergestellt werden. Daher wurden basierend auf einem Fermentationsprozess im Zulaufverfahren im 20 l Bioreaktor mit Regelung der Glucose- und L-Tyrosin-Zufuhr prozesstechnische Ansätze zur Verbesserung der L-Phenylalanin-Produktion untersucht. Dazu wurden rekombinante, L-Tyrosin-auxotrophe *Escherichia coli* mit Deregulierungen im Aromatenbiosyntheseweg und unterschiedlichen Glucoseaufnahmesystemen verwendet. In Untersuchungen zur L-Phenylalanin-Produktion mit verschiedenen Stämmen wurde gezeigt, dass die für die Produktion geeignete Glucosekonzentration im Medium abhängig vom Glucoseaufnahmesystem des Stamms war. Der beste Produktionsstamm wurde identifiziert. Dieser wurde in Untersuchungen zum Einfluss von Prozessparametern wie Temperatur und pH-Wert sowie Medienbestandteilen eingesetzt. Daraus ergab sich, dass die Raum-Zeit-Ausbeute bei 37 °C am höchsten war, die Produktion jedoch durch eine hohe L-Phenylalanin-Konzentration ($>180\text{--}200\text{ mmol/l}$) inhibiert wurde. Zur Vermeidung einer Produktinhibierung und Verbesserung des Produktionsprozesses wurde ein neues Verfahren zur integrierten Produktabtrennung mittels Kationenselektiver Reaktivextraktion in Zentrifugalextraktoren entwickelt. In Offline-Extraktionen wurde die technische Realisierbarkeit, insbesondere die Phasentrennung und die Stabilität des Systems gezeigt und geeignete Bedingungen für eine Online-Extraktion identifiziert. Durch die Integration der Reaktivextraktion aus zell- und proteinfreiem Permeat in den Fermentationsprozess wurde die Produktbildungsphase deutlich verlängert und bis zum Ende $0,25\text{ mmol/(g\cdot h)}$ L-Phenylalanin produziert. Dabei wurde die Nebenproduktbildung reduziert und das L-Phenylalanin mittels der Extraktion aufkonzentriert. Die Produktkonzentration konnte relativ zum Prozess ohne integrierte Abtrennung um 34 % und die Produkt-Substrat-Selektivität um 28 % gesteigert werden.

Fermentative production of L-phenylalanine with *Escherichia coli* and integrated product separation

In this work a fermentation process with integrated product separation for the production of L-phenylalanine with recombinant *Escherichia coli* was developed. The aromatic amino acid L-phenylalanine is used for the production of the low-calorie sweetener aspartame. It is one of the most important commercially produced amino acids. In contrast to the chemo-enzymatic processes enantiomeric pure L-phenylalanine can be produced in fermentation processes based on glucose. Therefore, technical approaches were investigated to improve the L-phenylalanine production, based on a 20 l fed-batch fermentation process with control of glucose and L-tyrosine feeding. Recombinant L-tyrosine auxotrophic *E. coli* strains with deregulations in the aromatic biosynthesis pathway and different glucose uptake systems were used. Investigations of the L-phenylalanine production with different strains showed that the glucose concentration suitable for production is dependent on the glucose uptake system of the strain. The best production strain was identified and used for investigations of the influence of process parameters as temperature, pH and medium components. The space-time yield was highest at 37 °C but production was inhibited by high L-phenylalanine concentration (>180–200 mmol/l). To avoid a product inhibition and improve the production process a novel approach for integrated separation of L-phenylalanine from a fermentation process with cation-selective reactive extraction in centrifugal extractors was developed. In offline experiments good phase separation and stability of the system were shown. Suitable conditions for online extraction were identified. By integration of reactive extraction from cell and protein free permeate in the fermentation process the production phase was significantly extended and 0,25 mmol/(g·h) L-phenylalanine produced until the end of the fermentation. The byproduct formation was reduced and L-phenylalanine concentrated via the extraction. The product concentration was increased by 34 % and the product-substrate selectivity was increased by 28 % relative to the process without integrated separation.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Problemstellung und Zielsetzung	3
3	Stand des Wissens	7
3.1	Biologische Grundlagen	7
3.1.1	<i>Escherichia coli</i>	7
3.1.2	Stoffwechsel in <i>Escherichia coli</i>	7
3.1.3	L-Phenylalanin-Biosynthese in Produktionsstämmen	13
3.2	Bioprozessentwicklung	16
3.2.1	Bioreaktoren	16
3.2.2	Prozessführung in Bioreaktoren	17
3.2.3	Kinetische Parameter (Zulaufverfahren)	20
3.2.4	Kohlenstoffbilanz (Zulaufverfahren)	22
3.2.5	Verfahren zur Herstellung von L-Phenylalanin	22
3.2.6	Stand der fermentativen L-Phenylalanin-Produktion	23
3.3	Produktaufarbeitung	26
3.3.1	(Reaktiv-)Extraktion	26
3.3.2	Membranverfahren	30
3.3.3	Zentrifugalextraktion	31
3.3.4	CINC-Zentrifugalextraktor	36
3.4	Integration der Produktaufarbeitung in den Produktionsprozess	40
3.4.1	Filtration	40
3.4.2	Integrierte (Reaktiv-)Extraktion	43
3.4.3	Stand der integrierten L-Phenylalanin-Abtrennung mittels Reaktivextraktion	44
4	Produktionsorganismen, apparativer Aufbau und Durchführung der Experimente	47
4.1	Biologisches System	47
4.1.1	Produktionsstämme	47
4.1.2	Stammhaltung und Vorkultur	48
4.2	Fermentationen im Zulaufverfahren im Sixfors vario	48
4.2.1	Online-Analysemethoden	49
4.2.2	Prozessdatenerfassung und Prozesskontrolle	49
4.2.3	Durchführung der Fermentationen	50
4.3	Fermentationen im Zulaufverfahren im 20 l Bioreaktor	52
4.3.1	Online-Analysemethoden	52

4.3.2	Glucosemessung	53
4.3.3	Prozessdatenerfassung und Prozesskontrolle	56
4.3.4	Durchführung der Fermentationen	56
4.3.5	Regelung der Glucosezufuhr	58
4.3.6	L-Tyrosin-Zufuhr	59
4.4	Reaktivextraktion in Flüssig-Flüssig-Zentrifugen	60
4.4.1	Aufbau der Extraktionsanlage	61
4.4.2	Durchführung von Extraktionen mit Modelllösung	62
4.5	Zulaufverfahren im 20 l Bioreaktor mit integrierter Produktabtrennung . .	63
4.5.1	Kontinuierliche Permeatbereitstellung mittels Ultrafiltrationseinheiten	63
4.5.2	Aufbau der Anlage für den integrierten Prozess	65
4.5.3	Durchführung der Fermentationen mit integrierter Produktabtrennung	66
5	Einfluss von Glucoseaufnahmesystemen auf die Produktion	69
5.1	Phosphotransferase-System zur Glucoseaufnahme	69
5.1.1	Fermentation mit dem Stamm <i>E. coli</i> 4pF81	69
5.1.2	Kohlenstoffbilanz	72
5.1.3	Systeme zur Online-Glucosemessung	73
5.2	Glucoseaufnahme über ein heterologes System	75
5.2.1	Einfluss der Glucosekonzentration auf die Produktion	75
5.2.2	Einfluss der Induktion	80
5.3	Vergleich der Produktion mit verschiedenen Stämmen	81
5.3.1	Einfluss der Glucosekonzentration	82
5.3.2	Produktion von L-Phenylalanin und Intermediaten	83
5.3.3	Theoretische und tatsächliche Selektivitäten	85
5.4	Zusammenfassung	87
6	Einfluss verschiedener Fermentationsparameter auf den Prozess	89
6.1	Einfluss von Temperatur und pH-Wert auf die L-Phenylalanin-Produktion	89
6.2	Untersuchungen zum Abbruch der Produktion während des Prozesses . . .	93
6.2.1	Limitierung oder Inhibierung durch Mediumkomponenten?	94
6.2.2	Produktinhibierung	97
6.3	Zusammenfassung	101
7	Integration der Reaktivextraktion in den Fermentationsprozess	103
7.1	Reaktivextraktion in Flüssig-Flüssig-Zentrifugen	103
7.1.1	Phasentrennung und Stabilität	104
7.1.2	Charakterisierung der Reaktivextraktion	106
7.1.3	Parameterwahl für die Online-Extraktion	114
7.2	Fermentationsprozess mit integrierter Reaktivextraktion von L-Phenylalanin	116
7.2.1	Integrierte Produktabtrennung während der gesamten Produktionsphase	116
7.2.2	Integrierte Produktabtrennung mit zwei Extraktionsphasen während der Produktionsphase	120
7.2.3	Integrierte Produktabtrennung über einen Abschnitt der Produktionsphase	123
7.2.4	Selektivität der Produktabtrennung	126

7.2.5	Vergleich der Fermentationen mit integrierter Produktabtrennung .	127
7.2.6	Vergleich von Fermentationen ohne und mit integrierter Produktabtrennung	132
7.3	Zusammenfassung	136
8	Zusammenfassung	139
9	Ausblick	143
A	Anhang	145
A.1	Fehlerbetrachtung	145
A.1.1	Fehlerquellen	145
A.1.2	Datenauswertung	147
A.2	Materialien	148
A.2.1	Medien und Lösungen	148
A.2.2	Geräteparameter des OLGA	152
A.2.3	Geräteparameter des Process TRACE	153
A.2.4	Geräteparameter der HPLC	153
A.2.5	Geräteparameter der GC	154
A.2.6	Ultrafiltrationsmodule	154
A.2.7	Technische Daten der Flüssig-Flüssig-Zentrifugen	154
A.2.8	Chemikalien und Enzyme	155
A.2.9	Geräte und Labormaterialien	155
A.2.10	Software zur Datenaufnahme und -auswertung	156
A.3	Methoden	157
A.3.1	Offline-Analysemethoden	157
A.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	158
A.3.3	TCA-Proteinfällung	159
A.3.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	159
A.3.5	Rasterelektronenmikroskopie	159
A.3.6	Präzipitation von L-Phenylalanin zur Aufreinigung	159
A.3.7	GC-MS und ICP-MS-Analytik	159
A.3.8	GC-Analytik	160
A.3.9	Regelung der Glucosekonzentration	160
A.4	Abbildungen	160
B	Symbol- und Abkürzungsverzeichnis	165

1 Einleitung

Seit Tausenden von Jahren macht sich die Menschheit Mikroorganismen bei der Herstellung von Sauerteig, Bier, Wein und Essig zu Nutze. Mit dem zunehmenden Wissen über die Mikrobiologie wurden Mikroorganismen seit Anfang des 20. Jahrhunderts zur industriellen Herstellung von Produkten wie Zitronensäure und Ethanol eingesetzt. Mit dem Penicillin-Prozess, der vor 60 Jahren durch Integration von klassischer Genetik, organischer Chemie und Verfahrenstechnik entstand, begann die Herstellung pharmazeutischer Produkte. Davon ausgehend wurden Prozesse zur Produktion von weiteren Antibiotika sowie Aminosäuren, Enzymen und Vitaminen entwickelt. Dabei wurden die natürlichen Stoffwechselwege der Mikroorganismen genutzt. Durch klassische, ungerichtete Mutagenese und eine geeignete Prozessstrategie wurden die Organismen hinsichtlich ihrer Produktausbeute optimiert [Schlegel 1992], [Enfors u. a. 2003].

Mit dem Beginn der Entwicklung der molekularen Genetik vor etwa 30 Jahren entstand die moderne Biotechnologie. Durch die Gentechnik wurde die Produktion von Wertstoffen möglich, die über die natürlichen Stoffwechselwege der Mikroorganismen nicht hätten synthetisiert werden können. Zunehmend wurden Biokatalysatoren durch Einbringen heterologer Aktivitäten oder durch gezielte metabolische Veränderungen von enzymatischen, regulatorischen oder Transportfunktionen entwickelt [Bailey 1991]. Damit kann der am besten für die industrielle Produktion geeignete Organismus eingesetzt werden, z.B. *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Aspergillus niger* oder *Saccharomyces cerevisiae*, Säugerzellen oder Insektenzellen. Beispiele für die industrielle biotechnologische Produktion sind die hochmolekularen Substanzen Insulin, Interferon oder Faktor VIII sowie niedermolekulare Aminosäuren oder Vitamine.

Die gesamte industrielle Aminosäureproduktion hat einen Umfang von mehr als einer Million Tonnen pro Jahr. Ohne die drei großen Aminosäuren L-Glutaminsäure, L-Lysin und D,L-Methionin wurde der Markt 2001 mit 90.000 t/Jahr beziffert. Zu den größten Produzenten gehören Ajinomoto, Kyowa Hakko und Degussa [Budzinski 2001]. Die Herstellung von Aminosäuren erfolgt durch chemische Synthese, Extraktion, Fermentation und enzymatische Methoden [Drauz u. a. 2002]. Sie werden als Futtermitteladditive, Bestandteile von Nahrungsmitteln, Pharmazeutika oder in Infusionslösungen und als Ausgangsstoffe für weitere enzymatische oder chemische Synthesen verwendet [Burkovski und Krämer 2002]. Mit einer für 2002 prognostizierten Produktion der aromatischen Aminosäure L-Phenylalanin von 14.000 Tonnen [Budzinski 2001] und einem prognostizierten Umsatz von 850 M US \$ für 2004 [Müller 2001] gehört sie bei steigendem Weltmarktbedarf zu den wichtigsten kommerziell produzierten Aminosäuren. Das L-Enantiomer dieser für den Menschen essentiellen Aminosäure wird hauptsächlich für die Herstellung des Süßstoffs Aspartam (L- α -Aspartyl-L-Phenylalanin-Methylester)

und in geringem Maß für medizinische Zwecke verwendet [Ager u. a. 1998]. Die Holland Sweetener Company, ein Joint Venture der Unternehmen DSM und Tosoh, stellt Aspartam großtechnisch in einem chemo-enzymatischen Verfahren her [Schmid u. a. 2001].

Aminosäuren wie L-Glutaminsäure, L-Lysin oder L-Threonin werden in mikrobiellen Fermentationsverfahren produziert. Die aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tryptophan lassen sich ebenfalls fermentativ und dabei enantiomererein herstellen. Anstelle von toxischen, fossilen Ausgangsmaterialien wie Benzol oder teuren synthetischen Vorstufen kann der nachwachsende Rohstoff D-Glucose, der aus Pflanzenstärke günstig verfügbar ist, verwendet werden [Frost und Lieveense 1994]. Insgesamt erscheinen Fermentationsprozesse, die sich durch milde Bedingungen auszeichnen, nach wirtschaftlichen Aspekten überlegen [Drauz u. a. 2002]. Verschiedene Ansätze zur fermentativen L-Phenylalanin-Produktion wurden in der Vergangenheit entwickelt, beispielsweise mit *C. glutamicum* oder *E. coli*. *E. coli* eignet sich aufgrund des sehr gut bekannten Stoffwechsels, des schnellen Wachstums auf definiertem Medium, das die Produktaufarbeitung vereinfacht und hoher Selektivitäten [Bongaerts u. a. 2001].

Als Voraussetzung für die technische Entwicklung eines Bioprozesses zur Produktion von L-Phenylalanin muss ein geeigneter Produktionsstamm zur Verfügung stehen. Die weitere Bioprozessentwicklung umfasst den Fermentationsprozess und die Produktaufarbeitung. Bei der Fermentationsprozessentwicklung steht die Optimierung von Kultivierungsparametern, Reaktorauslegung, Prozessführung und -regelung zur Steigerung von Effizienz und Produktivität im Mittelpunkt. Die abschließende Produktaufarbeitung dient zur Abtrennung und Aufreinigung des Produktes [Weatherley 1994].

Am Ende eines Fermentationsprozesses liegen die Produkte in geringer Konzentration in wässriger Lösung in einem Gemisch aus Produkt, Salzen, organischen Säuren, Proteinen, Zellmatrix, intakten Zellen und weiteren Bestandteilen vor. Dadurch liegt der Anteil der Kosten der Aufarbeitung an den gesamten Produktionskosten zwischen 15 % (z.B. bei Ethanol) und mehr als 80 % bei der Herstellung hochwertiger rekombinanter Proteine [Stanbury u. a. 1995], [Weatherley 1994]. Zumeist wird das Produkt erst im Anschluss an die fermentative Produktion aufgearbeitet. Eine Abtrennung bereits während des Bioprozesses kann jedoch Vorteile bieten, beispielsweise die Vermeidung von Inhibierungen durch hohe Produktkonzentrationen während des Produktionsprozesses. Daneben kann die Anzahl der nachfolgenden Aufarbeitungsschritte durch ein *In situ*-Aufarbeitungsverfahren reduziert werden. Ein wirtschaftlicher Vorteil besteht darin, dass Investitionskosten bei einer kontinuierlichen Aufarbeitung durch die kleineren Volumenströme gesenkt werden können [Freeman u. a. 1993]. Auch durch eine Rückführung des Nährstoffe enthaltenden Mediums lassen sich Kosten sparen [Martak u. a. 1997]. Dennoch ist eine *In situ*-Abtrennung anstelle einer separaten Produktaufarbeitung nach dem Produktionsende selten. Die Begründung dafür liegt in den erhöhten Anforderungen, die an ein integriertes Aufarbeitungsverfahren gestellt werden, um eine Beeinträchtigung des Produktionsprozesses zu vermeiden. So muss ein Einfluss auf die Reaktionsbedingungen und ein Eintrag toxischer Substanzen ausgeschlossen werden. Dennoch wurden Produktionsprozesse beschrieben, die durch eine integrierte Aufarbeitung verbessert werden konnten [Wieczorek und Brauer 1998], [Gerigk u. a. 2002b], [Maaß u. a. 2002].

2 Problemstellung und Zielsetzung

Die aromatische Aminosäure L-Phenylalanin ist als Bestandteil des Süßstoffs Aspartam eine der wichtigsten Aminosäuren. Der Weltmarktbedarf an diesem Produkt ist weiter steigend. Im Rahmen eines Bioregio-Projektes (Projekt-Nr. 0311644) sollte ein Prozess zur fermentativen Produktion von L-Phenylalanin mit rekombinanten *Escherichia coli* entwickelt werden. Dazu gehörten die Stammentwicklung, die Entwicklung des Fermentationsprozesses und die Entwicklung eines Aufarbeitungsverfahrens, die von den Kooperationspartnern Institut für Biotechnologie 1 und 2, der DSM Biotech GmbH und der DSM Research zu erarbeiten waren.

Die Produktionsstämme wurden im Institut für Biotechnologie 1 in Zusammenarbeit mit der DSM Biotech GmbH durch gezieltes „Metabolic Engineering“ entwickelt. Durch die rationale Entwicklung sollte das Verständnis der Stoffwechselprozesse verbessert und daraus sukzessiv weitere Verbesserungsmöglichkeiten abgeleitet werden.

Zur Produktion von L-Phenylalanin mit *E. coli* wurde im Rahmen des Teilprojektes von Gerigk ein Fermentationsprozess im Zulaufverfahren entwickelt [Gerigk 2001]. Dazu wurden rekombinante, L-Tyrosin-auxotrophe *E. coli* Stämme mit Deregulierungen im Aromatenbiosyntheseweg verwendet. Die Konzentrationen der Substrate Glucose und L-Tyrosin wurden über die Zufuhrdaten geregelt. Damit war ein reproduzierbarer und für verschiedene Stämme verwendbarer Prozess gegeben. Den Untersuchungen zufolge war die L-Tyrosin-sensitive DAHP-Synthase (AroF), das Eingangsenzym der Aromatenbiosynthese, unter L-Tyrosin-limitierten Bedingungen aktiver und führte zu verbesserter Produktion als eine gegen Feedback-Inhibierung resistente DAHP-Synthase. Eine Glucose-Konzentration von 5 g/l war als geeignet für die Produktion ermittelt worden. Im 20 l Bioreaktor wurde nach 50 Stunden eine Produktkonzentration von ≈ 34 g/l erreicht. Die L-Phenylalanin-Glucose-Selektivität lag am Ende bei 13,2 mol/mol % und die Raum-Zeit-Ausbeute bei 0,63 g/(l·h). Zudem wurde ein Scale-up vom 20 l Bioreaktor in den 300 l Pilotbioreaktor durchgeführt. Die Produktbildung nahm in diesen Fermentationen jedoch in den letzten Prozessstunden stark ab. Diese Abnahme war wahrscheinlich auf die Inhibierung der DAHP-Synthase AroF durch hohe L-Phenylalanin-Konzentrationen zurückzuführen [Jossek 2000], [Backman u. a. 1990].

Eine Inhibierung durch L-Phenylalanin kann durch genetische Veränderungen oder durch prozesstechnische Ansätze umgangen werden. Als technischer Ansatz bietet sich hierbei die sofortige Abtrennung des Produktes aus dem Fermentationsprozess während der Produktion an. Dadurch werden eine Produktinhibierung vermieden, die Produktausbeute gesteigert und gleichzeitig die Produktionskosten gesenkt [Schuegerl 2000].

Von Maaß wurde mit Untersuchungen zur Reaktivextraktion von L-Phenylalanin in Hohlfasermembranmodulen zur Abtrennung ein prozesstechnischer Ansatz verfolgt [Maaß 2001]. Von den für Extraktion- und Rückextraktion getesteten Stoffsystemen wurde das System aus dem Kationen-selektiven Carrier D₂EHPA in dem organischen Lösungsmittel Kerosin und Schwefelsäure als Akzeptor zur Rückextraktion als optimal identifiziert. Der Carrier hatte in niedrigen Konzentrationen keinen toxischen, sondern im Gegenteil einen positiven Effekt auf die Produktion. Basierend auf diesen Untersuchungen wurde ein Fermentationsprozess mit integrierter L-Phenylalanin-Abtrennung entwickelt. Dabei dienten die Hohlfasermembranmodule zur Trennung der Fermentationslösung von der organischen Phase. In einem Experiment im 300 l Pilotbioreaktor mit integrierter Reaktivextraktion stieg die Produktkonzentration im Vergleich zu einem Experiment ohne Abtrennung nur um 3 g/l auf 32 g/l und wurde folglich kaum verbessert. Dagegen konnte die Selektivität von 12,5 mol/mol % auf 16,5 mol/mol % gesteigert werden. Mittels dieses Prozesses konnte L-Phenylalanin selektiv abgetrennt und aufkonzentriert werden. Nach der Präzipitation aus der Akzeptorlösung wurde eine Produktreinheit von 98 % erreicht. Die Aufarbeitung wurde damit auf die drei Schritte Extraktion, Rückextraktion und Produktreinigung durch Präzipitation reduziert [Maaß 2001], [Gerigk 2001].

Bei diesem Verfahren wurden jedoch technische Probleme festgestellt, die ein Scale-up verhindern könnten. Die Grenzflächenstabilität zwischen wässriger und organischer Phase in den Poren der Hohlfasermembranmodule ist abhängig von der transmembranen Druckdifferenz. Daher können Druckschwankungen während des Prozesses zu Phaseninstabilitäten und Durchbrüchen führen, die zum Abbruch des Prozesses führen würden. Dazu kommt die aufgrund der laminaren Strömung in den Hohlfasern geringe Stoffübertragung. Dadurch war die L-Phenylalanin-Abtrennung nicht ausreichend, um die L-Phenylalanin-Konzentration im Bioreaktor niedrig zu halten. Bei der integrierten Extraktion in Hohlfasermembranmodulen wurde weniger als 1/3 des produzierten L-Phenylalanins abgetrennt. Für ein Scale-up würden demzufolge große Membranflächen benötigt. Da die Module eine limitierte Standzeit haben, wäre die Verwendung zudem mit hohen Kosten verbunden. Die Reaktivextraktion selbst kann dennoch als vielversprechende Abtrennungstechnik angesehen werden.

Im Vergleich zu den beschriebenen Verfahren wurde mit einem gegen Inhibierung durch L-Phenylalanin resistenten Stamm in einer Fermentation im Zulaufverfahren eine L-Phenylalanin-Konzentration von 46 g/l bei einer Biomassekonzentration von 40 g/l erreicht. Die L-Phenylalanin-Glucose-Selektivität lag in diesem Prozess nach 50 Stunden bei 17,4 %, die Raum-Zeit-Ausbeute bei 0,85 g/(l·h) [Konstantinov u. a. 1991]. Von Backman u. a. [Backman u. a. 1990] wurde die Produktion von 50 g/l L-Phenylalanin mit einem gegen Inhibierung durch L-Phenylalanin resistenten Stamm beschrieben.

Das **Ziel dieser Arbeit** war die Verbesserung des Verfahrens zur Produktion von L-Phenylalanin mit rekombinanten *Escherichia coli*. Dies sollte basierend auf den von Gerigk und Maaß entwickelten Verfahren erfolgen [Gerigk 2001], [Maaß 2001]. So sollten die Produktkonzentration, die L-Phenylalanin-Glucose-Selektivität und die Raum-Zeit-Ausbeute durch prozesstechnische Ansätze gesteigert werden. Dabei sollte bis zum Ende der Fermentation eine hohe Produktbildungsrate aufrecht erhalten werden. Sowohl Reproduzierbarkeit als auch die prinzipielle Möglichkeit eines Scale-up sollten gegeben sein.

1. L-Phenylalanin-Produktion mit *E. coli* Stämmen mit unterschiedlichen Glucoseaufnahmesystemen

Stämme mit unterschiedlichen Glucoseaufnahmesystemen sollten zur L-Phenylalanin-Produktion eingesetzt, stoffwechselphysiologisch charakterisiert und schließlich der beste Produzent identifiziert werden. Die zur Verfügung stehenden Stämme waren L-Tyrosin-auxotroph und enthielten Deregulierungen im Aromatenbiosyntheseweg. Enzyme aus dem Aromatenbiosyntheseweg wurden plasmidkodiert überexprimiert. Die Glucoseaufnahme erfolgte entweder über das Glucose-spezifische Phosphotransferase-System oder über ein heterologes System. Bei letzterem wurde die Glucose über den Glucose-Facilitator aus *Zymomonas mobilis* aufgenommen und durch eine Glucokinase phosphoryliert. Im Gegensatz zur Glucoseaufnahme über das Phosphotransferase-System wird dabei kein Phosphoenolpyruvat verbraucht. Eine verbesserte Bereitstellung dieses Vorläufermetaboliten sollte zu einer höheren L-Phenylalanin-Produktion führen.

Die Kapazität der Glucoseaufnahme der Zellen mit heterologem Glucoseaufnahmesystem war sowohl für das Wachstum als auch die Produktion der Stämme essenziell. Daher sollte der Einfluss der Glucosekonzentration sowie der Einfluss der Induktion auf die Produktion untersucht werden. Da die Glucoseaffinität der beiden Glucoseaufnahmesysteme unterschiedlich ist (Phosphotransferase-System: $K_m=3-10 \mu\text{mol/l}$ [Postma u. a. 1993]; Glucose-Facilitator: $K_m=4,1 \text{ mmol/l}$ [Weisser 1996]) war es möglich, dass der Einfluss der Glucosekonzentration bei beiden Systemen unterschiedlich war. Durch intensive Prozessanalytik sollte das Verständnis der ablaufenden Stoffwechselvorgänge verbessert werden. Der beste L-Phenylalanin-Produzent sollte für die weiteren Arbeiten zur Prozessverbesserung verwendet werden.

2. Einfluss von Prozessparametern und Identifizierung einer Limitierung oder Inhibierung der L-Phenylalanin-Produktion

In Vitro-Experimenten zufolge war die Enzymaktivität der L-Tyrosin-sensitiven DAHP-Synthase (AroF), dem Eingangsenzym der Aromatenbiosynthese, bei einer Temperatur von 33 °C höher als bei 37 °C [Jossek 2000]. Dagegen ist das Wachstum von *E. coli* bei einer Temperatur von 37 °C optimal. Bei niedrigerer Temperatur laufen chemische und enzymatische Reaktionen in der Zelle langsamer ab. Der pH-Wert beeinflusst ebenfalls die Reaktionsraten verschiedenster Reaktionen und Enzyme [Ingraham und Marr 1996]. Unter Verwendung des besten L-Phenylalanin-Produzenten sollte daher der Einfluss der Prozessparameter Temperatur und pH-Wert auf den Fermentationsprozess und die L-Phenylalanin-Produktion untersucht werden.

In der Arbeit von Gerigk wurde deutlich, dass die Produktbildung während des Prozesses nach 30-40 Stunden abnahm und in einigen Experimenten sogar abbrach [Gerigk 2001]. Als Ursache war eine Inhibierung der Produktion durch hohe L-Phenylalanin-Konzentrationen anzunehmen, aber auch eine Inhibierung oder Limitierung durch Mediumkomponenten oder eine Kombination mehrerer Einflussgrößen war möglich. Um die Einflüsse genauer zu untersuchen, sollten sowohl Untersuchungen zum Einfluss von Mediumbestandteilen als auch zum Einfluss hoher L-Phenylalanin-Konzentrationen auf die Produktion durchgeführt werden.

3. Untersuchungen zur integrierten Produktabtrennung und Aufkonzentrierung mittels Reaktivextraktion in Flüssig-Flüssig-Zentrifugen

Um eine Inhibierung durch hohe L-Phenylalanin-Konzentrationen zu vermeiden, das System zur integrierten Reaktivextraktion zu vereinfachen und die Produktion zu verbessern, sollte ein neues Verfahren zur integrierten Abtrennung von L-Phenylalanin untersucht werden. Dadurch sollte eine hohe Produktbildungsrate mit gleichzeitig hohen Raum-Zeit-Ausbeuten bis zum Ende der Fermentation aufrecht erhalten werden.

Ein Verfahren zur integrierten Produktabtrennung sollte einfach und robust sein. Flüssig-Flüssig-Zentrifugen sind robuster als Hohlfasermembranmodule in Bezug auf Druckschwankungen. Zudem ist in Zentrifugen der Stoffübergang höher, da turbulente Bedingungen herrschen. Allerdings können dadurch auch größere Mengen von organischem Lösungsmittel eingetragen werden, die für die Mikroorganismen toxisch sein könnten. Ein Scale-up ist bei Verwendung von Zentrifugen grundsätzlich möglich.

Bevor Flüssig-Flüssig-Zentrifugen in der Online-Produktabtrennung eingesetzt werden konnten, war die technische Realisierbarkeit zu zeigen. Dazu sollten insbesondere die Phasentrennung und die Stabilität des Systems untersucht werden. Weiterhin sollte die Extraktionsleistung des Systems abhängig von der Zusammensetzung der wässrigen Phasen und der organischen Phase des Stoffsystems sowie der Zentrifugenparameter bestimmt werden. Mittels dieser Untersuchungen sollten geeignete Einstellungen für eine Online-Extraktion ermittelt werden. Diese Einstellungen sollten so gewählt werden, dass die Konzentration des L-Phenylalanins im Bioreaktor konstant gehalten oder sogar abgesenkt wurde.

Basierend auf diesen Experimenten sollte die Reaktivextraktion in den Fermentationsprozess integriert werden. Dazu war eine dauerhaft stabile Zellrückhaltung über einen Umlauf und die Bereitstellung von zellfreiem Permeat für die Reaktivextraktion zu gewährleisten. In diesem Umlauf durften die Zellen nicht durch Gradientenbildung und nachfolgende Sauerstofflimitierung beeinflusst werden.

Zunächst sollte untersucht werden, ob ein stabiles integriertes Extraktionssystem über die Fermentationsdauer aufrecht erhalten werden konnte. Danach sollte der Einfluss der Reaktivextraktion auf den Fermentationsprozess und die Zellen untersucht werden. Trat ein toxischer Effekt auf, so sollten Ansätze zu dessen Vermeidung entwickelt werden. Schließlich war der Einfluss der Produktabtrennung auf den Gesamtprozess und die L-Phenylalanin-Produktion zu untersuchen. Durch verschiedene Prozessführungsvarianten sollte der integrierte Prozess möglichst optimiert werden.

Die integrierte Produktabtrennung sollte durch die Verwendung von Zentrifugalextraktoren anstelle von Hohlfasermembranmodulen vereinfacht und der Prozess insgesamt verbessert werden. Durch die verschiedenen in dieser Arbeit zu untersuchenden prozesstechnischen Ansätze sollten Parameter wie L-Phenylalanin-Konzentration, Raum-Zeit-Ausbeute und L-Phenylalanin-Glucose-Selektivität gesteigert werden.

3 Stand des Wissens

3.1 Biologische Grundlagen

3.1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli ist ein Gram-negatives, stäbchenförmiges, peritrich begeißeltes, nicht sporenbildendes Bakterium, das zur Gruppe der Enterobacteriaceae gehört. Entdeckt wurde es 1885 von Theodor Escherich als Darmbakterium. Daher dient *E. coli* auch zum Nachweis fäkalen Verunreinigungen im Trinkwasser [Schlegel 1992]. *E. coli* ist der molekularbiologisch am besten untersuchte Organismus und ist damit zu einem Modellorganismus in Molekular- und Mikrobiologie geworden [Roempp 1999]. Das Genom von *E. coli* K12 ist vollständig sequenziert [Blattner u. a. 1997]. Das Bakterium ist anspruchslos und zeichnet sich durch schnelles Wachstum auf komplexen Nährmedien mit einer Generationszeit von 0,3–1 h bei 37 °C und pH 6–8 aus. Auf synthetischen Nährmedien aus Kohlenstoffquelle, Stickstoffquelle und Mineralsalzen ist es einfach zu kultivieren. Als fakultativ anaerobes Bakterium kann *E. coli* unter aeroben und anaeroben Bedingungen wachsen [Madigan u. a. 1997]. Aufgrund dieser Eigenschaften und der zur Verfügung stehenden molekulargenetischen Methoden wird *E. coli* häufig als Biokatalysator in biotechnologischen Prozessen verwendet. Mit der fermentativen Produktion von Insulin hat *E. coli* industrielle Bedeutung erlangt. Darüber hinaus wird es beispielsweise zur Produktion von Aminosäuren, Enzymen oder heterologen Proteinen wie Interferonen oder Somatostatin verwendet [Roempp 1999].

3.1.2 Stoffwechsel in *Escherichia coli*

E. coli kann Substrate wie Glucose, Fructose, Mannose, Glycerin oder organische Säuren als Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen. Als Substrat in Nährmedien wird häufig Glucose eingesetzt.

Glucoseaufnahme über das Phosphotransferase-System

Die Glucoseaufnahme in *E. coli* erfolgt über das Phosphotransferase-System (PT-System) mittels Gruppentranslokation. Dabei ist der Transport des Substrats an eine chemische Reaktion, die Phosphorylierung der Glucose, gekoppelt. Die Energie wird von Phosphoenolpyruvat (PEP), einem Intermediat der Glykolyse, bereitgestellt, das zu Pyruvat umgewandelt wird. Das PT-System ist in Abb. 3.1 dargestellt. Die Phosphatgruppe des PEP wird über eine Phosphorylierungskette aus den Enzymen EI, HPr, EIIA und EIIB auf das Glucosemolekül übertragen. Die Umwandlung von PEP in Pyruvat wird durch das unspezifische Protein EI katalysiert. Über das unspezifische Enzym HPr wird die Phosphatgruppe weiter an die Domäne EIIA^{Glc} des Glucose-spezifischen EII-Proteins

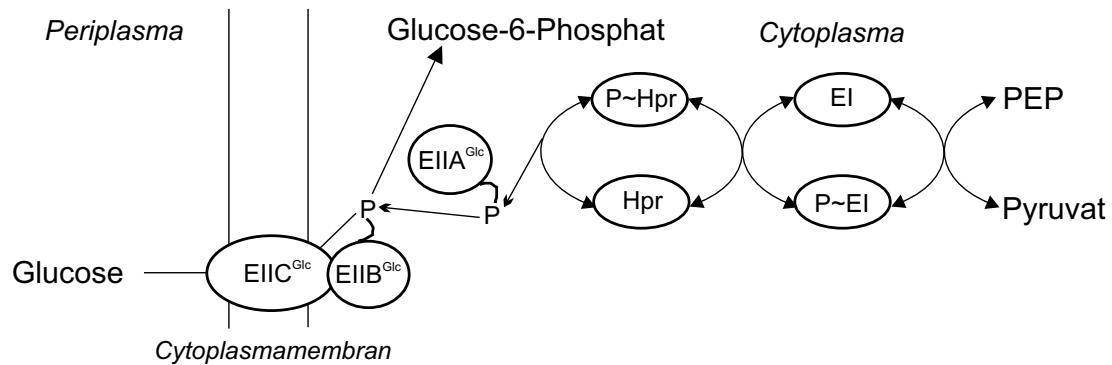


Abb. 3.1: Glucoseaufnahme in *E. coli* über das Phosphotransferase-System; P weist auf die Phosphorylierung der Enzyme EI, HPr, EIIA und EIIB hin

übertragen und von dort an EIIB^{Glc}. Über die membranständige Domäne EIIC^{Glc}, die einen Transportkanal ausbildet, wird die Glucose in die Zelle aufgenommen. Die Phosphatgruppe wird auf die Glucose übertragen und Glucose-6-Phosphat wird in das Zellinnere entlassen [Postma u. a. 1993], [Lengeler u. a. 1999].

Neben dem PT-System für Glucose existieren in der Zelle verschiedene weitere PT-Systeme für andere Zucker, beispielsweise Fructose und Mannose, die jeweils eine hohe Substratspezifität haben. Glucose wird mit hoher Affinität über das Glucose-spezifische PT-System transportiert ($K_m=3-10 \mu\text{mol/l}^1$) [Postma u. a. 1993]. Ein Zucker kann über verschiedene PT-Systeme mit unterschiedlicher Affinität aufgenommen werden. Bei höheren Glucosekonzentrationen kann der Transport z.B. über das Mannose-spezifische PT-System erfolgen. Die Affinität dieses Systems für Glucose ist deutlich geringer ($K_m \approx 1 \text{ mmol/l}$) [Ferenci 1996]. Bei externen Glucosekonzentrationen unter 1 mmol/l wird Glucose zusätzlich über das Mgl-System, ein ATP-getriebenes System, aufgenommen [Ferenci 1999].

Glucoseaufnahme über ein heterologes System aus *Zymomonas mobilis*

Zymomonas mobilis ist ein Gram-negatives, anaerobes, aber aerotolerantes Bakterium, das an der Fermentation zuckerhaltiger Pflanzensäfte beteiligt ist. *Z. mobilis* wächst auf Glucose, Fructose oder Saccharose und hat eine hohe Zucker- und Ethanoltoleranz. Es wächst noch bei Glucosekonzentrationen von bis zu 40 % (v/v) [Swings und DeLey 1977], [Weuster-Botz 1991]. Die Zucker werden über den Entner-Doudoroff-Weg (2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogluconat-Weg) zu Pyruvat und weiter zu Ethanol und Kohlendioxid abgebaut [Sahm u. a. 1992]. Der Entner-Doudoroff-Weg liefert nur je ein Mol ATP, NADH₂ und NADPH₂ pro Mol umgesetztes Monosaccharid [Schlegel 1992].

Die Glucoseaufnahme erfolgt in *Z. mobilis* mittels erleichterter Diffusion (Uniport) über den Glucose-Facilitator, ein Membranprotein. Dieser Carrier-vermittelte Transport ist unabhängig von weiteren Soluten und dem Energiezustand der Zelle. Eine interne Akkumulation von Substrat ist nicht möglich. Die Substrataufnahme wird durch den Substratgradienten angetrieben. Während die Transportrate dieses Systems hoch ist, ist die Affinität

¹Die Michaelis-Menten-Konstante K_m gibt die Konzentration bei halbmaximaler Transportrate an und charakterisiert damit die Affinität des Systems für das Substrat.

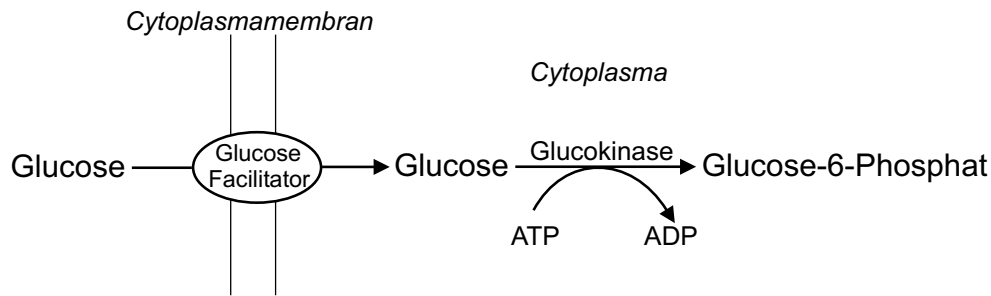


Abb. 3.2: Heterologes Glucoseaufnahmesystem aus *Zymomonas mobilis* bestehend aus Glucose-Facilitator und Glucokinase

niedrig ($K_m \approx 4,1 \text{ mmol/l}$ [Weisser 1996]). Nach der Aufnahme wird die Glucose in der Zelle unter ATP-Verbrauch durch eine Glucokinase phosphoryliert. Das Einbringen des Glucose-Facilitators in *E. coli* mit deletiertem PT-System ermöglicht eine Aufnahme von Glucose [Snoep u. a. 1994], [Weisser u. a. 1995] (siehe Abb. 3.2).

Aerober und Anaerober Stoffwechsel

Als fakultativ anaerober Organismus kann *E. coli* Energie aerob durch Atmung oder anaerob durch gemischte Säuregärung gewinnen (siehe Abb. 3.3). Aerob wird Glucose-6-Phosphat über den Fructose-1,6-Bisphosphatweg (Glycolyse) und den Pentosephosphatweg, die zentralen konstitutiven Stoffwechselwege, abgebaut. Ein induzierbarer Weg ist der 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogluconat-Weg, über den in *E. coli* Gluconat verstoffwechselt wird [Lengeler u. a. 1999].

Bei der Glycolyse wird Glucose-6-Phosphat über mehrere Zwischenstufen zu Glyceraldehyd-3-Phosphat und über weitere Zwischenstufen unter Bildung von ATP zu Phosphoenolpyruvat (PEP) umgewandelt. Aus PEP wird Pyruvat gebildet, wobei ATP entsteht. Phosphoenolpyruvat und Pyruvat sind Ausgangsintermediate für verschiedene Biosynthesewege. So ist PEP Vorläufermetabolit der Aromatenbiosynthese. Unter Abspaltung von Kohlendioxid wird Pyruvat weiter zu Acetyl-CoA umgewandelt. Acetyl-CoA wird im Tricarbonsäurezyklus (TCS-Zyklus) mit Oxalacetat gekoppelt, woraus Citrat entsteht. Über Dehydrierungs-, Decarboxylierungs- und Oxidationsreaktionen und Bildung von Kohlendioxid entsteht wieder Oxalacetat. Ausgehend vom TCS-Zyklus werden verschiedene Zellbestandteile gebildet. Zum Ausgleich der dazu aus dem TCS-Zyklus entzogenen Intermediate wird Oxalacetat über anaplerotische Reaktionen (Auffüllreaktionen) kontinuierlich regeneriert. Zudem erfolgt über den TCS-Zyklus die Bildung von Energie in Form von ATP. Die bei der Oxidation der Intermediate frei werdenden Elektronen werden auf die Coenzyme NAD und FAD übertragen. In der Atmungskette werden die Reduktionsäquivalente in Form von Elektronen und Wasserstoffprotonen von NADH und FADH auf Sauerstoff übertragen. Über die Elektronentransportphosphorylierung entsteht im Gegenzug ATP. *E. coli* bildet über Glycolyse, TCS-Zyklus und Atmungskette unter aeroben Bedingungen insgesamt 26 mol ATP pro mol Glucose [Schlegel 1992].

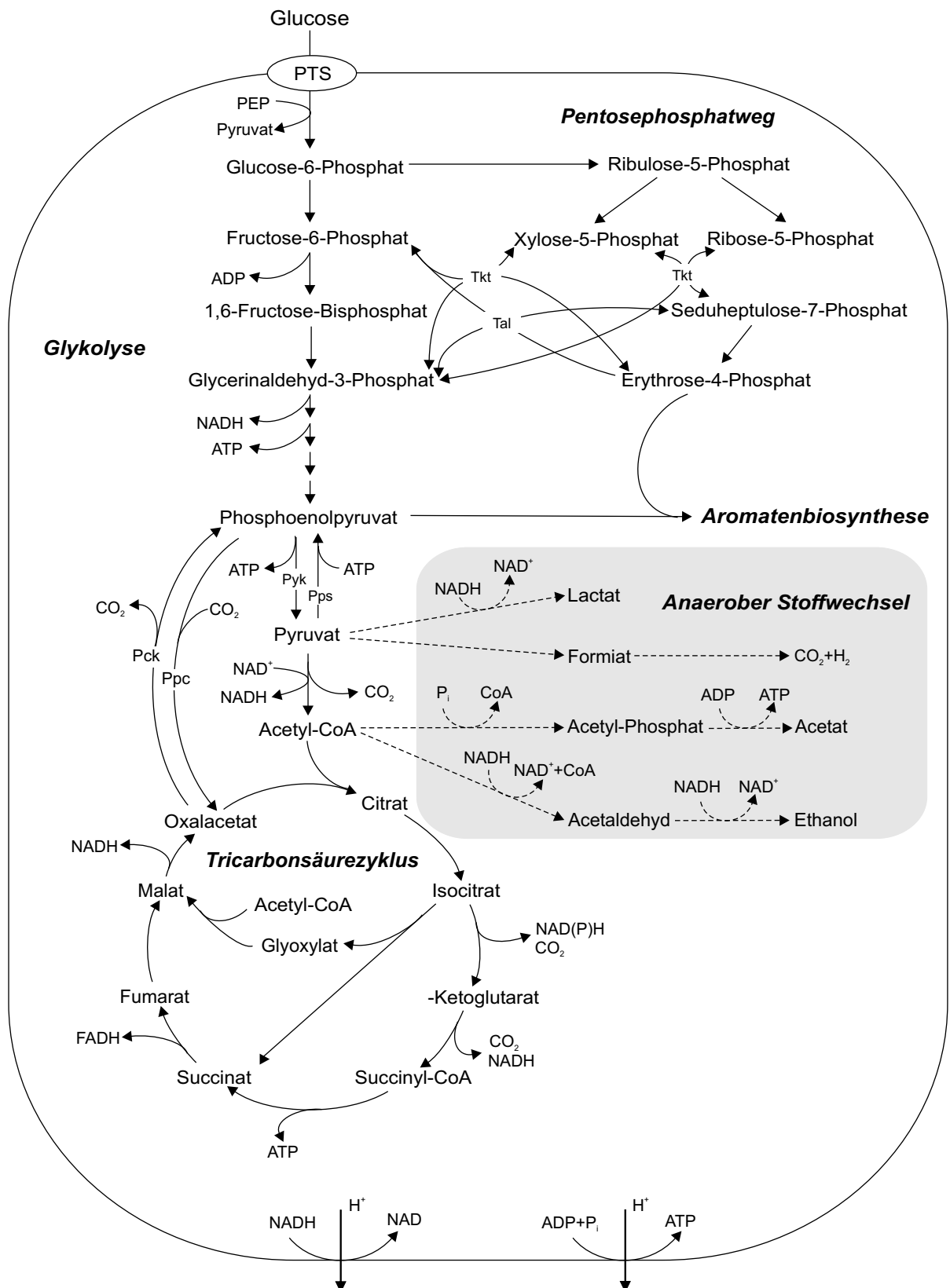


Abb. 3.3: Wichtige Stoffwechselwege in *Escherichia coli*; aerober und anaerober Stoffwechsel (PEP: Phosphoenolpyruvat, Tal: Transaldolase, Tkt: Transketolase, Pps: PEP-Synthase, Pyk: Pyruvatkinase, Ppc: PEP-Carboxylase, Pck: PEP-Carboxykinase)

Über den oxidativen Pentosephosphatweg werden Hexosephosphate und Pentosephosphate ineinander umgewandelt. Reduktionsäquivalente (NADPH) und Pentosen für die Biosynthese, wie das für die Nucleotidsynthese wichtige Ribose-5-Phosphat werden gebildet. Zudem entsteht Erythrose-4-Phosphat, das für die Synthese aromatischer Metabolite verwendet wird.

Unter anaeroben Bedingungen ist kein Sauerstoff als Elektronenakzeptor vorhanden. *E. coli* gewinnt unter diesen Bedingungen Energie durch gemischte Säuregärung. Die Spaltprodukte der Glucose dienen dabei zugleich als Elektronendonatoren und -akzeptoren. Aus Pyruvat werden Lactat und Formiat gebildet. Formiat wird zu Kohlendioxid und Wasserstoff umgewandelt. Acetyl-CoA wird zu Acetat und Ethanol metabolisiert. Bei der Bildung von Acetat entsteht ATP. Aus Phosphoenolpyruvat wird Succinat gebildet [Boeck und Sawers 1996]. Pro mol Glucose werden nur 1–4 mol ATP gebildet. Um ausreichend Energie zu gewinnen, muss daher mehr Substrat umgesetzt werden als bei aerobem Stoffwechsel [Schlegel 1992].

Auch unter aeroben Bedingungen und dabei hohen Glucosekonzentrationen kann Acetat gebildet werden. Die aerobe Acetatbildung wird als Glucose-Überschussstoffwechsel oder bakterieller Crabtree-Effekt bezeichnet. Abbauprodukte aus der Glycolyse akkumulieren. Acetyl-CoA wird über Acetyl-Phosphat zu Acetat umgesetzt. Der Überschussstoffwechsel kann auch als Ungleichgewicht zwischen Substrataufnahme und dem Bedarf der Zelle für Biosynthese und Energieproduktion beschrieben werden [Holms 1996]. Durch die Acetatbildung wird Energie gewonnen. Pro mol Acetat wird ein mol ATP gebildet [Ko u. a. 1993]. Damit könnte der Zelle eine zusätzliche Möglichkeit zur ATP-Gewinnung zur Verfügung stehen, wenn die respiratorische Kapazität der Zelle erschöpft ist [Andersen und von Meyenburg 1980]. Die aerobe Acetatproduktion inhibiert jedoch Wachstum und Proteinproduktion [Luli und Strohl 1990], [Shimizu u. a. 1988]. Eine Reduzierung der Acetatbildung kann durch genetische Veränderungen der Zellen erreicht werden. So wurde bei Zellen mit inaktivem PT-System keine Acetatproduktion beobachtet, jedoch war die Wachstumsrate gleichzeitig um 50 % reduziert [Ponce u. a. 1998]. Daneben kann eine Reduzierung der aeroben Acetatbildung durch die Erhöhung der anaplerotischen Flüsse erreicht werden [Farmer und Liao 1997].

Aromatenbiosynthese

Die aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan werden über den Aromatenbiosyntheseweg gebildet, der in Abb. 3.4 dargestellt ist. Phosphoenolpyruvat (PEP) aus der Glycolyse und Erythrose-4-Phosphat (E4P) aus dem Pentosephosphatweg werden in der Eingangsreaktion des Aromatenbiosyntheseweges durch drei Isoenzyme der 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat-Synthase (DAHP-Synthase) zu DAHP kondensiert. Daraus entsteht über Shikimat und mehrere Zwischenschritte unter Einbau eines zweiten PEP-Moleküls Chorismat. Aus Chorismat wird über Anthranilat in mehreren Schritten L-Tryptophan gebildet. L-Tyrosin und L-Phenylalanin werden über Prephenat und Phenylpyruvat, bzw. 4-Hydroxyphenylpyruvat aus Chorismat gebildet. Neben den aromatischen Aminosäuren werden Ausgangsmetabolite für die Synthese von para-Aminobenzoesäure, Folsäure, Menachinon und weiterer Metabolite gebildet [Pittard 1996].

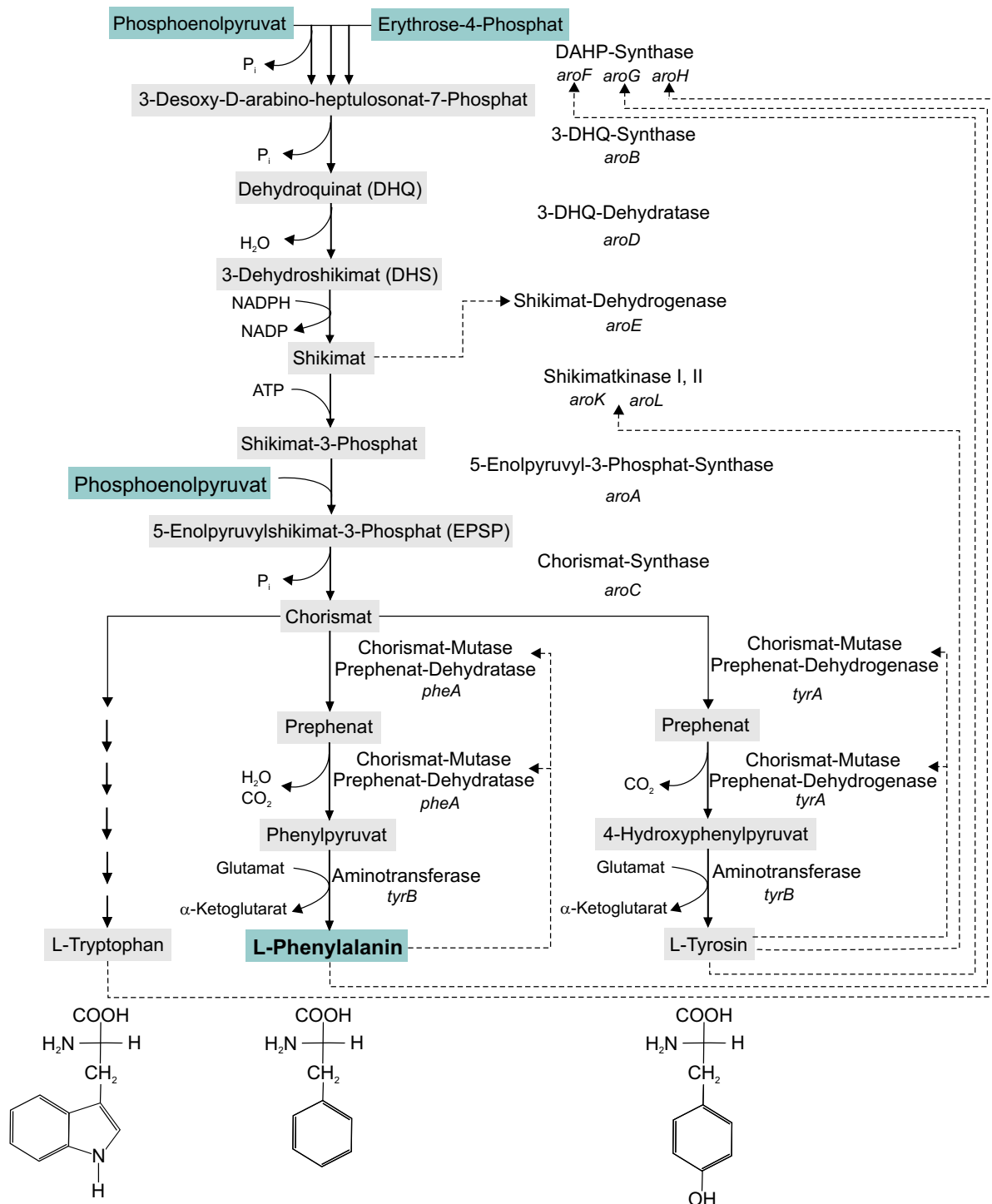


Abb. 3.4: Schema des Aromatenbiosyntheseweges in *Escherichia coli* mit den aromatischen Aminosäuren L-Tryptophan, L-Phenylalanin und L-Tyrosin

Der Aromatenbiosyntheseweg ist sowohl durch die genetische Regulation über Attenuation und Repression, als auch durch die Endprodukthemmung von Enzymen reguliert [Pittard 1996]. Über diese Systeme wird die Produktion aromatischer Metabolite genau an den Bedarf der Zelle angepasst. Sowohl die DAHP-Synthase als auch die Enzyme Chorismatmutase/Prephenatdehydratase bzw. Prephenatdehydrogenase werden durch die Endprodukte gehemmt. Die drei Isoenzyme der DAHP-Synthase sind Eisen-abhängige Metalloenzyme, die allosterisch durch L-Tyrosin (AroF), L-Phenylalanin (AroG) und L-Tryptophan (AroH) inhibiert werden. Abhängig von ihrer Konzentration hemmen die Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tyrosin die jeweils spezifische DAHP-Synthase bis zu 95 %, während die durch *aroH* kodierte DAHP-Synthase nur zu maximal 60 % durch L-Tryptophan inhibiert wird. Die L-Tyrosin-spezifische DAHP-Synthase ist auch auf der Ebene der Transkription reguliert, wobei die aromatische Aminosäure als Korepressor dient. Die Repression erfolgt durch Aktivierung des *tyrR*-Regulons [Pittard 1996]. Bereits bei 36 mg/l L-Tyrosin liegt die Inhibierung der Enzymaktivität bei 86 % [Foerberg und Haeggstroem 1988]. Das Gen *aroL*, das die Magnesium-abhängige Shikimatkinase II kodiert, wird bei erhöhten L-Tyrosin und L-Tryptophan-Konzentrationen ebenfalls auf Transkriptionsebene durch Aktivierung des *tyrR*-Regulons reprimiert. Es erfolgt eine Reduktion bis auf 10 % [Ely und Pittard 1979]. Die Chorismatmutase/Prephenatdehydrogenase wird durch Attenuation durch L-Tyrosin, die Chorismatmutase/Prephenatdehydratase durch Attenuation durch L-Phenylalanin reprimiert. Darüber hinaus wurde eine Feedback-Inhibierung der Shikimat-Dehydrogenase durch Shikimat festgestellt [Dell und Frost 1993]. Alle anderen an der Aromatenbiosynthese beteiligten Enzyme werden nicht reguliert bzw. die Mechanismen sind nicht bekannt.

Die aromatischen Aminosäuren werden über das allgemeine Transportprotein AroP sowie über für die einzelnen Aminosäuren spezifische Proteine in die Zelle transportiert [Sarsero u. a. 1991], [Pi u. a. 1991]. Liegen die Aminosäuren in mikromolarer Konzentration vor erfolgt eine Diffusion über die lipophile Membran [Diaz u. a. 2001]. Ein Carrier-vermittelter Export der aromatischen Aminosäuren, wie beispielsweise für Lysin bei *Corynebacterium glutamicum* beschrieben, ist hingegen nicht bekannt [Bröer und Krämer 1991].

3.1.3 L-Phenylalanin-Biosynthese in Produktionsstämmen

L-Phenylalanin wird in einem *E. coli* Wildtyp-Stamm nur für den eigenen Bedarf synthetisiert. Eine Überproduktion von L-Phenylalanin kann sowohl durch klassische Mutagenese als auch durch gezieltes „Pathway Engineering“ erreicht werden [Bongaerts u. a. 2001]. Für eine rationale Entwicklung definierter Produktionsstämme über „Metabolic Engineering“, die bei optimalem Wachstum und unter Vermeidung unerwünschter Nebenprodukte zu erhöhter Produktivität führen soll, ist eine genaue Kenntnis der Stoffwechselwege und Regulationsvorgänge notwendig. Mittels Stoffwechseluntersuchungen können bei Stämmen mit definierten Mutationen wiederum Rückschlüsse auf intrazelluläre Vorgänge gezogen und daraus weitere Verbesserungsmöglichkeiten abgeleitet werden.

Genetische Veränderungen im Aromatenbiosyntheseweg

Die katalytische Aktivität der DAHP-Synthase (AroF) konnte entweder durch Expression eines nicht allosterisch durch L-Tyrosin regulierten Enzyms [Frost und Draths 1995],

[Backman u. a. 1990] oder durch einfache Überexpression der Wildtyp-DAHP-Synthase unter L-Tyrosin-Limitierung erhöht werden [Gerigk 2001]. Durch Ersetzen der Chorismatmutase/Prephenatdehydratase (PheA) durch eine deregulierte Variante wurde eine erhöhte L-Phenylalanin-Produktion erreicht [Backman u. a. 1990], [Frost und Lievens 1994].

Die Inhibierung der durch das *tyrR*-Regulon regulierten Reaktion der Shikimatkinase II (AroL) und die daraus folgende Limitierung konnte durch Überexpression aufgehoben werden [Lawley und Pittard 1994]. Als weitere limitierende Schritte in der Aromatenbiosynthese wurden die durch die 3-Dehydroquinat-Synthase (AroB), die 5-Enolpyruvyl-3-phosphat-Synthase (AroA) und die Chorismat-Synthase (AroC) katalysierten Reaktionen identifiziert. Durch eine Erhöhung der Expression von AroB, AroA und AroC neben AroL wurde der Fluss durch die Aromatenbiosynthese deutlich verbessert und die entsprechenden Intermediate nicht mehr im Überstand nachgewiesen. Mit der Überexpression von AroL wurde gleichzeitig die Limitierung durch die Shikimatdehydrogenase (AroE) aufgehoben, da kein Shikimat mehr angehäuft wurde, das auf dieses Enzym eine Feedback-Inhibierung ausüben konnte [Dell und Frost 1993].

Die Produktion von L-Tyrosin in Konkurrenz zu L-Phenylalanin kann durch eine Deletion des Gens *tyrA* für die Chorismatmutase/Prephenatdehydrogenase ausgeschaltet werden. Dadurch sind die Stämme L-Tyrosin-auxotroph und müssen bei der Kultivierung mit L-Tyrosin supplementiert werden [Maiti und Chatterjee 1990].

Mittels klassischer genetischer Methoden konnte ein undefinierter Stamm mit verbessertem L-Phenylalanin-Export isoliert werden, der eine L-Phenylalanin-Produktion ermöglichte, die vergleichbar mit einem im Aromatenbiosyntheseweg deregulierten Stamm ist [Grinter 1998].

Genetische Veränderungen im Zentralstoffwechsel

Für die Produktion aromatischer Metabolite kann die Versorgung mit den Vorläufermetaboliten PEP und E4P über die genetischen Veränderungen im Aromatenbiosyntheseweg hinaus eine weitere Limitierung darstellen [Frost und Draths 1995].

Die Synthese von E4P wird durch Transketolase (Tkt) und Transaldolase (Tal) katalysiert [Sprenger 1995]. Durch Tkt-Überexpression wurde die Verfügbarkeit von E4P für die Aromatenbiosynthese erhöht [Draths u. a. 1992], [Li u. a. 1999], [Patnaik u. a. 1995]. Eine Überexpression der Transaldolase führte ebenfalls zu einer besseren Verfügbarkeit von E4P [Lu und Liao 1997], [Sprenger u. a. 1998], [Kraemer 2000]. Liao u. a. konnten hingegen keinen Einfluss durch die Transaldolase feststellen [Liao u. a. 1996].

Die Verteilung des zentralen Stoffwechselintermediats PEP in der Zelle ist in Abb. 3.5 dargestellt. Das Phosphotransferase-System ist der „Hauptkonsument“ von PEP. Bei der Glucoseaufnahme über das Phosphotransferase-System wird stöchiometrisch ein mol PEP zur Aufnahme und Phosphorylierung von einem mol Glucose verbraucht, das nicht mehr für die Aromatenbiosynthese zur Verfügung steht [Fraenkel 1996]. Außerdem werden große Teile über die PEP-Carboxylase zu Oxalacetat und über die Pyruvatkinasen zu Pyruvat umgesetzt (vgl. Abb. 3.3).

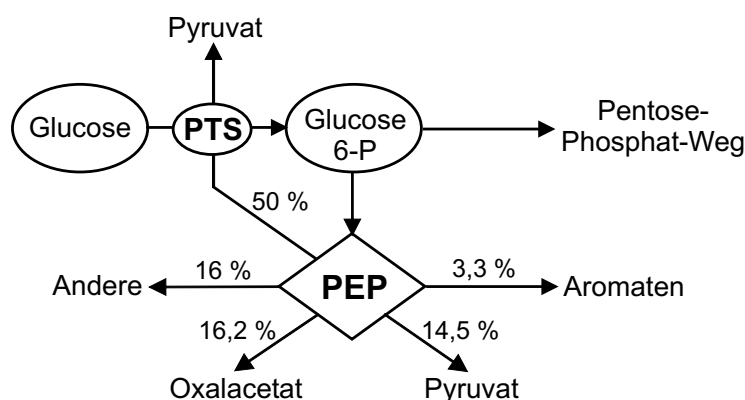


Abb. 3.5: Verteilung von Phosphoenolpyruvat (PEP) in *Escherichia coli* [Holms 1986]

Bei Stämmen mit Glucoseaufnahme über ein PEP-unabhängiges Galaktosepermeasesystem² und Phosphorylierung über die Glucokinase aus *E. coli* konnte eine verstärkte DAHP-Produktion in Schüttelkolben gezeigt werden [Flores u. a. 1996], [Gosset u. a. 1996], [Baez u. a. 2001]. Aufgrund der klassischen Selektion in kontinuierlicher Kultur waren die Stämme jedoch relativ undefiniert. Bei Glucoseaufnahme über die Galaktosepermease wurde im Bioreaktor keine verbesserte L-Phenylalanin-Produktion erreicht, aber weniger Nebenprodukte wie Acetat, Formiat, Ethanol, Lactat oder Succinat gebildet, vermutlich durch einen geringeren Kohlenstofffluss zum Pyruvat [Chen u. a. 1997]. Durch Glucoseaufnahme über ein heterologes, PEP-unabhängiges System aus Glucose-Facilitator und Glucokinase aus *Z. mobilis* konnte die DAHP-Ausbeute in Schüttelkolbenexperimenten erhöht werden [Sprenger u. a. 1998], [Kraemer 2000]. Die Shikimatproduktion konnte in einem Stamm mit Glucoseaufnahme über Glucose-Facilitator und Glucokinase aus *Z. mobilis* und zusätzlicher Expression der Transketolase deutlich gesteigert werden [Gibson u. a. 2001], [Chandran u. a. 2003]. Eine Steigerung der 3-Dehydroshikimat-Produktion konnte durch Kultivierung eines Produzenten mit Tkt-Überexpression auf einer Mischung aus Glucose, Arabinose und Xylose erreicht werden [Li und Frost 1999a]. Die Pentosen Arabinose und Xylose werden über PEP-unabhängige, hochaffine Permease-Transportsysteme aufgenommen.

Durch eine Überexpression der PEP-Synthase und der Transketolase wurde eine Verdopplung der DAHP-Produktion erreicht [Patnaik und Liao 1994], [Yi u. a. 2002], während die Überexpression nur eines der beiden Enzyme keine Wirkung hatte [Patnaik u. a. 1995]. Eine Inaktivierung der Pyruvatkinasen führte ebenfalls zu einem verbesserten Fluss in die Aromatenbiosynthese [Gosset u. a. 1996] und in die L-Phenylalanin-Produktion [Grinter 1998]. Eine weitere Erhöhung konnte durch zusätzliche Überexpression der Transketolase erreicht werden [Gosset u. a. 1996]. Die Ausschaltung der PEP-Carboxylase hatte keinen erhöhten Fluss in die Aromatenbiosynthese zur Folge [Patnaik und Liao 1994], [Anderlei 2002]. Dagegen hatten Miller u. a. [Miller u. a. 1987] eine Erhöhung der L-Phenylalanin-Produktion, aber auch der Acetat- und Pyruvatproduk-

²Bei der Glucoseaufnahme über die Galaktosepermease wird die Glucose durch Kotransport eines Protons über dieses membranständige Enzym in die Zelle aufgenommen

tion festgestellt, allerdings bei verdoppelter Generationszeit unter Supplementierung mit C4-Verbindungen. Die PEP-Verfügbarkeit konnte darüber hinaus durch Einbringen der Pyruvatcarboxylase aus *Corynebacterium glutamicum* erhöht werden [Anderlei 2002]. Durch eine Überexpression der Transketolase und der PEP-Carboxykinase bei Wachstum auf Glucose und Succinat konnte die DHS-Produktion verbessert werden [Li und Frost 1999b].

Systeme zur Gen-Expression

Die Expression von zelleigenen oder heterologen Genen kann chromosomal oder über Plasmidsysteme erfolgen. Vorteil der chromosomalen Integration ist die Stabilität des Genproduktes [Snell u. a. 1996]. Die Expression kann allerdings selbst unter Kontrolle eines starken Promotors unzureichend sein [Kreutzer 2000]. Eine stärkere Expression kann durch Verwendung von Plasmidsystemen mit höherer Kopienzahl und einem starken Promotor erreicht werden [Berry 1996]. Der Zeitpunkt der Expression kann durch Verwendung eines induzierbaren Promotors beeinflusst werden. Der starke P_{tac} -Promotor ist durch 1-Isopropyl- β -thiogalactosid (IPTG) induzierbar und nicht durch Glucose reguliert³. IPTG, ein Galactosid, wird nicht von dem Enzym β -Galactosidase gespalten und demzufolge nicht verstoffwechselt, wodurch ein konstantes Induktionsniveau sichergestellt wird. Bei einem Einsatz in der fermentativen Produktion zur Expression heterologer Proteine ist die Induktorkonzentration und die Art der Zugabe wichtig [Altenbach-Rehm 2000]. Der Einfluss der Induktion ist dabei vom biologischen System und dem Stress, der durch die Fremdproteinproduktion auf den Zellstoffwechsel ausgeübt wird, abhängig. Das Wachstum wird durch IPTG reduziert. IPTG-Konzentrationen über 4 mmol/l sind toxisch für die Zellen und führen zu Plasmidinstabilität, zum verfrühten Übergang in die stationäre Phase oder sogar zum Absterben der Zellen [Donovan u. a. 1996].

3.2 Bioprozessentwicklung

3.2.1 Bioreaktoren

Bioreaktoren dienen als Reaktionsgefäße zur Kultivierung von Biokatalysatoren unter definierten Bedingungen. Es werden verschiedene Arten von Reaktoren unterschieden. In Oberflächenreaktoren ist die Biomasse an einen festen Träger gebunden oder schwimmt an der Oberfläche. Weiter verbreitet ist die Submerskultur, bei der die Zellen suspendiert in flüssigem Nährmedium vorliegen. Das Nährmedium wird durchmischt. Die zu kultivierenden Zellen werden in aerober Kultur mit Sauerstoff versorgt und gasförmige Stoffwechselprodukte abgeführt. Eine weitere Klassifizierung der Reaktoren erfolgt nach Energieeintrag und Strömungsführung [Schuegerl und Bellgardt 2000]. Es gibt Rührkessel, Schlaufen- und

³Der P_{tac} -Promotor leitet sich aus dem P_{lac} -Promotor ab. Bei diesem wird die Transkription durch Katabolit-Repression gesteuert. Die Lac-Gene zur Verstoffwechslung von Lactose sind in Anwesenheit von Glucose inaktiv. In Abwesenheit von Glucose steigt der cAMP-Spiegel. cAMP bindet an das CAP-Protein, das an die DNA bindet, wodurch die Affinität der RNA-Polymerase zum Promotor erhöht wird und eine Expression erfolgt (positive Kontrolle). Bei beiden Systemen wird der Repressor der Genexpression durch das Gen *lacI* hergestellt. Dieser bindet an die DNA. IPTG bindet wie Lactose an den Repressor zur Aufhebung der Repression.

Blasensäulenreaktoren. Der Rührkessel ist aufgrund seiner universellen und flexiblen Einsetzbarkeit am weitesten verbreitet. Bioreaktoren unterscheiden sich darüber hinaus je nach Anwendung in der Größe. Schüttelkolben werden wegen ihrer einfachen Handhabung und den geringen Kosten oftmals zur grundlegenden Charakterisierung von Biokatalysatoren verwendet, während die weitere Prozessentwicklung im Labor- und Pilotbioreaktor bis hin zum Produktionsbioreaktor erfolgt. Dabei spielen Hydrodynamik, Leistungseintrag, Durchmischung und Stofftransport im Bioreaktor eine Rolle.

3.2.2 Prozessführung in Bioreaktoren

Neben der Wahl eines geeigneten Reaktortyps ist die Reaktionsführung entscheidend. Dabei wird zwischen Satzverfahren (engl. Batch, geschlossenes Verfahren), Zulaufverfahren (engl. Fed-Batch, teiloffen) und kontinuierlichem Verfahren (offen) unterschieden. In der industriellen Produktion werden Satzverfahren und Zulaufverfahren bevorzugt verwendet, um Probleme mit der Stabilität von Produktionsorganismen und der Sterilität bei langer Prozessdauer zu vermeiden [Schuegerl und Bellgardt 2000].

In Abb. 3.6 ist ein idealer Rührkesselreaktor im Satz-, im Zulauf- und im kontinuierlichen Verfahren dargestellt. Zur Vereinfachung wird von einem idealen System ausgegangen. Die allgemeine Bilanzgleichung zur Beschreibung des Systems lautet:

$$\frac{d(V \cdot c_i)}{dt} = \dot{V}_{ein} \cdot c_{i,ein} - \dot{V}_{aus} \cdot c_{i,aus} \pm r_i \cdot V \quad (3.1)$$

mit⁴:

V	Fermentationsvolumen	[l]
c_i	Konzentration der Komponente i	[mmol/l]
$c_{i,ein}$	Eingangskonzentration	[mmol/l]
$c_{i,aus}$	Ausgangskonzentration	[mmol/l]
$\dot{V}_{ein}$	Volumenstrom des Zulauf	[l/h]
$\dot{V}_{aus}$	Volumenstrom des Ablaufs	[l/h]
r_i	spez. Reaktionsgeschwindigkeit der Komponente i	[mmol/(l·h)]
i	Substrat (S), Biomasse (X), Produkt (P)	

Satzverfahren (Batch)

Bei diesem Verfahren werden alle Medienbestandteile im Bioreaktor vorgelegt. Nur Sauerstoff und Korrekturmittel, zu denen Säure, Lauge oder Antischaummittel gehören, werden zugegeben. Wachstum und Produktion erfolgen bis zu dem Zeitpunkt, an dem eine der Mediumkomponenten aufgebraucht ist oder die Anhäufung eines Produkts inhibierend wirkt. Die Zellzahl lässt sich bei Verwertung von nur einem Substrat mit der allgemeinen sigmoiden Wachstumskurve beschreiben, bestehend aus der Lag-Phase, in der sich die Zellen auf die Nährstoff- und Reaktionsbedingungen einstellen, der exponentiellen Phase mit maximalem Wachstum, der stationären Phase und der Absterbephase [Schlegel 1992]. Der

⁴Anstelle von SI-Einheiten sind die Einheiten angegeben, die zur Berechnung entsprechender Größen verwendet wurden.

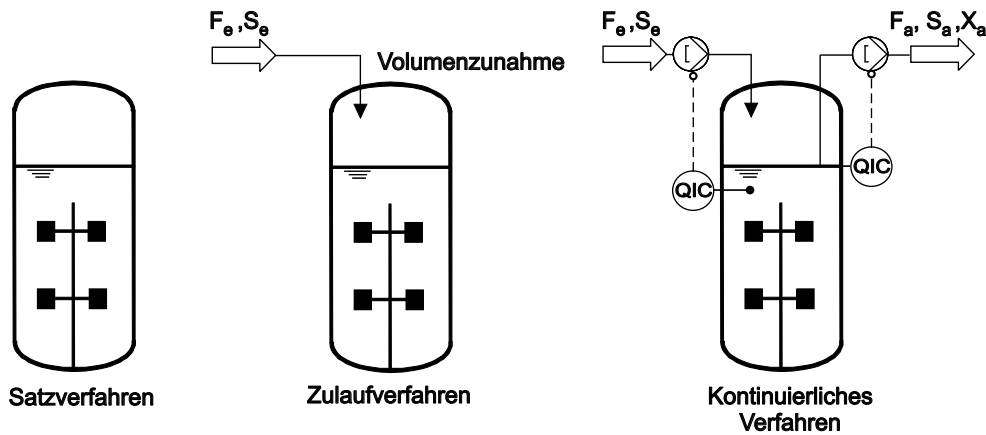


Abb. 3.6: Schematische Darstellung eines idealen Rührreaktors im Satz-, Zulauf- und kontinuierlichen Verfahren

apparative Aufwand ist gering, aber durch Limitierungen im Medium oder Inhibierungen durch Produkte oder Nebenprodukte ist der Prozess zeitlich eingeschränkt.

Für eine Fermentation im Satz-Verfahren gelten die folgenden Bedingungen:

$$V = konst. \quad (3.2)$$

$$\dot{V}_{ein} = \dot{V}_{aus} = 0 \quad (3.3)$$

$$c_i = f(t) \quad (3.4)$$

Daraus ergibt sich abgeleitet aus der allgemeinen Massenbilanz:

$$\frac{dc_i}{dt} = \pm r_i \quad (3.5)$$

Zulaufverfahren (Fed-Batch)

Im Gegensatz zum Satzverfahren werden beim Zulaufverfahren limitierende Medienbestandteile nachdosiert, um Wachstums- oder Produktbildungsphase zu verlängern. Das Volumen nimmt zu. Durch Regelung oder Steuerung der Substratzufuhr können optimale Bedingungen für Wachstum und Produktion geschaffen werden. Beispielsweise kann das Substrat limitierend zugeführt werden, da hohe Substratkonzentrationen oftmals inhibierend auf die Zellen wirken. Darüber hinaus können Viskositätseffekte bei der Produktion hochviskoser Biopolymere reduziert werden. Eine Aufkonzentrierung des Produkts oder der Nebenprodukte bis zu inhibierenden Konzentrationen kann verringert werden. Mit diesem Verfahren werden höhere Zelldichten, längere Prozessdauer und höhere Produktkonzentrationen als im Satzverfahren erreicht. Nachteil des Satz- und des Zulaufverfahrens ist die relativ geringe Produktivität, da der Bioreaktor zwischen den Kultivierungen gereinigt und der Prozess mit niedrigen Zelldichten neu gestartet werden muss [Schuegerl und Bellgardt 2000].

Als modifiziertes Verfahren ist das „repetitive“ Zulaufverfahren zu nennen. Dabei wird während des Fermentationsprozesses ein Teil des Biomasse-haltigen Fermentationsmediums oder durch Biomasserückhaltung gewonnener zellfreier Fermentationsüberstand

entnommen und neues Medium zugeführt. Dadurch kann der Prozess verlängert werden, da inhibierende Substanzen entfernt und limitierende Substanzen zugeführt werden können.

Für eine Fermentation im Zulaufverfahren gelten die folgenden Bedingungen:

$$V = f(t) \quad (3.6)$$

$$\dot{V}_{ein} = f(t) \quad (3.7)$$

$$\dot{V}_{aus} = 0 \quad (3.8)$$

$$c_i = f(t) \quad (3.9)$$

Daraus ergibt sich abgeleitet aus der allgemeinen Massenbilanz:

$$\frac{d(V \cdot c_i)}{dt} = \dot{V}_{ein} \cdot c_{i,ein} \pm r_i \cdot V \quad (3.10)$$

Bei nutristatischer Prozessführung, d.h. konstanter Konzentration des Substrats im Reaktor, gilt:

$$\dot{V}_{ein} = f(\sigma) \quad (3.11)$$

$$c_S = konst. \quad (3.12)$$

Kontinuierliches Verfahren

Bei diesem Verfahren wird kontinuierlich steriles Medium zu- und Zellen enthaltendes Medium abgeführt. Zu- und Abfuhr erfolgen normalerweise mit gleichen Raten, so dass ein „Fließgleichgewicht“ erreicht wird und das Arbeitsvolumen konstant ist. Es gibt unterschiedliche Betriebsweisen. Im Chemostaten wird die Zufuhr rate konstant gehalten. Im Turbidostaten wird die Zellkonzentration durch die Zufuhr kontrolliert. Die Kontrolle im Auxostaten erfolgt durch den pH-Wert. Bei der nutristatischen Prozessführung wird die Konzentration eines Substrats im Reaktor konstant gehalten. Die kontinuierliche Kultur ist für Produkte geeignet, die wachstumsgekoppelt produziert werden. Ein Vorteil ist die hohe erreichbare Produktivität, die sich durch die konstanten Reaktionsbedingungen und die Minimierung der Reinigungszeiten ergibt. Gegen den kontinuierlichen Betrieb sprechen unter anderem Sterilitätsprobleme und die mögliche Instabilität der produzierenden Zellen. Ist die Produktkonzentration niedrig, so wird die Aufarbeitung erschwert. Eine modifizierte Form ist die kontinuierliche Kultivierung mit Zellrückhaltung, bei der hohe Zellkonzentrationen und dadurch eine relativ höhere Fließgleichgewichtskapazität aufrecht erhalten werden können. Dabei werden möglicherweise inhibierende Produkte verdünnt. Zellrückhaltung und Verweilzeitentkopplung werden zudem in der anaeroben Abwasserreinigung eingesetzt, bei der niedrige Substratkonzentrationen vorliegen [Fritsche 1998].

Für eine Fermentation im kontinuierlichen Verfahren gelten die folgenden Bedingungen:

$$V = konst. \quad (3.13)$$

$$\dot{V}_{ein} = \dot{V}_{aus} \quad (3.14)$$

$$c_i = konst. \quad (3.15)$$

Daraus ergibt sich abgeleitet aus der allgemeinen Massenbilanz:

$$D \cdot (c_{i, \text{ein}} - c_{i, \text{aus}}) = r_i \quad (3.16)$$

$$\text{mit : } D = \frac{1}{\tau} = \frac{\dot{V}}{V} \quad (3.17)$$

mit:

$$\begin{array}{ll} D & \text{Durchflussrate} \quad [\text{h}^{-1}] \\ \tau & \text{mittlere Verweilzeit} \quad [\text{h}] \end{array}$$

Im Fließgleichgewicht gilt unter der Annahme, dass der Erhaltungsstoffwechsel vernachlässigbar ist:

$$D = \mu = \text{konst.} \quad (3.18)$$

3.2.3 Kinetische Parameter (Zulaufverfahren)

Wachstum

Ein Maß für das Wachstum ist die Wachstumsgeschwindigkeit. Die Biomasse-spezifische Wachstumsrate (μ) beschreibt die Änderung der Biomassekonzentration über die Zeit. Für eine Satzkultur gilt:

$$\mu = \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_X}{dt} \quad (3.19)$$

Im Zulaufbetrieb berechnet sich die Wachstumsrate wie folgt:

$$\mu = \frac{1}{c_X} \cdot \left(\frac{dc_X}{dt} + \frac{\dot{V}}{V} \cdot c_X \right) \quad (3.20)$$

Substratverbrauch

Für die auf die Biomasse bezogene Substratverbrauchsrate (σ) gilt im Zulaufverfahren:

$$\sigma = \frac{1}{c_X} \cdot \left(\frac{\dot{V}}{V} \cdot (c_S - c_{S, \text{ein}}) - \frac{dc_S}{dt} \right) \quad (3.21)$$

mit:

$$c_{S, \text{ein}} \quad \text{Substratkonzentration im Zulauf} \quad [\text{mmol/l}]$$

Produktbildung

Für die auf die Biomasse bezogene Produktbildungsrate (π) gilt im Zulaufverfahren:

$$\pi = \frac{1}{c_X} \cdot \left(\frac{dc_P}{dt} + \frac{\dot{V}}{V} \cdot c_P \right) \quad (3.22)$$

Selektive Größen

Zur weiteren Beschreibung des Prozesses werden differentielle Selektivitäten definiert: die Biomasse-Substrat-Selektivität (Y_{XS}), die Produkt-Biomasse-Selektivität (Y_{PX}) und die Produkt-Substrat-Selektivität (Y_{PS}):

$$Y_{XS} = \frac{\mu}{\sigma} \quad (3.23)$$

$$Y_{PX} = \frac{\pi}{\mu} \quad (3.24)$$

$$Y_{PS} = \frac{\pi}{\sigma} \quad (3.25)$$

Zur Beurteilung des Gesamtprozesses wird die integrale Selektivität Y_{PS} herangezogen, die das Verhältnis der Produktmenge (P) zur Substratmenge (S) angibt:

$$Int. Y_{PS} = \frac{P_t - P_{t=0}}{S_t - S_{t=0}} \quad (3.26)$$

Die integrale Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) berechnet sich wie folgt:

$$RZA = \frac{c_{P_t} - c_{P_{t=0}}}{t} \quad (3.27)$$

Sauerstoffverbrauch und Kohlendioxidbildung

Die Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs und der Kohlendioxidbildung erfolgt über die Massenbilanz in der Gasphase. Die Konzentrationen in der Flüssigphase werden vernachlässigt⁵. Für die Sauerstofftransferrate (OTR) und die Kohlendioxidtransferrate (CTR) gilt:

$$OTR = \frac{\dot{V}_g \cdot ([O_2]_{ein} - [O_2]_{aus})}{V} \quad (3.28)$$

$$CTR = \frac{\dot{V}_g \cdot ([CO_2]_{aus} - [CO_2]_{ein})}{V} \quad (3.29)$$

mit:

$\dot{V}_g$	Gasvolumenstrom	[l/h]
$[O_2], [CO_2]$	Konzentration von O_2, CO_2	
ein, aus	Zuluft, Abluft	

Für die Sauerstoffaufnahme (OUR) und die Kohlendioxidbildungsrate (CER) ergibt sich daraus über einige Zwischenschritte:

$$OUR = \frac{\dot{V}_g^{ein}}{V \cdot 22,414} \cdot \left(Y_{O_2}^{ein} - \frac{(1 - Y_{O_2}^{ein} - Y_{CO_2}^{ein})}{(1 - Y_{O_2}^{aus} - Y_{CO_2}^{aus})} \cdot Y_{O_2}^{aus} \right) \quad (3.30)$$

$$CER = \frac{\dot{V}_g^{ein}}{V \cdot 22,414} \cdot \left(Y_{CO_2}^{aus} - \frac{(1 - Y_{O_2}^{ein} - Y_{CO_2}^{ein})}{(1 - Y_{O_2}^{aus} - Y_{CO_2}^{aus})} \cdot Y_{CO_2}^{ein} \right) \quad (3.31)$$

mit:

Y_{CO_2}	Kohlendioxidanteil
Y_{O_2}	Sauerstoffanteil

⁵Die Löslichkeit von Kohlendioxid in der Flüssigphase ändert sich abhängig von pH-Wert und Druck, so dass die Bilanzierung dadurch beeinflusst wird.

3.2.4 Kohlenstoffbilanz (Zulaufverfahren)

Für den Kohlenstoff kann eine Massenbilanz aufgestellt werden. Die Kohlenstoffbilanzierung dient der Überprüfung der Analysen, insbesondere der Genauigkeit und der Vollständigkeit. Kann die Bilanz nicht zu annähernd 100 % geschlossen werden, so wurden entweder nicht alle Stoffwechselprodukte nachgewiesen oder aber die Analytikmethoden sind zu stark fehlerbehaftet [Schell u. a. 2002]. Die Bilanz ergibt sich aus dem Massenfluss in den Bioreaktor abzüglich des Massenflusses aus dem Bioreaktor. Die allgemeine Form der Massenbilanz für einen Prozess im Zulaufverfahren lautet wie folgt:

$$\sum (C_{S,t=0} + C_{S,zu} - C_{S,t}) = (C_{X,t} - C_{X,t=0}) + C_{P,t} + \sum C_{NP,t} + C_{CO_2,t} \quad (3.32)$$

mit:

C Kohlenstoffmenge in Substrat (S), Biomasse (X), Produkt (P), [mol]
Nebenprodukten (NP), Kohlendioxid (CO₂)

Das Kohlendioxid, das über die Zuluft in den Reaktor eingetragen wird, im Bioreaktor gelöst vorliegendes Kohlendioxid sowie der Wassergehalt der Luft werden dabei vernachlässigt.

3.2.5 Verfahren zur Herstellung von L-Phenylalanin

Zur Produktion von L-Phenylalanin hat es in der Vergangenheit verschiedenste Ansätze gegeben. Isolierte Enzyme wurden zur Produktion verwendet, z.B. aus *Pseudomonas putida* [Ziehr u. a. 1987], *Brevibacterium sp.* [Hummel u. a. 1987] oder *Paracoccus denitrificans* [Nakamichi u. a. 1989]. Ganzzellbiotransformationen von Phenylpyruvat zu L-Phenylalanin wurden beispielsweise mit ruhenden [Then u. a. 1987], immobilisierten [Wood und Calton 1988] und wachsenden [Chao u. a. 1999] *Escherichia coli* beschrieben. Ein Beispiel ist die stereo- und enantioselektive Addition von Ammonium an Trans-Zinnsäure, die durch das Enzym L-Phenylalanin-Ammoniumlyase katalysiert wird und in der industriellen Produktion Anwendung fand [McGuire 1986].

Die DSM verwendet ein chemisches Verfahren zur Herstellung von D-/L-Phenylalanin-Methylester, das zur Herstellung von Aspartam in einem chemo-enzymatisches Verfahren eingesetzt wird [Schmid u. a. 2001]. Dabei wird neben D-/L-Phenylalanin-Methylester auch Fumarsäure chemisch synthetisiert. Die enantioselektive Addition von Ammonium an Fumarsäure zu Z-Aspartat wird von dem Enzym Aspartase katalysiert. Das Enzym Thermolysin katalysiert selektiv die Reaktion von Z-Aspartat mit L-Phenylalanin-Methylester aus dem racemischen Gemisch zu Z-Aspartam, das durch katalytische Hydrogenierung zu Aspartam umgewandelt wird (L- α -Aspartyl-L-Phenylalanin-Methylester). Das D-Phenylalanin wird racemisiert und recycelt.

Neben den genannten Produktionsverfahren wurden verschiedene Fermentationsprozesse zur L-Phenylalanin-Produktion beschrieben. Hierbei wurden als Organismen unter anderem genetisch veränderte *Brevibacterium lactofermentum* [Tsuchida u. a. 1987], *Corynebacterium glutamicum* [Ikeda u. a. 1993], [Wang u. a. 1994], [Shu und Liao 2002] oder *Escherichia coli* [Choi und Tribe 1982], [Hwang u. a. 1985], [Gil u. a. 1985], [Park und Rogers 1986], [Park und Rogers 1987], [Sugimoto u. a. 1987],

[Backman u. a. 1990], [Konstantinov u. a. 1990], [Takagi u. a. 1996], [Grinter 1998], [Weikert u. a. 1998], [Gerigk 2001], [Maaß 2001] eingesetzt, um nur einige Beispiele zu nennen. Auf die Produktion mit rekombinanten *E. coli* wird im folgenden Abschnitt genauer eingegangen.

3.2.6 Stand der fermentativen L-Phenylalanin-Produktion

Die fermentative Herstellung von L-Phenylalanin ist sowohl ökologisch als auch ökonomisch sinnvoll, da kein Erdöl oder teuer synthetisierte Vorstufen wie bei enzymatischen Verfahren oder Biotransformationen verwendet werden. Stattdessen werden der nachwachsende Rohstoff Zucker und Ammoniak eingesetzt.

Die meisten Prozesse verwenden *E. coli*. Der Organismus weist höhere Wachstumsraten als beispielsweise *C. glutamicum* auf [Park und Rogers 1987]. Die Regulationsmechanismen im Stoffwechsel sind relativ gut bekannt und zur Kultivierung können einfache Medien verwendet werden. Mit *E. coli* sind bislang die höchsten L-Phenylalanin-Konzentrationen erreicht worden. Einige wichtige Größen aus der Literatur sind in Tab. 3.1 angegeben.

Von Foerberg u. a. wurde ein Fermentationsprozess im Zulaufverfahren mit einem rekombinanten, L-Tyrosin-auxotrophen Stamm entwickelt. In der Wachstumsphase wurde die DAHP-Synthase AroF durch hohe L-Tyrosin-Konzentrationen gehemmt. Die Produktbildung erfolgte erst in der anschließenden Phase unter L-Tyrosin-Limitierung und limitierter Glucosezufuhr mit ruhenden Zellen. Eine durchschnittliche L-Phenylalanin-Glucose-Selektivität von 0,2 g/g (21,8 mol/mol %) wurde erreicht. Die L-Phenylalanin-Konzentration lag jedoch nur bei 2,8 g/l [Foerberg und Haeggstroem 1987], [Foerberg u. a. 1988], [Foerberg und Haeggstroem 1988].

Auf die Wildtyp-DAHP-Synthase AroF wird nicht nur durch L-Tyrosin eine Feedback-Inhibierung ausgeübt, sondern auch durch unphysiologisch hohe L-Phenylalanin-Konzentrationen, so die Annahme von Backman u. a. [Backman u. a. 1990]. Durch Analog-Resistenz-Mutation mit toxischen Aminosäure-Analoga wurde ein Stamm mit einer gegen Feedback-Inhibierung resistenten DAHP-Synthase (AroF*) isoliert. Damit wurden in einem Prozess im Zulaufverfahren 50 g/l L-Phenylalanin in 36 Stunden produziert. Dabei lag die L-Phenylalanin-Glucose-Selektivität bei 0,23 g/g (25,1 mol/mol %).

Tab. 3.1: Vergleich wichtiger Prozessgrößen von in der Literatur beschriebenen Fermentationsprozessen zur L-Phenylalanin-Produktion mit *E. coli*

Autoren	L-Phe [g/l]	Int. RZA [g/(l·h)]	Int. Y_{PS} [mol/mol %]
Foerberg u. a. 1988	2,8	0,13*	21,8
Konstantinov u. a. 1990	46	0,85	17,4
Backman u. a. 1990	50	1,39*	25,1
Gerigk 2001	34	0,63	13,2

* Die Daten sind in dem Artikel nicht explizit angegeben, sondern wurden aus vorliegenden Daten berechnet

Neben der DAHP-Synthase AroF wird auch die Shikimatkinase AroL durch L-Tyrosin über Aktivierung des Regulatorproteins TyrR inhibiert. Eine Inhibierung durch L-Tyrosin kann einerseits durch Herstellung eines gegen Inhibierung resistenten Stammes verhindert werden. Andererseits kann eine Inhibierung durch L-Tyrosin durch prozesstechnische Maßnahmen vermieden werden. Bei Einsatz eines L-Tyrosin-auxotrophen L-Phenylalanin-Produzenten zur L-Phenylalanin-Produktion kann die L-Tyrosin-Zufuhr limitiert werden, so dass kein L-Tyrosin akkumuliert. Über eine Limitierung kann zudem die Wachstumsrate gesteuert werden. Wachstums- und Produktionsphase können dadurch voneinander getrennt werden. Die Limitierung durch L-Tyrosin ist entscheidend für Selektivität und Produktbildungsrate [Foerberg u. a. 1988], [Hwang u. a. 1985].

Wie die L-Tyrosin-Konzentration ist auch die Glucosekonzentration ein entscheidender Parameter bei der L-Phenylalanin-Produktion. Das bei Überschussmetabolismus gebildete Acetat inhibiert Wachstum und Produktion. Bereits Glucosekonzentrationen unter 1 g/l können zum Crabtree-Effekt führen [Luli und Strohl 1990]. Bei 1-8 g/l Acetat wird die Wachstumsrate verringert [Xu u. a. 1999b]. Die Acetatbildung kann durch genetische Veränderungen der Stämme oder Änderungen der Kultivierungsbedingungen minimiert werden [Lee 1996], [Riesenberg und Guthke 1999]. Die Glucoseaufnahmerate und der Fluss von Pyruvat in den TCA-Zyklus und die Atmung sind die sensitivsten Parameter bei der Kontrolle des Ausmaßes der Acetatbildung. So produzierten Stämme mit überexprimierter PEP-Synthase und DAHP-Synthase AroG in Schüttelkolben kaum Acetat. Auch durch einen größeren Fluß durch die PEP-Carboxylase und einen deregulierten Glyoxylatweg und damit verstärkten Fluss in anaplerotische Stoffwechselwege konnte die Acetatproduktion verringert werden [Farmer und Liao 1997]. Eingriffe in den Zentralstoffwechsel zur Reduzierung der Acetatbildung können jedoch weitergehende, unerwünschte Einflüsse auf den gesamten Stoffwechsel haben.

Daher bieten sich prozesstechnische Ansätze zur Minimierung der Acetatbildung an. Insbesondere bei der Produktion in großen Reaktoren mit Gradientenbildung ist die Regelung oder Steuerung der Glucose zur Vermeidung von Acetat entscheidend [Holms 1996, van de Walle und Shiloach 1998, Axe und Bailey 1995]. Hohe Glucosekonzentrationen führen in großen Reaktoren zu sauerstofflimitierten Bereichen, in denen Acetat gebildet und dadurch die Selektivität verringert wird [Xu u. a. 1999a]. Bei geeigneter Prozessführung kann über eine Kontrolle der Glucose-Zufuhr und der Gelöstsauerstoffkonzentration eine Acetatbildung verringert werden [Konstantinov u. a. 1991], [Konstantinov und Yoshida 1992], [Akesson u. a. 2001]. Zur Regelung der Glucosekonzentration wurden Ansätze unter Verwendung empirischer Zusammenhänge oder parameteradaptiver Regler und Online-Messung der Glucosekonzentration im Bioreaktor eingesetzt [Hitzmann u. a. 2000], [Kelle u. a. 1996], [Mulchandani und Basse 1995], [Luli und Strohl 1990], [Kleman u. a. 1991a], [Kleman u. a. 1991b]. Dabei muss die Glucose zur Vermeidung von Acetatbildung niedrig gehalten werden. Gleichzeitig muss sie ausreichend hoch sein, um Wachstums- und Produktbildungsraten aufrecht zu erhalten [Akesson u. a. 2001]. Da die Glucoseaufnahmerate in einem Prozess im Zulaufverfahren mit der Prozessdauer abnimmt [Lin u. a. 2001], ist eine Anpassung der Glucosezufuhr notwendig, z.B. über einen vorausschauenden und rückwirkenden (Predictive and Feedback) Regelalgorithmus [Kleman u. a. 1991a], [Kleman u. a. 1991b].

Ein Fermentationsprozess zur L-Phenylalanin-Produktion mit einem empirisch ermittelten Regelalgorithmus für Glucose wurde von Konstantinov u. a. entwickelt [Konstantinov u. a. 1990]. Die Glucosezufuhr wurde während der Produktionsphase basierend auf der Sauerstoffaufnahme geregelt. Eine andere Möglichkeit zur Regelung der Glucosezufuhr während der Wachstumsphase war mit der Einstellung eines konstanten MGA, einer Variable, die eine Glucoseakkumulation anzeigte, gegeben. Durch Einstellung einer konstanten Gelöstsauerstoffkonzentration konnte die Glucosezufuhr nach der Wachstumsphase, wenn nur noch Produktion stattfand, geregelt werden. Dabei wurde die Abnahme der Glucoseaufnahmekapazität der Zellen mit zunehmender Prozessdauer berücksichtigt. L-Tyrosin wurde bei diesem Prozess unter Verwendung einer gegen Feedback-Inhibierung resistenten DAHP-Synthase am Anfang der Fermentation vorgelegt. Die metabolische Aktivität der Zellen nahm nach 48 Stunden ab. Acetatbildung setzte ein und Produktbildung und Selektivität nahmen ab. Insgesamt wurden bei diesem Prozess nach 48 Stunden 46 g/l L-Phenylalanin bei einer Biotrockenmasse von 40 g/l produziert. Es wurden eine Selektivität von 17,4 % und eine Raum-Zeit-Ausbeute von 0,85 g/(l·h) erreicht [Konstantinov und Yoshida 1990], [Konstantinov u. a. 1990], [Konstantinov u. a. 1991].

Takagi u. a. beschrieben einen Prozess mit Regelung der Glucosezufuhr über eine Online-Trübungsmessung in der Wachstumsphase [Takagi u. a. 1996]. In der Produktionsphase wurde die Glucosezufuhr über die maximale Glucoseaufnahmerate geregelt und so die Glucosekonzentration unter 0,1 g/l gehalten. L-Tyrosin wurde in den ersten 30 Stunden diskontinuierlich nachdosiert. Im weiteren Verlauf wurde kontinuierlich L-Tyrosin für den Erhaltungsstoffwechsel zudosiert. Dadurch konnten die Enzymaktivitäten und die Produktbildungsrate gegenüber einem Prozess ohne L-Tyrosin-Zufuhr für den Erhaltungsstoffwechsel erhöht werden, die L-Phenylalanin-Glucose-Selektivität wurde allerdings verringert.

Von Gerigk wurde ein Prozess zur L-Phenylalanin-Produktion mit L-Tyrosin-auxotrophen Produktionsstämmen entwickelt [Gerigk 2001]. Die L-Tyrosin-Zufuhr wurde in der Wachstumsphase indirekt über die Sauerstoffaufnahme nach einer empirischen Beziehung geregelt. In der Produktionsphase wurde nur wenig L-Tyrosin für den Erhaltungsstoffwechsel zugeführt. Durch Einstellung einer L-Tyrosin-Limitierung bereits in der Wachstumsphase konnte die aktivere L-Tyrosin-sensitive Wildtyp-DAHP-Synthase anstelle einer Feedback-resistenten Variante verwendet werden. Bei einer stärkeren Limitierung in der Wachstumsphase wurde eine höhere DAHP-Synthase-Aktivität und höhere L-Phenylalanin-Produktion gemessen. Die Glucose wurde in diesem Prozess online gemessen und die Glucosekonzentration über Kalmanfilter und Minimalvarianz-Regler in einem geschlossenen Regelkreis geregelt. Solange L-Phenylalanin produziert wurde, trat bei gesättigter Glucosekonzentration (5 g/L) erstaunlicherweise keine Acetatbildung auf. Bei einer Regelung der Glucosekonzentration auf 0,1 g/l nahmen Raum-Zeit-Ausbeute und L-Phenylalanin-Konzentration ab, die Selektivität hingegen zu. Dagegen wurde bei sehr starkem Glucoseüberschuss (30 g/l) sehr viel Acetat gebildet und die Produktion brach ab. Insgesamt konnten 34 g/l L-Phenylalanin mit einer L-Phenylalanin-Glucose-Selektivität von 13,2 mol/mol % und einer Raum-Zeit-Ausbeute von 0,63 g/(l·h) nach 50 Stunden erreicht werden.

3.3 Produktaufarbeitung

Die Produktaufarbeitung umfasst die Abtrennung und Aufreinigung von in Bioprozessen hergestellten Produkten und ist integraler Bestandteil des gesamten Produktionsprozesses. Sie kann durch Verfahren wie Kristallisation, Fließbettadsorption, Elektrodialyse, Ionenaustausch oder Reaktivextraktion erfolgen.

Für die Aufarbeitung von Aminosäuren sind verschiedene Verfahren beschrieben. Üblicherweise werden zuerst die Zellen mittels Zentrifugation oder Membranfiltration abgetrennt. Im Anschluss folgen Ionenaustausch oder Adsorption, Verdampfung und Kristallisation zur Aufreinigung [Adarkar u. a. 1997], [Miyazawa 1991]. Für die Aufarbeitung von L-Phenylalanin ist die Reaktivextraktion neben der Kristallisation am besten geeignet. Dies ergab sich aus einer Gegenüberstellung der für die Produktivität und eine mögliche integrierte Abtrennung entscheidenden Parameter Selektivität, Mediumverluste, Toxizität, Einfluss auf die Ionenstärke, Gradientenbildung und Aufkonzentrierung bei verschiedenen Verfahren [Maaß 2001].

3.3.1 (Reaktiv-)Extraktion

Bei der Extraktion wird eine Komponente (Extraktstoff) mittels eines Lösungsmittels, das selektiv auf die abzutrennende Komponente wirkt (Extraktionsmittel), aus einem Stoffgemisch (Extraktionsgut) abgetrennt. Dabei wird die Komponente selektiv umverteilt. Übrig bleibt der Extrakt aus Extraktionsmittel und Extraktstoff und das an Extraktstoff verarmte Extraktionsgut (Raffinat) [Vauck und Müller 1994]. Das Extraktionsgut ist oftmals eine wässrige Lösung, das Extraktionsmittel ein organisches Lösungsmittel oder eine wässrige Lösung. Zur Regenerierung des Lösungsmittels kann der Extraktstoff in eine wässrige Akzeptorphase rückextrahiert werden.

Es wird zwischen chemischer und physikalischer Extraktion unterschieden. Bei der physikalischen Extraktion wird die Verteilung des zu extrahierenden Stoffes zwischen dem Extraktionsgut (R) und dem Extraktionsmittel (L) durch die Nernstverteilung bestimmt. Die Konzentration (c) des Extraktstoffs in den Phasen ist durch den Verteilungskoeffizienten k gegeben [Vauck und Müller 1994]:

$$k = \frac{c_L}{c_R} \quad (3.33)$$

Bei der chemischen Extraktion oder Reaktivextraktion wird ein Lösungsvermittler (Carrier) in der Lösungsmittelphase gelöst, der eine Verbindung mit dem zu extrahierenden Stoff eingeht [Rydberg u. a. 1992]. Die Reaktivextraktion hat gegenüber der physikalischen Extraktion zum einen den Vorteil, dass auch ionische Extraktstoffe, die sich nicht in organischem Lösungsmittel lösen, selektiv extrahiert werden können. Zum anderen sind die Verteilungskoeffizienten und damit die Effizienz höher [Schlichting u. a. 1987]. Die organische Phase wirkt als Barriere für die Abtrennung von wasserlöslichen Medienbestandteilen.

Zwei Arten von Carrier werden überwiegend in der Reaktivextraktion eingesetzt [Weatherley 1994]:

1. Phosphor-Sauerstoff-Verbindungen und Schwefel-Sauerstoffverbindungen, z.B. die Kationen-selektive Bis-(2-Ethylhexyl)-Phosphorsäure (D₂EHPA) oder Dinonylnaphthalinschwefelsäure (DNNSA) und
2. Hochmolekulare aliphatische Amine, z.B. das Anionen-selektive Alamin 336 oder Aliquat 336.

Sowohl die Eigenschaften des Carriers als auch die des Lösungsmittels haben Einfluss auf die Extraktion. Entscheidend sind Wasserlöslichkeit, Toxizität und im Zusammenhang mit Bioprozessen die Biokompatibilität. Thermische und chemische Stabilität sowie die Kosten sind ebenfalls wichtige Faktoren. Um eine gute Phasentrennung zu gewährleisten, sollten Viskosität und Dichte möglichst gering sein. Der Carrier muss im organischen Lösungsmittel löslich sein und sollte keine Tendenz zur Emulsionsbildung aufweisen. Darüber hinaus sind Selektivität, Kapazität und Regenerierbarkeit des Carriers sowie der Einfluss des Lösungsmittels auf die Selektivität entscheidend [Bart 2001], [Weatherley 1994].

Anwendungen der Reaktivextraktion

Die Reaktivextraktion wird zur selektiven Abtrennung von stark polaren organischen Säuren wie Milchsäure oder Zitronensäure aber auch Penicillin, Cephalosporin oder Streptomycin verwendet [Pai u. a. 2002], [Scheler u. a. 1997]. Beispielsweise konnten Acetat und Milchsäure mit den Anionen-selektiven Carriern Aliquat-336, Alamine 336 oder Amberlite 2A extrahiert werden [Katikaneni und Cheryan 2002], [Wasewar u. a. 2002], [von Frieling und Schuegerl 1999]. Penicillin wird großtechnisch in saurer Umgebung⁶, in der es sehr instabil ist, extrahiert. Die Reaktivextraktion von Penicillin mit Amberlite LA-2 in n-Butylacetat ermöglichte eine Extraktion des Penicillins im neutralen pH-Bereich, in dem es stabiler ist als in saurer Umgebung [Likidis und Schuegerl 1987].

Aminosäuren, die aufgrund ihrer funktionellen Gruppen abhängig vom pH-Wert als Anion, Kation oder Zwitterion vorliegen, konnten sowohl durch Kationen-selektive als auch Anionen-selektive Carrier mittels Reaktivextraktion extrahiert werden [Adarkar u. a. 1997], [Cascaval u. a. 2001], [Kelly u. a. 1998], [Liu u. a. 2000]. Untersuchungen zur Extraktion von L-Phenylalanin aus wässrigen Modelllösungen wurden beispielsweise mit Aliquat 336, Alamin 336, D₂EHPA oder DNNSA durchgeführt. Als organische Lösungsmittel wurden Oktan, Oktanol, N-Paraffin oder Methyl-Isobutyl-Keton verwendet [Boyadzhiev und Atanassova 1994] [Liu u. a. 1999], [Cameron und Husson 2001], [Pursell u. a. 2003], [Teramoto u. a. 1991], [Thien u. a. 1988], [Escalante u. a. 1998].

Von Maaß [Maaß 2001] wurde die Reaktivextraktion von L-Phenylalanin mit verschiedenen Carriern (DNNSA, D₂EHPA, Alamin 304, Alamin 308 und Aliquat 336) und Lösungsmitteln (Xylen, Oktanol, Dekanol, Butylstearat, Kerosin, Dekan, Dodecan und Pentadecan) untersucht. Mit dem Kationen-selektiven Carrier D₂EHPA gelöst in Kerosin⁷ wurde sowohl ein hoher Extraktionsgrad als auch die beste Phasentrennung und Biokompatibilität erreicht. Zudem sind diese Substanzen relativ preiswert. Zur Rückextraktion von

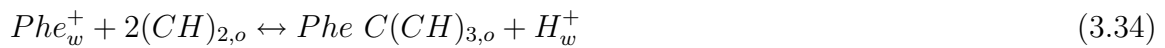
⁶Penicillin ist eine schwache Säure, die nur bei saurem pH-Wert in ungeladenem Zustand in organisches Lösungsmittel extrahiert werden kann.

⁷Kerosin ist eine Mischung aus Alkanen von C₁₂–C₁₆.

L-Phenylalanin aus der organischen Phase und Regenerierung derselben wurden Lösungen von NaOH, KOH, KCl und H_2SO_4 in Wasser getestet. H_2SO_4 war aufgrund des erreichten Extraktionsgrades und ausbleibender Emulsionsbildung am besten geeignet.

Reaktion bei der Reaktivextraktion von L-Phenylalanin

Bei der Extraktion von L-Phenylalanin (Phe) mit dem Carrier D_2EHPA ⁸ (CH) erfolgt eine Kationenaustauschreaktion. Ein L-Phenylalanin-Kation bildet einen Komplex mit vier D_2EHPA -Molekülen [Liu u. a. 1999]. Das sich einstellende Gleichgewicht kann wie folgt beschrieben werden:



Für die Gleichgewichtskonstante K gilt:

$$K = \frac{[Phe C(CH)_{3,o}] \cdot [H_w^+]}{[Phe_w^+] \cdot [(CH)_{2,o}]^2} \quad (3.35)$$

mit

w, o wässrige, organische Phase

Der Reaktionsort der Reaktivextraktion wird durch die Löslichkeit des Carriers und des Extraktstoffs ineinander festgelegt. L-Phenylalanin ist aufgrund der polaren Gruppen schlecht in organischem Lösungsmittel löslich. Der organische Carrier D_2EHPA ist in der wässrigen Phase kaum löslich (≈ 1 g/l). Daher wird von einer Reaktion an der Phasengrenzfläche ausgegangen [Maaß 2001]. Die Kationenaustauschreaktion ist in Abb. 3.7 schematisch dargestellt. Dieser Modellvorstellung zufolge wird der Carrier bei der Extraktion mit L-Phenylalanin-Kationen beladen und ein Proton in die wässrige Phase abgegeben. Bei der Rückextraktion wird ein L-Phenylalanin-Kation in die wässrige Akzeptorphase abgegeben. Ein Proton der Schwefelsäure geht in die organische Phase über, wodurch der Carrier regeneriert wird.

⁸Eine Darstellung der D_2EHPA -Struktur findet sich in Abschnitt A.4.

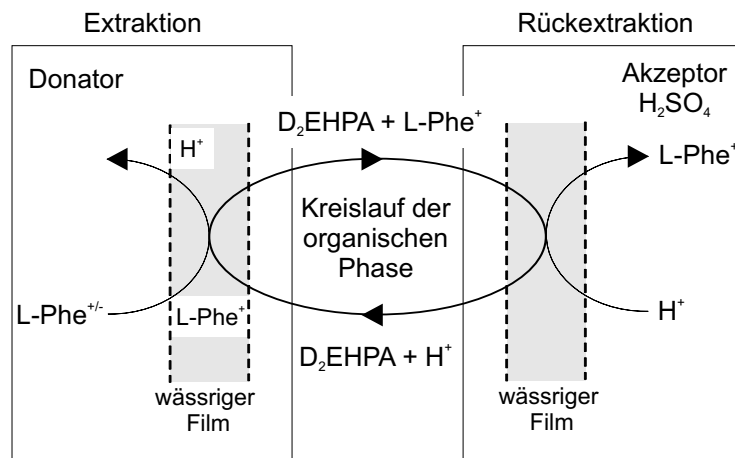


Abb. 3.7: Reaktion an der Phasengrenzfläche bei der Extraktion von L-Phenylalanin mit dem Carrier D_2EHPA und H_2SO_4 -Lösung zur Rückextraktion

Einfluss des pH-Werts auf die Reaktivextraktion von L-Phenylalanin

Im neutralen Bereich liegt L-Phenylalanin überwiegend als Zwitterion vor ($pI=5,5$). Unterhalb des pK_s von 1,83 liegt L-Phenylalanin protoniert, oberhalb des pK_b von 9,18 deprotoniert vor. Maaß zufolge ist die Extraktion von L-Phenylalanin mit dem sauren Carrier D_2EHPA über einen großen Bereich unabhängig vom pH-Wert [Maaß 2001]. Vorstellbar ist, dass L-Phenylalanin als Zwitterion direkt mit D_2EHPA an der Phasengrenze reagiert und einen Ionenpaarkomplex bildet. Bei der Rückextraktion wird dieser Komplex durch die Protonen im Akzeptor aufgelöst. Ebenfalls denkbar ist, dass L-Phenylalanin im neutralen Bereich gut extrahiert werden kann, da sich eine geringe Menge D_2EHPA in der wässrigen Phase löst und dissoziiert, wodurch der pH-Wert gesenkt wird und L-Phenylalanin-Kationen entstehen. Zudem wird der pH-Wert an der Phasengrenze durch die Dissoziation des sich dort anlagernden Carriers herabgesetzt, so dass L-Phenylalanin-Kationen vorliegen. Diese binden an den Carrier.

Stoffübergang bei der Reaktivextraktion

Der Stoffübergang und die Geschwindigkeit der chemischen Reaktion sind für die Reaktivextraktion entscheidend. Bei einer langsamen Reaktion ist nur die Reaktionskinetik, nicht aber der diffusive Stofftransfer relevant. Dagegen ist bei einer schnellen Reaktion die spezifische Stofftransferrate bestimmend [Hafez 1983]. Eine vorliegende Transportlimitierung kann durch hydrodynamische Veränderungen aufgehoben werden, während eine Reaktionslimitierung dadurch nicht aufgehoben wird.

Es gibt verschiedene Theorien zum diffusiven Stofftransfer. Die Zweifilm-Theorie (Lewis (1916) und Whitman (1923)) geht von ruhenden, stationären, laminaren Grenzflächenfilmen auf beiden Seiten der Phasengrenzfläche zwischen den beiden Fluiden aus, über die ein Transfer durch molekulare Diffusion erfolgt. Je größer die Turbulenz in den Kernzonen der Fluide, desto dünner sind die laminaren Grenzflächenfilme [Javed 1992]. In Abb. 3.8 ist der Stoffübergang im laminaren Grenzflächenfilm dargestellt. Die Konzentration kann sowohl in der wässrigen Phase höher sein, wie hier dargestellt, als auch in der organischen Phase. Da Lösungsgleichgewicht an der Phasengrenze angenommen wird, sind die Diffusionsgeschwindigkeiten durch beide Filme im stationären Zustand gleich. Der Stoffübergang ist abhängig von der Konzentrationsdifferenz.

Es gilt:

$$-J_s = \beta_w \cdot (c_w - c_{w,lim}) = \beta_o \cdot (c_{o,lim} - c_o) \quad (3.36)$$

mit

J_s	flächenbezogener Stofffluss	$[\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})]$
β	Stoffübergangskoeffizient ($\beta = D/\delta$)	$[\text{m}/\text{s}]$
D	Diffusionsquotient	$[\text{m}^2/\text{s}]$
δ	Dicke der Grenzschicht	$[\text{m}]$
c, c_{lim}	Konzentration in der Flüssigkeit, bzw. an der Phasengrenzfläche	$[\text{mol}/\text{m}^3]$

Im Gegensatz zur Zweifilm-Theorie gehen die Penetrations- (Higbie (1935)) und die Oberflächenenerneuerungstheorie (Danckwerts (1951)) von einer Oberflächenenerneuerung

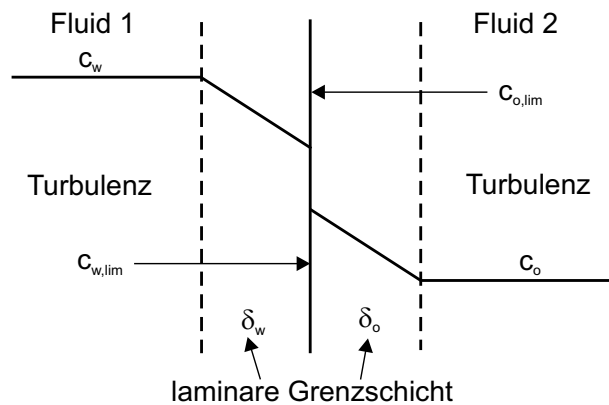


Abb. 3.8: Zweifilmtheorie: Konzentrationsverlauf im laminaren Grenzflächenfilm mit c als der Konzentration der gelösten Substanz und δ als der Grenzfilmdicke

durch Wirbel aus. Die Wirbel werden durch Turbulenz an die Phasengrenzfläche transportiert. Bei ersterer wird eine gleiche, bei letzterer eine unterschiedliche Aufenthaltsdauer der Wirbel an der Phasengrenzfläche angenommen. Der Stoffübergang kann also als nichtstationärer molekularer Transfer zwischen Wirbel und Umgebung bezeichnet werden [Javed 1992]. Der Stofftransfer ist proportional zur Wurzel des Diffusionskoeffizienten.

Bei allen drei Theorien ist die Konzentrationsdifferenz die treibende Kraft und proportional zum Stofftransfer [Schuegerl 1994]. Modelle zum Stoffübergang bei der Extraktion⁹ wurden von verschiedenen Autoren beschrieben [Teramoto u. a. 1991], [Scarpello und Stuckey 2000], [Liu und Dai 2003].

3.3.2 Membranverfahren

Die Reaktivextraktion kann technisch mittels der Emulsion Liquid Membrane-Technologie (ELM), der Supported Liquid Membrane-Technologie (SLM) oder auch der Hohlfasermembran-gestützten Technologie erfolgen. Bei der ELM-Technologie wird mit Hilfe eines oberflächenaktiven Emulsionsstabilisators eine Emulsion aus der organischen Phase mit dem Carrier und der Akzeptorphase hergestellt, wobei die organische Phase Tröpfchen der Akzeptorphase umhüllt. Durch Zugabe der wässrigen Lösung mit dem Extraktstoff wird extrahiert. Die Extraktion von L-Phenylalanin mittels dieser Technik wurde mehrfach beschrieben [Teramoto u. a. 1991], [Thien u. a. 1988], [Escalante u. a. 1998]. Nachteile dieses Systems sind dessen Instabilität und die notwendige Auflösung der Emulsionen im Anschluss an die Extraktion. Die SLM-Technologie zeichnet sich durch die Immobilisierung der organischen Phase in einer hydrophoben, mikroporösen Membran aus. Dabei werden keine Emulgatoren eingesetzt und die Technologie ist flexibler als die ELM-Technologie. Die Systeme sind jedoch instabil [Adarkar u. a. 1997].

Bei der Hohlfasermembran-gestützten Technologie werden für Extraktion und Rückextraktion zwei getrennte Einheiten verwendet. Wässrige und organische Phase werden

⁹Untersuchungen zum Stoffübergang und zur Modellbildung werden üblicherweise bei laminarer Strömung in einer Lewis-Rührzelle durchgeführt. Die Lewis-Rührzelle zeichnet sich durch eine feste Phasengrenzfläche und laminare Strömungsverhältnisse ohne Turbulenzen aus.

durch die feste Membran voneinander getrennt. Dieses System ist nichtdispersiv. Die Rückextraktion kann zur Aufkonzentrierung genutzt werden [Yang und Cussler 2000]. Höhere Verteilungskoeffizienten können durch einen höheren Volumenstrom und eine höhere Carrierkonzentration erzielt werden [Scheler u. a. 1997]. Hohlfasermembranmodule wurden zur Extraktion von Acetat [Lee u. a. 2001], Milchsäure [Scheler u. a. 1997], Penicillin G [Yang und Cussler 2000], [Lazarova u. a. 2002] sowie L-Phenylalanin [Maaß u. a. 2002] eingesetzt.

Stoffübergang bei der Reaktivextraktion von L-Phenylalanin mittels der Hohlfasermembran-gestützten Technologie

Von Maaß wurden Untersuchungen zum Stoffübergang bei der Reaktivextraktion von L-Phenylalanin in Hohlfasermembranmodulen durchgeführt [Maaß u. a. 2002]. Das verwendete System ist in Abb. 3.16 in Abschnitt 3.4.3 dargestellt. Die Stoffübergangskoeffizienten wurden bei laminarer Strömung für Extraktion (D_2EHPA in Kerosin) und Rückextraktion (H_2SO_4 -Lösung) bestimmt. Eine Verbesserung des Stoffübergangs konnte durch folgende Parameteränderungen erreicht werden:

- Erhöhung der Carrier-Konzentration,
- Erhöhung des Volumenstroms der Akzeptorphase,
- Verringerung des Volumenstroms der organischen Phase (Die Vermutung war, dass die Carrier bei einem hohen Volumenstrom nicht vollständig regeneriert wurden, sondern beladen blieben.) und
- Verdopplung der Schwefelsäurekonzentration (Verbesserung der Rückextraktion).

Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass der Prozess durch den Übergang von der organischen Phase in die Akzeptorphase und damit die Regenerierung der organischen Phase limitiert war [Maaß u. a. 2002]. Modellierungen von Takors [Takors 2003] hatten gezeigt, dass der Stofftransfer in Hohlfasermembranmodulen durch den Transport der L-Phenylalanin-Kationen in der Donatorphase und des Carrier-L-Phenylalanin-Komplexes in der Akzeptorphase limitiert ist. Eine Verbesserung der Extraktion könnte nur durch eine Erhöhung der Membranfläche oder die Verbesserung der Stoffübertragung erreicht werden. Die Stoffübertragung ist den Modellierungen zufolge in dem unter laminaren Bedingungen vorhandenen Film der wässrigen Phase limitiert. Daher würde eine Aufhebung des Films durch turbulente Strömungsbedingungen die Stoffübertragung verbessern.

3.3.3 Zentrifugalextraktion

Der erste Zentrifugalextraktor, ein Podbielniak-Extraktor, wurde in den frühen 1930ern für die biotechnologische Produktion entwickelt. Bei der großtechnischen Penicillin-Produktion ist eine 200fache Aufkonzentrierung erforderlich, da die Konzentration in der Kulturbrühe am Ende niedrig ist. Zudem ist bei der Aufarbeitung mittels Extraktion eine möglichst kurze Kontaktzeit mit dem Lösungsmittel erforderlich, da das Penicillin in der für die Extraktion notwendigen sauren Umgebung sehr instabil ist. Darüber hinaus neigt die Fermentationslösung zu stabilen Emulsionen, die durch Schwerkraft kaum zu trennen

sind. Durch den Einsatz des Podbielniak-Extraktors, eines vielstufigen Gegenstrom-Zentrifugalextraktors, konnten diese Probleme gelöst werden [Podbielniak u. a. 1970].

Die Funktionsweise von Zentrifugalextraktoren wird durch die Parameter Druck, Hold-up, Rückvermischung, Flutung und Effizienz charakterisiert. Der Eingangs- und Ausgangsdruck bestimmen die Position der Grenzfläche zwischen den beiden Flüssigkeiten. Sie muss so angeordnet sein, dass eine saubere Trennung der Phasen erfolgt. Hold-up ist definiert als der Volumenanteil der dispersen Phase in der Mischzone und ist ein Hinweis auf die Kontaktfläche. Die Rückvermischung nimmt mit der Zunahme von Volumenstrom und Drehzahl ab [Hafez 1983]. Flutung tritt auf, wenn die zwei Flüssigkeiten nicht effektiv getrennt werden, z.B. bei extremen Phasenverhältnissen von schwerer zu leichter Phase oder bei unausgeglichene Ausgangsdrücken. Die Flutung ist ein Maß für die Kapazität des Extraktors. Das wichtigste Kriterium für einen Zentrifugalextraktor ist die Effizienz, die abhängig von den Arbeitsbedingungen ist [Baier 1999].

Die Vorteile von Zentrifugalextraktoren gegenüber Extraktionssystemen wie Pulskolonnen, Mixer-Settlern oder Hohlfasermodulen, sind [Gebauer u. a. 1982]

- die große Phasenkontaktfläche und die sehr gute Stoffübertragung durch die starke Durchmischung der Phasen,
- die kurze Kontakt- und Aufenthaltszeit, wodurch auch empfindliche Stoffe extrahiert werden können,
- die Trennung der Phasen im Zentrifugalfeld, die den Einsatz von Stoffsystemen mit geringen Dichteunterschieden ermöglicht, so dass eine größere Anzahl an Lösungsmitteln einsetzbar ist,
- die flexiblen Phasenverhältnisse [Baier 1999],
- der hohe mögliche Durchsatz [Schuegerl 1994] und
- die vergleichsweise kleine Baugröße und das kleine Innenvolumen, insbesondere wenn hochwertige Baustoffe oder teure Lösungsmittel eingesetzt werden.

Die Nachteile von Zentrifugalextraktoren sind [Schuegerl 1994]

- hohe Investitionskosten und hohe variable Kosten,
- hohe Drücke, durch die die Extraktion beeinflusst wird,
- eine mögliche Flutung und unzureichende Phasentrennung bei extrem unterschiedlichen Volumenströmen der Phasen [Lo u. a. 1983] und
- die Bildung von Emulsionen, die nur schwer aufzulösen sind, z.B. durch Kontakt von Lösungsmittel mit Proteinen aus Bioprozessen [Yang und Cussler 2000].

Aufgrund der vielen Vorteile haben Zentrifugalextraktoren, ausgehend von der pharmazeutischen Industrie, Verwendung in der Farbstoffherstellung, in der Lebensmitteltechnik oder in der Kerntechnik gefunden [Gebauer u. a. 1982].

Bauarten von Zentrifugalextraktoren

Zentrifugalextraktoren können in Gruppen eingeteilt werden, dargestellt in Abb. 3.9. Systeme mit getrennten Einheiten für Mischung und Trennung werden als Mixer-Settler bezeichnet. Im Gegensatz zu den üblichen Mixer-Settlern erfolgt die Trennung nicht durch Schwerkraft, sondern durch Zentrifugalkraft. Diese Systeme haben entweder Misch- und Trennstufe in einer Einheit oder in separaten Einheiten und können zu Kaskaden ausgebaut werden. Die Phasen werden in jeder Stufe vollständig voneinander getrennt. Daneben gibt es Differentialkontaktoren mit axialer Phasenführung parallel zur Rotationsachse oder radialer Phasenführung. Diese weisen keine diskreten Stufen auf, sondern mehrere Stufen sind in einer Einheit vorhanden. Durchmischung und Trennung werden durch Einbauten und Hydrodynamik bestimmt [Gebauer u. a. 1982].

Zu den Differentialkontaktoren gehört der Alfa-Laval-Extraktor, der axial und radial durchströmt wird (siehe Abb. 3.10). Er besteht aus einer vertikal angeordneten Trommel mit einem System aus schraubenförmigen Kanälen. Die schwere Phase wird an der Rotationsachse eingeleitet und wandert aufgrund der Zentrifugalkraft nach außen während die leichte Phase an der Peripherie eingeleitet wird und nach innen wandert. Die Phasen bewegen sich im Gegenstrom in den Schraubengängen (Axialbewegung). Am oberen und unteren Ende werden sie durch Gitter in den inneren bzw. äußeren Schraubengang geleitet (Radialbewegung). In den Gängen und an den Gittern herrscht Turbulenz. Durch die Zentrifugalbeschleunigung werden die Phasen voneinander getrennt.

Der bereits erwähnte Podbielniak-Extraktor ist ebenfalls ein Differentialkontaktor, in dem die Flüssigkeiten kontinuierlich radial durch eine horizontal gelagerte, rotierende Trommel strömen (siehe Abb. 3.10). Wie im Alfa-Laval-Extraktor wird die schwere Phase an der Rotationsachse, die leichte Phase an der Peripherie zugeführt. An konzentrischen Lochblechen werden die im Gegenstrom geführten Phasen dispergiert und Tropfen koaleszieren, wodurch eine mehrstufige Gegenstrom-Extraktion stattfindet. Durch die Zentrifugalkraft erfolgt eine Phasentrennung [Gebauer u. a. 1982].

Der Wesfalia-Extraktor ist ein Mixer-Settler mit Misch- und Trennstufe in einer Einheit (siehe Abb. 3.11). In der vertikal angeordneten Trommel sind konische Tellerringe

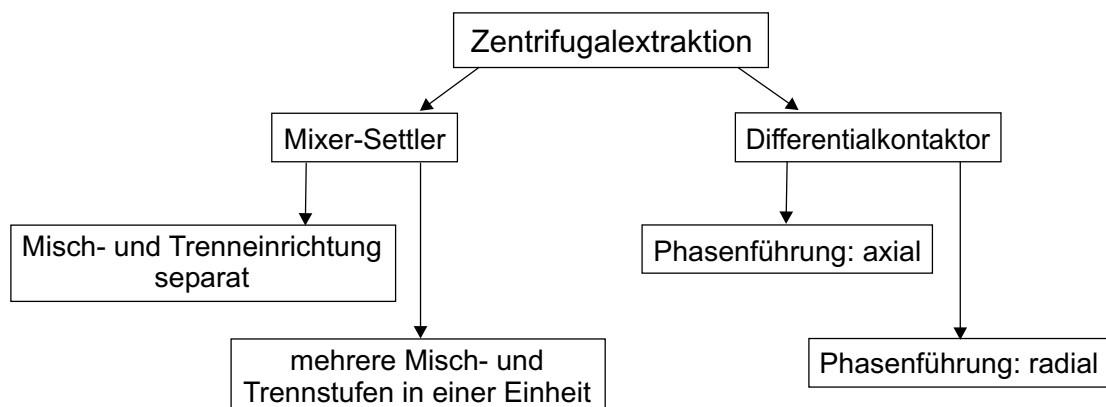


Abb. 3.9: Einteilung von Zentrifugalextraktoren [Gebauer u. a. 1982]

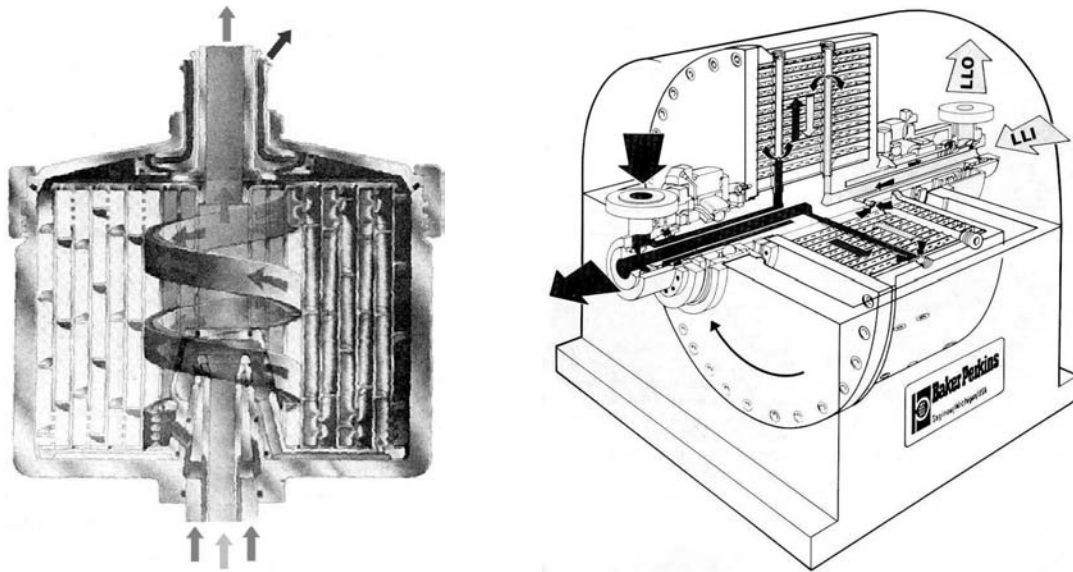


Abb. 3.10: Schematische Darstellung eines Alfa-Laval-Extraktors (links) und eines Podbielniak-Extraktors (rechts), aus [Hafez 1983]

eingebaut. Die vorab gemischten Phasen treten zentrisch in den Verteilerraum ein und werden in radialer Richtung beschleunigt. Die konischen Teller bewirken eine dünne Flüssigkeitsschicht und damit kurze Tropfenwege. Durch Steigkanäle strömt die Flüssigkeit nach oben [Gebauer u. a. 1982]. Die leichte Phase wird an der Rotationsachse ausgetragen, die schwere Phase an der Peripherie.

Neben dem Westfalia-Extraktor gehört der Robatel-Extraktor zu den Mixer-Settlern (siehe Abb. 3.11). In diesem Extraktor findet die Mischung der Phasen am unteren Ende der vertikal angeordneten Trommel in einer Mischkammer mittels eines Zentrifugalmischers statt. Von dort werden die Phasen in eine Trennkammer gefördert, die mit Kanalsystemen und Wehren zum Ablauf ausgestattet ist [Gebauer u. a. 1982].

Ein weiterer Mixer-Settler mit Misch- und Trennstufe in einer Einheit ist der Argonne National Laboratories (ANL) Extraktor. Die Mischung erfolgt in einem Ringspalt zwischen einem vertikal angeordneten Gehäuse und einem rotierenden Zylinder, wobei die Phasen im Gleichstrom fließen. Im Inneren des Zylinders werden die Phasen anschließend aufgrund ihrer Dichteunterschiede durch die Zentrifugalkräfte getrennt und fließen über ein Wehrsystem ab [Gebauer u. a. 1982]. Eine Weiterentwicklung des ANL-Extraktors ist der CINC-Zentrifugalextraktor [Meikrantz u. a. 2002] (siehe Abschnitt 3.3.4).

Die genannten Mixer-Settler-Systeme arbeiten im Gleichstrom. Ein Betrieb im Gegenstrom ist durch mehrere hintereinander geschaltete Einheiten realisierbar [Schuegerl 1994]. Im Gegenstrombetrieb können die Lösungsmittelmengen reduziert und die Endkonzentration des Extraktstoffs im Extraktionsmittel erhöht werden.

Die Auswahl eines Zentrifugalextraktors ist abhängig von Parametern wie den verwendeten Lösungen, der zu erreichenden Extraktionsrate und dem gewünschten Durchsatz [Verrall 1992]. Da Untersuchungen zu Rückvermischungseffekten und Stoffaustauschmes-

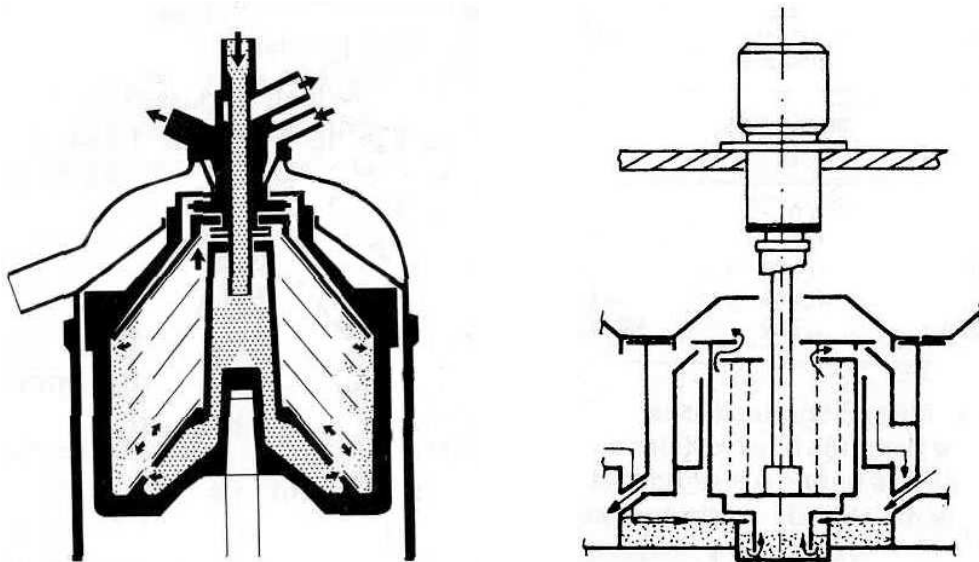


Abb. 3.11: Schematische Darstellung eines Westfalia-Extraktors (links), aus [Verrall 1992] und eines Robatel-Extraktors (rechts), aus [Gebauer u. a. 1982]

sungen experimentell schwierig sind, ist ein quantitativer Vergleich der Wirkungsgrade oder der Trennfähigkeit nicht möglich [Gebauer u. a. 1982]. Wichtige Eigenschaften der genannten Zentrifugalextraktoren sind in Tab. 3.2 zusammengestellt [Schuegerl 1994].

Die Stufeneffizienz ist in einstufigen Extraktoren wie dem CINC-Zentrifugalextraktor höher als in Extraktoren mit mehreren theoretischen Stufen [Hafez 1983]. Für die Prozessentwicklung, Evaluierung oder wenn eine häufige Reinigung notwendig ist, werden bei ausreichend hohem Verteilungskoeffizienten oftmals Extraktoren mit nur einer theoretischen Stufe verwendet, da diese leichter auseinander zu bauen und zu reinigen sind. Das Innenvolumen des CINC-Zentrifugalreaktors ist gering. Zudem zeichnet er sich dadurch aus, dass eine Umstellung von kontinuierlicher auf satzweise Extraktion, also Änderungen des Volumenstroms aber auch der Phasenverhältnisse keinen Einfluss auf

Tab. 3.2: Eigenschaften von Zentrifugalextraktoren [Hafez 1983], [Schuegerl 1994], [Vauck und Müller 1994], [Gebauer u. a. 1982]

Extraktor	Volumen [m ³]	Durchsatz [m ³ /h]	Eigenschaften
Alfa-Laval	0,02 ... 0,07	5 ... 20	hoher Durchsatz, kurze Verweilzeit, Trennung von Flüssigkeiten mit Neigung zu Emulsionsbildung
Podbielniak	0,8 ... 1,0	4 ... 200	hoher Durchsatz, kurze Verweilzeit, komplizierter Aufbau
Westfalia	0,003 ... 0,12	1,25 ... 120	hoher Durchsatz, kurze Verweilzeit, Trennung von Flüssigkeiten mit geringer Dichtedifferenz
Robatel	0,22 (BXP 800)	50	einfacher Aufbau
ANL/CINC	0,00014 ... 0,2 (CINC)	0,003 ... 0,76	geringes Volumen, einfacher Aufbau, hohe Stufeneffizienz, Trennung von Flüssigkeiten mit leicht auflösbaren Emulsionen

die Funktionstüchtigkeit des Extraktors haben. Zwischen den Einheiten sind bei diesem Extraktor keine Pumpen oder Behälter notwendig, wodurch das Umlaufvolumen der Flüssigphase minimiert wird.

Der Robatel und der ANL-Extraktor wurden in der Vergangenheit vor allem in der Nuklearindustrie eingesetzt, wo Sicherheit entscheidend ist. In der Biotechnologie finden Podbielniak-Extraktor, Alfa-Laval-Extraktor, Westfalia-Extraktor und CINC-Zentrifugalextraktor Anwendung. So wurde z.B. die Reaktivextraktion von Penicillin mit Amberlite LA-2 in n-Butylacetat in einem Westfalia-Extraktor beschrieben [Likidis und Schuegerl 1987].

3.3.4 CINC-Zentrifugalextraktor

Ein CINC-Zentrifugalextraktor, bei dem sich der Rotor in einem feststehenden Gehäuse befindet, ist in Abb. 3.12 dargestellt. Leichte und schwere Phase werden kontinuierlich tangential über die Eingänge an den beiden Seiten eingeführt. In dem schmalen Spalt zwischen Rotoraußenwand und Gehäuse erfolgt die Mischung der beiden Phasen und damit die Extraktion. Durch kontinuierliche Zufuhr neuer Flüssigkeit bewegt sich diese weiter zum Gehäuseboden, auf dem radial Stege befestigt sind, wodurch die im Ringspalt hervorgerufene Rotation der Flüssigkeit reduziert wird. Die Flüssigkeiten werden in die Mitte zur Rotationsachse und dort durch eine Öffnung in den Rotorinnenraum, die Trennzone, geleitet [Meikrantz 1990]. Der Rotor ist in vier vertikale Kammern eingeteilt, wodurch die Flüssigkeiten die gleiche Drehgeschwindigkeit erreichen wie der Rotor [Leonard 1988]. Durch die nachströmende Flüssigkeit bewegen sich die Flüssigkeiten im Rotor nach oben. Dabei bilden sich durch die Einwirkung der Zentrifugalkraft drei Phasen aus, die schwere Phase, eine Dispersionsphase und die leichte Phase. Die schwere Phase wird an der Außenseite über ein einstellbares Wehr ausgetragen; die leichte Phase wird innen nahe der Rotationsachse ausgetragen.

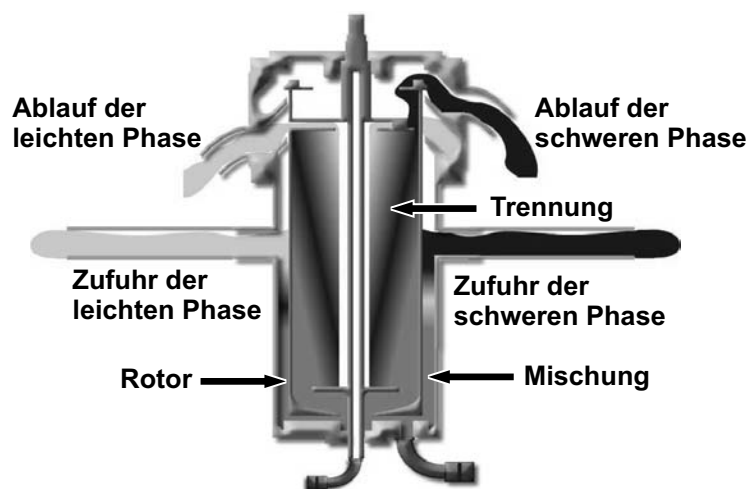


Abb. 3.12: Schematische Darstellung eines CINC-Zentrifugalextraktors, CINC Deutschland GmbH

Das Wehr am Ablauf der schweren Phase kann durch den Einbau unterschiedlicher Wehrscheiben¹⁰ an die Dichte der verwendeten Flüssigkeiten angepasst werden, so dass die Dispersionszone zwischen den Abflusswehren liegt. Durch Verwendung einer Wehrscheibe mit kleinerem Innendurchmesser und somit vergrößertem Gegendruck wird die Trenngrenze radial nach innen verschoben und umgekehrt. Die Dicke der Dispersionszone wächst mit zunehmendem Durchsatz. Der maximale Durchsatz des Extraktors ist erreicht, wenn beide Phasen verunreinigt sind [Leonard u. a. 1980]. Um ein stabiles System zu gewährleisten und starken Gegendruck zu verhindern, muss zudem ein freier Ablauf gewährleistet sein.

Wird mit scherempfindlichen Stoffen oder stark emulsionsbildenden Flüssigkeiten, z.B. hochviskosen Flüssigkeiten, gearbeitet, kann anstelle eines „High-Mix“-Einsatzes ein „Low-Mix“-Einsatz verwendet werden. Bei diesem sind keine Stege am Gehäuseboden angebracht, so dass die Scherkräfte deutlich geringer sind. Gleichzeitig wird jedoch der Stoffaustausch aufgrund der schlechteren Durchmischung verringert. Stoffübergang und Phasentrennung werden durch Rotordrehzahl, Volumenstrom und Scherkräfte beeinflusst. Über die Rotationsgeschwindigkeit können im Rotor Zentrifugalbeschleunigungen von 100-1000 g eingestellt werden [Meikrantz u. a. 2001].

Hydrodynamik und Phasentrennung

Der CINC-Zentrifugalextraktor lässt sich grob in drei Bereiche mit unterschiedlichen Stömungsverhältnissen einteilen, den ringförmigen Spalt zwischen Gehäuse und Rotor, die Zone unterhalb des Rotors und das Innere des Rotors.

In dem ringförmigen Spalt, in dem die Mischung stattfindet, herrscht Taylor-Couette-Strömung. Couette-Strömung wird durch konzentrische Stromlinien charakterisiert (Newton, 1687) und zur Messung der Viskosität benutzt. Rotiert der innere Zylinder schneller als der äußere Zylinder, bilden sich radiale Wirbel, die als Taylor-Wirbel bezeichnet werden (Stokes, 1848). Die Phasen werden emulgiert. Die Emulsion führt zu einer großen Stofftransferfläche zwischen den Phasen. Da sich die Flüssigkeiten durch Zufuhr neuer Flüssigkeiten zugleich axial bewegen, wird ein kontinuierlicher Kontakt gewährleistet. Durch die Taylor-Wirbel wird die axiale Dispersion reduziert [Baier 1999]. Werden pulsierende Schlauchpumpen für die Zufuhr der Flüssigkeiten verwendet, unterliegt das System leichten Druckschwankungen, die zu Rückvermischung führen können. In der Zone unterhalb des Rotors ist aufgrund der radial angebrachten Stege und der Drehung des Rotors turbulente Strömung anzunehmen.

Im Inneren des Rotors werden die Phasen im Zentrifugalfeld getrennt. Auch in diesem Bereich ist noch Phasenkontakt vorhanden und damit Stoffübergang. Die Absetzgeschwindigkeit (V_a) im Zentrifugalfeld kann durch das Stokes'sche Gesetz berechnet werden, wenn kugelförmige Partikeln, Newtonsche Flüssigkeiten, laminare Strömung und ungehindertes Absetzen gegeben sind.

¹⁰Die Wehrscheiben sind Lochscheiben mit unterschiedlichen Lochdurchmessern.

Es gilt:

$$V_a = \frac{d^2(\rho_s - \rho_l)}{18\eta} \cdot r\omega^2 \quad (3.37)$$

mit:

V_a	Absetzgeschwindigkeit	[m/s]
d	Tropfendurchmesser	[m]
ρ_s	Dichte der schweren Phase	[kg/m ³]
ρ_l	Dichte der leichten Phase	[kg/m ³]
r	Abstand zum Mittelpunkt des Rotors	[m]
ω	Winkelgeschwindigkeit	[m/s]
η	Dynamische Viskosität	[Pa·s]

Demnach ist die Trennung der Phasen umso schneller, je größer die Tropfen, die Drehgeschwindigkeit des Rotors, der Dichteunterschied zwischen den Phasen und je kleiner die Viskosität der Flüssigkeiten ist. Im Extraktor sind die genannten Voraussetzungen jedoch nicht gegeben. Unter anderem treten Tropfenschwärme auf und die Hydrodynamik wird durch die stattfindende Reaktion beeinflusst. Dennoch kann entnommen werden, wie das Zentrifugalfeld Koaleszenz und Stofftransfer beeinflusst [Weatherley 1994].

Die Phasentrennung kann durch eine Erhöhung der Verweilzeit verbessert werden. Dies wird entweder durch einen geringeren Volumenstrom oder eine größere Zentrifuge erreicht. Durch die Erhöhung der Drehzahl, die zu einer erhöhten Zentrifugalbeschleunigung führt, können kleinere Tröpfchen abgetrennt werden. Werden im Spalt zwischen Gehäuse und Rotor durch eine hohe Drehzahl kleine Tröpfchen erzeugt, so wird eine bessere Trennung eher durch eine größere Verweilzeit als durch eine weitere Erhöhung der Drehzahl erreicht [Meikrantz u. a. 2001].

Emulsionen bilden sich bei zu geringer Dichtedifferenz, geringer Oberflächenspannung und hohen Viskositätsunterschieden. Die sich im Inneren des Rotors zwischen den Phasen ausbildende Dispersionsphase ist von der Dichtedifferenz, der Rotations-Geschwindigkeit, dem Durchsatz und der Neigung der Phasen zur Emulsionsbildung abhängig. Je stabiler die gebildete Emulsion ist, desto dicker ist auch die Dispersionszone. Grenzflächenaktive Stoffe wie Tenside mit lipophilem Rest und hydrophiler Gruppe lagern sich an der Grenzfläche an und setzen die Oberflächenspannung herab. Emulgatoren, Proteine, Fette oder Polysaccharide beeinflussen die Grenzfläche [Weatherley 1994].

Stoffübergang

Die Theorie des Stoffübergangs wurde in Abschnitt 3.3.1 genauer erläutert. Bei der Extraktion in Zentrifugen ist eine Phase dispers, die andere, normalerweise die mit dem größeren Volumen, kontinuierlich. Die Beschreibung des Stoffübergangs in Extraktoren ist problematisch, da der Stofftransfer in Tropfen betrachtet werden muss. Verhalten und Mobilität der Tropfen und Tropfenschwärme sind jedoch nicht verstanden. Kleine Tropfen (2 mm) sind starr und sphärisch, während bei größeren Tropfen interne Zirkulation und Oszillation auftritt. Mit zunehmender Größe tritt Turbulenz auf, der Stoffübergang nimmt zu und ist dann unabhängig von der Diffusion [Bart 2001]. Hinzu kommt das Marangoni-Phänomen, eine spontane Phasengrenzflächenströmung (Konvektion), die

durch Grenzflächenspannungsgradienten angetrieben wird. Grenzflächenturbulenz tritt auf, wodurch der Stoffübergang verbessert wird. Die Turbulenzintensität ist abhängig vom Konzentrationsgradienten und den physikalischen Eigenschaften des Systems. Dieses Phänomen tritt oftmals bei einer chemischen Reaktion oder Emulsionsbildung auf [de Ortiz 1992]. Zudem ändert sich der zwischen den Phasen vorliegende Konzentrationsgradient über die Mischungsstrecke in der Zentrifuge bis zur Trennung der Phasen. Im CINC-Zentrifugalextraktor ist darüber hinaus das Flüssigkeitsvolumen in den einzelnen Bereichen des Extraktors nicht genau bestimmbar, da der Füllstand im Spalt und das sich an der Rotorachse ausbildende Luftpolster abhängig vom Volumenstrom ist. Die Volumina der Phasen sind abhängig von der gewählten Wehrscheibe. Eine Wehrscheibe mit kleinerem Innendurchmesser führt so zu einer kleineren organischen Phase, da die Phasengrenze durch den erhöhten Gegendruck am Auslauf der schweren Phase radial nach innen verschoben wird und umgekehrt.

Die Berechnung der Strömungs- und Stoffaustauschvorgänge disperser Flüssig-Flüssig-Systeme in Zentrifugalfeldern ist bislang aufgrund der komplexen Strömungsfelder nicht möglich [Otillinger und Blass 1985], [Boychyn u. a. 2001].

Berechnung charakteristischer Parameter der Extraktion

Zur Bewertung der Extraktionsleistung können verschiedene Parameter verwendet werden. Der Extraktionsgrad E und der Rückextraktionsgrad RE , der auf das extrahierte L-Phenylalanin bezogen wird, berechnen sich wie folgt:

$$E[\%] = \frac{c_{D_{ein}} - c_{D_{aus}}}{c_{D_{ein}}} \cdot 100 \quad (3.38)$$

$$RE[\%] = \frac{c_{A_{aus}}}{c_{D_{ein}} - c_{D_{aus}}} \cdot \frac{V_A}{V_D} \cdot 100 \quad (3.39)$$

Die Effizienz der Extraktion (ϵ_E) und der Rückextraktion (ϵ_{RE}) wird wie folgt berechnet:

$$\epsilon_E = \frac{c_{D_{ein}}}{c_{D_{ein}}^0} \quad (3.40)$$

$$\epsilon_{RE} = \frac{c_{A_{ein}}}{c_{D_{ein}}^0} \cdot \frac{V_A}{V_D} \quad (3.41)$$

Außerdem können Extraktions- (ER) und Rückextraktionsraten (RER) berechnet werden:

$$ER = \frac{\Delta c_{D_{ein}}}{\Delta t} \quad (3.42)$$

$$RER = \frac{\Delta c_{A_{ein}}}{\Delta t} \quad (3.43)$$

Als „Wiederfindung“ wird die Summe aus nachweisbarem Extraktstoff im Donator und Akzeptor bezogen auf den eingesetzten Extraktstoff bezeichnet:

$$Wiederfindung[\%] = \frac{c_{D_{ein}} + c_{A_{ein}}}{c_{D_{ein}}^0} \cdot \frac{V_A}{V_D} \cdot 100 \quad (3.44)$$

mit:

c_D	Extraktstoff-Konzentration im Donator	[mol/l]
c_A	Extraktstoff-Konzentration im Akzeptor	[mol/l]
ein, aus	Eingang, Ausgang der Zentrifuge	

3.4 Integration der Produktaufarbeitung in den Produktionsprozess

Integrierte Prozesse sind definiert als Prozesse, bei denen Produktbildung und Gewinnung des Produktes gleichzeitig erfolgen [Schuegerl u. a. 1994]. Die integrierte Produktaufarbeitung ist ein Ansatz zur Erhöhung der Produktivität und Reduzierung der Produktionskosten [Schuegerl 2000]. Sowohl eine Inhibierung der Produktion durch ein Produkt kann vermieden werden als auch ein Produkt vor Veränderungen, z.B. vor Oxidation geschützt werden. Darüber hinaus kann dadurch eine Aufkonzentrierung des Produktes erreicht und damit das Volumen und die Kosten für nachfolgende Schritte reduziert werden.

Verfahren für die *In-situ* Produktaufarbeitung sind Verdampfung, Extraktion, grö ßenselektive Permeation, Elektrodialyse, reversible Komplex-Bildung oder Produktimmobilisierung. Produkte wie Ethanol, Aceton-Butanol, organische Säuren wie Milchsäure, Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure oder Pharmazeutika wie Penicillin, Cycloheximid, Oxytetracyclin oder Alkaloide wurden untersucht [Freeman u. a. 1993]. Organische Säuren und Aminosäuren können durch Präzipitation, Solvent-Extraktion, Elektrodialyse, Ionenaustausch oder Kristallisation abgetrennt werden, Antibiotika durch Adsorption, Solvent-Extraktion oder Kristallisation [Schuegerl 2000].

Um eine externe Produktabtrennung in einen Produktionsprozess integrieren zu können, müssen vorab die Zellen abgetrennt werden. Dabei dürfen die Mikroorganismen nicht durch Gradientenbildung und nachfolgende Sauerstofflimitierung im Umlauf zur Zellrückhaltung beeinflusst werden. Die verwendete Aufarbeitungstechnik muss selektiv für das Produkt sein. Bei einem Einsatz der Reaktivextraktion ist die mögliche Toxizität der Carrier entscheidend, denn ein negativer Effekt auf die Zellen im Bioreaktor durch Rückführung des Fermentationsmediums muss unbedingt vermieden werden. Zudem sollte die Ionenstärke des Mediums möglichst nicht beeinflusst werden und der Verlust an Medienbestandteilen wie Salzen gering sein.

3.4.1 Filtration

Bei der Filtration werden Komponenten aus einem Gemisch aufgrund ihrer Größe getrennt. Es wird zwischen Kuchenfiltration und Querstromfiltration unterschieden. Bei der Querstromfiltration wird die zu filtrierende Lösung tangential zur Membran gefördert. Das Filtrat, auch Permeat genannt, passiert die Membran, während Rückstände durch die Strömung im Konzentrat weggespült werden. Ein Filtrationskuchen baut sich nicht auf (siehe Abb. 3.13). Die treibende Kraft für den Transport über die Membran entsteht durch Gradienten im chemischen Potential¹¹, d.h. Konzentrations-, Druck- oder Temperaturdifferenz. Relativ geringe Scherkräfte und die Möglichkeit der kontinuierlichen Filtration machen diese Methode für die Zellrückhaltung geeignet [Verrall 1996].

¹¹Das chemische Potential ist eine treibende Kraft, ausgedrückt durch die Änderung der freien Energie des Systems als Folge der Änderung der Zusammensetzung des Systems [Cheryan 1998].

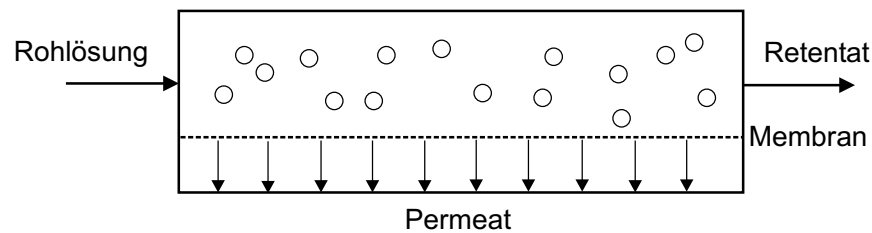


Abb. 3.13: Schematische Darstellung der Querstromfiltration

Filtrationsmodule

An Filtrationsmembranen werden die Anforderungen mechanischer, thermischer und chemischer Stabilität, guter Reinigungsmöglichkeiten, eines großen Oberflächen/Volumen-Verhältnisses und einer günstigen Fertigung gestellt. Zu den für Membranen verwendeten Materialien gehören anorganische Materialien wie Keramik oder organische Polymere, wie Celluloseacetat, Polyamid oder Polysulfon. Polysulfonmembranen werden oftmals für die Zellabtrennung verwendet. Durch diese dünnen Membranen ($0,1\text{--}0,5\ \mu\text{m}$) werden hohe Permeatflüsse erreicht. Eine Stabilisierung der Membranen erfolgt durch eine auf die Membran aufgebrachte schaumförmige Stützschrift ($150\text{--}300\ \mu\text{m}$) [Lee und Clark 1998].

Es gibt verschiedene Modulbauarten (siehe Abb. 3.14), z.B. Rohrmodule, Hohlfasermodule oder Plattenmodule. Rohrmodule sind für hochviskose oder Partikel enthaltende Medien geeignet. Vorteile der Rohrmodule sind der durch die turbulente Strömung bedingte geringere Druckverlust sowie eine geringe Tendenz zur Konzentrationspolarisation. In Hohlfasermodulen sind Membranfasern in einem Gehäuse angeordnet. Diese Module haben ein hohes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen, wodurch Innenvolumen, Verweilzeit und Förderstrom niedrig sind. Die Strömung ist laminar und die Scherraten daher vergleichsweise gering. Allerdings sind Druck und Druckverlust im Inneren der Fasern groß [Weatherley 1994]. Plattenmodule sind aus mehreren Membranlagen aufgebaut, die die Retentat- bzw. Filtratkanäle begrenzen. Zwischen den Membranen befinden sich gewebeartige Abstandshalter. Die Kanalabdichtung stellt sicher, dass die getrennten Fraktionen zu den jeweiligen Abflüssen am Kassettengehäuse geleitet werden [Schleicher und Schuell 2000]. Nach Gerigk ist ein Hohlfasermodule am besten für die Zellrückhaltung von *E. coli* geeignet [Gerigk 2001].

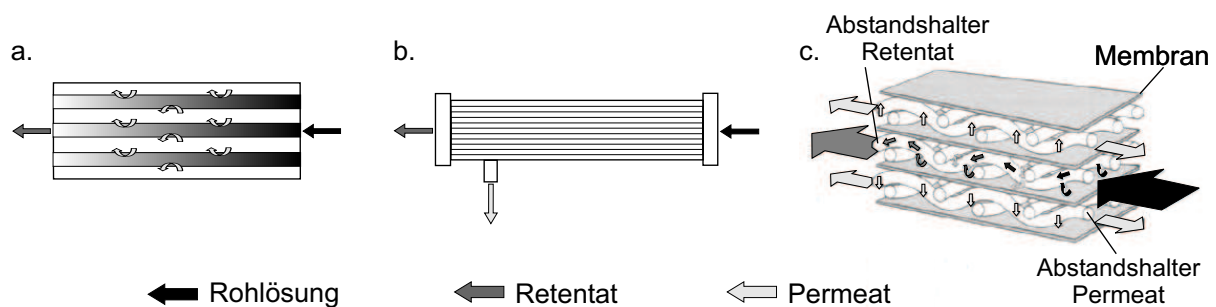


Abb. 3.14: Beispiele für Modulbauarten: a. Rohrmodul, b. Hohlfasermodule, c. Kassettenmodul

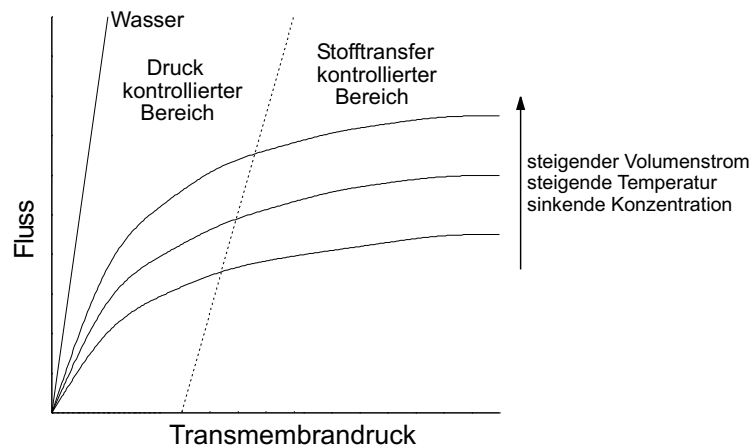


Abb. 3.15: Abhängigkeit des Permeatflusses vom Transmembrandruck

Ultrafiltration

Bei der Filtration werden die Verfahren abhängig von der Porengröße unterschieden. Bei der Ultrafiltration liegt die Porengröße bei $0,001\text{--}0,02\text{ }\mu\text{m}$ oder $1\text{--}1000\text{ kDa NMWC}^{12}$, bei der Mikrofiltration bei $0,02\text{--}10\text{ }\mu\text{m}$. Die Trennung erfolgt bei beiden Verfahren abhängig von der Größe. Die Ultrafiltration wird oftmals zur Rückhaltung von Zellen und Proteinen eingesetzt. Ionen und niedermolekulare Substanzen passieren die Membran, so dass pH-Wert und Ionenstärke konstant bleiben [Weatherley 1994].

Der Filtratfluss bei der Ultrafiltration ist abhängig vom Transmembrandruck (TMP) (siehe Abb. 3.15). Dieser berechnet sich wie folgt [Schleicher und Schuell 2000]:

$$TMP = \frac{p_{\text{Einlass}} + p_{\text{Auslass}}}{2} - p_{\text{Permeat}} \quad (3.45)$$

Mit steigendem Transmembrandruck nimmt der Filtratfluss zu. Der Fluss von reinem Wasser steigt linear an, wohingegen der Filtratfluss bei Filtration von Prozesslösungen zunächst linear ansteigt und sich dann in Abhängigkeit von Konzentration, Temperatur, tangentialer Geschwindigkeit und Druckabfall einem Grenzwert annähert. Demzufolge ist der Permeatfluss bei hohen Transmembrandrücken nicht druckabhängig, sondern stoffübergangskontrolliert [Cheryan 1998].

Konzentrationspolarisation und Fouling führen zu einer Verringerung des Permeatflusses. Bei der Konzentrationspolarisation konzentrieren sich nicht filtrierte Substanzen durch Konvektion an der Membran bis über die Löslichkeitsgrenze und kristallisieren aus. Dieser Effekt kann durch eine Änderung der Betriebsparameter aufgehoben werden¹³. Fouling entsteht durch bakterielles Wachstum, die Ablagerung organischen Materials oder von Kolloiden an der Membran, z.B. Ablagerung von Proteinen in Poren von

¹²Der „Nominal Molecular Weight Cut-off“ (NMWC) gibt die Molekulargewichtsgrenze der Partikeln an, die die Membran nicht mehr passieren können.

¹³Die Konzentrationspolarisation kann durch eine verringerte Zulaufkonzentration oder eine Verringerung der Grenzschichtdicke durch erhöhte Rückdiffusion, Mischen senkrecht zur Membran, eine Erhöhung des Zulaufvolumenstroms oder Luftblasen im Zulaufstrom aufgehoben werden.

Ultrafiltrationsmembranen [Weatherley 1994]. Dieser Effekt ist von der Wechselwirkung der Lösungsbestandteile abhängig. Die Membran ist nur durch Reinigung zu regenerieren.

Eine Modell, das den Fluss im druckkontrollierten und im stoffübergangskontrollierten Bereich beschreibt, ist das Widerstandsmodell [Cheryan 1998]:

$$J = \frac{TMP}{R_M + R_G + R_P} \quad (3.46)$$

Bei diesem Modell wird der membraneigene Widerstand R_M , der Widerstand der Gelschicht R_G und der Widerstand durch Adsorption von Partikeln an den Porenwänden R_P berücksichtigt.

3.4.2 Integrierte (Reaktiv-)Extraktion

Toxizität von Lösungsmitteln

Verschiedene Lösungsmittel reduzieren das Wachstum und die metabolische Aktivität von Mikroorganismen bzw. wirken sogar toxisch. Dies geschieht durch Einlagerung der Lösungsmittelmoleküle in oder an die Lipid-Schicht der Zellwand. Als Maß für die Biokompatibilität von organischen Lösungsmitteln gilt der $\log P$ -Wert, der als Logarithmus des Verteilungskoeffizienten in einem standardisierten 2-Phasengemisch aus n-Octanol und Wasser definiert ist:

$$\log P = \log \frac{c_{\text{Lösungsmittel}}^{n\text{-Octanol}}}{c_{\text{Lösungsmittel}}^{H_2O}} \quad (3.47)$$

Die Biokompatibilität nimmt mit abnehmender Polarität der Lösungsmittel zu. Lösungsmittel mit einem $\log P$ über 4 weisen eine gute Biokompatibilität auf [Vermue u. a. 1993]. Die bei der Reaktivextraktion oftmals als Carrier verwendeten Amine sind bereits in geringen Konzentrationen toxisch für Zellen [von Frieling und Schuegerl 1999], z.B. ist Alamin 336 toxisch für *Lactobacillus delbrueckii*. Geringe Mengen des Carriers D₂EHPA von bis zu 25 mg/l wirken sich dagegen positiv auf die Zellen und die Produktion von L-Phenylalanin mit *E. coli* aus. Die Annahme war, dass die Integrität der Zellmembran durch den Carrier verändert wurde. Dadurch wurde der L-Phenylalanin-Transport aus der Zelle möglicherweise verbessert und eine anzunehmende Inhibierung verringert oder aufgehoben [Maaß 2001]. Erst höhere Konzentrationen haben einen negativen Effekt auf Wachstum und Produktbildung.

Eine Maßnahme zur Reduzierung der Toxizität ist die Immobilisierung der Zellen. Durch Zugabe von Sojaöl oder Sonnenblumenöl, das sich in die Matrix einlagert, kann gelöstes Lösungsmittel aus der Matrix ferngehalten werden. Eine andere Maßnahme zur Reduzierung der Solventtoxizität ist der Einsatz von Membranen [Yabannawar und Wang 1991b], [Tik u. a. 2001].

Anwendungsbeispiele der integrierten Reaktivextraktion

Bislang sind nicht viele Prozesse zur Online-Produktextraktion während eines Fermentationsprozesses bekannt. Dies ist wahrscheinlich durch die Toxizität vieler Carrier

begründet. In den beschriebenen Ansätzen wurden die Zellen meist vorab mittels Filtration abgetrennt, um den direkten Kontakt der Zellen mit Lösungsmittel zu vermeiden. Die integrierte Extraktion von Ethanol, Butanol, Carboxysäuren, und Penicillin wurde beschrieben [Schuegerl u. a. 1994]. Milchsäure, die mit *Lactobacillus delbrueckii* produziert wird, konnte mit Alamin 336 in Oleylalkohol in einer Mixer-Settler-Einheit online extrahiert werden. Wachstum und Milchsäureproduktion wurden durch die Online-Extraktion verbessert, aber aufgrund der Toxizität des Carriers lag die maximale Extraktionsdauer bei sechs Stunden [Ye u. a. 1996], [Honda u. a. 1995]. Durch eine Immobilisierung der Zellen wurde eine Prozessverbesserung mit integrierter Extraktion über 16 Stunden erreicht [Yabannawar und Wang 1991a].

Zitronensäure wurde aus einer kontinuierlichen Fermentation mit *Aspergillus niger* extrahiert (Tri-Dodecylamin/Kerosin/Oktanol). Zur Rückhaltung von organischen Bestandteilen wurde der Fermentationsüberstand vor der Rückführung in den Bioreaktor über einen Aktivkohlefilter geleitet. Durch die Aufteilung der Fermentation in mehrere Produktionsphasen, wobei nach jeder Phase 80 % der Fermentationsbrühe gegen neues Medium getauscht wurden, konnte im Vergleich zu Experimenten im Satzverfahren Medium eingespart und die Betriebsdauer verlängert werden [Wieczorek und Brauer 1998].

Von Stark [Stark u. a. 2003] wurde ein Verfahren zur Extraktion von 2-Phenylethanol aus einer Biotransformation mit *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben. Dabei wurde das Extraktionsmittel Dibutyl Sebacat in einer Polymermembran eingekapselt, so dass direkter Kontakt mit Zellen vermieden wurde. Mittels eines Wirbelbettes, das an den Bioreaktor und einen zweiten Kreislauf gekoppelt war, erfolgten Extraktion und Rückextraktion zur Regenerierung der Kapseln. Mittels dieses Verfahrens konnte mehr 2-Phenylethanol aus L-Phenylalanin produziert werden.

3.4.3 Stand der integrierten L-Phenylalanin-Abtrennung mittels Reaktivextraktion

Ein System zur integrierten Abtrennung von L-Phenylalanin aus einem Fermentationsprozess im 300 l Bioreaktor wurde von Maass u. a. und Gerigk u. a. entwickelt [Maass u. a. 2002], [Gerigk u. a. 2002b]. Dabei wurden Hohlfasermembranmodule zur Extraktion verwendet, ein dispersionsfreies System, bei dem die Toxizität organischer Substanzen durch den fehlenden direkten Phasenkontakt relativ gering ist.

Eine schematische Darstellung des Systems ist in Abb. 3.16 gezeigt. Während einer Fermentation zur L-Phenylalanin-Produktion wurde über einen Umlauf mit Ultrafiltrationsmodul zur Zellrückhaltung zellfreies, L-Phenylalanin-Ionen enthaltendes Permeat gewonnen. Das Permeat wurde in die Extraktionsanlage gepumpt. Im ersten Hohlfasermembranmodul wurde L-Phenylalanin (Phe) aus dem zellfreien Permeat mit dem Kationentauscher D₂EHPA in Kerosin als organischer Phase extrahiert. Das die Zentrifuge verlassende wässrige Raffinat (H) wurde in den Bioreaktor zurückgeführt. Die organische Phase mit dem beladenen Carrier (C-Phe) wurde zur Rückextraktion mit 1 M Schwefelsäure in das zweite Hohlfasermembranmodul geleitet. L-Phenylalanin-Kationen wurden im Akzeptor (AH) aufkonzentriert und der Carrier regeneriert (CH) (vgl. Abschnitt 3.3.1).

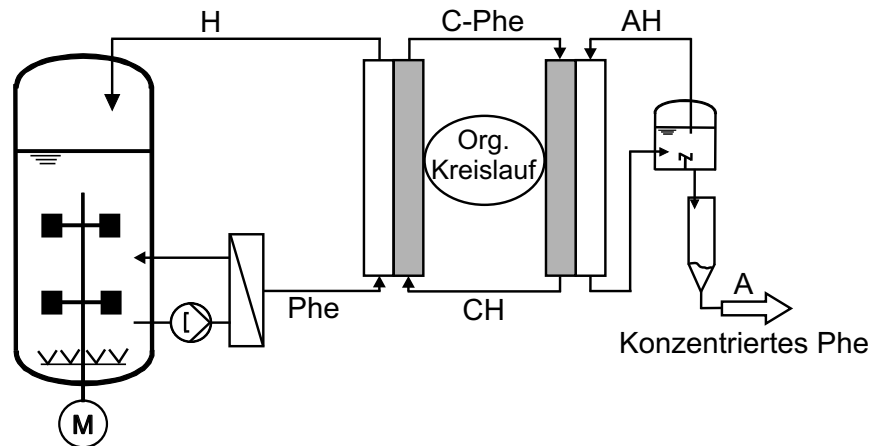


Abb. 3.16: Fermentationsprozess mit integrierter Reaktivextraktion in Hohlfasermembranmodulen

Durch die Integration der Abtrennung konnte die L-Phenylalanin-Konzentration im Vergleich zu einem Prozess ohne integrierte Produktabtrennung von 29 g/l, bzw. 22 g/l bei Betrieb des Umlaufs ohne Extraktion, auf 31 g/l gesteigert werden. Die Extraktion hatte demzufolge einen positiven Effekt. Der Umlauf schien sich jedoch negativ auf die Produktivität der Zellen auszuwirken. Die Raum-Zeit-Ausbeute lag bei 0,6–1,2 g/(l·h), die der Extraktion bei 0,3–0,5 g/(l·h), so dass weniger als 1/3 des produzierten L-Phenylalanins extrahiert wurde. Die integrale L-Phenylalanin-Glucose-Selektivität wurde durch die Integration der Abtrennung um 24 % (relativ) gesteigert. Durch eine Fällung des in der Schwefelsäure aufkonzentrierten L-Phenylalanins und Trocknung wurde eine L-Phenylalanin-Reinheit von über 98 % erreicht.

4 Produktionsorganismen, apparativer Aufbau und Durchführung der Experimente

4.1 Biologisches System

4.1.1 Produktionsstämme

Zur Produktion von L-Phenylalanin wurden *E. coli* Stämme durch die zielgerichtete Deletion oder Überexpression bestimmter Gene im Institut für Biotechnologie 1 der Forschungszentrum Jülich GmbH oder von der DSM Biotech GmbH hergestellt. Die Glucoseaufnahme erfolgte entweder über das Phosphotransferase-System (PTS(+)) oder über ein heterologes System aus *Zymomonas mobilis* (PTS(-)). Bei allen verwendeten Stämmen war der Aromatenbiosyntheseweg zur Produktion von L-Phenylalanin verändert (vgl. Abschnitt 3.1.2).

Die Produktionsstämme basierten auf dem Stamm *E. coli* K12 LJ110 (W3110) [Zeppenfeld u. a. 2000]. Durch chromosomale Deletion der Gene *pheA*, das die Chorismatmutase/Prephenatdehydratase kodiert und *tyrA*, das die Chorismatmutase/Prephenatdehydrogenase kodiert, waren die Stämme L-Tyrosin- und L-Phenylalanin-auxotroph. Die L-Tyrosin-Auxotrophie verhinderte den Kohlenstofffluss in die L-Tyrosin-Synthese. Zusätzlich war das Gen *aroF* deletiert, das die Tyrosin-spezifische 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat-Synthase (DAHP-Synthase) kodiert. Zur Produktion von L-Phenylalanin wurden die Zellen mit dem Expressionsvektor pJF119EH transformiert. Der für die Prozessentwicklung verwendete Stamm *E. coli* 4pF81 enthielt plasmidkodiert die Gene des Aromatenbiosyntheseweges *aroF*, *pheA*^{*}, das eine gegen Feedback-Inhibierung durch L-Phenylalanin resistente Variante der Chorismatmutase/Prephenatdehydratase kodiert, *aroB*, das die 3-Dehydroquinat-Synthase kodiert und *aroL*, das die Shikimatkinase II kodiert. Alle anderen Gene waren Wildtyp-Gene. Durch die Überexpression wurde die Akkumulation von Intermediaten der Aromatenbiosynthese auf dem Weg zu L-Phenylalanin weitgehend vermieden und der Kohlenstofffluss zu L-Phenylalanin gewährleistet. Die Gene waren unter Kontrolle des synthetischen, durch IPTG induzierbaren *P_{tac}*-Promotors. Ampicillinresistenz wurde als Selektionsmarker für Plasmide enthaltende Zellen plasmidkodiert exprimiert.

Im Gegensatz zu dem Stamm *E. coli* 4pF81, bei dem die Glucose über das Phosphotransferase-System aufgenommen wurde, erfolgte die Glucoseaufnahme bei dem Stamm *E. coli* 20pMK12 über ein heterologes Glucoseaufnahmesystem aus *Z. mo-*

Tab. 4.1: Genetischer Hintergrund der verwendeten Produktionsstämme

Bezeichnung	Stamm	Plasmid
4pF81	LJ110 $\Delta(pheA\ tyrA\ aroF)$	pJF119EH <i>aroF pheA* aroB aroL amp^R</i>
4pF69	LJ110 $\Delta(pheA\ tyrA\ aroF)$	pJF119EH <i>aroF pheA* aroL amp^R</i>
20pMK12	LJ110 $\Delta(pheA\ tyrA\ aroF)::$ <i>P_{tac}(aroF*<i>pheA</i>*)</i> $\Delta(ptsH\ ptsI\ crr)::kan$	pJF119EH <i>aroF* glf pheA* amp^R</i>

bilis. Bei diesem Stamm war das Phosphotransferase-System durch Deletion der Gene *ptsH*, *ptsI* und *crr* ausgeschaltet. Der Stamm enthielt chromosomal unter Kontrolle des *P_{tac}*-Promotors das Gen *aroF**, das eine gegen Feedback-Inhibierung durch L-Tyrosin resistente Variante der DAHP-Synthase kodiert und *pheA**. Das eingebrachte Plasmid pMK12 enthielt die Gene *aroF**, *pheA** und das den Glucose-Facilitator zur Glucoseaufnahme kodierende Gen *glf*. Auch bei diesem Konstrukt waren die Gene unter Kontrolle des durch IPTG induzierbaren *P_{tac}*-Promotors. Die Genotypen aller verwendeten Stämme und Plasmide zeigt Tab. 4.1.

4.1.2 Stammhaltung und Vorkultur

Zur Herstellung von Kulturen zur Stammhaltung wurden 100 ml Luria-Bertani (LB) Medium mit 1 % Ampicillin mit einer Kolonie von einer Agarplatte angeimpft. Im Schüttelinkubator wurden die Kulturen bei 37 °C und 150 Upm kultiviert. Bei Erreichen einer optischen Dichte (bei 620 nm) von 3-4 wurde die Kultur mit 50 % Glycerin versetzt und in Aliquots von 1,5–1,8 ml bei -80 °C gelagert.

Vorkulturen wurden durch Animpfen von 250 ml Vorkulturmedium in einem 1 l Schüttelkolben mit Schikanen mit 250–1000 μ l Stammkultur inokuliert, abhängig vom Wachstum des verwendeten Stamms. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 150 rpm in einem Schüttelinkubator Stamm-abhängig für 15 bis 20 Stunden bis zu einer $OD_{620} = 3 - 4$ inkubiert (siehe Abschnitt A.2.1 für Medienangaben).

4.2 Fermentationen im Zulaufverfahren im Sixfors vario

Experimente zur Charakterisierung von Stämmen wurden in der Sixfors vario Anlage (Infors AG; Basel, Schweiz) durchgeführt. Die Anlage bestand aus sechs parallelen Rührkeseln. Das Arbeitsvolumen lag bei 1,5–2,3 l. Der Fermentationsprozess im Zulaufverfahren basierte auf einer von Gerigk im 20 l Bioreaktor entwickelten Strategie [Gerigk 2001]. Vorkultur, Medium, die Sollwerte der Parameter Temperatur (37 °C), pH-Wert (6,5) und pO_2 (>30 %), Induktionszeitpunkt, Glucosekonzentration (5 g/l), Wachstumslimitierung durch L-Tyrosin und Fermentationsdauer (50 h) wurden übernommen.

4.2.1 Online-Analysemethoden

Temperatur, Begasung und Rührerdrehzahl

Die Temperatur wurde über einen Pt-100 Sensor gemessen. Zur Temperaturanpassung dienten elektrisch beheizte Thermomäntel und Kühlfinger in den Reaktoren. Die Begasung erfolgte mit Luft, deren Zufuhr über einen Massenstromregler geregelt wurde. Der Zuluftvolumenstrom lag im Bereich von 0,5–2,5 l/min. Die Rührerdrehzahl lag im Bereich von 500–1500 Upm. Die Fermentationen wurden bei Normaldruck durchgeführt. Geregelt wurden die Parameter mittels integrierter PID-Regler.

pH-Wert

Zur Messung des pH-Werts kamen Gelelektroden zum Einsatz. Vorab erfolgte eine Zweipunkt-Kalibrierung mit Pufferlösungen pH 4,0 und pH 7,0. Der pH-Sollwert wurde mittels eines PID-Reglers gehalten. Über diesen wurden Peristaltikpumpen an der Basiseinheit zur Dosierung von 25 %iger Ammoniaklösung angesteuert.

Sauerstoffpartialdruck

Die Gelöstsauerstoffkonzentration wurde über eine amperometrische Sauerstoffelektrode erfasst. Die Kalibrierung erfolgte vor der Inokulation durch Einstellung von 100 % Sättigung bei einer Drehzahl von 1000 Upm und Begasung mit 1,5 l/min. Der Null %-Wert wurde durch Begasung mit Stickstoff eingestellt. Über manuelle Einstellung der Begasungsrate und automatische Anpassung der Rührerdrehzahl wurde die Gelöstsauerstoffkonzentration geregelt.

Abgasanalytik

Kohlendioxid und Sauerstoff wurden in einem Teilstrom der Abluft mittels einer Abgasanalytik (Fisher-Rosemount GmbH, Hasselroth) gemessen. Die Konzentrationsbestimmung von Kohlendioxid erfolgte durch Nahinfrarotabsorption, die von Sauerstoff durch paramagnetische Messung¹. Der Nullabgleich der Abgasmessung erfolgte mit Stickstoff. Mit Prüfgas wurden 10 % Kohlendioxid, mit Luft 20,93 % Sauerstoff eingestellt.

4.2.2 Prozessdatenerfassung und Prozesskontrolle

Die Standardprozessparameter Rührerdrehzahl, Zuluft, Temperatur, pH und pO₂ wurden durch das Infors-System angezeigt und geregelt. Alle Prozessparameter, einschließlich der Werte der Abgasanalytik, wurden durch das Programm LabView (National Instruments) auf einem Prozessrechner erfasst. Die Dosierung der Substrate Glucose und L-Tyrosin erfolgte mit dem System Fed-batch-Pro (DASGIP AG, Jülich) durch eine Steuereinheit mit Dosiersystem und Datenerfassung über einen Prozessrechner. Über den Prozessrechner wurde das lineare Dosierprofil für L-Tyrosin vorgegeben und die Zufuhrraten für Glucose manuell angepasst. Diese Einstellungen konnten für jeden der sechs Reaktoren individuell erfolgen.

¹Für eine genauere Beschreibung der Methoden, siehe [Stanbury u. a. 1995].

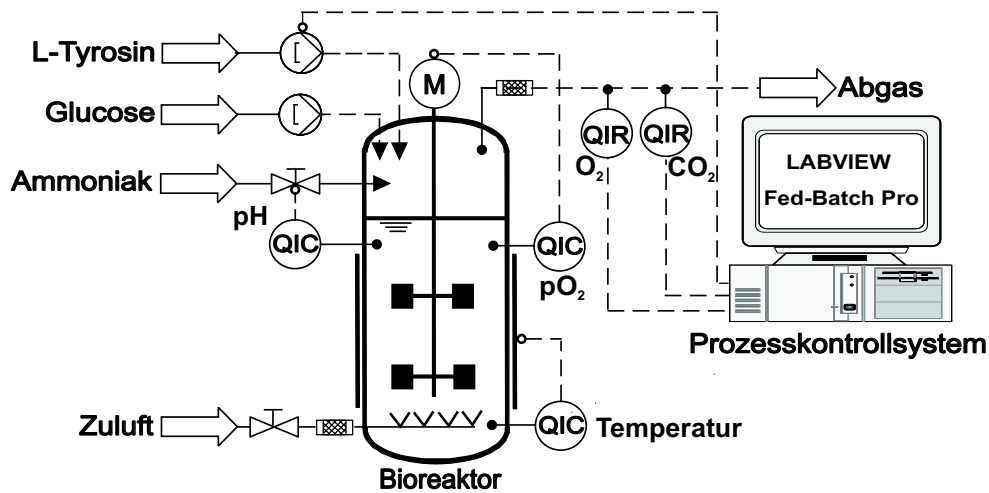


Abb. 4.1: Schematischer Aufbau des Sixfors-Bioreaktors mit Peripherie; der pH-Wert wurde über die Zugabe von Ammoniaklösung geregelt, die Gelöstsauerstoffkonzentration über die Rührerdrehzahl, die Temperatur über einen Thermomantel, L-Tyrosin wurde nach einem vorgegebenen Zufuhrprofil zudosiert (Geräteliste, siehe Abschnitt A.2)

Abb. 4.1 zeigt ein Fließbild eines Bioreaktors der Sixfors vario Anlage. In Abb. 4.2 ist ein Foto der gesamten Sixfors vario Anlage mit den sechs Bioreaktoren zu sehen.

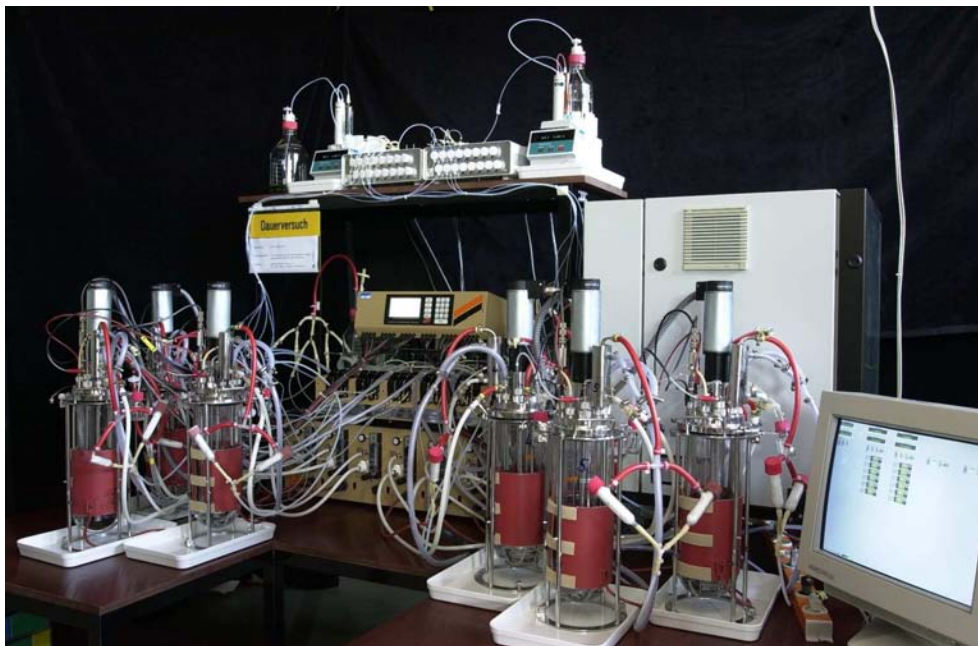


Abb. 4.2: Sixfors vario Anlage mit den sechs Bioreaktoren und Peripherie

4.2.3 Durchführung der Fermentationen

Die Fermentationen erfolgten im Zulaufverfahren. Vor Fermentationsbeginn wurden die bereits mit konzentrierter Glucoselösung gefüllten Bioreaktoren mit Sensoren, Elektroden, Zufuhrstrecken und erforderlichen Anschlüssen im Autoklav bei 121 °C für 20 Minuten sterilisiert. Das konzentrierte Medium mit den weiteren Bestandteilen, die aus Stabilitäts-

gründen nicht autoklaviert werden durften, wurde über eine Sterilfiltrationsstrecke (Sterilfilter: Sartobran, Sartorius AG, Göttingen) in die Reaktoren gebracht (Medium, siehe Abschnitt A.2.1). Das vorgelegte Fermentationsmedium wurde mit 10 % (v/v) Vorkultur beimpft, so dass 1,5 l erreicht wurden. Die Sauerstoffkonzentration wurde auf 30 % geregelt, da *E. coli* bei Sauerstofflimitierung unter anaeroben Bedingungen Produkte wie z.B. Acetat bildet [Schlegel 1992]. Bei Erreichen einer $OD_{620} = 10 - 14$ nach 7–10 Stunden wurde die L-Phenylalanin-Produktion durch Zugabe von IPTG induziert. Die Zufuhr der Substrate Glucose und L-Tyrosin wurde zum gleichen Zeitpunkt gestartet, da die vorgelegten Substratmengen annähernd aufgebraucht waren. Die Glucoselösung hatte eine Konzentration von 454 g/l, die L-Tyrosin-Lösung eine Konzentration von 25 g/l in 5 %iger Ammoniaklösung. L-Tyrosin-Lösung wurde linear ansteigend nach einem festen Profil bis zum Erreichen einer festgelegten Gesamtmenge zugegeben. Damit wurde eine $OD_{620} = 40 - 50$ erreicht. Danach wurde die Zugabe gestoppt und damit das Wachstum der L-Tyrosin-auxotrophen Stämme. Für die Produktion wurde Glucose mit 0,05–1,0 ml/min zudosiert. Die Glucosekonzentration wurde manuell mit einem amperometrischen Test überprüft. Entsprechend dieser Messung wurden die Dosieraten manuell an den Verbrauch im jeweiligen Bioreaktor angepasst. Der Sollwert lag bei 5 g/l Glucose. Eine zweite Induktion erfolgte nach 28–30 Stunden, um trotz Verdünnung der Fermentationsbrühe eine ausreichende Induktorkonzentration zu gewährleisten. Antischaum wurde bei Bedarf manuell zudosiert. Probenahmen erfolgten über die Fermentationsdauer im Abstand von 1,5–2 Stunden. Die Offline-Analytik beinhaltete die Messung von Glucose, optischer Dichte, Biotrockenmasskonzentration und HPLC-Analysen zur Bestimmung von Aminosäuren, Ammonium und organischen Säuren (siehe Abschnitt A.3.1). Beendet wurden die Fermentationen nach 50 Stunden. Der theoretische, idealisierte Verlauf einer Fermentation im Zulaufverfahren ist in Abb. 4.3 dargestellt.

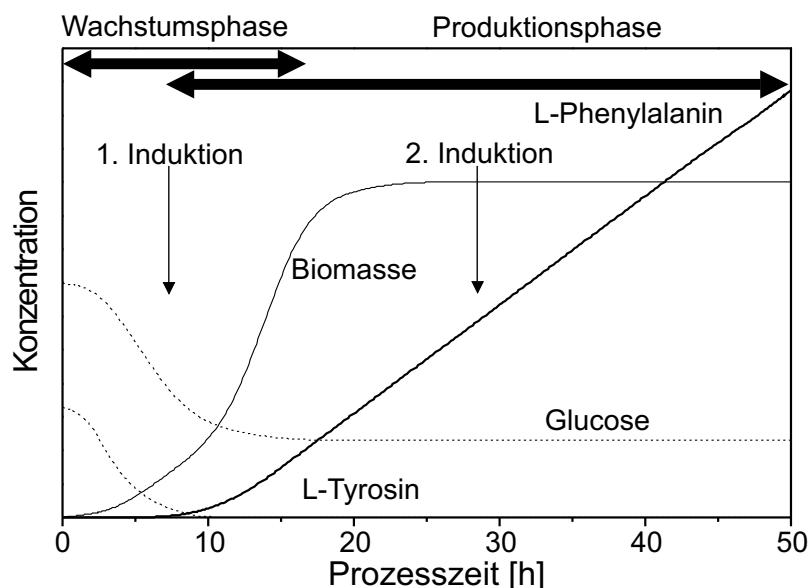


Abb. 4.3: Idealisierter Verlauf einer Fermentation im Zulaufverfahren mit den Konzentrationen der Substrate L-Tyrosin und Glucose sowie der Biomassekonzentration und der Produktkonzentration in Wachstums- und Produktionsphase

4.3 Fermentationen im Zulaufverfahren im 20 l Bioreaktor

Die Experimente zur Prozessentwicklung wurden in einem 20 l Bioreaktor (ISF 200, Infors AG; Basel, Schweiz) durchgeführt. Das Arbeitsvolumen lag dabei zwischen 7,5 und 15 l. Als Ausgangsbasis für die Prozessentwicklung wurde wie für die Experimente im Sixfors vario die von Gerigk entwickelte Fermentationsstrategie im Zulaufverfahren verwendet [Gerigk 2001]. Übernommen wurden Vorkultur, Medium, die Anfangssollwerte der Prozessparameter Temperatur (37 °C), pH-Wert (6,5) und pO_2 (>30 %), Induktionszeitpunkt, Glucosekonzentration (5 g/l), Wachstumslimitierung durch L-Tyrosin und Fermentationsdauer (50 h). In der weiteren Prozessentwicklung wurden verschiedene Änderungen vorgenommen, die in den folgenden Abschnitten beschrieben werden.

4.3.1 Online-Analysemethoden

Temperatur, Druck, Begasung und Rührerdrehzahl

Die Temperatur wurde über einen Pt-100 Sensor gemessen und über einen Heizmantel mit Wasserkreislauf eingestellt. Die Begasung erfolgte mit Luft, deren Zufuhr über einen Massenstromregler eingestellt wurde (Volumenstrom: 2,5–12 l/min). Der Druck wurde mittels eines Drucksensors gemessen (Überdruck: 0,2–0,5 bar). Die Rührerdrehzahl wurde auf Drehzahlen von 400–1600 Upm eingestellt. Nach einmaliger Kalibrierung war eine regelmäßige Kalibrierung der Parameter nicht erforderlich. Die Parameter wurden über in die Infors-Steuerung integrierte PID-Regler geregelt.

Gelöstsauerstoffkonzentration

Die Gelöstsauerstoffkonzentration wurde durch eine amperometrische Sauerstoffelektrode gemessen. Die Kalibrierung erfolgte vor Inokulation durch Einstellung von 100 % Sättigung bei einer Drehzahl von 1000 Upm, einer Begasung mit Luft mit 7,5 l/min und Überdruck von 0,4 bar. Der Null %-Wert wurde durch Begasung mit Stickstoff eingestellt. Die Gelöstsauerstoffkonzentration wurde in den ersten Experimenten² manuell auf >40 % eingestellt. In den anderen Fermentationen wurde die Gelöstsauerstoffkonzentration unter Verwendung des integrierten PID-Reglers über die Rührerdrehzahl geregelt. Zusätzlich wurden Begasungsrate und Druck manuell angepasst, da die maximale Rührerdrehzahl bei 1600 Upm lag.

pH-Wert

Der pH-Wert wurde mit einer Gelelektrode gemessen. Dazu erfolgte eine Zwei-Punkt-Kalibrierung mit Pufferlösungen pH 4,0 und pH 7,0. Der pH-Sollwert wurde mittels eines PID-Reglers konstant gehalten. Signale vom Regler wurden an eine Dosierstrecke gegeben, die über eine Waage mit Zulaufflasche eine Schlauchpumpe zur Dosierung von 25 %iger Ammoniaklösung ansteuerte.

²Die Gelöstsauerstoffkonzentration wurde in den Experimenten mit dem Stamm 20pMK12 manuell eingestellt, siehe Abschnitt 5.2.

Abgasanalytik

Kohlendioxid und Sauerstoff wurden in einem Teilstrom der Abluft über eine Abgasanalytik gemessen. Messung und Kalibrierung erfolgten wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben.

4.3.2 Glucosemessung

Um die Glucosekonzentration im Bioreaktor im Zulaufverfahren konstant zu halten, wurde die Glucosekonzentration online gemessen und geregelt. Für die Messung wurden zwei verschiedene Systeme verwendet. Zum einen war das der OnLine-General-Analyser (OLGA, IBA GmbH, Göttingen), zum anderen das System Process Trace (Trace AG, Braunschweig). Beide Systeme werden in den folgenden Abschnitten vorgestellt.

Online-Messung von Glucose mittels OLGA

Um eine Online-Messung mit dem OLGA, einem auf SIA-Technik basierenden System (Sequential Injection Analyser, [Schuhmann u. a. 1995]) durchführen zu können, wurde zellfreies Permeat über einen externen, an den Fermenter angeschlossenen Umlauf kontinuierlich bereitgestellt [Gerigk 2001]. Mit einer Schlauchpumpe wurde Fermentationsbrühe durch den Umlauf gepumpt, der über Animpfnadeln an den Bioreaktor angeschlossen war. Bei einem Umlaufvolumen von 20 ml und einem Volumenstrom von 1,6 l/min konnte eine Verweilzeit < 2 sec erreicht und so eine ausreichende Sauerstoffversorgung gewährleistet werden. Zellfreies Permeat wurde über ein eingebautes Hohlfaserfiltrationsmodul (NMWC: 500 kDa, $A=23 \text{ cm}^2$, 1 mm Porendurchmesser, Schleicher & Schuell, Dassel) durch Querstromfiltration gewonnen. Der Permeatstrom lag bei $\approx 1\text{--}2 \text{ ml/min}$. Über eine Schlauchpumpe wurde das zellfreie Permeat zum OLGA gepumpt und am Verteiler (Manifold) des OLGA vorbeigeführt. Die Totzeit lag bei einem Innenvolumen des Permeat-seitigen Umlaufs von 1,5 ml bei einer Minute. Von dem OLGA wurde das Permeat über ein Druckausgleichsgefäß³ zurück in den Fermenter gepumpt. Ein Fließbild und ein Bild des Umlaufs sind in Abb. 4.4 zu sehen. Sterilisation und Reinigung erfolgten mit Natronlauge und Wasser.

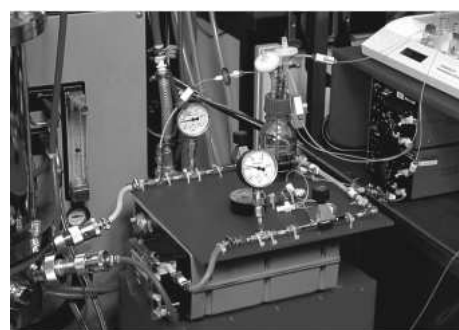
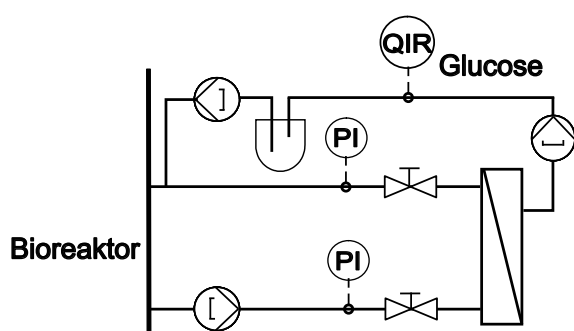


Abb. 4.4: Schematische Darstellung und Bild des Filtrationsumlaufs zur kontinuierlichen Bereitstellung von zellfreiem Permeat für die Glucosemessung mit dem OLGA [Gerigk 2001]

³Der OLGA musste druckfrei betrieben werden [IBA 1999], im Bioreaktor war jedoch Überdruck eingestellt.

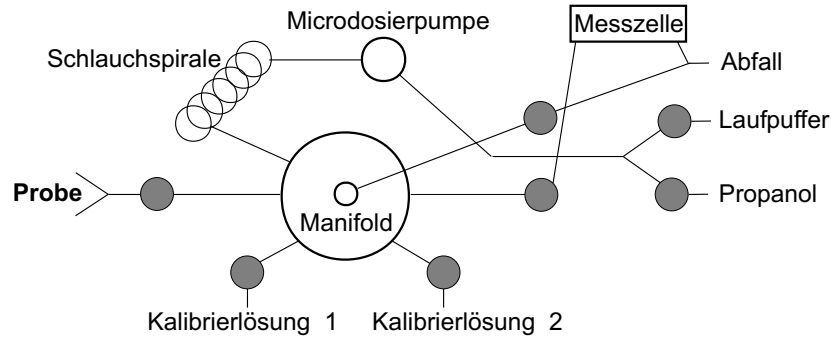


Abb. 4.5: Schematische Darstellung des OnLine-General-Analysers zur Glucosemessung (IBA GmbH, Göttingen)

Eine Probenahme von $10\ \mu\text{l}$ aus dem Permeatstrom und deren Messung erfolgte in Intervallen von ungefähr zwei Minuten, der gesamten Todzeit. Vor der Messung wurde die Probe mit OLGA-Puffer verdünnt, der auch für die Spülvorgänge zwischen den Messungen verwendet wurde. Die Glucosekonzentration wurde mit einem Biosensor in der Messküvette des Analysers gemessen, der vor jedem Experiment erneuert wurde. Die auf dem Biosensor immobilisierte Glucoseoxidase katalysierte dabei die Umsetzung von Glucose in Gluconolacton. Dabei wurde eine äquimolare Menge Wasserstoffperoxid frei, die amperometrisch gemessen wurde. Das Signal wurde über einen Verstärker an die Datenerfassung auf einem Prozessrechner mit OLGA-Software weitergeleitet. Das System wurde alle 60-90 Minuten mittels einer Zwei-Punkt-Kalibrierung mit Lösungen von 2,0 und 10,0 g/l Glucose bei einem Sollwert von 5 g/l kalibriert. Die Geräteparameter bei Sollwerten von 0,5, 5 und 30 g/l Glucose im Bioreaktor sind in Abschnitt A.2.2 aufgeführt. Ein Fließbild des OnLine-General-Analysers zeigt Abb. 4.5.

Online-Messung von Glucose mittels Process TRACE

Bei diesem System (siehe Abb. 4.6) wurde die Glucose basierend auf dem Verfahren der Fließdiffusionsanalyse bestimmt (siehe Abb. 4.7), bei der eine zeitabhängige Probenanreicherung erfolgt [Tollnick und Beuse 1999]. Vorteile dieses Systems gegenüber der Fließinjektion sind der hohe Messbereich durch variable Anreicherungszeiten und die hohe Standzeit des Sensors, da Probe und Puffer voneinander getrennt sind.

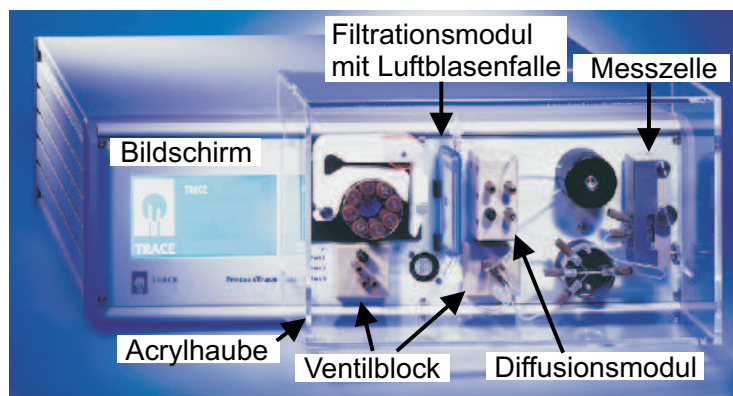


Abb. 4.6: Bild des Process TRACE Systems (Trace GmbH, Braunschweig)

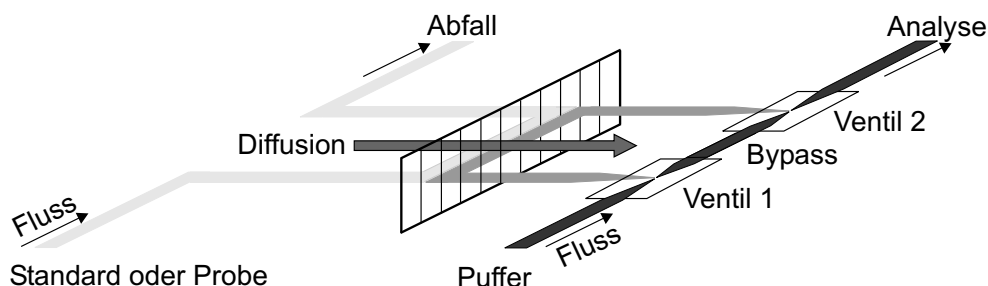


Abb. 4.7: Prinzip der Fließdiffusionsanalytik (Trace GmbH, Braunschweig)

Über eine Dialysesonde, die in den Bioreaktor eingebaut wurde, erfolgte die Entnahme zellfreier Probe (siehe Abb. 4.8). Die Dialysesonde wurde mit dem Bioreaktor sterilisiert. Die Glucose aus dem Reaktor diffundierte über die Dialysemembran und reicherte sich in der durch die Dialysesonde fließenden Pufferlösung an. Die Membran wurde vor jeder Fermentation erneuert, da sich auf der Membranaussenseite ein Biofilm bildete, der die Durchlässigkeit der Membran verringerte. Die angereicherte Pufferlösung wurde zum Detektor, einem beschichteten Biosensor, gepumpt. Dort wurde Glucose enzymatisch durch Glucoseoxidase zu Gluconolacton umgesetzt und das gebildete Wasserstoffperoxid amperometrisch gemessen. Messungen erfolgten in Intervallen von $\approx 2,5$ Minuten. Eine konstante Temperatur bei der enzymatischen Messung wurde durch ein Heizelement und eine Acrylhaube gewährleistet.

Vor Beginn der Messung wurden eine Kalibrierung des Systems und Messungen für 30–60 Minuten zur Aktivierung des Enzyms durchgeführt. Die Kalibrierung des Systems erfolgte mit Standardlösungen von 4 und 20 g/l Glucose. Bei der Kalibrierung erfolgte die Anreicherung der Glucose über die Membran im Diffusionsblock. Zur Probenahme wurde der kontinuierlich fließende Pufferstrom für eine definierte Zeit hinter der Dialysemembran angehalten. Dann wurde das Probenesegment vom Diffusionsblock zum Detektor geleitet und die Konzentration gemessen. Zudem wurde die Dialysesonde kalibriert, indem mit Hilfe einer externen Referenzmessung⁴ der Glucosekonzentration ein Sondenfaktor bestimmt wurde, der das Verhältnis des Sonden-signal zum Signal des Diffusionsblocks angab.

⁴siehe Abschnitt A.3.1

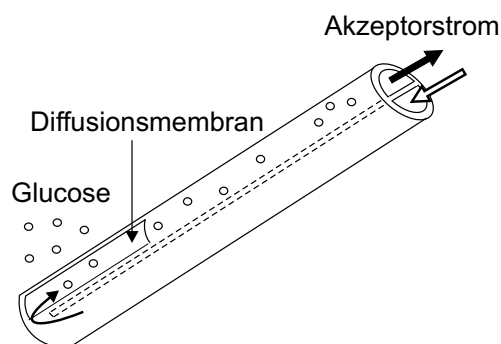


Abb. 4.8: Bild der Dialysesonde (Trace GmbH, Braunschweig) und schematische Darstellung des Funktionsprinzips der Dialysesonde

Die Kalibrierung dauerte bei einer Doppelbestimmung der Lösungen einschließlich aller Spülvorgänge ungefähr 36 Minuten. Während der Fermentation erfolgte eine Rekalibrierung über die Kalibrierlösungen im Abstand von 150–200 Messungen. Die Sonde wurde im Abstand von ungefähr 12 Stunden rekalibriert, indem der vom System ausgegebene Wert an den extern gemessenen Wert angepasst wurde. Die Kalibrierung erfolgte in der Produktionsphase, in der kein Wachstum mehr stattfand. Da sich der Glucoseverbrauch der Zellen in dieser Phase kaum änderte, hatte der „Datenausfall“ aufgrund der Kalibrierung keinen negativen Einfluss auf die Regelung.

4.3.3 Prozessdatenerfassung und Prozesskontrolle

Abb. 4.9 zeigt ein Fließbild des Prozesses mit 20 l Bioreaktor und Peripherie. Die Datenerfassung erfolgte über einen Prozessrechner mit der Software LabView. Über eine serielle Schnittstelle wurden die vom Infors-System angezeigten Prozessgrößen Begasungsrate, pH-Wert, Gelöstsauerstoffkonzentration, Druck, Temperatur, Rührerdrehzahl und Gewicht eingelesen. Bis auf das Gewicht wurden alle Variablen über in die Infors-Steuerung integrierte PID-Regler geregelt.

Nach Digitalisierung über ein SMP-Interface wurden die analogen Signale der Abgasanalytik und des Waagenwerts des Ammoniakvorrats über einen zweiten Prozessrechner mit der Software Medusa 2.0 erfasst (Forschungszentrum Jülich GmbH, Institut für Biotechnologie 2). Die Dosiersysteme von Glucose und L-Tyrosin, verbunden über serielle Schnittstellen, wurden ebenfalls über dieses System gesteuert. Die Zulaufraten wurden an die Dosiersysteme gesendet und die Istwerte im Prozessrechner aufgezeichnet.

Die Messwerte des OLGA-Systems wurden über einen weiteren Prozessrechner mit OLGA-Software erfasst und wie das Messsignal des Process Trace Systems über eine serielle Schnittstelle an die LabView Datenerfassung geleitet und von dort weiter zum Medusa-System. Daneben wurden auch Reaktorgewicht, die Werte der Abgasanalytik und die Begasungsrate an dieses System geleitet. Die Medusa-Software wurde für die Glucoseregulung und die L-Tyrosin-Steuerung über die Sauerstoffaufnahmerate eingesetzt. Das System ermittelte die Zulaufraten.

4.3.4 Durchführung der Fermentationen

Die Fermentationen erfolgten im Zulaufverfahren. Vor dem Fermentationsbeginn und vor der Sterilisation des Bioreaktors wurde die pH-Elektrode kalibriert. pH-Elektrode, Sauerstoffelektrode und Dialysesonde zur Probenahme für die Glucosemessung wurden in den Reaktor eingebaut. Wurde das OLGA-System zur Glucosemessung mit Filtrationsumlauf verwendet, wurde dieser eine Stunde mit 1 M Natronlauge sterilisiert und die Anschlüsse danach in den Reaktor eingebaut. Zulaufflaschen für Substrate und Ammoniaklösung sowie Schläuche wurden vorab im Autoklav bei 121 °C für 20 Minuten sterilisiert und angebracht. Dann erfolgte die Sterilisation des mit Wasser gefüllten Bioreaktors für 20 Minuten bei 121 °C. Nach der Sterilisation wurde das Wasser abgelassen und Medium in den Reaktor steriltrifert. Nachdem 37 °C und ein pH-Wert von 6,5 als Anfangsbedingungen eingestellt waren, wurden die Gelöstsauerstoffkonzentration, die Abgasanalytik und das jeweilige System zur Online-Messung von Glucose kalibriert.

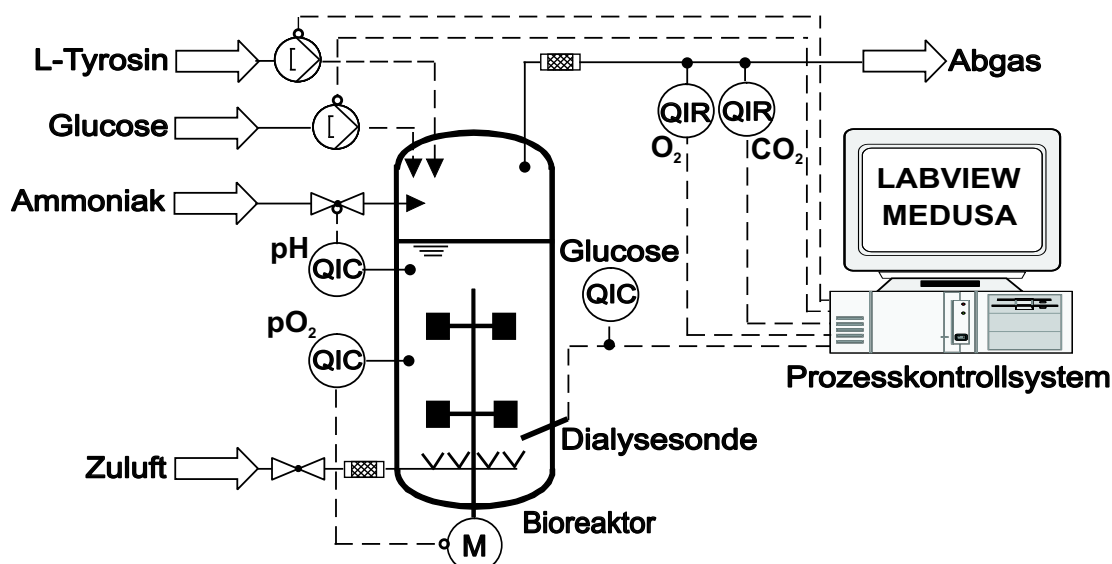


Abb. 4.9: Schematische Darstellung des Fermentationsprozesses im 20 l Bioreaktor mit Peripherie, mit Dialysesonde zur Glucosemessung (Geräteliste, siehe Abschnitt A.2.9)

Das vorgelegte Fermentationsmedium (6,75 l) wurde mit 10 % (v/v) Vorkultur beimpft, so dass 7,5 l erreicht wurden. Der Zuluftvolumenstrom betrug 2,5 l/min, die Drehzahl 400 Upm und der Druck 0,2 bar. Um den zunehmenden Sauerstoffbedarf der Zellen zu decken, wurde die Zuluft während der Wachstumsphase manuell bis maximal 12 l/min erhöht und ein Überdruck von bis zu 0,5 bar eingestellt. Über die Drehzahl mit einem Maximalwert von 1600 Upm wurde die Gelöstsauerstoffkonzentration auf 40 % geregelt, bzw. bei manueller Einstellung in den ersten Fermentationen auf >40 % eingestellt. Bei Erreichen einer $OD_{620} = 8 - 12$ nach ungefähr 6–7 Stunden wurde die L-Phenylalanin-Produktion durch Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ IPTG bei PTS(+)-Stämmen, bzw. die bei den jeweiligen Experimenten angegebene Konzentration induziert. Eine Induktion mit 100 $\mu\text{mol/l}$ IPTG war für PTS(+)-Stämme am besten geeignet [Gerigk 2001]. Nach 6–8 Stunden ($OD_{620} = 12 - 15$) waren die vorgelegten Substratmengen an Glucose (15 g/l) und L-Tyrosin (0,3 g/l) soweit aufgebraucht, dass die Zufuhr der Substrate gestartet wurde. Die Dosiereinheiten für Glucose und L-Tyrosin bestanden jeweils aus Waage, Dosierstrecke und Schlauchpumpe. Die Glucoselösung hatte eine Konzentration von 700 g/l, die L-Tyrosin-Lösung eine Konzentration von 25 g/l in 5 %iger Ammoniaklösung. In der Wachstumsphase wurde ein festgelegtes L-Tyrosin-Volumen von ≈ 170 ml geregelt zugegeben (L-Tyrosin-Zufuhr, siehe Abschnitt 4.3.6). Damit wurde eine $OD_{620} = 80$ erreicht. Danach wurde die L-Tyrosin-Zufuhr auf ein Minimum von 100 mg/h reduziert, ausreichend für den Erhaltungsstoffwechsel. Damit erfolgte kein weiteres Wachstum. Glucose wurde auf einen Sollwert von 5 g/l, bzw. den bei den jeweiligen Experimenten angegebenen Wert geregelt (siehe Abschnitt 4.3.5). Eine zweite Induktion mit gleicher Induktorkonzentration wie bei der ersten Induktion erfolgte nach 28–30 Stunden. Antischaum wurde bei Bedarf manuell über eine Schlauchpumpe zudosiert. Probenahmen erfolgten über die Fermentationsdauer im Abstand von 1,5–2 Stunden. Die durchgeführte Offline Analytik beinhaltete die Messung von Glucose, optischer Dichte, Biotrockenmasse, Plasmidstabilität, mikroskopische Aufnahmen und HPLC-Analysen zur Bestimmung von Aminosäuren, Ammonium und organischen Säuren.

Bei einigen Experimenten wurden ^1H -NMR-Analytik, Phosphat- und Ammoniumbestimmung durchgeführt (siehe Abschnitt A.3.1). Nach 50 Stunden wurden die Fermentationen beendet. Nach Abschluss der Fermentation wurde der Bioreaktor bei $121\text{ }^\circ\text{C}$ für 20 Minuten sterilisiert.

4.3.5 Regelung der Glucosezufuhr

Die Glucoseregulation hatte die Einstellung einer konstanten Glucosekonzentrationen während einer Fermentation zum Ziel. Dies war für eine optimale Prozessführung, die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit von Fermentationen notwendig.

Bei einem Fermentationsprozess handelt es sich um einen nichtlinearen Prozess, bei dem sich der Substratverbrauch mit der Zeit ändert und die Analysenwerte zu diskreten Zeitpunkten mit Totzeit eintreffen. Daher kam eine modellbasierte adaptive Regelstrategie im geschlossenen Regelkreis zum Einsatz [Weuster-Botz u. a. 1994]. Ein adaptiver Regelkreis ist in Abb.4.10 schematisch dargestellt.

Bei dem verwendeten System wurde ein erweiterter, semikontinuierlicher Kalman-Filter zur Minimierung des Messrauschens eingesetzt, bei dem Totzeiten einbezogen wurden [Wiechert 1991]. Zudem erfolgte eine Echtzeit-Schätzung der zukünftigen Glucosekonzentration, der Glucoseverbrauchsrate und der Änderung der Substratverbrauchsrate aus der gemessenen Glucosekonzentration und deren Änderung ⁵.

Vom Kalmanfilter wurden die geschätzten Werte zur nächsten Abtastzeit an den MV3-Regler übermittelt. Die Regelung der Stellgröße zur Einhaltung des Sollwertes erfolgte durch Minimierung eines Gütekriteriums (I) mit E als Erwartungswert (siehe Gleichung 4.1). Die zu erwartende nächste Regelgrößenabweichung ($y(t+1)$) und die Stellgrößenabweichung $u(t)$ wurden einbezogen. Der Gewichtungsfaktor r gewichtete Regelgrößenabweichung und Stellgrößenabweichung. Mit zunehmendem Gewichtungsfaktor nahmen die Stellgrößenausschläge ab. Um die Stellgröße (Gleichwert) im Arbeitspunkt ge-

⁵Die Systemgleichungen für die einzelnen Parameter wurden von Weuster-Botz u. a. [Weuster-Botz u. a. 1994] aufgeführt und sind Abschnitt A.3.9 zu entnehmen.

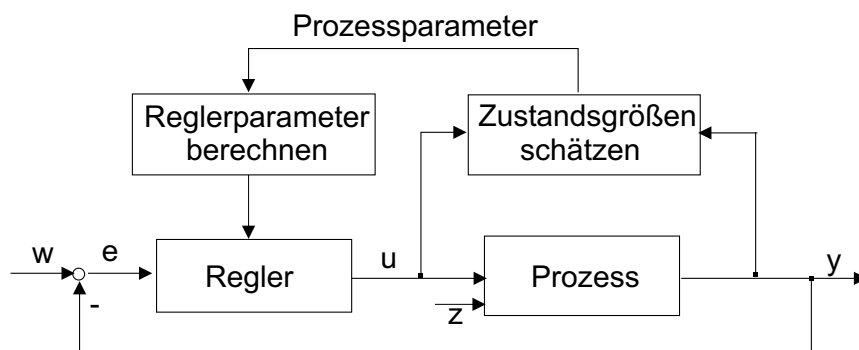


Abb. 4.10: Schematische Darstellung eines adaptiven Regelkreises mit w =Sollwert, e =Abweichungsgröße, z =Störgröße, u =Stellgröße (Dosierate), y =Regelgröße (Zustandsgröße, Glucosekonzentration)

Tab. 4.2: Parameter von Kalman-Filter und MV3-Regler

Parameter (Kalman-Filter)	1. Einstellung		Optimierte Einstellung	
	absolut	relativ	absolut	relativ
Rauschen: Substratkonzentration	0,5	10 %	0,1	10 %
Rauschen: Substratverbrauch	0,5	5 %	0,05	5 %
Rauschen: Änderung des Substratverbrauchs	0,5	2 %	0,05	2 %
Messrauschen	0,5	2 %	0,1	2 %
Parameter (MV3-Regler)		1. Einstellung	Optimierte Einstellung	
Gewichtung (r)		13	2	
Anzahl der Gleichwerte zur Mittelwertbildung		10	5	

nau zu bestimmen, müsste die entsprechende Substratverbrauchsrate bekannt sein. Diese wurde durch den Kalmanfilter geschätzt. Aufgrund der Änderung über die Zeit wurde zusätzlich eine Mittelwert aus dem Gleichwert zu mehreren Abtastzeitpunkten gebildet. Die Stellgrößenberechnung erfolgte nach dem Eintreffen neuer Regelgrößen [Striegel 1993].

$$I(t+1) = E(y^2(t+1) + ru^2(t)) \quad (4.1)$$

Die Glucosekonzentration wurde während der Fermentation semikontinuierlich gemessen und in Intervallen von ≈ 3 Min. Messwerte (siehe Abschnitt 4.3.2) über den LabView-Prozessrechner an den Medusa-Prozessrechner geleitet. In der Software Medusa waren Kalmanfilter und Minimal-Varianz-Regler (MV3) zur Glucoseregulation im geschlossenen Kreislauf implementiert. Die ermittelten Stellgrößen wurden an eine Dosierstrecke zur Anpassung der Glucosezufuhr weitergeleitet.

Die verwendeten Parameter sind in Tab. 4.2 aufgeführt. Die Parameter zur Glucoseregelung wurden in der Arbeit optimiert. Mit der Verwendung des Process Trace Systems wurden die neuen Werte verwendet, die zu einer verbesserten Regelung mit geringeren Schwankungen führten.

4.3.6 L-Tyrosin-Zufuhr

Eine L-Tyrosin-Zufuhr war aufgrund der L-Tyrosin-Auxotrophie der Stämme für das Wachstum notwendig. L-Tyrosin inhibiert jedoch die L-Tyrosin-sensitive DAHP-Synthase [Pittard 1996]. Daher musste es während der Wachstumsphase in sehr geringen Mengen zugegeben werden, um eine Akkumulation zu verhindern. Eine indirekte Regelung der L-Tyrosin-Zufuhr, die die Möglichkeit einer automatischen Zufuhr bot, wurde von Gerigk [Gerigk 2001] entwickelt. Die Regelung basierte auf dem empirisch ermittelten linearen Zusammenhang zwischen der volumetrischen L-Tyrosin-Verbrauchsrate und der volumetrischen Sauerstoffaufnahmerate unter L-Tyrosin-Limitierung. Die volumetrische Sauerstoffverbrauchsrate (OUR) wurde während des Fermentationsprozesses in der Medusa-Software aus Belüftungsrate, Reaktorgewicht und den Werten der Abgasanalytik berechnet. Aus der sich ergebenden volumetrischen L-Tyrosin-Verbrauchsrate wurde die Zulauftrate berechnet. Die L-Tyrosin-Konzentration lag so während des größten Teils der Wachstumsphase unterhalb der Nachweisgrenze der HPLC ($\approx 10 \mu\text{mol/l}$).

Eine stark limitierte Zugabe von L-Tyrosin wirkte sich nach Gerigk [Gerigk u. a. 2002a] positiv auf die Produktion von L-Phenylalanin aus. Bei stark limitierter Zugabe befand

Tab. 4.3: Dosierprofil der L-Tyrosin-Zufuhr

Prozesszeit [h]	6	7	8	9	10	10,5	11	11,5	12	12,5	13	13,5
L-Tyrosin [g/h]	12	15	17	19	22	24	26	29	33	36	40	4

sich das System jedoch in einem Grenzbereich, in dem das Wachstum aufgrund einer unzureichenden Menge an L-Tyrosin zeitweise stoppte und kein weiterer Anstieg der OUR und damit der L-Tyrosin-Zufuhr erfolgte. Da die Sauerstoffaufnahme zudem von der Aktivität und damit dem verwendeten Stamm abhängig war (z.B. pts(+) oder pts(-)), war die L-Tyrosin-Regelung unter stark limitierenden Bedingungen nicht universell anwendbar. Daher wurde die L-Tyrosin-Zufuhr zunächst manuell eingestellt. Die empirisch ermittelten Zulaufdaten wurden wie in Tab. 4.3 angegeben stufenweise eingestellt, so dass eine strenge L-Tyrosin-Limitierung in der Wachstumsphase gegeben war.

Im Verlauf der Arbeit kam bei Fermentationen mit dem Stamm *E. coli* 4pF81 eine gegenüber der von Gerigk [Gerigk 2001] verwendeten Regelung leicht veränderte indirekte Regelung zur automatischen Zufuhr zum Einsatz. Dieser neue Ansatz unterschied sich durch Vorgabe einer Mindest-L-Tyrosin-Zufuhr (siehe Gleichung 4.2). Die volumetrische Sauerstoffverbrauchsrate wurde nach Gleichung 3.30 ermittelt.

$$\dot{v}_{Tyr} = m + b \cdot (OUR - OUR_{Start}) \quad (4.2)$$

mit:

$\dot{v}_{Tyr}$	volumetrische L-Tyrosin-Verbrauchsrate	[g/(l·h)]
OUR	volumetrische Sauerstoffaufnahme	[mmol/(l·h)]
m	Parameter 1	[(g/(l·h))]
b	Parameter 2	[(g/mmole)]

Empirisch wurden $OUR_{Start} = 60 \text{ mmol}/(l \cdot h)$, $m = 44$ und $b = 0,55$ als geeignet für Fermentationen mit dem Stamm 4pF81 ermittelt. Aus der volumetrischen L-Tyrosin-Verbrauchsrate wurde die L-Tyrosin-Zufuhr berechnet (siehe Gleichung 4.3). Die sich ergebende Zufuhr war ähnlich der bei manueller Einstellung.

$$\dot{V}_{Tyr} = \frac{\dot{v}_{Tyr} \cdot V_R \cdot \rho}{c_{Tyr}} \quad (4.3)$$

mit:

$\dot{V}_{Tyr}$	L-Tyrosin-Zulaufrate	[g/h]
V_R	Volumen im Bioreaktor	[l]
ρ	Dichte der L-Tyrosin-Lösung ($\approx 1000 \text{ g/l}$)	[g/l]
c_{Tyr}	Konzentration der L-Tyrosin-Lösung	[g/l]

4.4 Reaktivextraktion in Flüssig-Flüssig-Zentrifugen

Für die integrierte Abtrennung von L-Phenylalanin aus dem Fermentationsprozess wurden Flüssig-Flüssig-Zentrifugen (CINC Deutschland GmbH, Brakel) verwendet. Die Zentrifugalextraktoren arbeiteten nach dem Mixer-Settler Prinzip. Extraktion und Separation von

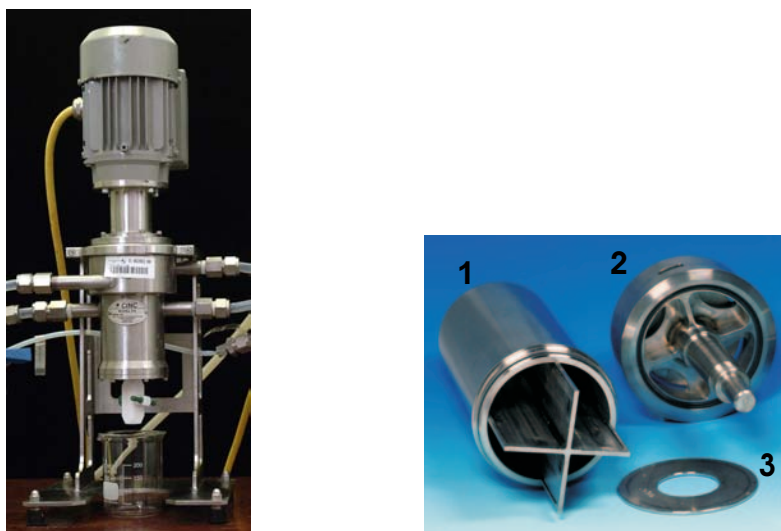


Abb. 4.11: Bild einer Zentrifuge; Teile der Zentrifuge: 1: Rotor und Rotoreinsatz, 2: Rotorkopf, 3: Wehrscheibe (Geräteliste, siehe Abschnitt A.2.9)

wässriger und organischer Phase erfolgten in einer Einheit. Das Modell V2 mit einem Arbeitsbereich von 3 l/h bis 2 l/min wurde verwendet. Über die Steuereinheit der Zentrifugen waren Drehzahlen zwischen 2.000 und 5.900 Upm einstellbar, die Beschleunigungen von 100-1000 g an der Rotorauswand entsprachen, bzw. 30–100 Hz auf der Anzeige der Steuerheit. Das Innenvolumen dieses Modells lag bei ≈ 140 ml. Die Verweilzeit in der Zentrifuge lag abhängig vom Volumenstrom bei 25–170 Sekunden⁶ (bei einem Gesamtvolumenstrom von 3 l/h–20 l/h). Die Geräteparameter sind Abschnitt A.2.7 zu entnehmen. Ein Bild einer Zentrifuge und von Teilen der Zentrifuge ist in Abb. 4.11 zu sehen (siehe auch Abschnitt 3.3.4).

4.4.1 Aufbau der Extraktionsanlage

Die Anlage zur Reaktivextraktion bestand aus zwei Flüssig-Flüssig-Zentrifugen. In der ersten Zentrifuge fand die Extraktion des in wässriger Lösung befindlichen L-Phenylalanins (Donatorphase) mit dem Carrier D₂EHPA (Extraktionsmittel) in Kerosin (organische Phase) statt. In der zweiten Zentrifuge erfolgte die Rückextraktion des L-Phenylalanins aus der organischen Phase in die Akzeptorphase (Schwefelsäure). Alle Verbindungsstrecken bestanden aus Teflon und Marprene-Pumpenschläuchen, um Haltbarkeit gegenüber Kerosin und Säure zu gewährleisten. Mit Schlauchpumpen wurden die wässrigen Phasen und die organische Phase in die Zentrifugen gefördert. Der Volumenstrom der einzelnen Phasen konnte individuell eingestellt werden. Die organische Phase wurde im Kreis geführt. Sie wurde aus dem Vorratsgefäß in die Zentrifuge zur Extraktion gepumpt. Nach Extraktion und Separation floss die organische Phase von dort in die zweite Zentrifuge zur Rückextraktion mit der Akzeptorphase. Aus den Zentrifugen liefen die Phasen frei in Gefäße. Wichtig war ein freier Abfluss an allen Ausgängen, um Schaum- oder Emulsionsbildung zu vermeiden. Die Probenahme der wässrigen Phasen erfolgte über

⁶Das Phasenvolumen in der Zentrifuge war abhängig von der verwendeten Wehrscheibe, durch die die Dispersionszone zwischen den Phasen nach innen oder außen verschoben wurde.

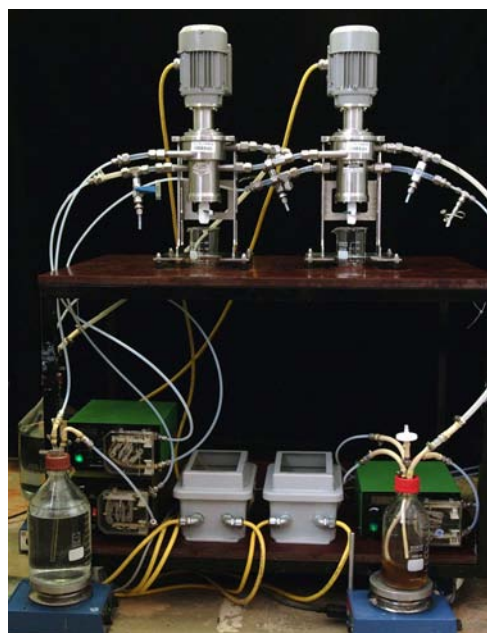
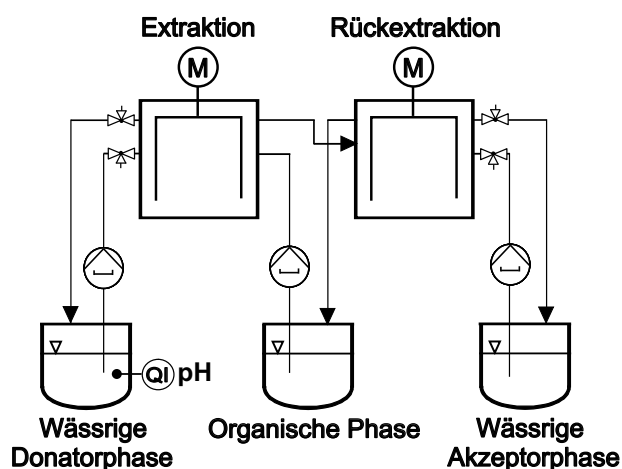


Abb. 4.12: Schematische Darstellung und Foto der Extraktionsanlage mit Zentrifugen, Steuereinheiten, Vorratsgefäßen und Pumpen (Geräteliste, siehe Abschnitt A.2.9)

3-Wege-Hähne an den jeweiligen Ein- und Ausgängen der Zentrifugen. Eine schematische Darstellung und ein Foto der Extraktionsanlage zeigt Abb. 4.12.

Vor der Durchführung von Extraktionsexperimenten in den Zentrifugen war die Einstellung des Wehrs am Ablauf der schweren Phase in den beiden Zentrifugen notwendig, um einen sauberen Ablauf von schwerer und leichter Phase zu gewährleisten. Zunächst wurde die Größe der Wehrscheibe mittels der Dichten der verwendeten Flüssigkeiten über ein zu den Zentrifugen gehöriges Programm berechnet⁷. Bei den Offline-Extraktionen, die in Abschnitt 7.1 beschrieben werden, stellte sich jedoch heraus, dass die vorab berechneten Wehrscheiben nicht den zur vollständigen Phasentrennung geeigneten Wehrscheiben entsprachen. Dies war auf die Eigenschaften der Phasen zurückzuführen, da nicht nur die Dichte, sondern auch Viskosität oder Phasenbestandteile wie Salze einen Einfluss auf die Phasentrennung haben [Weatherley 1994]. Daher wurden die bei verschiedenen Volumenströmen in den Zentrifugen einzusetzenden Wehrscheiben empirisch ermittelt (siehe Tab. 4.4). Bei der Verwendung von Fermentationsüberstand anstelle von Salzlösung wurde die Wehrscheibe der Zentrifuge zur Extraktion 0,025 größer gewählt als angegeben.

4.4.2 Durchführung von Extraktionen mit Modelllösung

Zur Charakterisierung der Extraktion in den Zentrifugen wurden Experimente mit Modelllösung durchgeführt. Als Donatorphase wurde wässrige L-Phenylalanin-Lösung, 10–30 g/l L-Phenylalanin gelöst in 0,9 % NaCl oder proteinfreier Fermentationsüberstand (vgl. Abschnitt 4.5.1) verwendet. Dem pH-Wert bei Fermentationen entsprechend wurde der pH-Wert der Lösung am Anfang auf 6,5 eingestellt. Die Extraktion erfolgte

⁷Der Dichte-Bereich, in dem dem Programm zufolge die Wehrscheibe einer Größe verwendet werden kann, liegt bei $\pm 0,04$ kg/l, vgl. [Cinc 2001]

Tab. 4.4: Eingesetzte Wehrscheiben in Abhängigkeit der Volumenströme bei Verwendung von L-Phenylalanin in 0,9 % NaCl-Lösung

$\dot{V}_{Donator}$ [l/h]	$\dot{V}_{org.Phase}$ [l/h]	$\dot{V}_{Akzeptor}$ [l/h]	Wehrscheibe Extraktion	Wehrscheibe Rückextraktion
2	2	2	0,9	1,05
4	4	4	0,9	1,05
6	6	6	0,925	1,05
8	8	8	0,95	1,05
10	10	10	0,975	1,05

mit 10–30 % D₂EHPA in Kerosin, die Rückextraktion mit 1–2 M Schwefelsäure (nach [Maaß 2001]). Die Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Vor der Durchführung von Extraktionsexperimenten in den Zentrifugen wurden diese aus den Einzelteilen zusammengebaut. Abhängig vom durchgeführten Experiment wurde ein „High-Mix“- oder ein „Low-Mix“-Einsatz eingebaut und die passende Wehrscheibe eingesetzt. Rotor, Rotorkopf und eine Wehrscheibe sind in Abb. 4.11 zu sehen. Danach wurden die Zentrifugen mit wässriger Phase gefüllt, die Rotoren gestartet und dann die organische Phase eingeleitet. Durch diese Reihenfolge wurden die Phasen von Anfang an sauber getrennt. Bei den zur Charakterisierung durchgeführten Kreislaufexperimenten flossen die wässrigen Phasen aus den Zentrifugen zurück in Vorratsgefäße und von dort wieder in die Zentrifugen. Grundsätzlich wurden 2 l Donatorphase verwendet. Das Volumen der organischen Phase wurde mit 0,5 l im Vergleich zur Donatorphase klein gewählt, da durch die Rückextraktion eine Regenierung erfolgte. Um wie in einer Online-Abtrennung angestrebt, eine Volumenreduzierung von Donator zu Akzeptor zu erreichen, wurde ein Akzeptorvolumen von 1 l gewählt. Die Probenahme erfolgte an den Ein- und Ausgängen der wässrigen Phasen.

4.5 Zulaufverfahren im 20 l Bioreaktor mit integrierter Produktabtrennung

4.5.1 Kontinuierliche Permeatbereitstellung mittels Ultrafiltrationseinheiten

Für eine Online-Reaktivextraktion in Zentrifugen wurde zell- und proteinfreies Permeat benötigt, das während des Fermentationsprozesses gewonnen werden musste. Zur Rückhaltung von Zellen wurde ein an den Bioreaktor angeschlossener Umlauf mit einem Hohlfaserfiltrationsmodul aus Polysulfon (NMWC: 500 kDa, Membranfläche: 0,36 m², Porendurchmesser: 1 mm, Schleicher & Schuell GmbH, Dassel) verwendet. Ein Bild des verwendeten Moduls, das nach dem Prinzip der Querstromfiltration arbeitete, zeigt Abb. 4.13. Gerigk hatte gezeigt, dass dieses System zur Zellrückhaltung geeignet war [Gerigk 2001]. Hier wurde ein Modul mit relativ zum Fermentationsvolumen größerer Oberfläche verwendet. Dadurch wurde mehr Permeat bereitgestellt und die Scherkräfte,

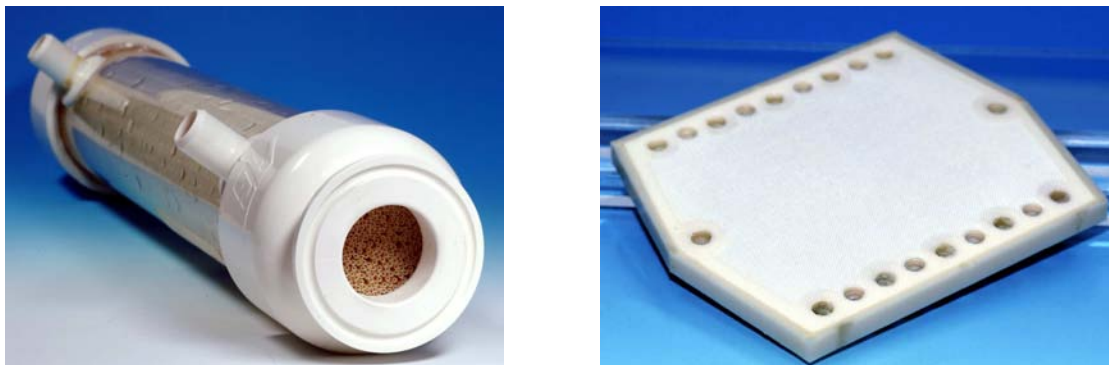


Abb. 4.13: Foto eines Hohlfaserfiltrationsmoduls (links), die Polysulfonfasern sind parallel in einem Gehäuse verklebt; Foto eines Kassettenmoduls (rechts)

die sich negativ auf die Zellen auswirken konnten, verringert⁸. Der Umlauf war über Anschlüsse mit regelbaren Hähnen an die Seitenstutzen des Bioreaktors angeschlossen. Mit einer Schlauchpumpe wurde Fermentationsbrühe durch den Umlauf gepumpt und zellfreies Permeat kontinuierlich bereitgestellt. Zur Überprüfung des Drucks waren am Ein- und Ausgang des Umlaufs Manometer angebracht. Um eine Sauerstofflimitierung im Umlauf zu vermeiden, wurde ein Volumenstrom von 6 l/min eingestellt. Daraus ergab sich eine Verweilzeit im Bypass von 3,6 Sekunden. Der Transmembrandruck betrug 1,0 bar. Der bei freiem Ablauf aus dem Modul erreichte Permeatvolumenstrom nahm mit der Betriebsdauer ab und lag bei $\approx 4,8\text{--}2$ l/h.

Bei der Reaktivextraktion in Zentrifugen war im Gegensatz zur Reaktivextraktion in Hohlfasermembranmodulen eine Abtrennung der Proteine notwendig (siehe Abschnitt 7.1.1). Dazu wurde eine Ultrafiltrationseinheit bestehend aus fünf Kassettenmodulen verwendet, die in einen Kassettenhalter eingebaut wurden (NMWC: 10 kDa, Membranfläche: $0,07\text{ m}^2/\text{Kassette}$, Schleicher & Schuell GmbH, Dassel). Zur Proteinrückhaltung wurde eine Porengröße von 10 kDa gewählt. Ein Foto eines solchen Kassettenmoduls ist in Abb. 4.13 gezeigt. Die Kassetten arbeiteten nach dem Prinzip der Querstromfiltration. Gegenüber Hohlfaserfiltrationsmodulen haben Kassetten die Vorteile einer geringeren Deckschichtbildung und eines höheren Drucks. Beide Parameter führen zu einer Erhöhung des Permeatflusses. Um einen ausreichend hohen Permeatvolumenstrom für die Extraktion zu erzeugen, waren fünf Kassettenmodule notwendig. Zur Überprüfung des Drucks waren am Ein- und Ausgang der Kassettenhalterung Manometer angebracht. Der zellfreie Fermentationsüberstand wurde mit einem Volumenstrom von maximal 4 l/min mit einer Schlauchpumpe durch die Einheit gepumpt. Der Transmembrandruck lag bei 1,5 bar. Der Permeatvolumenstrom aus der Einheit lag abhängig von der Betriebsdauer bei 3,5–1,5 l/h. Ein Volumenstrom in dieser Größenordnung war für die Online-Extraktion bei einem Fermentationsvolumen von 10–15 l ausreichend (siehe Extraktionsexperimente und Fermentationsexperimente in Kapitel 7).

Die Abtrennung von Zellen und Proteinen erfolgte in zwei aufeinander folgenden Filtrationseinheiten, um das Volumen des Umlaufs zur Zellrückhaltung zu minimieren

⁸Die Scherraten liegen bei dem eingesetzten Modul bei 2000 s^{-1} bei einem Volumenstrom von 6 l/min.

und so eine Sauerstofflimitierung der Zellen oder pH-Gradienten zu verhindern. Dennoch musste die Filtrationsfläche groß genug sein, um einen ausreichenden Permeatstrom für die Extraktion zu gewährleisten.

Für die in Abschnitt 4.4.2 beschriebenen Extraktionsexperimente mit Fermentationsüberstand wurde die Fermentationsbrühe nach Beendigung einer Fermentationen zunächst abzentrifugiert. Danach wurde aus diesem zellfreien Überstand mittels der 10 kDa-Ultrafiltrationseinheit proteinfreies Permeat für die Extraktionsexperimente bereitgestellt.

Sterilisation und Reinigung der Module

Der Hohlfaserfiltrationsmodul sowie die Kassettenmodule wurden chemisch mit 1 M Natronlauge sterilisiert. Die erlaubte Sterilisationsdauer für das Hohlfaserfiltrationsmodul lag bei zwei Stunden, die für die Kassettenmodule bei 30 Minuten. Zur Reinigung wurden die Module mit bidestilliertem Wasser (max. $T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$) gespült. Bei starker Verschmutzung wurden die Module mit 30 % Ethanollösung gespült und über Nacht darin gelagert.

4.5.2 Aufbau der Anlage für den integrierten Prozess

Zur Durchführung von Fermentationen mit Reaktivextraktion in Zentrifugen wurde eine Anlage, bestehend aus Bioreaktor, Umlauf zur Bereitstellung von zell- und proteinfreiem Permeat und zwei Zentrifugen zur Extraktion und Rückextraktion von L-Phenylalanin aufgebaut. Eine schematische Darstellung der Anlage zeigt Abb. 4.14.

Die Fermentationsbrühe aus dem Bioreaktor wurde durch den Umlauf zur Zellrückhaltung gepumpt. Das zellfreie Permeat wurde bei anfangs hohem Volumenstrom durch eine Pumpe in einen Vorratsbehälter gefördert. Während des Betriebs nahm der Permeatvolumenstrom ab. Diese Abnahme war auf Deckschichtbildung durch die Biomasse, auf den Antischaum im Medium und Bestandteile der organischen Phase, die die Poren verblockten, zurückzuführen [Gerigk 2001]. Um eine verstärkte Deckschichtbildung durch Unterdruck an der Permeatseite zu vermeiden, wurde die Pumprate auf der Permeatseite im Verlauf manuell verringert. Aus dem Vorratsgefäß, das für die Rezirkulation notwendig war, wurde das zellfreie Permeat durch die zweite Ultrafiltrationseinheit zur Proteinrückhaltung gepumpt. Der Füllstand im Vorratsgefäß wurde auf einen Maximalwert begrenzt und überschüssiges Volumen in den Bioreaktor zurückgeführt, um eine zu starke Reduzierung des Volumens im Bioreaktor zu vermeiden. Das Permeat aus der zweiten Ultrafiltrationseinheit lief frei in ein weiteres Gefäß auf einer Waage, durch die der Volumenstrom während des Prozesses kontrolliert werden konnte. Das Volumen in diesem Gefäß wurde bei ca. 50 ml gehalten. Aus dem Vorratsgefäß wurde das zell- und proteinfreie Permeat in die Zentrifuge zur Extraktion gepumpt. Die Stabilität der Extraktion war gewährleistet, da der Extraktionsprozess in den Zentrifugen nicht durch eine Änderung des Volumenflusses in der auftretenden Größenordnung beeinträchtigt wurde. Solange die Rotoren liefen, hatte auch ein kurzzeitiger Volumenstrom von Null keinen negativen Einfluss. Sobald das erste Permeat die Zentrifuge zur Extraktion erreichte, wurden die Zentrifugen und damit die Extraktion gestartet. Die Extraktion erfolgte mit 10 % D_2EHPA in Kerosin. Aus der Zentrifuge floss das wässrige Raffinat, das an L-Phenylalanin „verarmt“ war, frei in ein Gefäß ab. Mit einer pH-Elektrode wurde der pH-Wert des Raffinats kontrolliert, um Probleme bei der

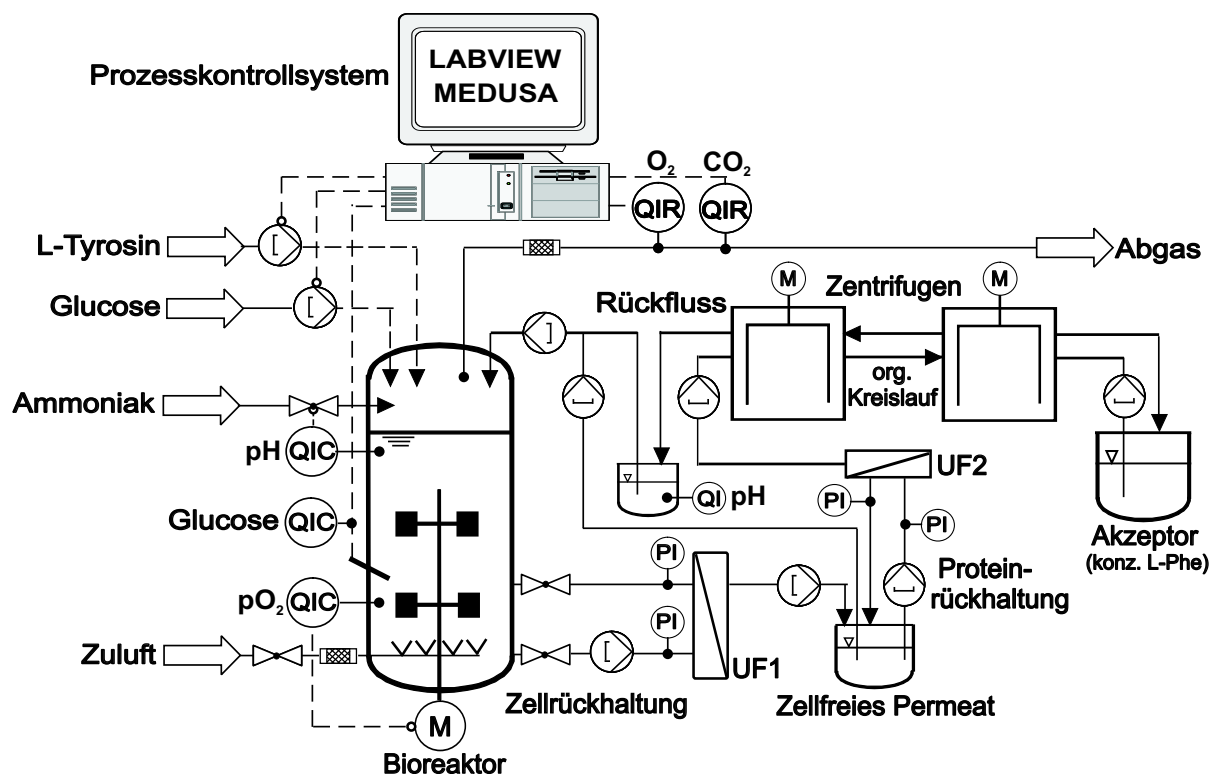


Abb. 4.14: Schematische Darstellung des Fermentationsprozesses im 20 l Bioreaktor mit Peripherie, Umlauf zur Bereitstellung von proteinfreiem Permeat und Zentrifugen zur Reaktivextraktion (Geräteliste, siehe Abschnitt A.2.9)

Extraktion, beispielsweise einen Übertrag von Schwefelsäure in die Extraktion feststellen zu können. Das Raffinat wurde von dort aus in den Bioreaktor zurückgepumpt. Auf diese Weise wurde das Volumen im Fermenter während der Online-Extraktion konstant gehalten. Beim Auftreten von Problemen, z.B. einer pH-Änderung, konnte der Rückfluss in den Bioreaktor gestoppt werden, um den Fermentationsprozess aufrecht zu erhalten. Die beladene organische Phase floss in die zweite Zentrifuge zur Rückextraktion mit 1 M Schwefelsäure, die wie die organische Phase im Kreis geführt wurde. Das Volumen des kompletten Umlaufs lag bei ungefähr 1,1 l, eingeschlossen das Volumen der wässrigen Phase in der Zentrifuge zur Extraktion. In Abb. 4.15 ist ein Foto der Fermentationsanlage mit Umlauf zu sehen.

4.5.3 Durchführung der Fermentationen mit integrierter Produktabtrennung

Die Fermentationen mit integrierter Reaktivextraktion wurden ähnlich wie in Abschnitt 4.3 beschrieben durchgeführt. Vor Fermentationsbeginn wurde der Umlauf zur Zellrückhaltung chemisch mit 1 M Natronlauge für zwei Stunden sterilisiert und an den Bioreaktor angeschlossen, der im Anschluss sterilisiert wurde. Das weitere Vorgehen entsprach dem bei einer Fermentation ohne Produktabtrennung. Anstelle von 7,5 l wurde ein Anfangsvolumen von 8,5 oder 10 l gewählt. Durch das größere Volumen wurde die Aufkonzentrierung der Biomasse im Bioreaktor bei Zuschaltung des Umlaufs mit einem Volumen von 1,1 l gering gehalten und möglichst gleiche Verhältnisse im Bioreaktor beibehalten. Der Fermentationsprozess in der Wachstumsphase entsprach



Abb. 4.15: Foto des 20 l Bioreaktors mit Peripherie und Umlauf zur Bereitstellung von proteinfreiem Permeat; das Permeat wurde von dort in die Zentrifugen zur Reaktivextraktion geleitet, zu sehen in Abb. 4.12

dem einer Fermentation ohne integrierte Extraktion. Ablauf, Analytik, Datenerfassung und Regelung waren gleich (siehe Abschnitt 4.3). In der Wachstumsphase wurde eine dem Anfangsvolumen angepasste Gesamtmenge (8,5 l: 190 g; 10 l: 225 g) an L-Tyrosin zudosiert und die L-Tyrosin-Zufuhr am Ende der Wachstumsphase auf 5 g/h (125 mg/h L-Tyrosin) umgestellt.

Vor Beginn der Extraktion wurden alle Vorratsgefäße des Umlaufs zur Zell- und Proteinrückhaltung für 20 Minuten bei 121 °C sterilisiert. Schlauchverbindungen und Zentrifugen wurden nicht sterilisiert, sondern mit Reinstwasser gereinigt. Demzufolge war das System weitestgehend monoseptisch. Da die optische Dichte zum Startzeitpunkt der Extraktion bereits bei ≈ 80 lag und Ampicillin zugegeben wurde (Stämme, siehe Abschnitt 4.1.1), war die Gefahr einer Kontamination durch Fremdkeime jedoch gering. In der Produktionsphase nach dem Ende der Wachstumsphase und Limitierung der L-Tyrosin-Zufuhr auf ein Minimum wurden Umlauf und Extraktion gestartet, wie im vorangehenden Abschnitt erklärt. Der genaue Zeitpunkt war von dem jeweiligen Experiment abhängig. Von da an liefen Fermentation und Extraktion parallel, entweder bis zum Ende des Fermentationsprozesses oder die Extraktion wurde nach einigen Stunden beendet, während der Fermentationsprozess bis $t = 50$ h weiterlief. Im zweiten Fall wurde das Permeat aus dem System in den Bioreaktor zurückgeführt und der Umlauf abgekoppelt. Neben den Proben aus dem Bioreaktor wurden während der Online-Extraktion Proben an den Ein- und Ausgängen der wässrigen Phasen der Zentrifugen genommen und analysiert. Am Ende wurden Bioreaktor und Umlauf wie bereits beschrieben sterilisiert und gereinigt.

5 Untersuchungen zum Einfluss von Glucoseaufnahmesystemen auf die Produktion

Zur Produktion von L-Phenylalanin mit *E. coli* wurde von Gerigk ein Fermentationsprozess im Zulaufverfahren entwickelt [Gerigk 2001]. Basierend auf diesem Prozess wurden verschiedene prozesstechnische Ansätze zur Verbesserung des Prozesses und der L-Phenylalanin-Produktion verfolgt. Daneben wurden unterschiedliche L-Phenylalanin-Produzenten eingesetzt und die L-Phenylalanin-Produktion untersucht.

Für die Untersuchungen wurden Produktionsstämme mit Glucoseaufnahme über das Phosphotransferase-System (PTS(+)) und Stämme mit Glucoseaufnahme über ein heterologes System aus *Zymomonas mobilis* (PTS(-)) verwendet. Da bei der Glucoseaufnahme über das Phosphotransferase-System Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Pyruvat umgesetzt wird, PEP aber gleichzeitig neben Erythrose-4-Phosphat (E4P) Vorläufermetabolit für die Aromatenbiosynthese ist, ist eine Limitierung in der PEP-Bereitstellung vorstellbar (vgl. Abschnitt 3.1.3). Dagegen wird bei Glucoseaufnahme über den Glucose-Facilitator aus *Zymomonas mobilis* und Phosphorylierung der Glucose über eine ATP-abhängige Kinase kein PEP verbraucht. Demzufolge sollte die Glucoseaufnahme über dieses heterologe System theoretisch zu einer verbesserten Bereitstellung von PEP und damit L-Phenylalanin-Produktion führen (vgl. [Valle u. a. 1996]).

5.1 L-Phenylalanin-Produktion mit einem Stamm mit Phosphotransferase-System zur Glucoseaufnahme

Als Ausgangsbasis der Prozessentwicklung wurde eine Fermentation mit dem Produktionsstamm *E. coli* 4pF81, bei dem die Glucoseaufnahme über das Phosphotransferase-System erfolgte, durchgeführt. Teilweise wurde die L-Phenylalanin-Produktion mit diesem Stamm bereits von Gerigk beschrieben [Gerigk 2001]. In dieser Arbeit erfolgten detailliertere Untersuchungen. Einige grundlegende neue Ergebnisse werden in diesem Abschnitt dargestellt und analysiert.

5.1.1 Fermentation mit dem Stamm *E. coli* 4pF81

Die Fermentation erfolgte im 20 l-Bioreaktor mit einem Anfangsvolumen von 7,5 l. Die Glucosekonzentration wurde auf 5 g/l geregelt, die Prozessdauer betrug 50 Stunden (vgl. Abschnitt 4.3.4).

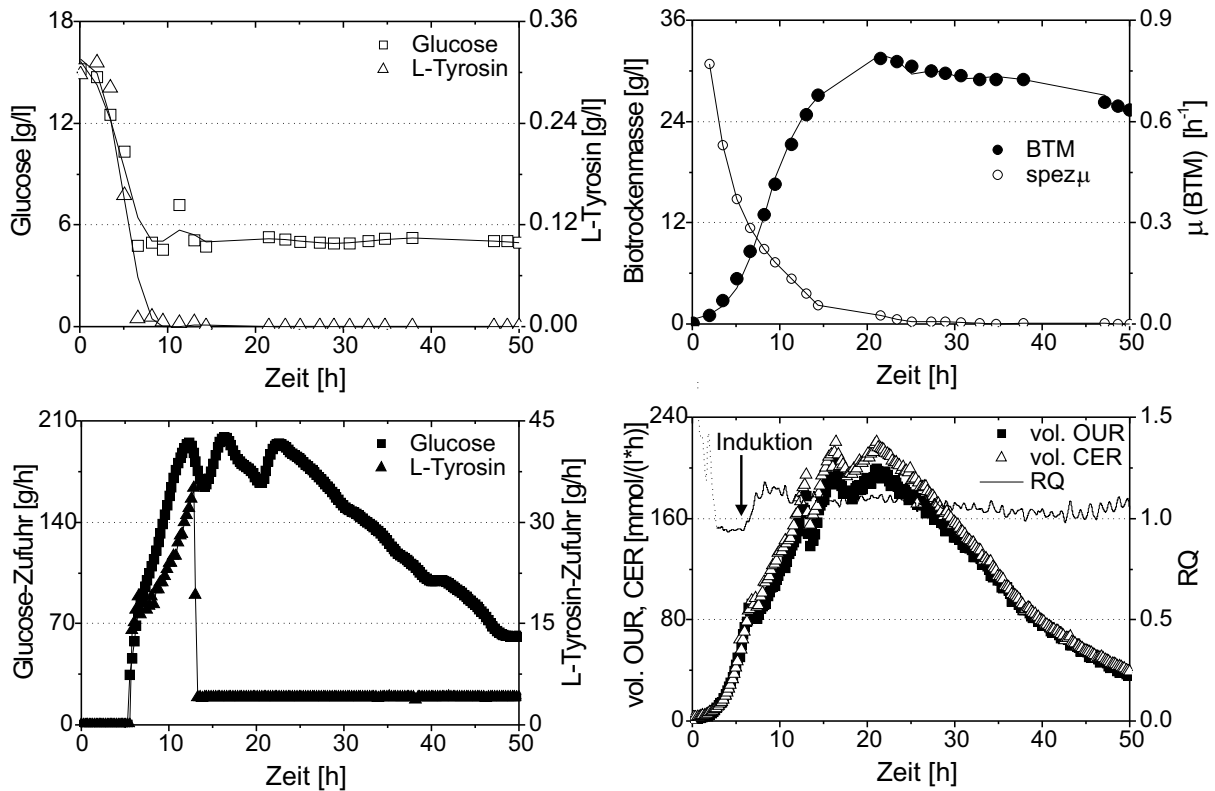


Abb. 5.1: Verlauf der Substratkonzentration, der Zufuhrraten der Glucoselösung und der L-Tyrosin-Lösung, der Biomassekonzentrationen, der Biomasse-spezifischen Wachstumsrate, der volumetrischen Sauerstoffaufnahme (OUR), der Kohlendioxidbildungsrate (CER) und des Respirationsquotienten (RQ) (*E. coli* 4pF81)

Den Verlauf wichtiger Prozessgrößen zeigt Abb. 5.1. Die im Medium vorliegenden Substratmengen an Glucose und L-Tyrosin wurden in den ersten Fermentationsstunden verwertet. Nach 5,5 Stunden wurden die Substratzufuhr und die Regelung der Glucosekonzentration auf 5 g/l (≈ 30 mmol/l) gestartet. L-Tyrosin war kurz danach nicht mehr mittels HPLC nachweisbar (Nachweisgrenze $\approx 10 \mu\text{mol/l}$). Die Biomassekonzentration stieg annähernd exponentiell an. Die Wachstumsrate wurde durch die L-Tyrosin-Zufuhr limitiert. Nach 14 Stunden wurde die L-Tyrosin-Zufuhr auf ein Minimum von 4 g/h L-Tyrosin-Lösung (0,1 g/h L-Tyrosin) reduziert, so dass nach dem vollständigen Verbrauch des L-Tyrosins kein weiteres Wachstum stattfand und die Biomassekonzentration annähernd konstant blieb. Die leichte Abnahme der Biomassekonzentration war auf die Verdünnung der Fermentationsbrühe durch die Substratzufuhr zurückzuführen. Die Wachstumsrate lag dementsprechend während des größten Teils der Produktionsphase bei Null. Die volumetrische Sauerstoffaufnahme und die Kohlendioxidbildungsrate stiegen während der Wachstumsphase auf Maximalwerte von 210–220 mmol/(l·h) an. Eine starke Abnahme war in Folge der Umstellung der L-Tyrosin-Zufuhr auf ein Minimum nach 14 Stunden festzustellen. Danach stiegen die Werte weiter. Es war anzunehmen, dass die Zellen den Stoffwechsel an die veränderten Bedingungen anpassten. Nach 22 Stunden begann eine deutliche Abnahme der Sauerstoffaufnahme und der Kohlendioxidbildungsrate, die sich bis zum Ende der Fermentation fortsetzte. Der Respirationsquotient (RQ), der den Quotienten von Kohlendioxidbildungsrate und Sauerstoffaufnahme angibt, ist bei vollständigem, aerobem Abbau von 1 mol Glucose zu 6 mol Kohlendioxid

unter Verbrauch von 6 mol Sauerstoff 1,0. Die Schwankungen in den ersten Stunden waren auf fehlerhafte Abgaswerte im niedrigen Bereich zurückzuführen. Bis zur Induktion lag der RQ bei $\approx 0,95$. Nach der Induktion stieg der RQ auf über 1,1, was auf die L-Phenylalanin-Produktion und die folglich unvollständige Oxidation der Glucose zu Kohlendioxid zurückgeführt werden kann.

Die L-Phenylalanin-Konzentration stieg nach der Induktion zunächst exponentiell an (siehe Abb. 5.2). Bei Erreichen von ungefähr 180 mmol/l L-Phenylalanin war nur noch eine verringerte Zunahme festzustellen. Die Endkonzentration betrug 206 mmol/l (34 g/l). Die Acetatkonzentration konnte mittels der Glucoseregulation über einen großen Teil der Fermentation gering gehalten werden. Sobald kaum noch L-Phenylalanin gebildet wurde, setzte jedoch eine verstärkte Acetatbildung ein. Die Endkonzentration lag bei 380 mmol/l (22,8 g/l). Zusammen mit der Acetatbildung setzte eine geringe Pyruvatproduktion mit einer Endkonzentration von 10 mmol/l und die Produktion von Alanin mit einer Endkonzentration von 3 mmol/l ein, die hier nicht dargestellt sind. Der Anstieg der Konzentrationen von Acetat, Alanin und Pyruvat ließ auf eine Umstellung des Stoffwechsels der Zellen weg von der L-Phenylalanin-Produktion hin zur Pyruvatproduktion und Verwertung schließen. Mögliche Ursachen dieser Veränderung werden in Abschnitt 6.2 aufgezeigt. Weitere in geringen Mengen gebildete Nebenprodukte waren Orotsäure (5 mmol/l), ein Zwischenprodukt bei der Synthese der Pyrimidin-Nucleotide, Uracil (2 mmol/l), das aus Orotsäure und Ribose-5-Phosphat entsteht und Glutamat (0,5 mmol/l).

Als Nebenprodukte aus dem Aromatenbiosyntheseweg wurden mittels HPLC bis zu 10 mmol/l Shikimat und bis zu 13 mmol/l 3-Dehydroshikimat gemessen. In Abb. 5.12 in Abschnitt 5.3 sind die genetischen Veränderungen in dem Stamm abgebildet. Die 3-Dehydroshikimat-Konzentration nahm während der Produktionsphase leicht zu. Während der Wachstumsphase nach der Induktion war außer den genannten Nebenprodukten Shikimat-3-Phosphat (S3P) qualitativ nachweisbar. Nach der Umstellung

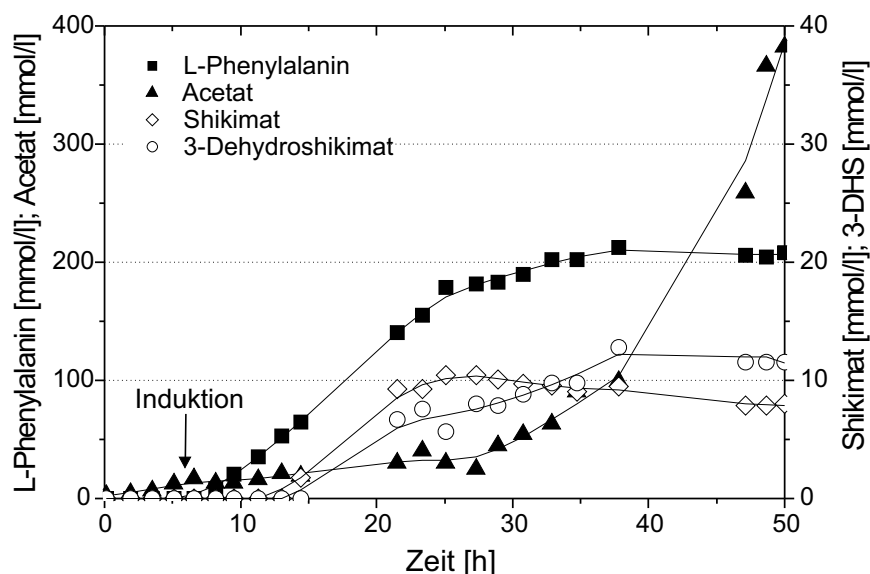


Abb. 5.2: Verlauf der Produkt- und Nebenproduktkonzentrationen (*E. coli* 4pF81)

auf L-Tyrosin-Limitierung am Ende der Wachstumsphase nahm die Konzentration von Shikimat-3-Phosphat jedoch schnell ab. Stattdessen war Shikimat nachweisbar, dessen Konzentration im weiteren Verlauf konstant blieb. Eine Abnahme hätte bedeutet, dass es metabolisiert wurde. Mittels einer Dephosphorylierungsreaktion konnte nachgewiesen werden, dass die Konzentration von Shikimat-3-Phosphat am Ende der Wachstumsphase ungefähr der Shikimatkonzentration entsprach. Eine mögliche Erklärung war, dass Shikimat nach der Umstellung im Stoffwechsel durch intra- oder extrazelluläre Dephosphorylierung aus Shikimat-3-Phosphat entstand [Oldiges 2003]. Genaue Mechanismen sind unbekannt, aber einen Einfluss könnte das bei der Dephosphorylierung frei werdende ATP haben. Die Nachweisbarkeit von Shikimat-3-Phosphat bedeutete in jedem Fall, dass in der Wachstumsphase entweder nicht ausreichend Phosphoenolpyruvat für die Bildung von 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat (EPSP) vorhanden war oder dass die chromosomale Expression der EPSP-Synthase (AroA) zu schwach war. Während der reinen Produktionsphase war weder Shikimat-3-Phosphat nachweisbar, noch war eine Zunahme an Shikimat festzustellen. Das bedeutete, dass entweder der Fluss durch die Aromatenbiosynthese aufgrund der Wachstumslimitierung geringer war, und somit keine Anhäufung mehr stattfand oder dass Phosphoenolpyruvat, das während des Wachstums für den Tricarbonsäure-Zyklus benötigt wurde, nicht mehr limitierend war. Das extrazellulär nachweisbare Shikimat wurde jedoch nicht von den Zellen abgebaut. 3-Dehydroshikimat akkumulierte wahrscheinlich, da die Shikimatdehydrogenase (AroE) durch Shikimat Feedback inhibiert wird [Dell und Frost 1993]. Durch eine Überexpression von AroE könnte die Limitierung aufgehoben werden. Da das Enzym auch die Reaktion von Dehydroquinat zu Chinasäure katalysiert, würde allerdings auch der Fluss in diese Richtung zunehmen [Chandran u. a. 2003]. Genauere Untersuchungen zum Aromatenbiosyntheseweg wurden von Oldiges durchgeführt [Oldiges 2003].

5.1.2 Kohlenstoffbilanz

Die Verteilung des umgesetzten Kohlenstoffs während der Fermentation zur L-Phenylalanin-Produktion wurde durch Berechnung der integralen molaren Kohlenstoffmengen der Produkte bestimmt. Die Kohlenstoffanteile der einzelnen Produkte sind in Abb. 5.3 in Prozent des in Form von Glucose und L-Tyrosin zugeführten Kohlenstoffs angegeben. Die Nebenprodukte Pyruvat, Alanin, Orotsäure, Uracil und Glutamat sind nicht aufgetragen, da deren Anteil summiert bei nur maximal 0,5 C-mol % lag. Der Kohlenstoffanteil aus der Biomasse wurde mittels einer empirischen Annahme der Biomassezusammensetzung ($\text{CH}_{1,83}\text{N}_{0,22}\text{O}_{0,5}$ [Nielsen und Villadsen 1994]) aus der Biotrockenmasse berechnet.

Aus dieser Bilanz war zu entnehmen, dass die Hälfte des eingesetzten Kohlenstoffs in Kohlendioxid umgewandelt wurde. Während der Produktionsphase erfolgte eine leichte Zunahme. Die Biomasse machte in der Produktionsphase 12-20 % aus. Der Anteil an L-Phenylalanin lag zwischen 20 und 26 % und nahm gegen Ende leicht ab, während der Acetatanteil bis auf 9 % zunahm. Shikimat und 3-Dehydroshikimat hatten nur einen sehr geringen Anteil von ungefähr 1 %.

Die Wachstumsphase bis $t = 14 \text{ h}$ ist schraffiert dargestellt, da die Kohlenstoffbilanz in diesem Bereich relativ ungenau war. Insbesondere die Bestimmung der Biomasse war

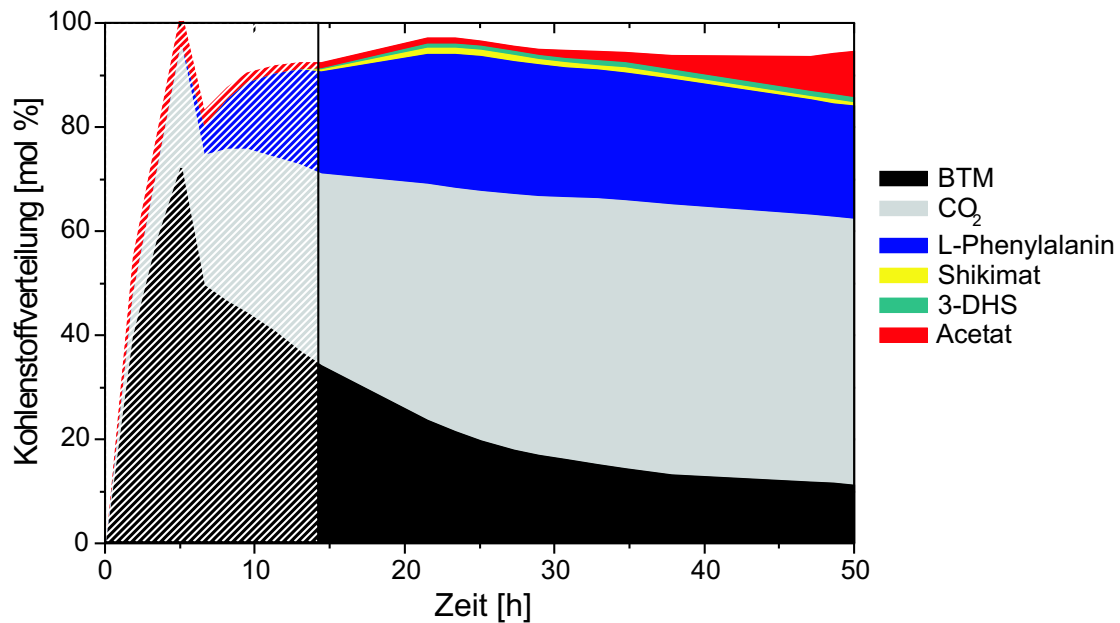


Abb. 5.3: Prozentuale Kohlenstoffverteilung des verbrauchten Kohlenstoffs auf die Produkte integriert über den Prozessverlauf (*E. coli* 4pF81)

bei niedrigen Biomassekonzentrationen fehlerhaft. Am Anfang der Fermentation waren die niedrigen Werte der Abgasanalytik aufgrund der unzureichenden Empfindlichkeit des Sensors der Abgasanalytik ebenfalls fehlerhaft. Diese hatten Einfluss auf die Berechnung der Kohlendioxidmenge. In der Produktionsphase konnte die Bilanz zu 93–97 % geschlossen werden. In HPLC-Messungen und ^1H -NMR-Messungen konnten keine weiteren Metabolite in größeren Konzentrationen gefunden werden, durch die diese Bilanzlücke hätte geschlossen werden können. Die tatsächliche Zusammensetzung der Biomasse entsprach jedoch möglicherweise nicht der angenommenen Zusammensetzung oder sie unterlag Schwankungen über den Fermentationsverlauf, was nicht überprüft wurde. Zudem wurde zur Vereinfachung im Bioreaktor gelöstes Kohlendioxid nicht in die Bilanz einbezogen, da die Menge in Abhängigkeit von Parametern wie Druck, pH-Wert und dem durch die Belüftung ausgetriebenen Kohlendioxid hätte ermittelt werden müssen. Zudem lag der Anteil des gelösten Kohlendioxids an der Gesamtbilanz in der Größenordnung von 0,1 %¹ und war somit vernachlässigbar. Insgesamt summierten sich bei der Berechnung der molaren Anteile die Fehler der einzelnen Messungen. Insbesondere der Fehler bei der Kohlendioxidmessung hatte einen großen Einfluss, da der Anteil des Kohlendioxids bei 50 % lag. Daher konnte angenommen werden, dass die Abweichung von 100 % auf Messungenauigkeiten zurückzuführen war und die Kohlenstoffbilanz geschlossen war (vgl. [Convery u. a. 2002], [Schell u. a. 2002]).

5.1.3 Systeme zur Online-Glucosemessung

Für eine optimale Prozessführung, die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Fermentationen war eine Regelung der Glucosekonzentration notwendig. Eine Limitierung

¹Die in Wasser gelöste Menge Kohlendioxid wurde über den Anteil im Abgas während der Produktion bei einer Temperatur von 25 °C und 0,5 bar Überdruck abgeschätzt.

der Glucose, die eine verringerte Produktbildungsrate zur Folge gehabt hätte oder Akkumulation mit nachfolgendem Überschussstoffwechsel und Bildung von Acetat wurde dadurch verhindert [Gerigk u. a. 2002a].

Für die Online-Messung der Glucose, deren Werte zur Regelung verwendet wurden, wurden zwei verschiedene Systeme eingesetzt. Das Eine war das von Gerigk [Gerigk 2001] beschriebene System mit Probenahme über ein Filtrationssystem und enzymatischer Glucosemessung über den OLGA und das Andere ein System mit automatischer Probenahme über eine Dialysesonde im Reaktor und enzymatischer Messung über das Process Trace System.

Bei Verwendung des OLGA-Systems waren die Scherraten in dem in den Umlauf eingebauten Ultrafiltrationsmodul zur Bereitstellung von zellfreiem Permeat für die Glucosemessung mit mehr als 16.000 s^{-1} hoch [Schleicher und Schuell 1998]. Diese wirkten sich möglicherweise negativ auf die Zellen aus. Untersuchungen dazu wurden jedoch nicht durchgeführt. Messfehler traten durch Luftblasen, die durch die Luftzufuhr im Bioreaktor über den Umlauf in das Glucosemessgerät gelangten, auf. Zudem fiel L-Phenylalanin bei zu hohen Konzentrationen durch die Abkühlung im Umlauf von 37 °C , der Temperatur im Bioreaktor, auf Umgebungstemperatur ($\approx 25\text{ °C}$) aus, so dass aufgrund von Verstopfungen keine Messung mehr möglich war. Die Löslichkeit von L-Phenylalanin in Wasser liegt bei 25 °C bei $29,65\text{ g/l}$ [Weast und Astle 1979]. Eine Beheizung der Verbindungsschläuche des Umlaufs über eine an ein Wasserbad angeschlossene Schlauchummantelung wurde getestet. Dieses System war jedoch zu anfällig für Leckagen. Bei den Experimenten, bei denen das System mit Filtration und Messung durch den OLGA zum Einsatz kam, wird es bei der Darstellung erwähnt.

Durch Verwendung des Process Trace Systems mit direkter Probenahme über eine Dialysesonde konnten die Probleme behoben werden. L-Phenylalanin fiel bei diesem

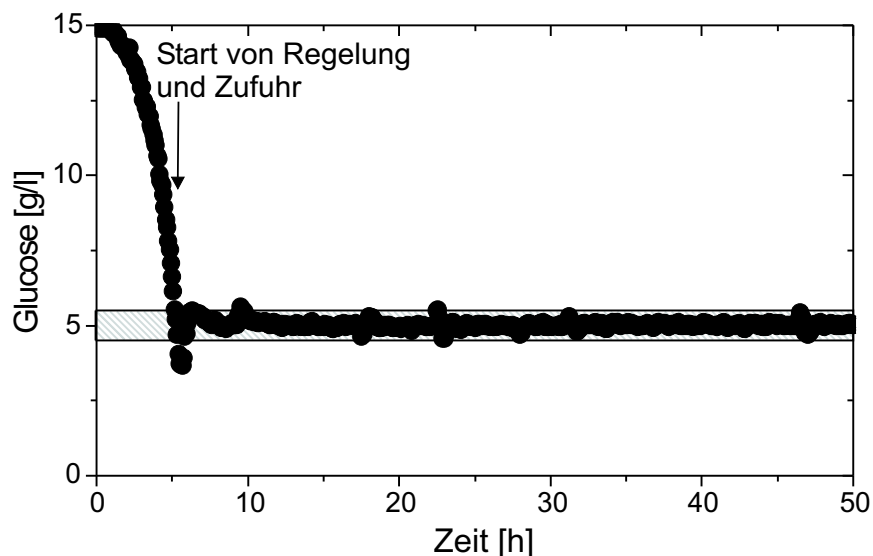


Abb. 5.4: Verlauf der Glucosekonzentration bei Regelung auf 5 g/l , Messung mit dem Process Trace System

System nicht aus, da nur ein geringer Anteil der Medienbestandteile luftblasenfrei über die Dialysemembran in den zu vermessenden Akzeptorstrom diffundierte. Den Verlauf der Glucosekonzentration während einer Fermentation zeigt Abb. 5.4.

Die Glucose konnte unter Verwendung optimierter Regelparameter von Kalman-Filter und MV3-Regler bei $\approx 5 \pm 0,5$ g/l gehalten werden². Bei Verwendung der Dialysemembran wurde mit zunehmender Prozessdauer eine geringere Konzentration gemessen als aktuell vorhanden war. Dies war auf die Bildung eines Biofilm auf der Dialysemembran zurückzuführen, durch den die Diffusion durch die Membran reduziert wurde [Fletcher 1999]. Diese Drift der Dialysesonde wurde durch eine Offline-Kontrollmessung und Nachkalibrierung des Sondenfaktors korrigiert.

5.2 Untersuchungen mit einem Stamm mit heterologem Glucoseaufnahmesystem aus *Zymomonas mobilis*

Nach der Darstellung der Ergebnisse der L-Phenylalanin-Produktion mit einem Stamm mit Glucoseaufnahme über das Phosphotransferase-System im vorangegangenen Abschnitt werden in diesem Abschnitt Untersuchungen mit dem Stamm 20pMK12 mit Glucoseaufnahme über den Glucose-Facilitator aus *Zymomonas mobilis* vorgestellt.

Die Kapazität der Glucoseaufnahme der Zellen war sowohl für das Wachstum als auch die Produktion der Stämme essenziell. *E. coli* besitzt Phosphotransferase-Systeme für die Aufnahme verschiedener Substrate. Da die allgemeinen Gene der Phosphotransferase-Systeme in dem Stamm 20pMK12 jedoch deletiert waren, konnte die Glucose nicht über diese Systeme aufgenommen werden [Postma u. a. 1993]. Das Gen des Glucose-Facilitators, über den die Glucose in dem PTS(-)-Stamm aufgenommen wurde, war unter Kontrolle des durch IPTG induzierbaren P_{tac} -Promotors. Zum Einfluss der Glucosekonzentration und der Induktion auf Wachstum und L-Phenylalanin-Produktion wurden Untersuchungen durchgeführt.

5.2.1 Einfluss der Glucosekonzentration auf die Produktion

Der Einfluss der Glucosekonzentration auf die L-Phenylalanin-Produktion mit Stämmen mit Phosphotransferase-System wurde von mehreren Autoren beschrieben [Takagi u. a. 1996], [Gerigk u. a. 2002a]. Bei diesen Stämmen nahm der Überschussstoffwechsel, der zur Bildung von Acetat führte, mit der Glucosekonzentration zu. Die Selektivität nahm ab. Dieses System unterscheidet sich deutlich von der Glucoseaufnahme über den Glucose-Facilitator, die durch erleichterte Diffusion erfolgt. Dabei wird die maximale Aufnahme durch den Carrier limitiert. Die Glucoseaufnahme wird durch den Substratgradienten angetrieben und in *Z. mobilis* durch eine hohe Glucoseumsatzrate aufrecht erhalten. Die Michaelis-Menten-Konstante K_m , die die Affinität für das Substrat charakterisiert, wurde für den Glucose-Facilitator mit 4,1 mmol/l angegeben [Weisser 1996].

²Die Genauigkeit des OLGA-Systems lag bei 5 ± 1 g/l Glucose [Gerigk 2001].

Daher wurden Untersuchungen zur Produktion bei verschiedenen Glucosekonzentrationen mit dem PTS(-)-Stamm 20pMK12 durchgeführt [Bujnicki 2001]. Bei den Fermentationen wurden Glucosekonzentrationen von 0,5 g/l (≈ 3 mmol/l), 5 g/l (≈ 30 mmol/l) und 30 g/l (≈ 170 mmol/l) in der Produktionsphase eingestellt. Eine Konzentration von 0,5 g/l lag in der Größenordnung des K_m -Wertes, 5 g/l darüber. Mit 30 g/l wurde ein deutlicher Überschuss eingestellt. Die Online-Glucosebestimmung erfolgte in diesen Experimenten mittels Filtrationssystem und OLGA. Bei der Fermentation mit 0,5 g/l Glucose lag die Glucosekonzentration am Anfang bei 6 g/l, um ausreichend Glucose zum Wachstum zur Verfügung zu stellen. Nach 8,5 Stunden war 1 g/l Glucose erreicht und die Konzentration wurde bis zum Ende der Wachstumsphase bei 1 g/l geregelt. Nach dem Ende der Wachstumsphase nach 18 Stunden wurde sie auf 0,5 g/l geregelt. Bei der Fermentation mit 5 g/l Glucose in der Produktionsphase wurden am Anfang 15 g/l Glucose vorgelegt. Die Regelung auf den Sollwert erfolgte ab $t = 8$ h. Bei der Fermentation mit 30 g/l Glucose wurde diese Konzentration von Anfang an eingestellt (siehe Abb. 5.5). Die Produktion wurde mit $10 \mu\text{mol/l}$ IPTG bei $\text{OD}_{620}=10\text{--}12$ induziert. Bei der Fermentation mit 30 g/l Glucose wurde aufgrund einer geringeren optischen Dichte der Vorkultur ≈ 2 h später induziert. Die weitere Prozessdurchführung erfolgte wie in Abschnitt 4.3.4 beschrieben.

Wachstum des PTS(-)-Stamms 20pMK12 war auch ohne Induktion möglich. Das hatten Wachstumsversuche in Schüttelkolben ergeben. Eine Induktorkonzentration von $10 \mu\text{mol/l}$ führte zu gutem Wachstum, eine Induktorkonzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ hatte jedoch negative Auswirkungen [Sprenger 2001]. Daher wurde in diesen Versuchen eine Induktorkonzentration von $10 \mu\text{mol/l}$ IPTG gewählt. Wachstum ohne Induktion war nur dadurch zu erklären, dass Glucose bei der hohen Glucosekonzentration von 6–30 g/l am Anfang der Fermentationen im Medium möglicherweise diffusiv über die Membran aufgenommen wurde oder der P_{tac} -Promotor möglicherweise nicht absolut dicht war, obwohl der Inhibitor (*lacI*) ebenfalls über das Plasmid exprimiert wurde [Old und Primrose 1994]. Darüber hinaus war nicht auszuschließen, dass Glucose über andere Aufnahmesysteme in die Zelle aufgenommen wurde (vgl. Abschnitt 3.1.2).

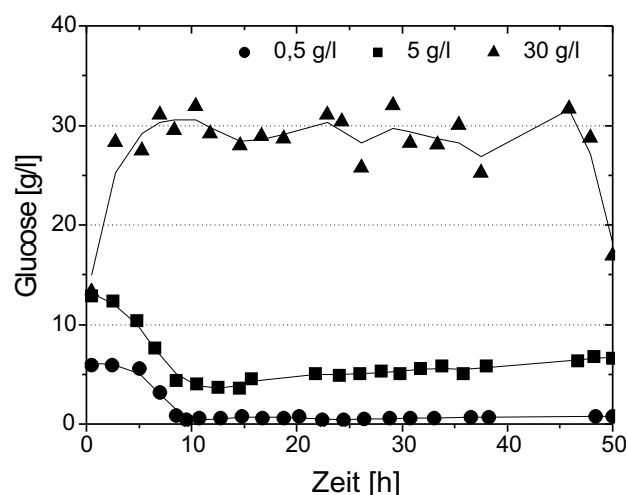


Abb. 5.5: Verlauf der Glucosekonzentrationen in Fermentationen des PTS(-)-Stammes *E. coli* 20pMK12 bei verschiedenen Glucosekonzentrationen

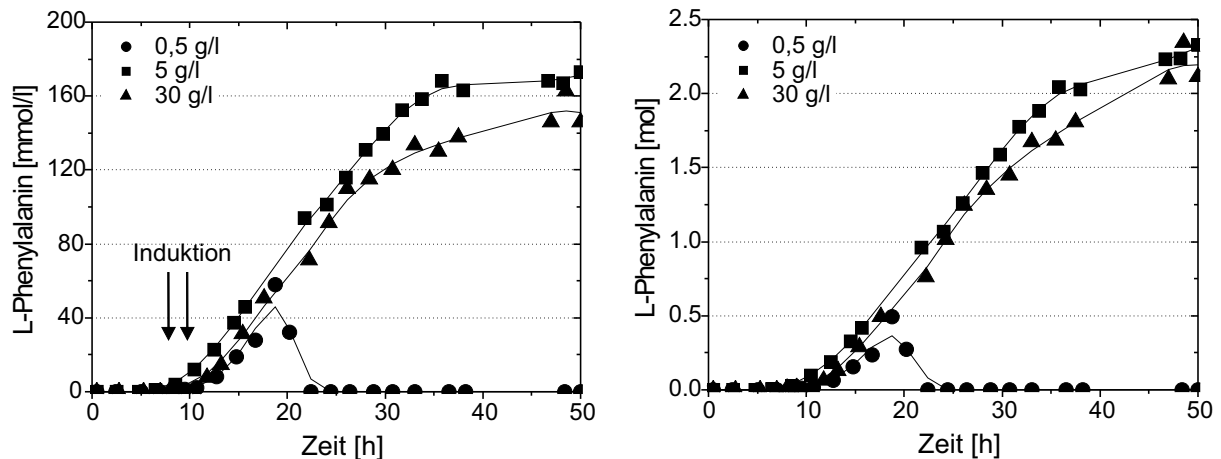


Abb. 5.6: Verlauf der L-Phenylalanin-Konzentration und der absoluten L-Phenylalanin-Menge in Fermentationen mit dem PTS(-)-Stamm *E. coli* 20pMK12 bei verschiedenen Glucosekonzentrationen

Abb. 5.6 zeigt die Produktkonzentrationen und die Gesamtmenge an L-Phenylalanin in den Fermentationen. Bei einer Glucosekonzentration von 0,5 g/l wurde bis $t = 18$ h wenig L-Phenylalanin gebildet. Ab diesem Zeitpunkt wurde L-Tyrosin auf das Minimum für den Erhaltungsstoffwechsel limitiert. Danach erfolgte bei 0,5 g/l Glucose keine weitere L-Phenylalanin-Produktion, sondern die Konzentration nahm bis auf Null ab. Bei den Fermentationen mit 5 g/l und 30 g/l Glucose war in den ersten 25 Prozessstunden kaum ein Unterschied zu erkennen. Dabei war zu beachten, dass die Induktion bei der höheren Konzentration zwei Stunden später erfolgte. Am Ende wurde mit 5 g/l Glucose eine L-Phenylalanin-Konzentration von 171 mmol/l (28,2 g/l) erreicht, bei höherer Glucosekonzentration mit 151 mmol/l etwas weniger. In den letzten 10 Stunden wurde nicht mehr viel L-Phenylalanin produziert. Etwas deutlicher wird der sehr ähnliche Verlauf bei der Betrachtung der Gesamtmenge an L-Phenylalanin, bei der die Verdünnungseffekte durch die Dosierung unterschiedlicher Glucosevolumina aufgehoben wurden. Hier wurden 2,3 mol (363 g) bei 5 g/l Glucose bzw. 2,2 mol (380 g) L-Phenylalanin bei 30 g/l Glucose bis zum Ende der Fermentationen gebildet.

Acetat wurde unter limitierten Bedingungen gar nicht gebildet. Bei höherer Glucosekonzentration wurde nur in den letzten Stunden der Fermentationen wenig Acetat gebildet, bis zu 60 mmol/l bei 5 g/l Glucose und 20 mmol/l bei 30 g/l Glucose. Auf die Acetatbildung wird auch in Abschnitt 6.2 eingegangen.

Zur genaueren Betrachtung der Produktion bei Limitierung und Überschuss sind in Abb. 5.7 die Biomassekonzentrationen und die Biomasse-spezifischen Produktbildungs-raten aufgetragen. Die Biomassekonzentrationen stiegen in den Fermentationen mit ausreichend Glucose vergleichbar auf ≈ 33 g/l an. Dagegen erreichte die Konzentration in der Fermentation unter limitierten Bedingungen erst nach ungefähr 25 Stunden diesen Wert. Der Anstieg war deutlich langsamer, da die Glucosekonzentration ab $t = 8,5$ h bei nur 0,5 g/l (3 mmol/l) lag. Die Produktbildungs-raten der Fermentationen mit Glucoseüberschuss waren über einen großen Teil vergleichbar. Die Produktbildungs-rate bei der Fermentation unter Glucoselimitierung lag zunächst deutlich unter den Pro-

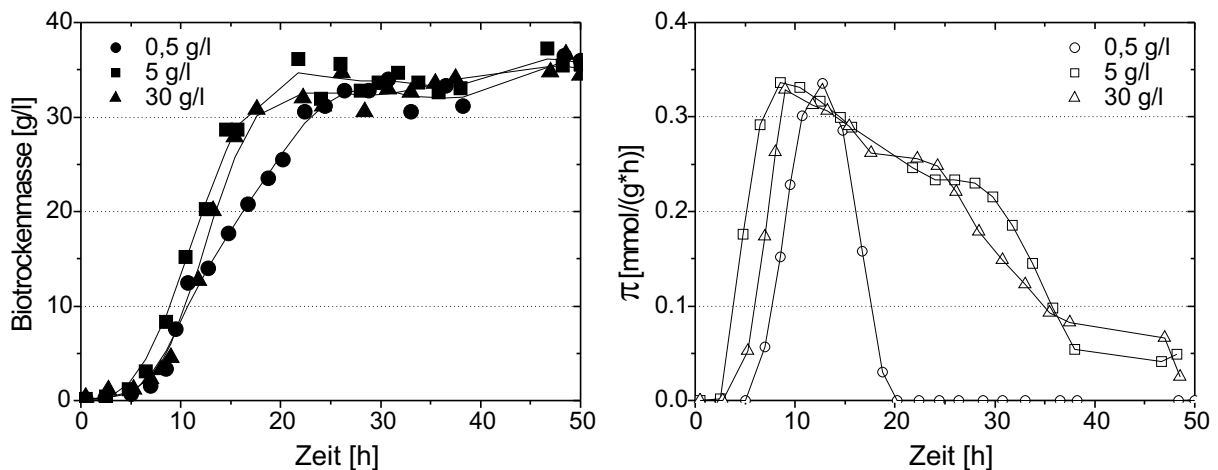


Abb. 5.7: Verlauf der Biomassekonzentration und der Biomasse-spezifischen Produktbildungsrate in Fermentationen des PTS(-)-Stammes *E. coli* 20pMK12 bei verschiedenen Glucosekonzentrationen

duktbildungsraten bei höheren Konzentrationen und ab $t = 18 \text{ h}$ bei Null. Mit $0,5 \text{ g/l}$ lag die Glucosekonzentration in der Größenordnung des K_m von $4,1 \text{ mmol/l}$ für den Glucose-Facilitator (siehe Abb. 5.8). Da die Glucose, bedingt durch das Dosiersystem mit Schlauchpumpe bei geringen Dosieraten intermittierend zugeführt wurde, bekam jeweils ein Teil der Zellen immer wieder Glucose. Die Menge war ausreichend für langsames Wachstum. Das Wachstum wurde jedoch wie die Produktbildung limitiert. Nach der Limitierung der L-Tyrosin-Zufuhr wurde zur Aufrechterhaltung einer Konzentration von $0,5 \text{ g/l}$ nur noch wenig Glucose zudosiert. Diese Dosierate war bei der erreichten Biomassekonzentration nicht mehr ausreichend für Wachstum und Produktbildung. Das zuvor produzierte L-Phenylalanin wurde wahrscheinlich für die Biomassebildung verbraucht. Eine stärkere Limitierung der Glucosekonzentration auf $0,1 \text{ g/l}$ wurde getestet, doch diese hatte einen sprunghaften Anstieg der Gelöstsauerstoffkonzentration im Bioreaktor zur Folge. Das ließ darauf schließen, dass die Zellen inaktiv wurden, weil sie gar keine Glucose mehr erhielten.

Der Verlauf der Biomasse-spezifischen Glucoseaufnahmeraten (siehe Abb. 5.8) zeigt, dass sich diese bei 5 und 30 g/l nur in den ersten Prozessstunden unterschieden. Die Biomassekonzentration war bei 30 g/l Glucose während der Wachstumsphase etwas geringer. Generell waren die Glucoseaufnahmeraten am Anfang stärker fehlerbehaftet, da die Biomassebestimmung bei niedrigen Biomassekonzentrationen am Anfang ungenau war (vgl. Abschnitt A.1). Die Aufnahmeraten nahmen während der Produktionsphase langsam ab und lagen zwischen $2,5$ und $1 \text{ mmol/(g}\cdot\text{h)}$. Während der Produktionsphase war die Glucoseaufnahmerate bei 30 g/l Glucose etwas höher als bei 5 g/l Glucose. Die Aufnahmeraten bei $0,5 \text{ g/l}$ Glucose lagen mit Werten nahe Null während der Produktionsphase deutlich unter den anderen. Da in dieser Fermentation weder Produkte noch Nebenprodukte gebildet wurden, wurde die zugeführte Glucose nur in Biomasse und Kohlendioxid umgesetzt. Daher lag auch die Gesamtmenge an verbrauchter Glucose nur bei $5,7 \text{ mol}$, während der Verbrauch bei den anderen beiden Fermentation über die Zeit annähernd gleich war und bei $19,4 \text{ mol}$ (5 g/l), bzw. $21,3 \text{ mol}$ (30 g/l) lag.

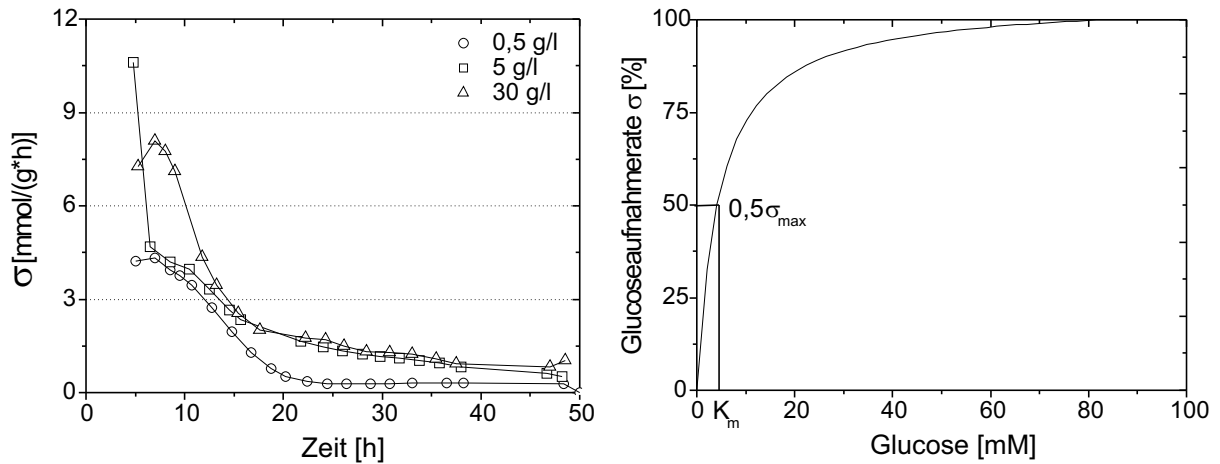


Abb. 5.8: Verlauf der Biomasse-spezifischen Glucoseaufnahmeraten in Fermentationen des PTS(-)-Stammes *E. coli* 20pMK12 bei verschiedenen Glucosekonzentrationen; Idealisier- te Darstellung der Glucoseaufnahmerate in Abhängigkeit der Glucosekonzentration, mit K_m -Wert

Die Gesamtmengen an aufgenommenem Substrat und daraus gebildeter Biomasse, L-Phenylalanin und Kohlendioxid bei 5 und 30 g/l Glucose nach 50 Prozessstunden sind in Abb. 5.9 dargestellt. Die Kohlendioxidmenge kann jedoch nur als Abschätzung angesehen werden, da die Abgasanalytik bei der Fermentation mit dem Stamm 20pMK12 bei 5 g/l Glucose falsche Werte lieferte, so dass der Kohlendioxidanteil nicht bestimmt werden konnte. Da die Kohlenstoffbilanz bei dem Experiment mit 30 g/l annähernd zu 100 % geschlossen werden konnte, wie es auch bei anderen Experimenten der Fall war, wurde angenommen, dass der fehlende Kohlenstoffanteil in der Bilanz bei 5 g/l Glucose Kohlendioxid war. Dieser Wert entsprach dem Maximalwert an Kohlendioxid, der tatsächlich gebildet werden konnte. Weitere Nebenprodukte konnten nicht gefunden werden, so dass diese Annahme als zulässig erachtet wurde.

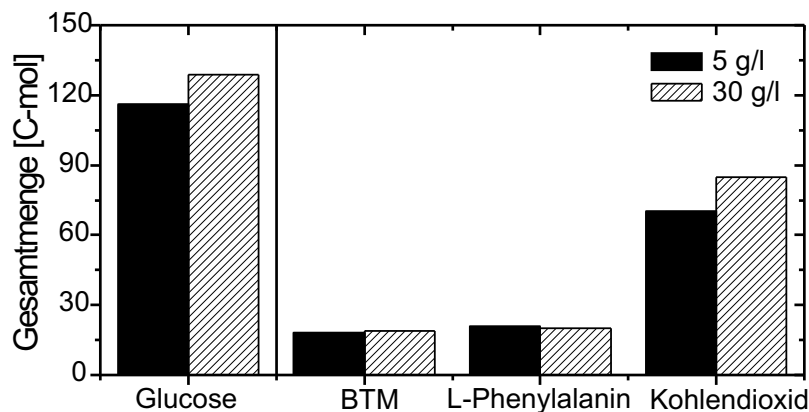


Abb. 5.9: Gesamtmengen (C-mol) an aufgenommenem Substrat und daraus gebildeter Bio- masse, L-Phenylalanin und Kohlendioxid bei Fermentationen mit dem Stamm *E. coli* 20pMK12 bei 5 g/l und 30 g/l Glucose nach 50 Stunden; bei 5 g/l wurde die Kohlendi- oxidmenge unter der Annahme, dass die Kohlenstoffbilanz geschlossen war, abgeschätzt

In dieser Darstellung ist zu erkennen, dass bei höherer Glucosekonzentration insgesamt mehr Glucose aufgenommen wurde. Die Glucoseaufnahme über den Glucose-Facilitator wurde durch den Substratgradienten angetrieben. Demzufolge sollte die Glucoseaufnahme bei einer höheren Glucosekonzentration höher sein. Die gebildeten Mengen Biomasse und L-Phenylalanin waren im Rahmen der Messungenauigkeiten bei beiden Fermentationen gleich (vgl. Abschnitt A.1). Die sich ergebende integrale L-Phenylalanin-Glucose-Selektivität der Fermentationen mit Glucoseüberschuss lag nach 50 h bei 11,9 mol/mol % (5 g/l) und 10,3 mol/mol % (30 g/l). Die Menge an gebildetem Kohlendioxid hingegen war bei 30 g/l Glucose höher als bei 5 g/l Glucose. Diesen Ergebnissen zufolge nahmen die Zellen bei höherer Glucosekonzentration etwas mehr Glucose auf. Diese zusätzliche Menge wurde aber nicht in L-Phenylalanin umgesetzt, sondern in Kohlendioxid. Es war anzunehmen, dass die dabei gewonnene Energie in anderen, nicht Wachstums-assoziierten Prozessen verwendet wurde [Neidhardt 1996].

5.2.2 Einfluss der Induktion

Versuche zur Induktion in Schüttelkolben hatten ergeben, dass eine Induktorkonzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ zu gutem Wachstum führte, eine Induktorkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ jedoch negative Auswirkungen hatte [Sprenger 2001]. Zur weitergehenden Untersuchung des Einflusses der Induktorkonzentration auf Wachstum und L-Phenylalanin-Produktion wurden Fermentationen im Zulaufverfahren im Sixfors vario durchgeführt. Damit waren höhere Biomassekonzentrationen erreichbar als im Schüttelkolben. Der Fermentationsprozess wurde durchgeführt wie in Abschnitt 4.2.3 beschrieben. Induziert wurde mit 10, 25 und 50 $\mu\text{mol/l}$ IPTG. Abb. 5.10 zeigt die Unterschiede der optischen Dichte und der L-Phenylalanin-Produktion. Bei gleicher L-Tyrosin-Zufuhr wuchsen die Zellen abhängig von der Induktorkonzentration bis zu unterschiedlicher maximaler optischer Dichte. Die höchste optische Dichte wurde bei der geringsten IPTG-Konzentration erreicht. Das Wachstum wurde demzufolge durch höhere Induktorkonzentrationen beeinträchtigt. Die L-Phenylalanin-Konzentration erreichte den höchsten Wert von 145 mmol/l bei Induktion mit 25 $\mu\text{mol/l}$ IPTG. Acetat wurde nicht gebildet.

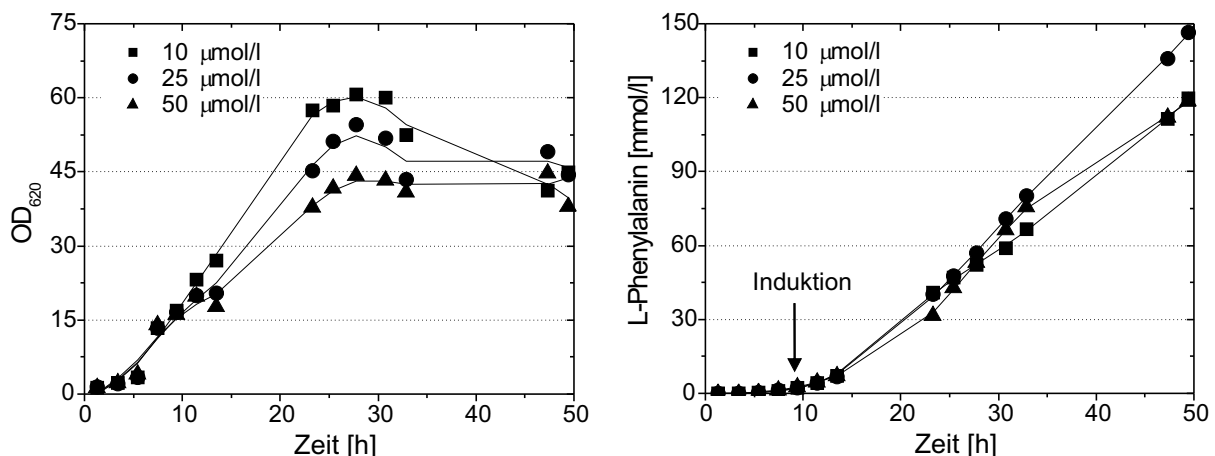


Abb. 5.10: Verlauf von optischer Dichte und L-Phenylalanin-Konzentration während einer Fermentation im Sixfors vario bei unterschiedlichen Induktorkonzentrationen (*E. coli* 20pMK12)

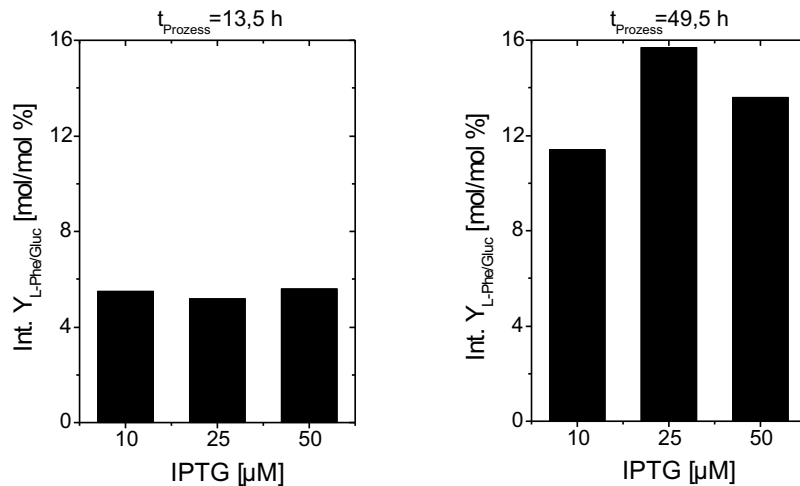


Abb. 5.11: Integrale L-Phenylalanin-Glucose-Selektivität nach 13,5 und 49,5 Prozessstunden bei Fermentationen im Sixfors vario bei unterschiedlichen Induktorkonzentrationen (*E. coli* 20pMK12)

Die integrale L-Phenylalanin-Glucose-Selektivität war am Anfang der Produktionsphase nach 13,5 Stunden mit $\approx 5,5$ mol/mol % bei allen Fermentationen ungefähr gleich. Am Ende der Fermentationen lag die integrale Selektivität mit 15,7 % bei 25 $\mu\text{mol/l}$ IPTG am höchsten. Bei Induktion mit 50 $\mu\text{mol/l}$ IPTG lag sie bei 13,6 % und bei 10 $\mu\text{mol/l}$ IPTG bei 11,4 % (siehe Abb. 5.11). Obwohl die maximal erreichte optische Dichte mit zunehmender IPTG-Konzentration stärker beeinträchtigt wurde, wurden bei einer Induktorkonzentration von 25 $\mu\text{mol/l}$ die höchste L-Phenylalanin-Konzentration und Selektivität erreicht. Das konnte darin begründet liegen, dass die Gene zur L-Phenylalanin-Produktion bei niedrigerer Induktor-Konzentration nicht ausreichend exprimiert wurden. Bei höherer Induktor-Konzentration hingegen wirkte sich die hohe Expression des Glucose-Facilitators, eines heterologen Proteins, auf Dauer möglicherweise negativ auf den Stoffwechsel der Zellen und damit die Produktbildung aus [Neubauer u. a. 2003]. Eine verbesserte Produktion konnte diesen Ergebnissen zufolge mit einer Induktorkonzentration von 25 $\mu\text{mol/l}$ erreicht werden. Zur weitergehenden Untersuchung des Einflusses der Induktion wären entsprechende Versuche im 20 l Bioreaktor unter definierten Bedingungen notwendig, die im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden, da der PTS(-)-Stamm nicht für die weitere Prozessentwicklung verwendet wurde (vgl. Abschnitt 5.3).

5.3 Vergleich der Produktion mit verschiedenen Stämmen

In den Abschnitten 5.1 und 5.2 wurden Untersuchungen mit dem PTS(+)-Stamm 4pF81 und dem PTS(-)-Stamm 20pMK12 vorgestellt. Diese Stämme unterschieden sich außer in dem System zur Glucoseaufnahme auch in der Expression von Genen des Aromatenbiosyntheseweges. Die genetischen Veränderungen der Stämme sind in Abb. 5.12 dargestellt. Zusätzlich ist der PTS(+)-Stamm 4pF20 abgebildet. Die L-Phenylalanin-Produktion mit diesem PTS(+)-Stamm mit Veränderungen im Aromatenbiosyntheseweg, vergleichbar mit denen des Stamms 20pMK12, wurde von Gerigk [Gerigk 2001] untersucht. Bei diesem Stamm wurden wie bei dem Stamm 20pMK12 nur die Chorismatmutase/Prephenatdehydratase und die DAHP-Synthase plasmidkodiert exprimiert. In beiden

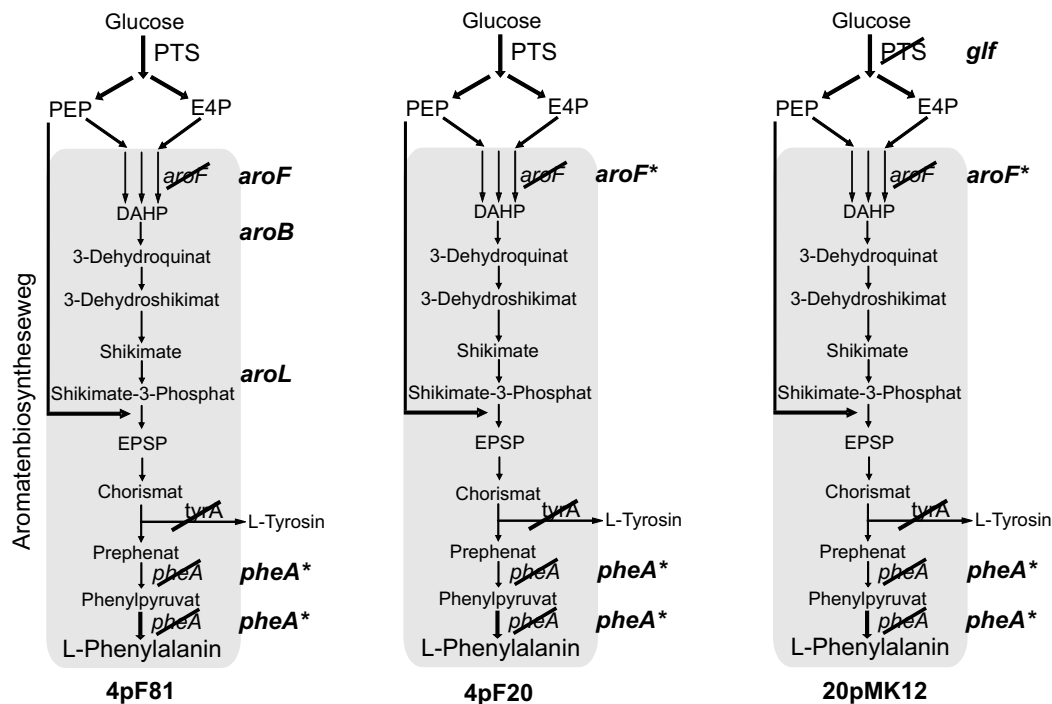


Abb. 5.12: Genetische Veränderungen in den Stämmen *E. coli* 4pF81 (PTS(+)), 4pF20 (PTS(+)) und 20pMK12 (PTS(-)); angegeben sind nur die veränderten Gene, die plasmidkodierten Gene sind jeweils rechts dargestellt; * steht für Resistenz gegen Feedback-Inhibierung durch L-Tyrosin (*aroF**) oder L-Phenylalanin (*pheA**)

Stämmen wurde im Gegensatz zu dem Stamm 4pF81, bei dem die Wildtyp-DAHPSynthase exprimiert wurde, *AroF**, eine gegen Feedback-Inhibierung durch L-Tyrosin resistente Variante, überexprimiert. Da diese DAHPSynthase inaktiver und instabiler als der Wildtyp war und Inclusion bodies bildete, waren Stämme mit dem Wildtyp besser geeignet, vorausgesetzt, dass die Prozessstrategie der L-Tyrosin-Limitierung zur Vermeidung einer L-Tyrosin-Inhibierung eingesetzt wurde [Gerigk 2001]. Da die Dehydroquinsäuresynthase (*AroB*) und die Shikimatkinase II (*AroL*) in den Stämmen 20pMK12 und 4pF20 nicht überexprimiert wurden, war die Bildung von DAH(P) und Shikimat, sowie 3-Dehydroshikimat festzustellen. Bei dem Stamm 4pF81 wurden nur geringe Mengen Shikimat und 3-Dehydroshikimat nachgewiesen.

Für die Untersuchungen stand kein PTS(-)-Stamm mit weitergehenden Veränderungen im Aromatenbiosyntheseweg zur Verfügung. Die Stämme 4pF81 und 20pMK12 wurden trotz ihrer Unterschiede in den Veränderungen im Aromatenbiosyntheseweg grundlegend verglichen, um Tendenzen aufzuzeigen. Die Daten des PTS(+)-Stamms 4pF20 wurden zum Vergleich herangezogen.

5.3.1 Einfluss der Glucosekonzentration

Ein Vergleich zum Einfluss der Glucosekonzentration auf die L-Phenylalanin-Produktion zeigt unabhängig von den Veränderungen im Aromatenbiosyntheseweg deutliche Unterschiede zwischen dem PTS(+) und dem PTS(-)-Stamm. Bei Stämmen mit Glucoseaufnahme über das Phosphotransferase-System führte ein hoher Glucoseüberschuss zu

Überflusstoffwechsel mit der Bildung von Acetat. Auch unter limitierten Bedingungen mit sehr geringen Glucosekonzentrationen wurde das Substrat in die Zelle aufgenommen und Wachstum und Produktion erfolgten [Gerigk u. a. 2002a]. Das Phosphotransferase-System ist ein sehr affines System ($K_m=3-10 \mu\text{mol/l}$) [Postma u. a. 1993]. Im Gegensatz dazu ist die Affinität des Glucose-Facilitators gegenüber Glucose deutlich geringer ($K_m=4,1 \text{ mmol/l}$ [Weisser 1996]). Bei der Glucoseaufnahme über den Glucose-Facilitator unter Glucose-limitierten Bedingungen erfolgte daher keine Produktion. Zudem wurde bei einer hohen Glucosekonzentration von 30 g/l keine nennenswerte Acetatbildung festgestellt. Bei der Glucoseaufnahme mittels erleichterter Diffusion wurden höhere Mindest-Glucosekonzentrationen zur L-Phenylalanin-Produktion benötigt als bei Glucoseaufnahme über das Phosphotransferase-System. Demzufolge ergab sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Systemen. Die geringe Acetatbildung stellte einen Vorteil für die Prozessführung dar. Eine genaue Glucoseregulation wäre voraussichtlich nicht notwendig, solange ausreichend Glucose vorhanden ist.

5.3.2 Produktion von L-Phenylalanin und Intermediaten

Theoretisch sollte die Versorgung mit dem Vorläufermetaboliten PEP in dem PTS(-)-Stamm verbessert sein, da bei der Glucoseaufnahme kein PEP verbraucht wurde. Eine mögliche Limitierung durch PEP sollte damit aufgehoben sein und eine verstärkte Produktion von Intermediaten des Aromatenbiosyntheseweges und L-Phenylalanin sollte die Folge sein. Die Konzentrationen von L-Phenylalanin, den Intermediaten des Aromatenbiosyntheseweges und Acetat, die Raum-Zeit-Ausbeute und die Produkt-Glucose-Selektivitäten sind Tab. 5.1 zu entnehmen.

Der Stamm 4pF81 bildete deutlich mehr L-Phenylalanin als der Stamm 20pMK12, da der Fluss durch den Aromatenbiosyntheseweg höher war. Für andere Stämme war bereits von Gerigk gezeigt worden, dass eine Überexpression von AroB und AroL zu einer verstärkten L-Phenylalanin-Produktion führte [Gerigk 2001]. So waren auch die Raum-Zeit-Ausbeute, die maximale differentielle Selektivität und die integrale L-Phenylalanin-Glucose-Selektivität am Ende der Fermentation bei dem Stamm 4pF81 deutlich besser. Der Stamm 20pMK12 bildete dagegen mehr DAH(P), 3-DHS und Shikimat. Ein Vergleich der integralen molaren

Tab. 5.1: Vergleich der Konzentrationen von Intermediaten aus dem Aromatenbiosyntheseweg, L-Phenylalanin und Acetat (Ace), der Raum-Zeit-Ausbeute und der Selektivitäten von Stämmen mit unterschiedlichen Glucoseaufnahmesystemen bei 5 g/l Glucose; die integrale und die maximale differentielle molare L-Phenylalanin-Glucose-Selektivität sowie die Selektivität der Summe aller Metabolite des Aromatenbiosyntheseweges (L-Phe, DAH(P), 3-DHS und Shikimat (Shi)) bezogen auf Glucose in mol Kohlenstoff sind angegeben (n.a.: nicht angegeben), Daten des Stamms 4pF20 aus [Gerigk 2001].

Stamm	L-Phe	DAH(P)	3-DHS	Shi	Ace	RZA (30h) Int.	$Y_{P/S}$ Int.	$Y_{P/S}$ Diff.	$Y_{Aro/S}$ Int.
	[g/l]	[g/l]	[g/l]	[g/l]	[g/l]	[g/(l*h)]	[mol%]	[mol%]	[C-mol%]
4pF81	34	0	2	1,4	21	1,05	14,5	20,8	23,5
20pMK12	28,6	5,6	1,5	3,6	4,03	0,78	12	18,5	22,8
4pF20	32,2	12	n.a.	5,8	4,74	0,8	13	n.a.	n.a.

Kohlenstoff-Selektivität aller Metabolite des Aromatenbiosyntheseweges am Ende der Fermentation zeigte, dass diese mit 22,8 % bei dem Stamm 20pMK12 und 23,5 % bei dem Stamm 4pF81 annähernd gleich waren.

Um die L-Phenylalanin-Produktion eines PTS(+) und eines PTS(-)-Stamms besser vergleichen zu können, wurden die Daten des Stamms 4pF20 herangezogen. Auch in diesem Fall waren sowohl die L-Phenylalanin-Konzentration als auch die DAH(P)-Bildung, die Shikimat-Bildung und die integrale Selektivität am Ende der Fermentation besser als bei dem Stamm 20pMK12. Der größte Unterschied zwischen dem PTS(+)-Stamm 4pF20 und dem PTS(-)-Stamm war bei der DAH(P)-Produktion festzustellen. Demzufolge war der Fluss in den Aromatenbiosyntheseweg bei dem PTS(-)-Stamm geringer. Die Acetatbildung unterschied sich nicht. Es war möglich, dass der PTS(-)-Stamm aufgrund des durch die Veränderungen auferlegten „Metabolic burden“ insgesamt schlechter war als der PTS(+)-Stamm. Die Deletion des Phosphotransferase-Systems hatte möglicherweise weitergehende negative Auswirkungen auf den gesamten Stoffwechsel [Postma u. a. 1993]. Nicht ausgeschlossen ist, dass die Induktion mit 10 $\mu\text{mol/l}$ anstelle von 25 $\mu\text{mol/l}$ IPTG bei dem Stamm 20pMK12 für die niedrigere Produktion mitverantwortlich war (vgl. Abschnitt 5.2.2).

Um weitere mögliche Ursachen zu finden, sind in Abb. 5.13 zum Vergleich die Glucoseaufnahmeraten während einer Fermentation mit dem PTS(+)-Stamm 4pF81 und dem PTS(-)-Stamm 20pMK12 aufgetragen. Während der Produktionsphase ab $t = 14 - 15 \text{ h}$ lag die Aufnahmerate des PTS(-)-Stammes unter der des PTS(+)-Stammes, obwohl die Glucosekonzentration im Medium gleich war. Es war möglich, dass die Induktion zu schwach war und somit die Kapazität des Glucose-Facilitators nicht ausreichend war oder die Stabilität zu schlecht war.

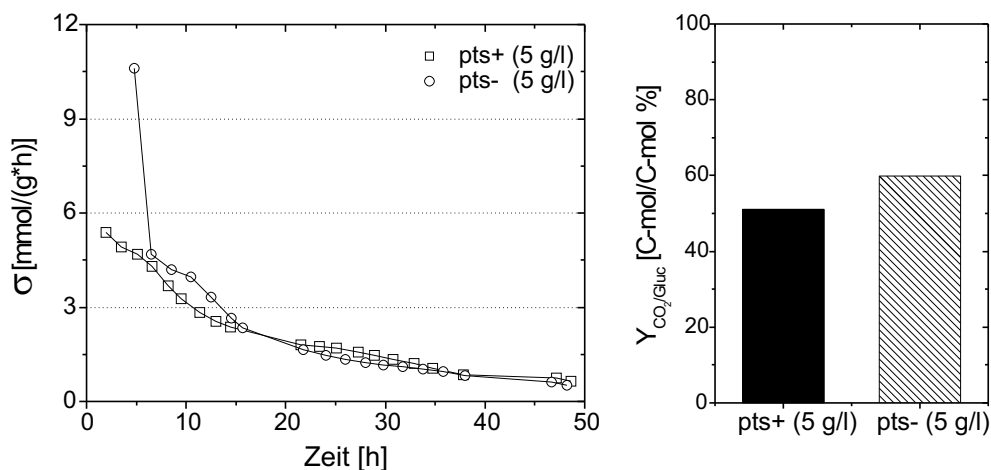


Abb. 5.13: Verlauf der Biomasse-spezifischen Glucoseaufnahmeraten bei Fermentationen des PTS(+)-Stammes *E. coli* 4pF81 und des PTS(-)-Stammes *E. coli* 20pMK12 bei 5 g/l Glucose; Anteil an Kohlendioxid an der umgesetzten Glucose [C-mol %], bei dem PTS(-)-Stamm unter der Annahme, dass die Kohlenstoffbilanz geschlossen werden kann

Die Glucoseaufnahme über den Glucose-Facilitator ist vom Substratgradienten abhängig. Bei 30 g/l Glucose war ein höherer Substratgradient anzunehmen als bei 5 g/l und tatsächlich wurde mehr Glucose aufgenommen (vgl. Abschnitt 5.2.1). Dies würde eher für eine ausreichende Expression des Glucose-Facilitators sprechen. Dagegen war denkbar, dass der für die Glucoseaufnahme notwendige hohe Substratgradient bei nur 5 g/l Glucose im Medium nicht aufrecht erhalten wurde, weil die Glucose nach der Aufnahme in der Zelle nicht vollständig weiter umgesetzt wurde [Weisser 1996]. Eine Limitierung durch die Glucokinase, die die Bildung von Glucose-6-Phosphat aus Glucose katalysierte, war möglich. Die Expression der Glucokinase von *E. coli* ist relativ schwach [Curtis und Epstein 1975]. Eine solche Limitierung könnte durch Überexpression des Gens der Glucokinase aufgehoben werden. Allerdings führt die Überexpression des Gens *glk* zu einer starken Belastung der Zellen [Kraemer 2000]. Da bei der Phosphorylierung der Glucose über die Glucokinase ATP benötigt wird, war zudem denkbar, dass im Verhältnis mehr Glucose in den Zitronensäurezyklus und die ATP-Produktion abfloss. Von Chen u. a. [Chen u. a. 1997] wurde für die Glucoseaufnahme über die Galactose-Permease postuliert, dass die Stämme weniger ATP zur Verfügung hatten und daher mehr Kohlendioxid zur Energieversorgung der Zelle produzierten. Unter dem Vorbehalt, dass die wie in Abschnitt 5.2.1 beschrieben ermittelte Kohlendioxidmenge des PTS(-)-Stammes korrekt war, floss bei dem PTS(-)-Stamm tatsächlich mehr Glucose in die Kohlendioxidproduktion (Abb. 5.13).

Damit sind mögliche Ursachen für die Unterschiede in der Glucoseaufnahme genannt. Eine höhere Glucoseaufnahme, die bei 30 g/l Glucose gegeben war, führte jedoch nicht zu einer verbesserten L-Phenylalanin-Produktion. Daher waren möglicherweise eher andere Ursachen für die geringere L-Phenylalanin-Produktion verantwortlich.

Über die genannten Ursachen hinaus war die Verfügbarkeit von E4P, dem zweiten Vorläufermetaboliten der Aromatenbiosynthese möglicherweise limitierend, so dass eine verbesserte Bereitstellung von PEP nicht zu einem höheren Fluss in die Aromatenbiosynthese führte. Von Chandran u. a. [Chandran u. a. 2003] wurden Experimente zur Shikimat-Produktion mit Glucoseaufnahme über den Glucose-Facilitator und zusätzlicher plasmidkodierter Expression der Transketolase durchgeführt. Aufgrund der zusätzlichen Überexpression der Transketolase zur verbesserten Bereitstellung von E4P konnten die Shikimatkonzentration und die Selektivität gegenüber Stämmen mit Glucoseaufnahme über das Phosphotransferase-System deutlich verbessert werden.

Demnach war eine Steigerung des Flusses in den Aromatenbiosyntheseweg durch Veränderungen im Zentralstoffwechsel möglich, doch die Stämme mussten zuvor entsprechend der genannten Punkte weiter entwickelt werden und Parameter wie die Induktion angepasst werden, um am Ende die L-Phenylalanin-Produktion über die des PTS(+)-Stammes hinaus zu steigern.

5.3.3 Theoretische und tatsächliche Selektivitäten

Von Schmidt wurden Untersuchungen zur maximalen theoretischen L-Phenylalanin-Produktion basierend auf stöchiometrischen Modellen durchgeführt [Schmidt 1998]. Bei Stämmen mit Phosphotransferase-System zur Glucoseaufnahme, bei denen eine Reaktion

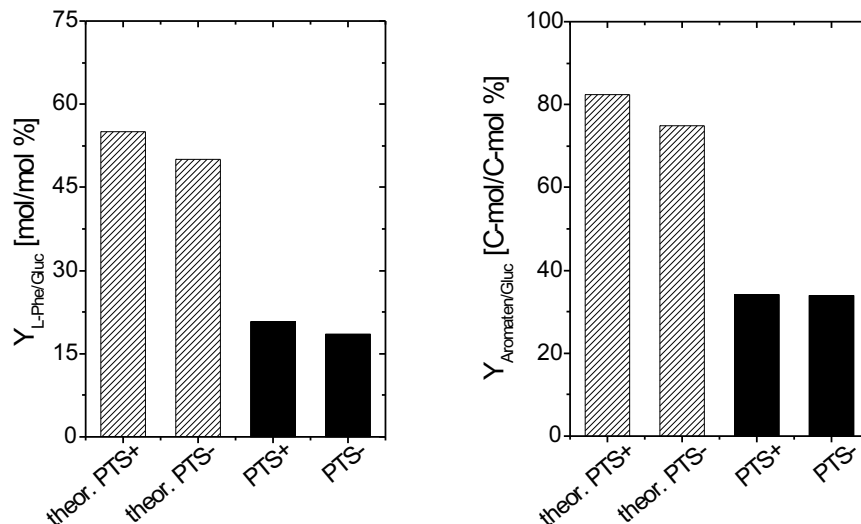


Abb. 5.14: Maximale theoretische L-Phenylalanin-Glucose Selektivitäten für PTS(+) und PTS(-)-Stämme (Angabe in mol und in C-mol) und maximale differentielle Selektivität der Stämme 4pF81 (PTS(+)) und 4pF20 (PTS(-)) (Angabe der L-Phenylalanin-Glucose-Selektivität in mol, Angabe der Selektivität aller Intermediate des Aromatenbiosyntheseweges in C-mol, da die Intermediate unterschiedliche Anzahlen an C-Atomen enthalten)

von Pyruvat zu Phosphoenolpyruvat ausgeschlossen und wachstumsentkoppelte Produktbildung angenommen wurde, lag die maximale molare L-Phenylalanin-Glucose-Selektivität bei 30 %. Bei dieser Optimierung wurde viel Kohlendioxid über den Zitronensäurezyklus gebildet, aber der oxidative Teil des Pentosephosphatweges nicht verwendet. Wurde eine Umwandlung von Pyruvat zu Phosphoenolpyruvat zugelassen, ergab sich ein Maximum von 55 %. Dabei wurde der oxidative Teil des Pentosephosphatweges verwendet, aber der Fluss in den Zitronensäurezyklus war Null. Bei Glucoseaufnahme über den Glucose-Facilitator dagegen ergab sich eine maximale theoretische Selektivität von 50 %, mit der Bedingung, dass die Glucose vollständig über den Pentosephosphatweg metabolisiert wurde und der Fluss durch den Zitronensäurezyklus Null war. Die Kohlenstoff-Selektivität wurde betrachtet. Dargestellt sind die theoretischen und die tatsächlichen Selektivitäten in Abb. 5.14.

Die erreichten maximalen differentiellen Selektivitäten lagen mit 20,8 mol/mol % nach 21,5 h (4pF81) und 18,5 mol/mol % nach 28 h (20pMK12) deutlich unter den theoretisch maximal möglichen Werten. Um die Produktion im Stamm 20pMK12 zu verbessern, wäre zunächst die Überexpression von weiteren Enzymen des Aromatenbiosyntheseweges und der Transketolase notwendig. Um eine hohe Expression zu erreichen, müssten die Gene in ein Plasmid inseriert werden. Die Zahl der Gene, die in ein Plasmid inseriert werden können, ist jedoch begrenzt. Systeme mit zwei Plasmiden, über die mehr Gene exprimiert wurden, waren zu instabil [Kreutzer 2000]. Die Plasmid-Stabilität war zu schlecht. Eine chromosomale Insertion von Genen unter Kontrolle des P_{tac} -Promotors führte bei den Genen *aroF*, *pheA'*, *aroL* nicht zu ausreichender Expression, um Limitierungen aufzuheben [Gerigk 2001]. Wurde der Glucose-Facilitator durch ein chromosomal integriertes Gen exprimiert, so war die Aktivität nicht ausreichend für die Glucoseaufnahme [Kraemer 2000].

Die integrale Selektivität, insbesondere bei dem Stamm 4pF81, war mit einem Wert von 17,5 mol/mol % nach 25 Stunden am höchsten und sank im weiteren Verlauf ab. Am Ende der Produktionsphase wurde viel Acetat gebildet. Experimente im Sixfors vario, die sich aufgrund der manuellen Glucoseeinstellung zeitweise in den Glucosekonzentrationen unterschieden, hatten gezeigt, dass die Selektivität bei PTS(+)-Stämmen mit zunehmender Glucosekonzentration abnahm [Rueping 2002]. Der Wert der integralen Selektivität nach 25 Stunden könnte demzufolge wahrscheinlich dadurch aufrecht erhalten werden, dass mit abnehmender L-Phenylalanin-Produktion die Glucosezufuhr entsprechend der Kapazität der Zellen reduziert und damit eine Acetatproduktion vermieden würde. Eine Steigerung der Selektivität wäre wahrscheinlich auch durch Verwendung einer Mischung von Glucose und Pentosen wie Arabinose oder Xylose als Substrate möglich. Die Pentosen werden über ATP-abhängige Permeasen in die Zellen aufgenommen, so dass der Zelle mehr Phosphoenolpyruvat zur Verfügung steht. Bei gleichzeitiger Überexpression der Transketolase konnte so die Selektivität der 3-Dehydroshikimat-Produktion gesteigert werden [Li u. a. 1999].

Bei Bestimmung der theoretischen Selektivität war die Annahme, dass der Fluss durch den Zitronensäurezyklus Null ist. Sowohl bei dem PTS(+)-Stamm als auch bei dem PTS(-)-Stamm wurde jedoch ein großer Teil des eingesetzten Kohlenstoffs in Kohlendioxid umgewandelt (vgl. Abb. 5.3 und Abb. 5.9). Viel Kohlendioxid wird in der Zelle über den Zitronensäurezyklus gebildet, mit dem die Energieproduktion verbunden ist. Um die Selektivität insgesamt zu erhöhen, wäre demzufolge eine Verringerung des Flusses in den Zitronensäurezyklus, bzw. Erhöhung des Rückflusses durch Überexpression oder Deletion der entsprechenden Gene sinnvoll.

Um Selektivitäten nahe der theoretischen Werte zu erreichen, müssten genetische Veränderungen vorgenommen werden, wie beschrieben und die L-Phenylalanin-Produktbildungsraten erhöht werden. Untersuchungen zu prozesstechnischen Einflüssen auf die L-Phenylalanin-Produktion wie auch prozesstechnische Ansätze zur Verbesserung der L-Phenylalanin-Produktion werden in den Kapiteln 6 und 7 vorgestellt.

5.4 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde die L-Phenylalanin-Produktion mit Stämmen mit unterschiedlichen Systemen zur Glucoseaufnahme, der Glucoseaufnahme über das Phosphotransferasesystem (PTS(+)) bzw. über einen Glucose-Facilitator (PTS(-)), dargestellt. Der Einfluss der Glucosekonzentration und der Induktion auf die Produktion mit dem PTS(-)-Stamm wurden untersucht. Im Anschluss wurde die L-Phenylalanin-Produktion mit den unterschiedlichen Stämmen einem Vergleich unterzogen.

- Mit dem PTS(+)-Stamm *E. coli* 4pF81 wurde eine L-Phenylalanin-Konzentration von 206 mmol/l (34 g/l) erreicht. Als Nebenprodukte aus dem Aromatenbiosyntheseweg wurden nur Shikimat und 3-Dehydroshikimat nachgewiesen. Bis zum Ende der Fermentation wurde jedoch mit 380 mmol/l viel Acetat gebildet. Die Kohlenstoffbi-

lanz konnte geschlossen werden, was bedeutete, dass alle Stoffwechselprodukte erfasst wurden.

- Eine technische Verbesserung der Online-Glucosemessung wurde durch Verwendung des Process Trace Systems mit Probenahme über eine Dialysesonde anstelle des Systems mit Filtrationsumlauf und OLGA erreicht. Ein Ausfallen des L-Phenylalanins sowie Störungen durch Luftblasen traten bei diesem System nicht auf. Durch Optimierung der Parameter von Kalman-Filter und MV3-Regler wurde die Regelung auf $5 \pm 0,5$ g/l verbessert.
- Mit dem PTS(-)-Stamm 20pMK12 wurden bei einer Glucosekonzentration von 5 g/l 171 mmol/l L-Phenylalanin produziert. Untersuchungen zum Einfluss der Glucosekonzentration auf die L-Phenylalanin-Produktion mit dem Stamm 20pMK12 ergaben, dass für die Produktion eine Mindestkonzentration oberhalb des K_m -Wertes von 4,1 mmol/l notwendig war. Die Produktion bei 5 g/l oder 30 g/l war ähnlich. Acetat wurde kaum gebildet. Im Gegensatz zur Produktion mit dem PTS(+)-Stamm 4pF81 war kein Überschussstoffwechsel festzustellen, was auf eine geringere Glucoseaufnahmekapazität des Systems aus Glucose-Facilitator und *E. coli*-eigener Glucokinase hinwies.
- Im kleineren Maßstab (≈ 2 l) mit vereinfachter Prozessführung wurde gezeigt, dass die Produktion mit dem PTS(-)-Stamm *E. coli* 20pMK12 durch eine IPTG-Konzentration von 25 μ mol/l anstelle von 10 μ mol/l verbessert werden konnte.
- Die Verwendung des PTS(-)-Stamms 20pMK12 führte im Vergleich zu PTS(+)-Stämmen nicht zu verbesserter L-Phenylalanin-Produktion, obwohl die Bereitstellung von PEP verbessert sein sollte. Über die Gründe können nur Vermutungen angestellt werden. Eine zu starke Belastung der Zellen durch das heterologe System und die Ausschaltung des Phosphotransferase-Systems, eine zu geringe Induktorkonzentration, eine Energielimitierung oder eine unzureichende Bereitstellung des zweiten Vorläufermetaboliten E4P waren denkbar.
- Die maximalen differentiellen L-Phenylalanin-Glucose-Selektivitäten bei dem PTS(+)-Stamm und bei dem PTS(-)-Stamm lagen mit 20,8 mol/mol % bzw. 18,5 mol/mol % deutlich unterhalb der theoretisch maximal möglichen Werte. Um sich diesen anzunähern müssten weitere genetische Veränderungen an den Stämmen vorgenommen werden.

Die L-Phenylalanin-Produktion mit dem in dieser Arbeit zur Verfügung stehenden Stamm mit heterologem Glucoseaufnahmesystem war gegenüber dem Stamm mit Glucoseaufnahme über das Phosphotransferase-System nicht verbessert. Daher wurde der PTS(+)-Stamm 4pF81 für die weitere Prozessentwicklung verwendet.

6 Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Fermentationsparameter auf den Prozess

Um den in Abschnitt 5.1 beschriebenen Prozess zu verbessern und Einflüsse auf den Prozessverlauf und die Produktion zu identifizieren, wurden Parameter wie Temperatur, pH-Wert und Medium untersucht. Die Ergebnisse werden in diesem Kapitel vorgestellt. Alle Experimente wurden mit dem Stamm *E. coli* 4pF81 durchgeführt, wenn nicht anders angegeben. Die Prozessführung erfolgte entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 4.3.4. Änderungen werden in den einzelnen Abschnitten beschrieben.

6.1 Einfluss von Temperatur und pH-Wert auf die L-Phenylalanin-Produktion

Das Wachstum von *E. coli* ist bei einer Temperatur von 37 °C optimal. Bei niedrigerer Temperatur laufen chemische und enzymatische Reaktionen in der Zelle langsamer ab, so dass die Wachstumsgeschwindigkeit abnimmt. Bei höherer Temperatur können Zellbestandteile geschädigt werden [Ingraham und Marr 1996]. Das Temperaturoptimum der DAHP-Synthase, dem Eingangsenzym der Aromatenbiosynthese, liegt *in vitro*-Versuchen zufolge bei 33 °C. Bei dieser Temperatur ist das Enzym stabil und aktiver als bei einer Temperatur von 37 °C [Jossek 2000]. Daher wurden Experimente durchgeführt, bei denen die Temperatur von 37 °C in der Wachstumsphase auf 33 °C in der Produktionsphase gesenkt wurde. Dadurch sollte gleiches Wachstum gewährleistet und der Einfluss auf die L-Phenylalanin-Produktion untersucht werden.

Als zweiter Parameter wurde der pH-Wert untersucht. Bei einem pH-Wert zwischen 6 und 8 wächst *E. coli* mit maximaler Wachstumsrate. Der pH-Wert beeinflusst die Reaktionsraten verschiedenster Reaktionen. Enzyme funktionieren nur in einem kleinen pH-Bereich optimal [Ingraham und Marr 1996]. Daher wurde die Produktion bei einem pH-Wert von 6,5 und 6,9 untersucht.

Die Bedingungen in der Wachstumsphase waren 37 °C und pH 6.5. Erst am Ende der Wachstumsphase, d.h. nach ungefähr 14 Stunden, wurde pH 6,9 eingestellt, um Wachstum unter den gleichen Bedingungen zu ermöglichen und den Einfluss auf die Produktion deutlich machen zu können. Zudem sollte am Anfang ein pH >6,7 vermieden werden, da

das im Medium vorhandene Magnesium bei höheren Werten als Magnesium-Ammonium-Hydrogensulfat ausfällt [Jander und Blasius 1990]. Die untersuchten Prozessbedingungen sind in Tab. 6.1 auf Seite 93 aufgeführt.

Die L-Phenylalanin-Konzentration in Experimenten mit $T = 33\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ist in Abb. 6.1 dargestellt. Nach der Einstellung der jeweiligen Temperatur nach 14 Stunden wurden die Unterschiede deutlich. Bei einer Temperatur von $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ stieg die Konzentration schneller bis auf 180 mmol/l an als bei einer Temperatur von $33\text{ }^{\circ}\text{C}$, bei der der Wert erst nach 33 Stunden erreicht wurde. Bei der höheren Temperatur liefen die Reaktionen in der Zelle schneller ab. Während die Konzentration bei hoher Temperatur ab $t = 30\text{ h}$ kaum noch anstieg und am Ende 206 mmol/l (34 g/l) L-Phenylalanin erreichte, war bei niedriger Temperatur ein kontinuierlicher Anstieg auf 223 mmol/l ($36,8\text{ g/l}$) L-Phenylalanin am Ende zu erkennen. Insgesamt wurden bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ $2,81\text{ mol}$ (464 g) L-Phenylalanin gebildet und damit etwas weniger als bei $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit $2,9\text{ mol}$ (479 g) L-Phenylalanin.

Aufgrund der Regelung der Glucosekonzentration konnte die Acetatkonzentration über den größten Teil der Fermentation niedrig gehalten werden (siehe Abb. 6.1). Bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ begann die Acetatkonzentration jedoch nach 30 Stunden zu steigen. Ab diesem Zeitpunkt stieg die L-Phenylalanin-Konzentration kaum noch an. Die aufgenommene Glucose wurde nicht oder kaum mehr über den Aromatenbiosyntheseweg zum L-Phenylalanin geleitet. Überschussstoffwechsel, der zur Bildung von Acetat bei aerobem Fermentationsbetrieb führte, setzte ein. Mögliche Ursachen des Abbruchs der Produktion werden in Abschnitt 6.2 genauer behandelt. In dem Experiment bei $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ stieg die L-Phenylalanin-Konzentration bis zum Ende an und es wurde kaum Acetat produziert. Als weiteres Nebenprodukt wurden bei der Fermentation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zu 13 mmol/l 3-Dehydroshikimat gemessen (vgl. Abschnitt 5.1). Dagegen war bei einer Temperatur von $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ nur $<1\text{ mmol/l}$ 3-Dehydroshikimat nachweisbar. Die Aktivität der Zellen ist bei niedrigerer Temperatur insgesamt reduziert und damit der Kohlenstofffluss, so dass keine Anhäufung von 3-Dehydroshikimat durch eine Limitierung des Enzyms Shikimatdehydrogenase erfolgte.

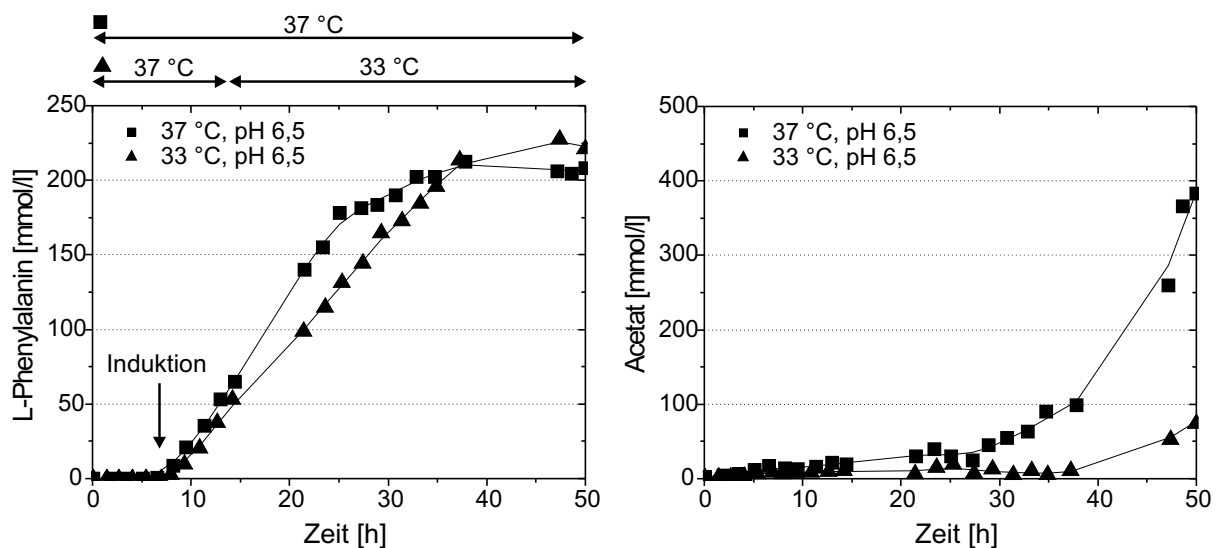


Abb. 6.1: L-Phenylalanin-Konzentrationen und Acetatkonzentrationen während des Fermentationsprozesses bei verschiedenen Temperaturen

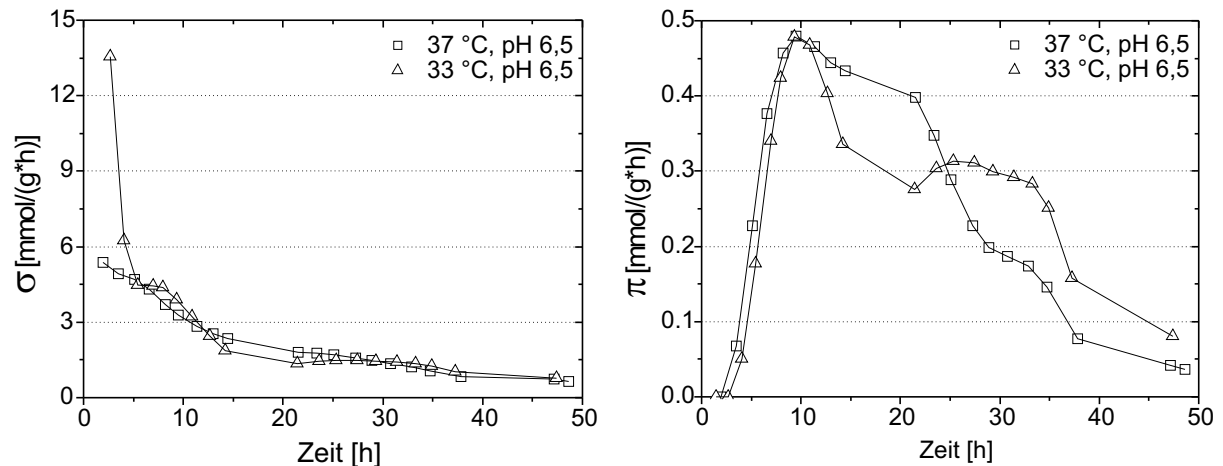


Abb. 6.2: Verlauf der Biomasse-spezifischen Glucoseaufnahmeraten und der Biomasse-spezifischen Produktbildungsrate bei verschiedenen Temperaturen

Um eine eindeutige Aussage zu machen, wären Flussuntersuchungen bei verschiedenen Temperaturen notwendig, die hier jedoch nicht durchgeführt wurden.

Die Biomasse-spezifischen Glucoseaufnahmeraten und die Produktbildungsrate während der Fermentationen mit 33 °C und 37 °C zeigt Abb. 6.2. Bei 37 °C lag die Glucoseaufnahmerate in der Zeit von $t = 14 - 25$ h etwas höher als bei 33 °C. Insgesamt wurden bei niedrigerer Temperatur 17,6 mol Glucose verbraucht und bei höherer Temperatur 19,4 mol. Die höhere Glucoseaufnahmerate in dem Abschnitt von $t = 14 - 25$ h entspricht dem Verlauf der Produktbildungsrate. Während die Produktbildungsrate bei 37 °C ab $t = 22$ h von 0,4 $\text{mmol}/(\text{g}\cdot\text{h})$ abnahm und nach ungefähr 35 Stunden Null erreicht hatte, lag sie bei $T = 33$ °C zunächst niedriger als bei höherer Temperatur. Dafür lagen die Werte bis zum Ende nach 50 Stunden bei 0,1–0,3 $\text{mmol}/(\text{g}\cdot\text{h})$.

Die Kohlendioxidbildungsrate, dargestellt in Abb. 6.3, zeigen deutlich, dass die Stoffwechselaktivität bei 37 °C insgesamt höher war, solange die Produktbildungsrate hoch war. Bei der Fermentation mit Umstellung auf 33 °C nach ungefähr 14 Stunden nahm die Kohlendioxidbildungsrate zu diesem Zeitpunkt deutlich ab. Dafür waren die Zellen bei niedrigerer Temperatur länger aktiv und die Produktionsphase war verlängert. Dies war wahrscheinlich auf die bei 33 °C stabilere DAHP-Synthase zurückzuführen. Bei Fortsetzung des Fermentationsprozesses über 50 Stunden hinaus war auch bei 33 °C keine weitere Produktbildung festzustellen. Dafür könnten einerseits nach 50 Stunden möglicherweise nur noch unzureichend vorhandene Medienbestandteile für Erhaltungsstoffwechsel und Produktion verantwortlich sein. Andererseits ist denkbar, dass die L-Phenylalanin-Akkumulation einen negativen Einfluss hatte und die DAHP-Synthase inaktiv geworden war. Messungen der DAHP-Synthase-Aktivität wurden nicht zum Nachweis herangezogen, da die Messung sehr fehlerbehaftet war und am Ende einer Fermentation Unterschiede zwischen Werten, die in jedem Fall niedrig waren, nicht auszumachen waren [Gerigk 2001]. Weitere Untersuchungen dazu werden in den nachfolgenden Abschnitten vorgestellt.

Die differentielle Raum-Zeit-Ausbeute hatte ihr Maximum bei 37 °C bereits nach 14,5 Stunden am Ende der Wachstumsphase mit 12,5 $\text{mmol}/(\text{l}\cdot\text{h})$ und sank ab $t = 21,5$ h

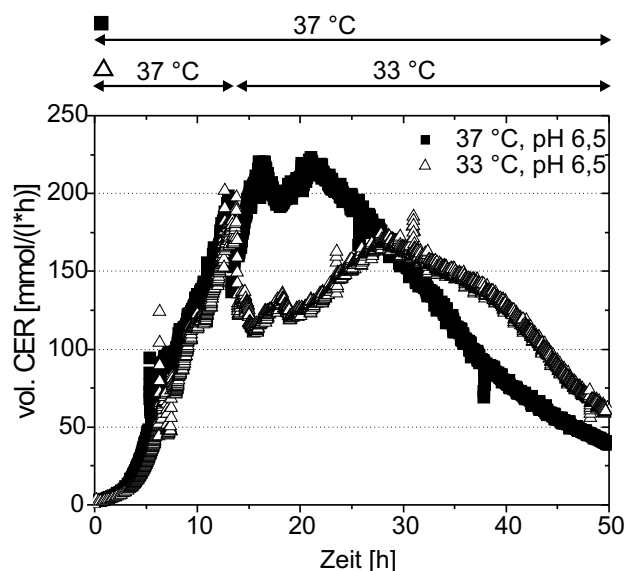


Abb. 6.3: Verlauf der volumetrischen Kohlendioxidbildungsraten bei verschiedenen Temperaturen

stark ab, während sie bei 33 °C bis $t = 35$ h bei 8–9,5 mmol/(l·h) lag und erst danach sank. Die integrale, über die Fermentationsdauer gemittelte Raum-Zeit-Ausbeute lag bei 37 °C über nahezu den gesamten Prozess deutlich über der bei 33 °C. Am Ende lag sie mit 4,1 mmol/(l·h) im Vergleich zu 4,5 mmol/(l·h) nur wenig darunter. Die differentielle Produkt-Substrat-Selektivität verlief ähnlich der differentiellen Raum-Zeit-Ausbeute und lag bei 37 °C bei maximal 20,8 mol/mol % und bei 33 °C bei maximal 21 mol/mol %. Bei hoher Temperatur lag die integrale, über die Fermentationsdauer gemittelte Produkt-Substrat-Selektivität, bis $t = 28$ h über der bei niedriger Temperatur. Am Ende der Fermentation wurde jedoch bei 33 °C eine Selektivität von 16,1 mol/mol % und bei 37 °C 14,5 mol/mol % erreicht. Die Acetatbildung bei höherer Temperatur trug zu einer Verringerung der Produkt-Substrat-Selektivität bei (siehe Abb. 6.4).

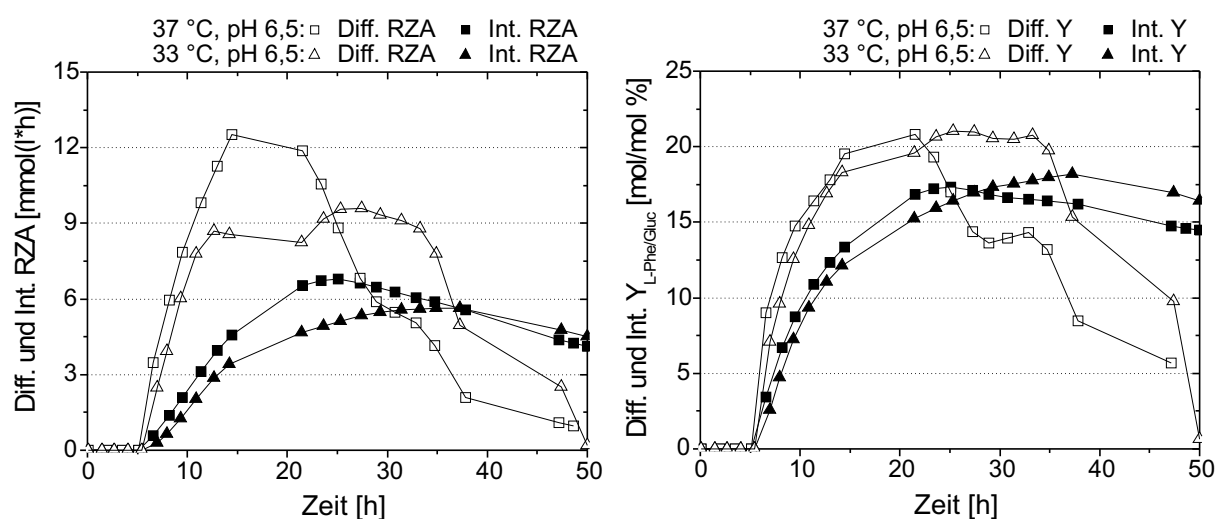


Abb. 6.4: Verlauf der differentiellen und integralen Raum-Zeit-Ausbeute und L-Phenylalanin-Glucose-Selektivität bei verschiedenen Temperaturen

Einige Daten der Fermentationen bei verschiedenen pH-Werten sind in Tab. 6.1 dargestellt. Die L-Phenylalanin-Konzentration war bei hoher Temperatur bei pH 6,5 höher, bei niedriger Temperatur bei pH 6,9. Demzufolge war keine Verbesserung des Prozesses durch einen höheren oder niedrigeren pH-Wert festzustellen. Die Acetatkonzentrationen lagen in ähnlicher Größenordnung, die L-Phenylalanin-Glucose-Selektivität war unabhängig vom pH-Wert. Die festzustellenden Unterschiede lagen im Rahmen der Messungenauigkeiten (vgl. Abschnitt A.1). Der pH-Wert hatte demzufolge keinen Einfluss auf die Produktion, so dass im Weiteren nicht darauf eingegangen wird.

Die Daten in Tab. 6.1 zeigen zusammengefasst die Unterschiede bei Temperaturen von 33 °C und 37 °C. Die integrale Selektivität und die L-Phenylalanin-Konzentration waren am Ende der Fermentation bei niedrigerer Temperatur höher. Weniger Glucose wurde verbraucht und mehr L-Phenylalanin gebildet. Über den Prozessverlauf lag die wichtige Prozessgröße Raum-Zeit-Ausbeute jedoch bei $T = 37\text{ °C}$ größtenteils höher als bei $T = 33\text{ °C}$. Bei höherer Temperatur wurde in kürzerer Zeit mehr L-Phenylalanin produziert. Daher wurden die weiteren Fermentation in dieser Arbeit bei $T = 37\text{ °C}$ und pH 6,5 durchgeführt.

Tab. 6.1: Daten zur Produktion unter Variation von Temperatur und pH-Wert

Nr.	T [°C]	pH	L-Phenylalanin [mmol/l]	Acetat [mmol/l]	Int. Y_{ps} (50 h) [mol/mol %]	Int. RZA (30 h) [mmol/(l·h)]
1	37 °C	6,5	206	383	14,5	6,3
2	37 °C	6,9	196	464	14,2	6,1
3	33 °C	6,5	223	77	16,2	5,5
4	33 °C	6,9	232	6	16,1	5,1

6.2 Untersuchungen zum Abbruch der Produktion während des Prozesses

Bei den in Abschnitt 6.1 dargestellten Ergebnissen einer Fermentation unter Referenzbedingungen ($T = 37\text{ °C}$, pH 6,5, $pO_2 = 40\%$) hatte sich gezeigt, dass die Produktion von L-Phenylalanin mit der Fermentationsdauer immer mehr abnahm. Bei Erreichen einer Konzentration von 180–200 mmol/l (29,7–33 g/l) fand nahezu keine Produktion mehr statt. Ein Abbruch der Produktion konnte einerseits aufgrund einer Limitierung oder Inhibierung durch Medienbestandteile, andererseits aufgrund einer Inhibierung durch das Produkt L-Phenylalanin eintreten. Eine Abnahme der Produktion durch Plamidverlust konnte durch die regelmäßige Überprüfung der Plasmidstabilität über den Fermentationsverlauf ausgeschlossen werden. Die Plasmidstabilität lag bis zum Ende der Fermentationen bei $\approx 80\%$. Nebenprodukte, die bei Glucoseüberschuss gebildet werden konnten und zu einer Inhibierung der Zellaktivität oder der Produktion führen konnten, wurden nicht detektiert. Intermediate des Aromatenbiosyntheseweges wie z.B. EPSP, das toxisch für die Zelle ist, wurden extrazellulär ebenfalls nicht nachgewiesen. Daher war anzunehmen, dass keine Intermediate in inhibierenden Konzentrationen vorhanden waren.

In diesem Abschnitt werden die Untersuchungen zu möglichen Limitierungen oder Inhibierungen vorgestellt. Die Durchführung der Fermentationen für die entsprechenden Untersuchungen erfolgte bis auf die jeweils genannten Änderungen wie in Abschnitt 4.3.4 beschrieben.

6.2.1 Limitierung oder Inhibierung durch Mediumkomponenten?

Einfluss von Ammonium

Ammonium wurde bei den Fermentationen als Titrationsmittel zur pH-Einstellung verwendet. Es war nicht auszuschließen, dass der Ammoniumgehalt im Fermenter auf inhibierende Konzentrationen anstieg. Eine erhöhte Konzentration an Ammonium führte zu Wachstumsinhibierung ($> 3,6 \text{ g/l NH}_4^+$) und schließlich vollständiger Inhibierung ($> 8,6 \text{ g/l NH}_4^+$) [Thompson u. a. 1985]. Eine Konzentration von $> 0,1 \text{ g/l NH}_4^+$ sollte hingegen aufrecht erhalten werden, um eine Limitierung zu vermeiden [Kole u. a. 1985]. Eine Limitierung war jedoch unwahrscheinlich, da Ammonium kontinuierlich zudosiert wurde.

Zur Untersuchung wurde bei einer Fermentation unter Referenzbedingungen mit dem Stamm *E. coli* 4pF81 Ammonium im Fermentationsüberstand mit einem Schnelltest gemessen (siehe Abschnitt A.3.1). Den Messungen zufolge lag die Ammoniumkonzentration in der Fermentationsbrühe über den größten Teil der Fermentation unter 2 g/l und stieg erst am Ende auf bis zu $3,2 \text{ g/l}$ an (siehe Abb. 6.5). Die L-Phenylalanin-Produktion brach nach ungefähr 35 Stunden ab. Eine Inhibierung der Produktion durch eine erhöhte Ammoniumkonzentration konnte durch die Messungen ausgeschlossen werden. Auch eine Limitierung lag nicht vor, da die Werte während der gesamten Zeit über $0,5 \text{ g/l}$ lagen.

Einfluss von Phosphat

Ein wichtiger Bestandteil des Mediums war Phosphat, das sowohl für das Wachstum als auch die L-Phenylalanin-Produktion benötigt wurde. Eine *E. coli* Zelle enthält $\approx 2,5 \%$ Phosphor [Nielsen und Villadsen 1994], so dass mit dem im Medium vorgelegten Phosphat

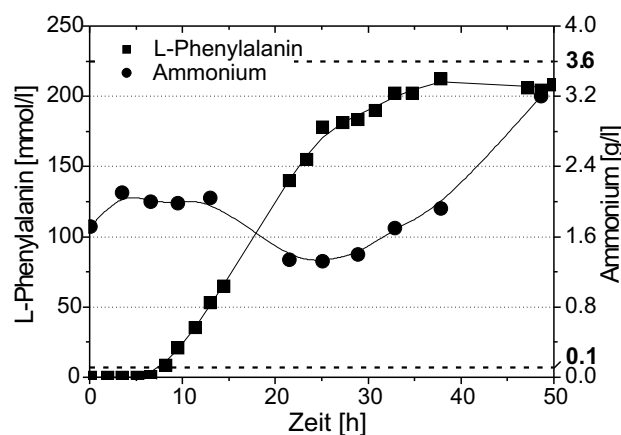


Abb. 6.5: Verlauf der Ammoniumkonzentration und der L-Phenylalanin-Konzentration während einer Fermentation

ungefähr 30 g/l Biomasse gebildet werden konnten.

Zur Identifizierung einer möglichen Phosphatlimitierung im Medium wurde eine Fermentation mit kontinuierlicher Phosphatzugabe durchgeführt. Dazu wurden ab $t = 12$ h 0,75 g/h KH_2PO_4 dosiert. Die insgesamt dosierte Phosphatmenge entsprach 110 % des am Anfang der Fermentation vorgelegten Phosphats. Für das Experiment wurde der Stamm *E. coli* 4pF69 verwendet, der die Gene *aroF*, *pheA*^{*} und *aroL* plasmidkodiert enthielt. Der Stamm *E. coli* 4pF81, bei dem durch zusätzliche Überexpressions des Gens *aroB* kein DAH(P), ein Intermediat der Aromatenbiosynthese, gebildet wurde, stand zum Zeitpunkt des Experiments noch nicht zur Verfügung¹. Für die Online-Glucosemessung wurde das System mit Filtrationsumlauf und OLGA verwendet. Die Phosphatkonzentration in den Proben wurde mittels eines Schnelltest gemessen (siehe Abschnitt A.3.1).

Einen Vergleich der Phosphatkonzentration und der Biomasse-spezifischen Produktbildungsraten bei einem Experiment mit und einem ohne Phosphatzugabe zeigt Abb. 6.6. Phosphat konnte in beiden Experimenten bis $t = 25$ h im Fermentationsüberstand nachgewiesen werden. Danach war ohne Phosphatdosierung kein Phosphat mehr nachweisbar. Die untere Nachweisgrenze lag bei 0,002 g/l. Bei kontinuierlicher Phosphatzugabe waren bis zum Ende der Fermentation 0,007-0,03 g/l Phosphat nachweisbar. Unabhängig von der Phosphatkonzentration sank die Produktbildung ab $t = 35$ h auf Null, bzw. annähernd Null ab. Daher konnte eine Limitierung durch Phosphat als Ursache des Abbruchs der Produktion ausgeschlossen werden. Zudem ist *E. coli* in der Lage, Phosphat in Form von Polyphosphaten intrazellulär zu speichern [Lengeler u. a. 1999], so dass auch dann, wenn Phosphat nicht nachweisbar war, wahrscheinlich ausreichend Phosphat in der Zelle vorlag. In kontinuierlicher Kultur wirkte sich eine Phosphatlimitierung sogar positiv auf die Produktion aus [Choi und Tribe 1982], [Park und Rogers 1986].

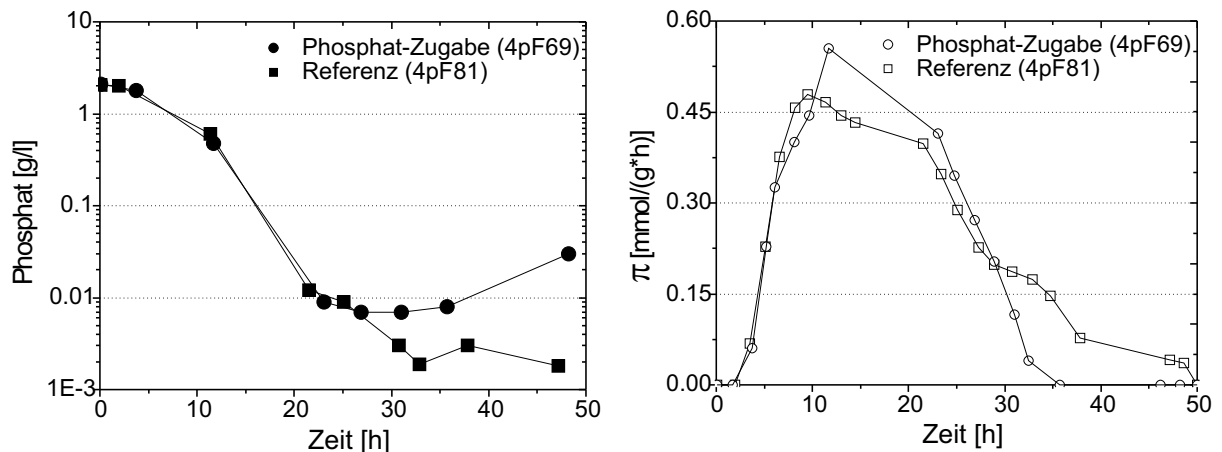


Abb. 6.6: Verlauf der Phosphatkonzentrationen und der Biomasse-spezifischen Produktbildungsraten in Fermentationen ohne (*E. coli* 4pF81) und mit Zugabe von Phosphat (*E. coli* 4pF69)

¹Weitere Informationen zum Stamm *E. coli* 4pF69, siehe [Gerigk 2001].

Einfluss des Mediums

Neben Phosphat konnten theoretisch auch andere Mediumbestandteile limitierend sein. Daher wurde der Einfluss des Mediums auf die Produktion von L-Phenylalanin in Fermentationen mit unterschiedlichen Biomassekonzentrationen untersucht. Bei Verwendung der gleichen Mediumzusammensetzung wurde der Anteil der für die Biomassebildung benötigten Substrate durch eine geringere End-Biomassekonzentration reduziert und sollte demzufolge für die Produktion von L-Phenylalanin zur Verfügung stehen. Eine mögliche Limitierung durch Medienbestandteile sollte somit aufgehoben werden. Fermentationen wurden bei einer Biotrockenmasse von BTM=20 g/l ($OD_{620} = 40$), BTM=25 g/l ($OD_{620} = 60$) und BTM=30 g/l ($OD_{620} = 80$) in der Produktionsphase durchgeführt. Für die Online-Glucosemessung wurde bei der Fermentation mit einer BTM=25 g/l das System mit Filtrationsumlauf und OLGA verwendet. Für die beiden anderen Experimente wurde das Process Trace System verwendet. Um die gewünschte optische Dichte einzustellen, wurde die L-Tyrosin-Zufuhr, durch die das Wachstum geregelt wurde, zu entsprechend früheren Zeitpunkten auf ein Minimum ausreichend für den Erhaltungsstoffwechsel reduziert.

Der Verlauf der Biomassekonzentration und die Biomasse-spezifischen Produktbildungsraten sind in Abb. 6.7 dargestellt. Die vorgegebenen Biomassekonzentrationen wurden nach ungefähr 12–17 Stunden erreicht. Die Abnahme gegen Ende der Fermentationen beruhte auf der Verdünnung im Zulaufbetrieb. Schwankungen in den Werten waren auf Messungenauigkeiten zurückzuführen (vgl. Abschnitt A.1). Auch die Unterschiede der Produktbildungsraten während der Wachstumsphase waren auf fehlerhafte Messungen zurückzuführen. Es wurde deutlich, dass die Produktbildungsraten bei allen drei Fermentationen gegen Ende der Fermentation abnahmen. Die Abnahme trat jedoch zeitlich versetzt ein, bei 30 g/l BTM bereits nach ≈ 22 h, bei 25 g/l BTM nach ≈ 25 h und bei 20 g/l BTM erst gegen Ende der Fermentation.

Die L-Phenylalanin-Konzentration erreichte am Ende der Fermentationen bei allen Biomassekonzentrationen relativ ähnliche Werte. Die Werte lagen bei 186 mmol/l (20 g/l,

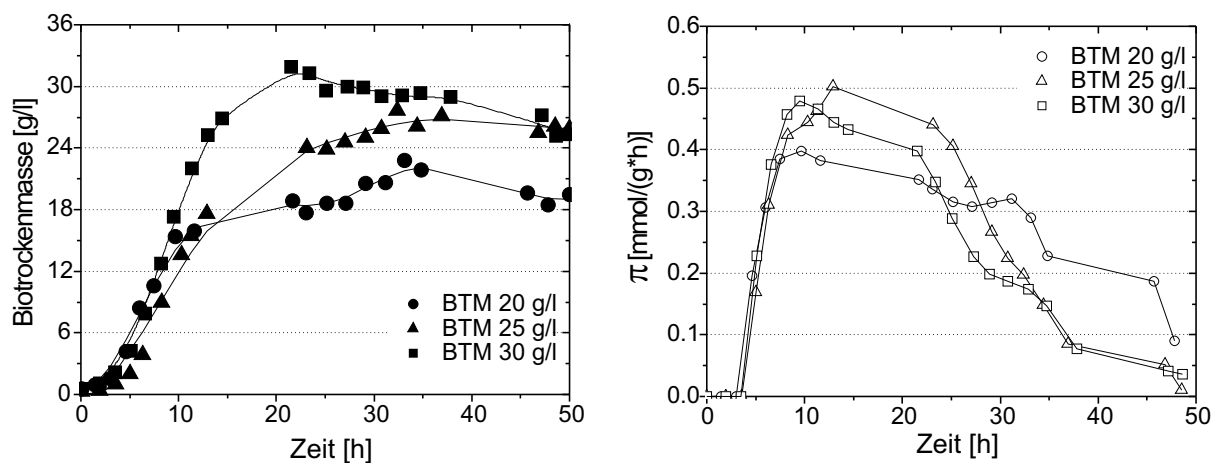


Abb. 6.7: Verlauf der Biomassekonzentration in Fermentationen bei Zugabe unterschiedlicher Mengen L-Tyrosin und Verlauf der Biomasse-spezifischen Produktbildungsraten

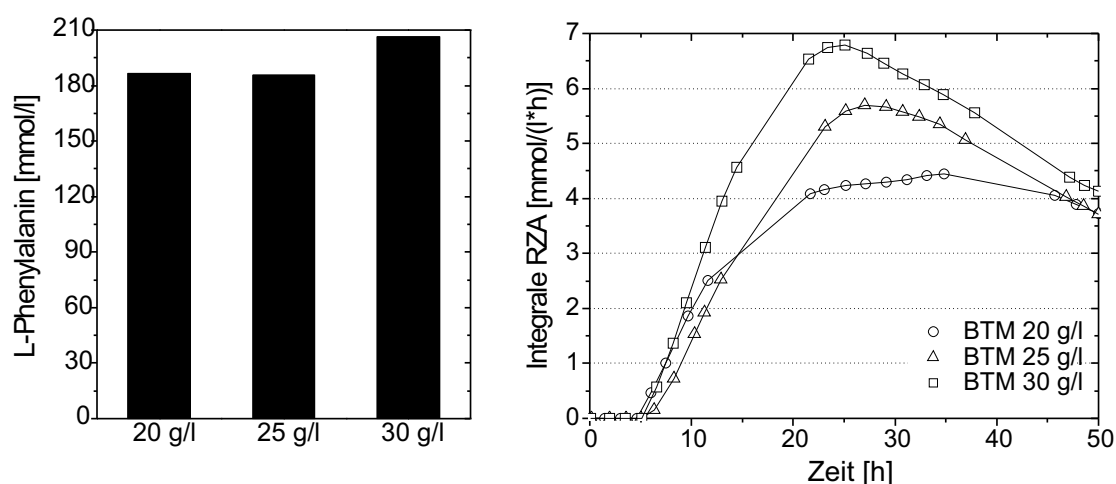


Abb. 6.8: L-Phenylalanin-Konzentration am Ende der Fermentationen und integrale Raum-Zeit-Ausbeute bei verschiedenen Biomassekonzentrationen

25 g/l BTM) und 206 mmol/l bei 30 g/l BTM (siehe Abb. 6.8). Die maximale Konzentration wurde jedoch zu unterschiedlichen Zeitpunkten erreicht. Die Unterschiede in der über die Fermentationsdauer integrierten Raum-Zeit-Ausbeute machen deutlich, dass bei höherer Biomassekonzentration mehr L-Phenylalanin in kürzerer Zeit gebildet wurde. Die Raum-Zeit-Ausbeute erreichte bei der höchsten Biomassekonzentration einen Maximalwert von 6,8 mmol/(l·h), bei 25 g/l BTM 5,7 mmol/(l·h) und bei niedriger Konzentration den niedrigsten Wert mit 4,5 mmol/(l·h).

Selbst bei niedriger Biomassekonzentration wurde keine höhere L-Phenylalanin-Konzentration erreicht, sondern die Produktbildungsrate nahm bei Erreichen von 180 mmol/l L-Phenylalanin stark ab. Bei den Fermentationen mit niedrigerer Biomassekonzentration wurden wahrscheinlich weniger Medienbestandteile für das Wachstum benötigt. Die nicht für das Wachstum verwerteten Medienbestandteile hätten stattdessen für die L-Phenylalanin-Produktion zur Verfügung gestanden. Daher wäre anzunehmen, dass Mediumkomponenten in ausreichender Menge vorhanden waren und keine Limitierung vorlag. Dagegen ist signifikant, dass die Biomasse-spezifischen Produktbildungsraten bei niedrigerer Biotrockenmassekonzentration über den Fermentationsverlauf deutlich langsamer abfielen als bei höherer Konzentration. Zudem wurde unabhängig von der Biomassekonzentration am Ende nahezu die gleiche integrale Raum-Zeit-Ausbeute erreicht. Diese Ergebnisse lassen auf eine Inhibierung durch L-Phenylalanin schließen. Untersuchungen dazu werden im folgenden Abschnitt beschrieben.

6.2.2 Produktinhibierung

Der Abbruch der L-Phenylalanin-Produktion war den vorangehenden Abschnitten zufolge weder auf eine Inhibierung noch auf eine Limitierung durch Mediumbestandteile zurückzuführen. Zudem wurde in Fermentationen mit dem Stamm *E. coli* 4pF81 deutlich, dass weniger Nebenprodukte aus dem Aromatenbiosyntheseweg akkumulierten und eine L-Phenylalanin-Konzentration von 200 mmol/l schneller erreicht wurde als bei dem Stamm *E. coli* 4pF69 [Gerigk 2001]. Dennoch wurde nicht mehr L-Phenylalanin produziert. Die Ergebnisse der Fermentationen bei verschiedenen Biomassekonzentrationen deuten auf eine

Inhibierung durch L-Phenylalanin hin. *In vitro*-Experimenten von Jossek [Jossek 2000] zufolge wurde die Enzymaktivität der L-Tyrosin-sensitiven DAHP-Synthase, dem Eingangsenzym der Aromatenbiosynthese, durch erhöhte L-Phenylalanin-Konzentrationen herabgesetzt. Bei einer Konzentration von 20 mmol/l (3 g/l) L-Phenylalanin wurde die Aktivität um 64 % reduziert². Der von Jossek verwendete Assay war für die Untersuchung des Einflusses höherer L-Phenylalanin-Konzentrationen nicht geeignet. Daher wurden Untersuchungen zur möglicherweise durch L-Phenylalanin in Konzentrationen von 180-200 mmol/l verursachten Inhibierung durchgeführt, die in diesem Abschnitt vorgestellt werden.

Zur Identifizierung einer Produktinhibierung wurde die L-Phenylalanin-Konzentration in einer Fermentation durch Zugabe einer hochkonzentrierten L-Phenylalanin-Suspension sprunghaft erhöht. Die Zugabe erfolgte nach dem Ende der Wachstumsphase, da das Wachstum der Zellen durch L-Phenylalanin-Konzentrationen über dem physiologischen Niveau gehemmt wird [Gerigk 2001]. Zugegeben wurden 900 ml L-Phenylalanin-Suspension mit einer Konzentration von ≈ 600 mmol/l (100 g/l) bei $t = 21,5$ h. Bei einer zu diesem Zeitpunkt im Bioreaktor angenommenen Konzentration von ungefähr 120 mmol/l sollte durch die Zugabe eine Konzentration in der Größenordnung von 180-200 mmol/l L-Phenylalanin erreicht werden, die vorab als möglicherweise inhibierend identifiziert worden war.

Abb. 6.9 zeigt den Verlauf der L-Phenylalanin-Konzentration bei einer Fermentation ohne L-Phenylalanin-Zugabe im Vergleich zu der Fermentation mit Zugabe der L-Phenylalanin-Suspension. Die L-Phenylalanin-Konzentration vor der Zugabe lag bei 146 mmol/l. Nach der Zugabe lag sie bei 180 mmol/l. Bei Einrechnung der Verdünnung durch die Zugabe entsprach der Konzentrationsanstieg der zugegebenen Menge von

²Die gegen Feedback-Inhibierung resistente DAHP-Synthase, kodiert durch das Gen *aroF** wurde in *in vitro*-Experimenten bei 20 mmol/l (3 g/l) L-Phenylalanin um 30 % reduziert [Jossek 2000], bei 60 mmol/l (10 g/l) L-Phenylalanin um 50 % [Backman u. a. 1990].

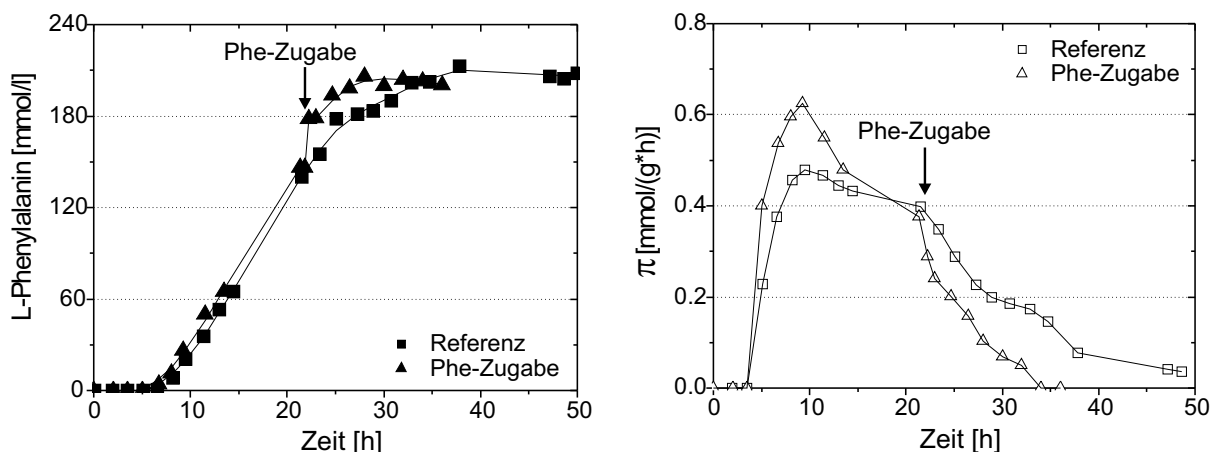


Abb. 6.9: L-Phenylalanin-Konzentrationen und Biomasse-spezifische Produktbildungsraten bei einer Fermentation ohne (Referenz) und einer Fermentation mit L-Phenylalanin-Zugabe während der Produktionsphase

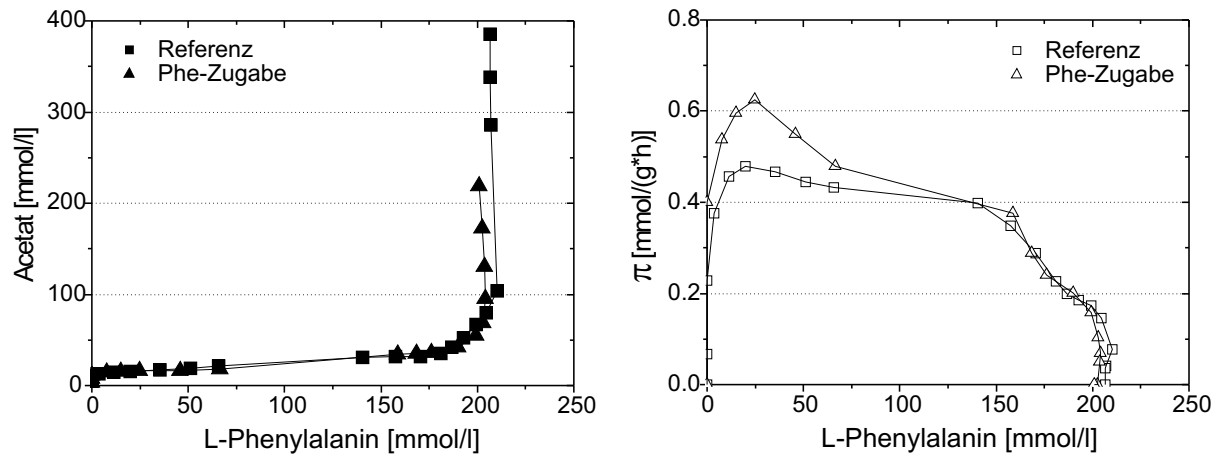


Abb. 6.10: Acetatbildung und Biomasse-spezifische Produktbildungsrate aufgetragen über die L-Phenylalanin-Konzentrationen bei einer Fermentation ohne (Referenz) und einer Fermentation mit L-Phenylalanin-Zugabe während der Produktionsphase

47 mmol/l L-Phenylalanin. Danach stieg die L-Phenylalanin-Konzentration kaum noch an. Bei der Fermentation ohne L-Phenylalanin-Zugabe stieg die Konzentration langsamer bis auf über 200 mmol/l an. Deutlicher wird der Einfluss der Zugabe von L-Phenylalanin bei Betrachtung der Biomasse-spezifischen Produktbildungsrate. Nach der Zugabe des L-Phenylalanins sank die Produktbildungsrate schnell bis auf Null ab. Die Produktbildungsrate bei der Referenzfermentation nahm zum Ende der Fermentation mit zunehmender L-Phenylalanin-Konzentration ebenfalls ab, aber deutlich später und im Vergleich langsamer. Osmotischer Stress auf die Zellen durch plötzliche Zugabe von L-Phenylalanin war nicht auszuschließen. Dennoch deuteten die Ergebnisse stark auf eine Inhibierung der Produktion durch hohe L-Phenylalanin-Konzentrationen hin.

Um die Ergebnisse zu verdeutlichen, ist in Abb. 6.10 die Abhängigkeit der Acetatbildung und der Produktbildungsrate von der L-Phenylalanin-Konzentration gezeigt. Bei Erreichen von ≈ 200 mmol/l L-Phenylalanin nahmen die Produktbildungsrate sowohl bei der Fermentation ohne L-Phenylalanin-Zugabe als auch bei der Fermentation mit L-Phenylalanin-Zugabe ab, die Acetatkonzentration hingegen zu. Bei einer Betrachtung des zeitlichen Verlaufs (vgl. Abb. 6.9) zeigte sich, dass dies unabhängig vom Zeitpunkt war, da eine L-Phenylalanin-Konzentration von 200 mmol/l zu unterschiedlichen Zeitpunkten erreicht wurde. Die Acetatbildung kann demzufolge als ein charakteristischer Parameter für die abnehmende Fähigkeit der Zellen, Glucose in L-Phenylalanin umzusetzen, betrachtet werden.

Einer Modellierung des Fermentationsprozesses zur L-Phenylalanin-Produktion mit dem Stamm 4pF20 zufolge, liegt die L-Phenylalanin-Inhibierungskonstante bei $20 \pm 1,35$ g/l [Takors 2003]. In dem hier dargestellten Experiment wurde die Produktion bei ≈ 200 mmol/l (33 g/l) L-Phenylalanin vollständig inhibiert. Die hohe L-Phenylalanin-Konzentration konnte sowohl eine kinetische Inhibierung verursacht haben, die bei sinkender Konzentration und nach kurzer Einwirkungsdauer wieder abgenommen hätte, als auch eine Abnahme der Expression und der Stabilität bei langer Einwirkungsdauer.

Um eine Inhibierung durch das Produkt zu vermeiden oder aufzuheben, konnten genetische Ansätze oder prozesstechnische Ansätze verfolgt werden. Als ein genetischer Ansatz bot sich die Ausschaltung des durch *tyrR* kodierten Regulatorproteins, das Teile der Aromatenbiosynthese auf Transkriptionsebene regelt [Pittard 1996]. In Zulauffermentationen in der Sixfors vario Anlage konnte jedoch keine Verbesserung der L-Phenylalanin-Produktion bei Verwendung eines Stammes mit deletiertem *tyrR* festgestellt werden [Rueping 2002]. Stattdessen bildete der Stamm weniger L-Phenylalanin bei geringerer L-Phenylalanin-Glucose-Selektivität. Weitere Möglichkeiten würden beispielsweise in der Entwicklung einer gegen Feedbackinhibierung durch L-Phenylalanin resistenten Variante des Gens *aroF* für die DAHP-Synthase bestehen. Solche genetischen Maßnahmen können jedoch sehr aufwendig sein und waren nicht Bestandteil dieser Arbeit.

Verschiedene prozesstechnische Möglichkeiten boten sich an, um eine Inhibierung durch hohe L-Phenylalanin-Konzentrationen zu vermeiden. Ein aktives Transportsystem für L-Phenylalanin ist bislang nicht bekannt, sondern L-Phenylalanin verläßt die Zelle wahrscheinlich durch Diffusion [Raeven 2003]. Diffusiver Transport ist vom Konzentrationsgradienten zwischen dem Zellinneren und der Zellumgebung abhängig, so dass eine hohe extrazelluläre L-Phenylalanin-Konzentration eine hohe intrazelluläre Konzentration zur Folge hat. Eine hohe intrazelluläre Konzentrationen führte im Fall der L-Phenylalanin-Synthese wahrscheinlich zur Reduzierung des Flusses in die Aromatenbiosynthese.

Um die L-Phenylalanin-Konzentration im Medium stärker und dauerhaft zu senken und eine Inhibierung durch zu hohe Konzentrationen zu vermeiden, waren Verfahren denkbar, bei denen eine Verdünnung des Mediums stattfindet. Kontinuierliche Fermentationen waren mit den verwendeten Stämmen aufgrund unzureichender Plasmidstabilität nicht möglich [Gerigk 2001]. Ein „Repetitive Fed-Batch-Verfahren“, d.h. die Abtrennung von zellfreiem Fermentationsmedium über ein Filtrationsmodul, dadurch eine kurzzeitige Aufkonzentrierung der Biomasse und die nachfolgende Zufuhr neuen Mediums wurde ausgeschlossen. Der Grund dafür war die hohe Sauerstoffaufnahme von *E. coli* zu dem Zeitpunkt, an dem eine solche Abtrennung hätte stattfinden müssen, die in dem Reaktor bei höherer Biomassekonzentration jedoch nicht hätte gedeckt werden können. Zudem bliebe bei einer Aufkonzentrierung wahrscheinlich viel Zellmaterial im Filtrationsmodul hängen, das somit für die L-Phenylalanin-Produktion nicht mehr zur Verfügung stehen würde und eine aufwendige Reinigungsprozedur erfordern würde. Eine weitere Möglichkeit war ein Fermentationsprozess im Diafiltrationsverfahren, bei der die L-Phenylalanin-Konzentration im Bioreaktor durch Abtrennung von zellfreiem Fermentationsüberstand über einen Umlauf mit Filtrationsmodul und kontinuierlicher Zufuhr von neuem Medium gesenkt wurde. Vorteil dieses System wäre die partielle Verweilzeitentkopplung durch die Zellrückhaltung und damit hohe Biomassekonzentration mit nur einem Filtrationsschritt. Das Medium hätte bei diesem Verfahren mit einem Volumenstrom von 1,5 l/h ab- und zugeführt werden müssen, um die L-Phenylalanin-Konzentration konstant zu halten. Bei Zufuhr über z.B. 30 Stunden wären dafür 45 l Medium benötigt worden. Das Produkt wäre bei einem solchen Prozess im Medium stark verdünnt worden und folglich eine Aufarbeitung abhängig vom verwendeten Verfahren aufwendiger geworden [Ye u. a. 1996]. Daher wurde dieses Verfahren ebenfalls nicht angewendet.

Stattdessen sollte in dieser Arbeit die integrierte Abtrennung von L-Phenylalanin mittels Reaktivextraktion untersucht und angewendet werden. Eine integrierte Aufarbeitung bot zum einen die Möglichkeit, das inhibierende L-Phenylalanin kontinuierlich abzutrennen, zum anderen die Möglichkeit das Produkt aufzuarbeiten und dabei aufzukonzentrieren. Die Untersuchungen dazu werden im Kapitel 7 dargestellt.

6.3 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden Untersuchungen zum Einfluss der Parameter Temperatur, pH-Wert und Medium auf die L-Phenylalanin-Produktion gezeigt. Limitierungen und Inhibierungen der L-Phenylalanin-Produktion durch Mediumbestandteile und eine mögliche Inhibierung durch L-Phenylalanin in Konzentrationen von 180-200 mmol/l wurden untersucht.

- Die Produktion bei einer Temperatur von 33 °C anstelle von 37 °C führte zu einer verlängerten Produktionsphase, vermutlich durch die bei 33 °C höhere Stabilität und Aktivität der DAHP-Synthase. Die L-Phenylalanin-Konzentration konnte um 10 %, die L-Phenylalanin-Glucose-Selektivität von 14,5 mol/mol % auf 16,2 mol/mol % gesteigert werden. Über den Prozessverlauf lag die wichtige Prozessgröße Raum-Zeit-Ausbeute jedoch bei $T = 33\text{ °C}$ größtenteils unter der bei $T = 37\text{ °C}$. Bei höherer Temperatur wurde in kürzerer Zeit mehr L-Phenylalanin produziert, da die Zellaktivität bei insgesamt höher war.
- Der pH-Wert hatte den Fermentationen zufolge keinen Einfluss auf die L-Phenylalanin-Produktion. Aufgrund der Ergebnisse der Experimente zum Einfluss von pH-Wert und Temperatur wurden die weiteren Fermentationen bei $T = 37\text{ °C}$ und pH 6,5 durchgeführt.
- Eine Inhibierung der L-Phenylalanin-Produktion durch Ammonium oder eine Limitierung durch Phosphat lag nicht vor.
- Bei Fermentationen mit verschiedenen Biomassekonzentrationen wurde bei geringerer Biomassekonzentration und dadurch höherer Mediumverfügbarkeit nicht mehr L-Phenylalanin gebildet und die Raum-Zeit-Ausbeute war wie zu erwarten niedriger. Demzufolge lag wahrscheinlich keine Limitierung durch Mediumbestandteile vor.
- Zur Untersuchung einer möglichen Inhibierung durch L-Phenylalanin wurde eine Fermentation mit Zugabe von hochkonzentrierter L-Phenylalanin-Suspension in der Produktionsphase durchgeführt. Die Zugabe hatte einen sofortigen Abfall der Produktbildungsrate zur Folge, so dass kaum noch L-Phenylalanin produziert wurde. Diesem Verlauf zufolge war eine Inhibierung der Produktion durch L-Phenylalanin selbst anzunehmen. Mit der Abnahme der L-Phenylalanin-Produktion nahm die Acetatbildung bei Erreichen von $\approx 180\text{--}200\text{ mmol/l}$ L-Phenylalanin zu und kann damit als ein charakteristischer Parameter für die abnehmende Fähigkeit der Zellen, Glucose in L-Phenylalanin umzusetzen, betrachtet werden.

Um eine Inhibierung durch L-Phenylalanin zu vermeiden und die Produktion verbessern zu können, musste entweder ein Produktionsstamm hergestellt werden, bei dem keine Inhibierung durch hohe L-Phenylalanin-Konzentrationen auftrat oder die L-Phenylalanin-Konzentration während der Produktion im Bioreaktor reduziert werden.

7 Integration der Reaktivextraktion in Flüssig-Flüssig-Zentrifugen in den Fermentationsprozess

Eine hohe Produktbildungsrate bis zum Ende des Fermentationsprozesses konnte durch die in den vorangegangenen Kapiteln vorgestellten Ansätze nicht oder nur bei insgesamt niedriger Raum-Zeit-Ausbeute erreicht werden. Um eine durchgehend hohe Produktbildung mit gleichzeitig hohen Raum-Zeit-Ausbeuten aufrecht zu erhalten, war die Vermeidung einer Inhibierung durch hohe Produktkonzentrationen notwendig. Dies sollte durch eine Abtrennung des Produktes erreicht werden.

Ein System zur integrierten Abtrennung von L-Phenylalanin wurde von Maaß u. a. und Gerigk u. a. entwickelt [Maaß u. a. 2002], [Gerigk u. a. 2002b]. Dieses System basierte auf der Reaktivextraktion in Hohlfasermembranmodulen, die jedoch verschiedene Nachteile aufwies (vgl. Abschnitt 3.3.2). Ein besonders wichtiger Aspekt war die dabei limitierte Stoffübertragung. Daher wurde die Verwendung von Flüssig-Flüssig-Zentrifugen zur integrierten Reaktivextraktion untersucht. Das wichtigste Kriterium zugunsten der Anwendung von Zentrifugalextraktoren war die hohe Effizienz der Stoffübertragung [Lo u. a. 1983]. Dem stand der mögliche Eintrag großer Mengen organischen Lösungsmittels in die Fermentation durch Rückführung des die Extraktion verlassenden Raffinats gegenüber. Ein Eintrag zu großer Mengen des Carriers konnte einen negativen Einfluss auf die produzierenden Zellen im Bioreaktor haben [Maaß 2001]. Dieses Kapitel umfasst die Untersuchungen zur Reaktivextraktion in Flüssig-Flüssig-Zentrifugen und deren Integration in den Fermentationsprozess.

7.1 Reaktiveextraktion in Flüssig-Flüssig-Zentrifugen

Vor einem Einsatz der Flüssig-Flüssig-Zentrifugen in der Online-Produktabtrennung war es notwendig, die technische Realisierbarkeit zu zeigen, insbesondere die Phasentrennung und die Stabilität des Systems. Darüber hinaus wurde die Extraktionsleistung des Systems abhängig von der Zusammensetzung der wässrigen Phasen und der organischen Phase des Stoffsystems sowie der Zentrifugenparameter untersucht. So sollten geeignete Einstellungen für eine Online-Extraktion ermittelt werden.

Die Extraktionsversuche wurden mit L-Phenylalanin in Lösung (Donator) als Modelllösung, D₂EHPA in Kerosin (Carrier in organischem Lösungsmittel) und Schwefelsäurelösung (Akzeptor) durchgeführt. Wenn nicht anders beschrieben, wurden 60 mmol/l

(10 g/l) L-Phenylalanin, 10 % D₂EHPA in Kerosin und 1 M Schwefelsäure verwendet. Der pH-Wert der wässrigen Donatorphase wurde am Anfang auf 6,5, entsprechend dem Wert in Fermentationen, eingestellt. Die Lösungen wurden jeweils im Kreis geführt (Versuchsdurchführung und Aufbau, siehe Abschnitt 4.4.2). Die Volumenströme der Lösungen bei Untersuchungen anderer Parameter waren jeweils gleich. Die Angaben der Volumenströme erfolgen in der Reihenfolge Donator (D), organische Phase (O), Akzeptor (A). Wenn nicht anders angegeben, wurde der „High-Mix“-Einsatz verwendet und die Rotordrehzahl der Zentrifugen lag bei 2400 Upm.

7.1.1 Phasentrennung und Stabilität

Die Dichtedifferenz, die Viskosität, die Löslichkeit der organischen und wässrigen Phasen ineinander und die Oberflächenspannung haben einen Einfluss auf Emulsionsbildung und Phasentrennung [Weatherley 1994]. Löslichkeit und Oberflächenspannung waren über die Bestandteile der Phasen beeinflussbar.

Salzgehalt der wässrigen Phase

Die Löslichkeit organischer Bestandteile in Wasser ist unter anderem von der Ionenstärke abhängig. Mit zunehmender Salzkonzentration nimmt die Löslichkeit organischer Bestandteile ab [Weatherley 1994]. Daher wurden zum Vergleich erste Extraktionsexperimente unter Verwendung von L-Phenylalanin in wässriger Lösung und in wässriger 0,9 % Natriumchlorid-Lösung (physiologische Salzlösung) durchgeführt [Kretzers 2002]. Die Extraktion mit L-Phenylalanin in wässriger Lösung führte in der Zentrifuge zur Extraktion bei Volumenströmen über 2 l/h zu starker Emulsionsbildung und unzureichender Phasentrennung. Dabei wurde die Dispersionsphase, die sich zwischen leichter und schwerer Phase in der Zentrifuge ausbildete, mit zunehmendem Volumenstrom größer und trat schließlich über den Ausgang der leichten oder der schweren Phase mit aus. Diese Phaseninstabilität wurde durch die Anlagerung des in Wasser gelösten Carriers D₂EHPA an die Phasengrenze und die daraus resultierende Reduzierung der Oberflächenspannung verursacht. Durch die Verwendung von Salzlösung konnte die Phasentrennung deutlich verbessert werden. Sowohl Extraktion als auch Rückextraktion waren bei höheren Volumenströmen stabil. Bei der Rückextraktion war die Phasentrennung durch die im Akzeptor dissoziiert ionisch vorliegende Schwefelsäure gut. Leitfähigkeit und damit Ionenstärke blieben über die Extraktionsdauer gleich. Daher eignete sich L-Phenylalanin in Salzlösung als Modelllösung für Extraktionsexperimente.

Extraktion mit zellfreiem Fermentationsüberstand

Zur Untersuchung des Einflusses von Bestandteilen des für eine Online-Extraktion zu verwendenden Fermentationsüberstands, wie Salzen oder organischen Säuren, die als Nebenprodukte gebildet wurden, auf die Phasentrennung wurden Extraktionen mit zellfreiem Fermentationsüberstand durchgeführt [Heidersdorf 2002]. Die Gewinnung des Überstands erfolgte wie in Abschnitt 4.5.1 beschrieben.

Bereits nach 20 Minuten Extraktion wurde starke Schaumbildung beobachtet. Im Rotor hatte sich Feststoff gebildet und sich an der Rotorwand abgesetzt (siehe Abb. 7.1). Dadurch war die Phasengrenze nach innen verschoben und die schwere Phase durch den



Abb. 7.1: Feststoff im Rotor der Zentrifuge und getrockneter Feststoff

Ausgang der leichten Phase ausgetragen worden. Zur Identifizierung der Ursache der Feststoffbildung wurde ein Volumenteil Fermentationsüberstand mit einem Volumenteil Kerosin mit Carrier bzw. ohne Carrier in einem Reaktionsgefäß gemischt und zentrifugiert. Mit Carrier war Feststoffbildung festzustellen, bei Verwendung von Kerosin ohne Carrier wurde hingegen kein Feststoff gebildet. Folglich war der Carrier für die Feststoffbildung verantwortlich. Durch einen Proteintest konnte nachgewiesen werden, dass in dem Feststoff ausgefallene Proteine vorlagen (siehe Abschnitt A.3.2). Nach einer Fällung der vorhandenen Proteine war keine Feststoffbildung mehr festzustellen. Da auch bei Verwendung einer Carrier-Konzentration von 1 % D₂EHPA Feststoffbildung festgestellt wurde, musste eine Abtrennung der Proteine erfolgen.

Extraktion mit zell- und proteinfreiem Fermentationsüberstand

Zur Abtrennung der Proteine aus dem zellfreien Fermentationsüberstand wurde ein System bestehend aus fünf Ultrafiltrations-Kassetten (MWCO 10 kDa) verwendet (siehe Abschnitt 4.5.1). In Extraktionsexperimenten mit dem proteinfreien Fermentationsüberstand wurde keine Feststoffbildung mehr festgestellt. Die Donatorphase wurde jedoch sofort trüb, was auf Emulsionsbildung und einen Eintrag organischer Phase schließen ließ. Bei hohen Volumenströmen von 8 l/h wurden die Phasen nach fünf Stunden nicht mehr sauber getrennt. Eine Dichteänderung war nicht feststellbar. Die Leitfähigkeit der Donatorphase nahm jedoch während eines Extraktionsexperimentes von ≈ 30 mS/cm auf ≈ 12 mS/cm ab [Kretzers 2002]. Die Instabilität war wahrscheinlich auf eine Veränderung der Löslichkeit des Carriers in der wässrigen Phase und der Oberflächenspannung aufgrund einer veränderten Phasenzusammensetzung zurückzuführen. Bei einer Online-Extraktion mit 10-15 l des als Donator verwendeten Fermentationsvolumens im Vergleich zu 2 l Modelllösung war von einem geringeren Einfluss der organischen Phase auszugehen. Zusätzlich sollte der Volumenstrom nicht zu hoch gewählt werden, um Stabilität zu gewährleisten.

Die Extraktion mit proteinfreiem Fermentationsüberstand war den Experimenten zufolge stabil, wenn unter den verwendeten Bedingungen ein Volumenstrom unter 8 l/h verwendet wurde. Da die Herstellung von proteinfreiem Überstand im Vergleich zu der von Salzlösung aufwendig war und die gleiche Zusammensetzung bei Überstand aus verschiedenen Fermentationen nicht gegeben war, wurde L-Phenylalanin in Natriumchlorid-Lösung als Modelllösung für Experimente zur Charakterisierung der Extraktion in den Zentrifugalextraktoren verwendet.

Carrier in der organischen Phase

Das als Carrier verwendete D₂EHPA stand von verschiedenen Herstellern zur Verfügung. D₂EHPA (FLUKA) führte zu starker Emulsionsbildung (vgl. [Maaß 2001]). Bei D₂EHPA (Hostarex PA216, HOECHST) war die Emulsionsbildung deutlich geringer. Abhängig von der verwendeten Charge wurde die beste Phasentrennung mit D₂EHPA (MERCK) erreicht. Die Ergebnisse einer Analyse der D₂EHPA-Reinheit mittels ³¹P-NMR sind in Tab. 7.1 dargestellt. Das D₂EHPA (MERCK) enthielt demzufolge die wenigsten Verunreinigungen. Allerdings waren Chargenunterschiede bei diesem Hersteller festzustellen, so dass das D₂EHPA (HOECHST) verwendet wurde, wenn nicht anders beschrieben. Dadurch sollten durchgehend gleiche Versuchsbedingungen gewährleistet werden.

Tab. 7.1: ³¹P-NMR-Analyse von D₂EHPA (DSM) (vgl. Abschnitt A.5)

Hersteller	Bestandteile
FLUKA	16 % Monomer, 50 % Monomer mit Seitenkette, Phosphorsäure, 4 unbekannte Produkte
HOECHST	Monomer, 1,8 % Phosphorsäure
MERCK	Monomer, 0,2 % Zersetzungsprodukte

7.1.2 Charakterisierung der Reaktivextraktion

Zur Charakterisierung der Reaktivextraktion in den Zentrifugalextraktoren wurde der Einfluss der Konzentrationen der verschiedenen Phasenbestandteile untersucht [Kretzers 2002]. Darüber hinaus konnten bei Verwendung der Zentrifugen die Scherkräfte durch Einbau eines „High-Mix“-Einsatzes oder „Low-Mix“-Einsatzes verändert werden, sowie die Rotordrehzahl und die Volumenströme der Phasen individuell eingestellt werden (vgl. Abschnitt 4.4). Die Einflüsse wurden untersucht.

Extraktion und pH-Wert

In Abb. 7.2 ist der prinzipielle Verlauf der L-Phenylalanin-Konzentration in der Donatorphase und in der Akzeptorphase während eines Extraktionsexperimentes mit Volumenströmen von 4 l/h dargestellt. Die L-Phenylalanin-Konzentration im Donator war bereits nach 2 Stunden auf 19 mmol/l gesunken, die Konzentration im Akzeptor auf 38 mmol/l gestiegen. Die Eingangs- und Ausgangskonzentration des Donators und des Akzeptors wiesen am Anfang deutliche Unterschiede auf. Das bedeutete, dass die Extraktionsrate hoch war. Mit abnehmender L-Phenylalanin-Konzentration im Donator nahmen Extraktions- und Rückextraktionsrate ab, bis eine maximale Extraktion und Rückextraktion erreicht war. Die „Wiederfindung“ lag über die Extraktionsdauer zwischen 92 und 98 %. Die Schwankungen waren auf Messungenauigkeiten zurückzuführen, die Differenz zu 100 % möglicherweise auf einen Restbestand in der organischen Phase durch unzureichende Rückextraktion [Maaß 2001].

Der pH-Wert sank während der Extraktion von 6,5 auf 2,4 ab (siehe Abb. 7.2). Diese Absenkung trat dadurch auf, dass sich die Säure D₂EHPA (pK_S=3,9) durch den direkten Phasenkontakt in der wässrigen Phase löste. Mit abnehmendem pH-Wert lagen mehr

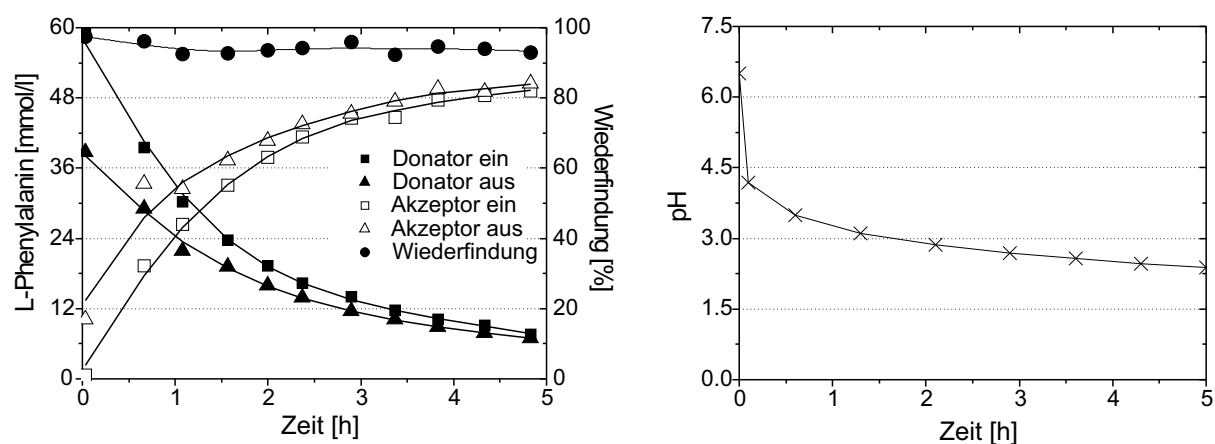


Abb. 7.2: Verlauf der Konzentrationen von Donator und Akzeptor während eines Extraktionsexperimentes, bezogen auf das Donatorvolumen und Darstellung der „Wiederfindung“; Verlauf des pH-Wertes; $\dot{V}_{D,O,A} = 4$

L-Phenylalanin-Kationen vor ($pI=5,5$). Im Bereich von pH 3-8¹ hatte der pH-Wert kaum einen Einfluss auf den Extraktionsgrad. Im sauren Bereich nahm der Extraktionsgrad ab. Im Bereich von pH 2-4 lag der Unterschied bei Verwendung von 10 % D₂EHPA jedoch unter 5 % [Maaß 2001]. Bei den durchgeführten Extraktionen lag der pH-Wert abhängig von den verwendeten Parametern am Ende der Extraktionen bei $\approx 1,5-3,5$. Der niedrige pH-Wert am Ende führte möglicherweise zu einem etwas niedrigeren Extraktionsgrad als optimal hätte erreicht werden können. Bei zu vergleichenden Experimenten war der pH-Wert am Ende ähnlich und damit der in jedem Fall nur geringe Einfluss. Zudem wurde die Phasentrennung durch eine Einstellung des pH-Wertes auf 6,5 während der gesamten Extraktion nicht beeinflusst [Kretzers 2002]. Daher wurde auf eine Einstellung des pH-Wertes verzichtet.

Einfluss der Donator-Konzentration

Der Einfluss der Donator-Konzentration wurde in Experimenten mit 60 mmol/l (10 g/l) und 120 mmol/l (20 g/l) L-Phenylalanin untersucht. Die L-Phenylalanin-Konzentration im Donator hatte keinen Einfluss auf den Anteil an extrahiertem L-Phenylalanin bezogen auf die Eingangskonzentration (siehe Abb. 7.3a). Die Extraktionsrate wurde hingegen beeinflusst, denn bei höherer L-Phenylalanin-Konzentration wurde absolut mehr L-Phenylalanin extrahiert (vgl. Abschnitt 7.1.3, Abb.7.8).

Einfluss der Carrier-Konzentration

Eine Erhöhung der Carrier-Konzentration in der organischen Phase von 10 % auf 20 % hatte einen deutlichen Einfluss auf Extraktion und Rückextraktion, dargestellt in Abb. 7.3b. Während bei 20 % D₂EHPA bereits nach zwei Stunden über 80 % extrahiert waren, wurde dieser Wert bei geringerer Konzentration erst nach fünf Stunden erreicht. Die Effizienz der Extraktion und der Rückextraktion wurden um ungefähr 15 % gesteigert. Eine Erhöhung der Carrier-Konzentration hatte durch die größere Anzahl zur Verfügung stehender Carrier-

¹Für L-Phenylalanin gilt: $pK_S = 1,83$ und $pK_B = 9,13$ [Weast und Astle 1979].

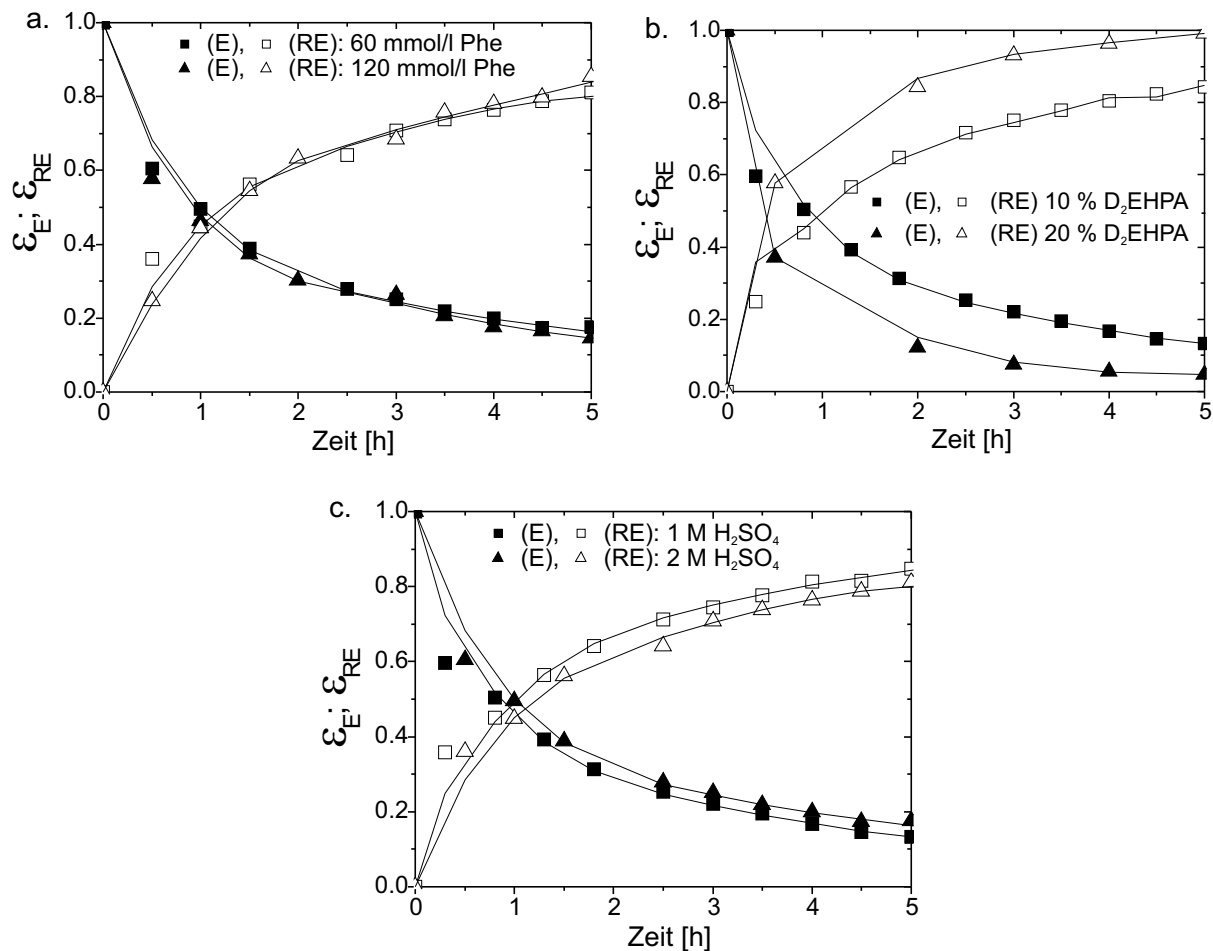


Abb. 7.3: Einfluss a. der Donator-Konzentration, mit Akzeptor-Konzentration $C_A = 2$ M; b. der Carrier-Konzentration; c. der Akzeptor-Konzentration auf die Effizienz von Extraktion und Rückextraktion; $\dot{V}_D = 8$; $\dot{V}_O = 4, 5$; $\dot{V}_A = 8$ (Werte aufgrund der Datenlage berechnet aus der Ausgangskonzentration, die generell etwas über der Eingangskonzentration lag)

Moleküle eine verbesserte Extraktion zur Folge. Entsprechend mehr Carrier wurden bei der Rückextraktion auch entladen, so dass die Rückextraktion im Verhältnis zur Extraktion gleich blieb. Untersuchungen von Maaß hatten bereits ergeben, dass eine Erhöhung der zur Verfügung stehenden Carrier-Moleküle in der organischen Phase zur Extraktion des L-Phenylalanins einen positiven Einfluss auf die Extraktion in Hohlfasermembranmodulen hatte [Maaß u. a. 2002].

Einfluss der Akzeptor-Konzentration

Zur Untersuchung des Einflusses des Akzeptors wurden Versuche mit 1 M und 2 M Schwefelsäure durchgeführt. Eine erhöhte Akzeptor-Konzentration hatte keinen Einfluss auf die Extraktion oder die Rückextraktion (siehe Abb. 7.3c). Eine Erhöhung der Gegenionen im Akzeptor zur Rückextraktion hatte in Hohlfasermembranmodulen zu einer verbesserten

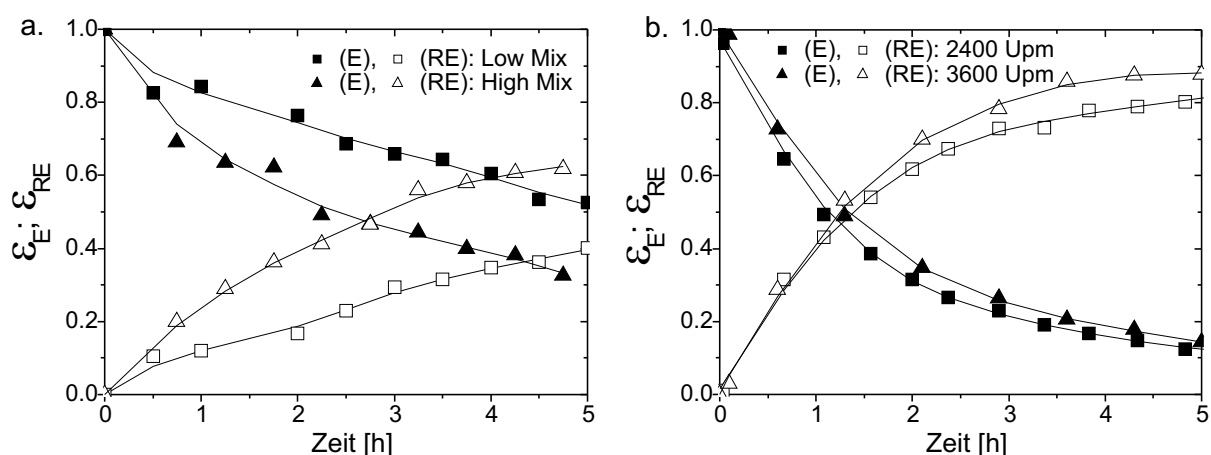


Abb. 7.4: a. Einfluss der Scherkraft auf die Effizienz von Extraktion und Rückextraktion, $\dot{V}_D = 2$ (mit L-Phenylalanin in Wasser); $\dot{V}_O = 1,5$; $\dot{V}_A = 2$ (Werte aufgrund der Datenlage berechnet aus der Ausgangskonzentration, die generell etwas über der Eingangskonzentration lag); b. Einfluss der Drehzahl auf die Effizienz von Extraktion und Rückextraktion, $\dot{V}_{D,O,A} = 4$

Extraktion geführt. Dagegen war bei der Extraktion in einer Rührzelle² mit turbulenter Strömung kaum ein Einfluss der Akzeptorkonzentration festzustellen [Maaß 2001], was dem Ergebnis der Extraktion in den Zentrifugen entsprach, in denen ebenfalls turbulente Strömung herrschte.

Einfluss der Scherkraft

Die Scherkräfte und damit die Phasenkontakfläche in den Zentrifugalextraktoren konnten durch die Verwendung eines „High-Mix“-Einsatzes im Vergleich zu einem „Low-Mix“-Einsatz vergrößert werden. Die Emulsionsbildung wurde dagegen durch Verwendung des „Low-Mix“-Einsatzes verringert. Wie Abb. 7.4a zeigt, waren bei Verwendung des „Low-Mix“-Einsatzes Extraktions- und Rückextraktionsrate in gleichem Maß reduziert. Die Extraktionseffizienz lag um 20 % niedriger und erreichte einen maximalen Wert von 0,4 nach fünf Stunden. Bei Verwendung des „High-Mix“-Einsatzes in Extraktionen mit L-Phenylalanin in Natriumchlorid-Lösung traten weder bei der Extraktion noch bei der Rückextraktion Probleme bei der Phasentrennung auf. Daher wurde der „High-Mix“-Einsatz für die Experimente verwendet.

Einfluss der Drehzahl

Grundsätzlich hat die Drehzahl Einfluss auf die Durchmischungsintensität und die Beschleunigung in der Zentrifuge. Eine höhere Drehzahl sollte zu höheren Scherkräften und verbesserter Stoffübertragung im Spalt zwischen Rotor und Gehäusewand führen. Gleichzeitig werden bei höheren Scherkräften auch die Flüssigkeitstropfen kleiner, so dass die Abtrennung erschwert wird. Andererseits führt eine Erhöhung der Rotordrehzahl zu einer

²Der Unterschied der Experimente in einer Rührzelle zu denen in den Zentrifugen lag darin, dass die Lösungen nicht im Kreis geführt wurden, sondern bis zur Sättigung extrahiert und in einem zweiten Schritt rückextrahiert wurde.

erhöhten Zentrifugalbeschleunigung, wodurch kleinere Tropfen abgetrennt werden können. Bei zu hohen Scherkräften werden die Flüssigkeitstropfen jedoch so klein, dass es zu Emulsionsbildung kommt und die Beschleunigung nicht mehr ausreichend für die Phasentrennung ist [Meikrantz u. a. 2001]. So trat bei einer Extraktion mit wässriger L-Phenylalanin-Lösung bei einer Drehzahl von 4800 Upm Emulsionsbildung auf. Zur weitergehenden Untersuchung wurden daher Extraktionen mit niedrigeren Rotordrehzahlen von 2400 Upm ($\nu=40$ Hz, Beschleunigungsverhältnis: ≈ 150 g) und 3600 Upm ($\nu=60$ Hz, Beschleunigungsverhältnis: ≈ 340 g) durchgeführt. Dabei war kein nennenswerter Einfluss auf die Extraktionseffizienz festzustellen (siehe Abb. 7.4b). Die auftretenden Differenzen in der Extraktionseffizienz lagen im Rahmen der Messungenauigkeiten (vgl. Abschnitt A.1). Der fehlende Einfluss von erhöhten Drehzahlen auf die Extraktionsleistung war möglicherweise auf einen zu geringen Einfluss der Erhöhung auf die Stoffübertragung zurückzuführen. Zudem erfolgte die Phasentrennung im Rotor schneller, wodurch die Phasenkontaktzeit für die Stoffübertragung verkürzt wurde. Daher wurde eine Drehzahl von 2400 Upm für die weiteren Experimente verwendet.

Einfluss des Volumenstroms

Der Volumenstrom beeinflusst die Verweilzeit der Phasen in den Zentrifugen. Bei einem verringerten Volumenstrom wird die Verweilzeit in der Zentrifuge verlängert und damit die Mischzeit. Durch die verlängerte Verweilzeit im Rotor wird die Phasentrennung verbessert. Durch einen höheren Volumenstrom wird der Füllstand im ringförmigen Spalt zwischen Gehäuse und Rotor höher, d.h. die Mischung der Phasen findet über eine längere Strecke statt. Dabei bleiben die Scherkräfte in dem Spalt niedrig. Die Verweilzeit und damit die Mischung im Rotor wird dagegen kürzer. Bei Kreislaufexperimenten ist zu beachten, dass die Lösung bei verdoppeltem Volumenstrom im gleichen Zeitraum auch ungefähr doppelt so oft³ durch die Zentrifugen fließt.

Der Einfluss des Volumenstroms wurde im Bereich von 2 l/h bis 10 l/h untersucht. Bei höheren Volumenströmen war das System nicht stabil. In diesem Bereich war das System bei Verwendung von Modelllösung und gleichen Volumenströmen aller Phasen stabil. Wurde für die wässrige Phase ein Volumenstrom von 10 l/h und für die organische Phase 6 l/h verwendet, war das System dagegen nicht stabil. Ungleiche Volumenströme in Zentrifugalextraktoren führen bei insgesamt hohen Volumenströmen zur Flutung des Systems [Hafez 1983].

In den weiteren Experimenten wurde zunächst der Volumenstrom von jeweils einer Phase variiert (siehe Abb. 7.5a-c). Eine Erhöhung des Volumenstroms der Donatorphase führte zu einer verbesserten Extraktion und Rückextraktion, da bereits nach ungefähr 1,5 Stunden 80 % extrahiert waren, wohingegen bei niedrigerem Volumenstrom erst nach 4 Stunden 80 % extrahiert waren. Die Extraktionseffizienz und die Rückextraktionseffizienz wurden um ≈ 15 –20 % gesteigert. Dabei waren allerdings entweder die Messungen der Extraktion oder die der Rückextraktion ungenau, da die Rückextraktionseffizienz nicht über der Extraktionseffizienz liegen kann (vgl. Abschnitt A.1). Die Extraktionseffizienz wurde wahr-

³Die Verweilzeit wird bei einer Verdopplung des Volumenstroms nicht genau halbiert, da sich der Füllstand im Spalt zwischen Rotor und Gehäuse ändert.

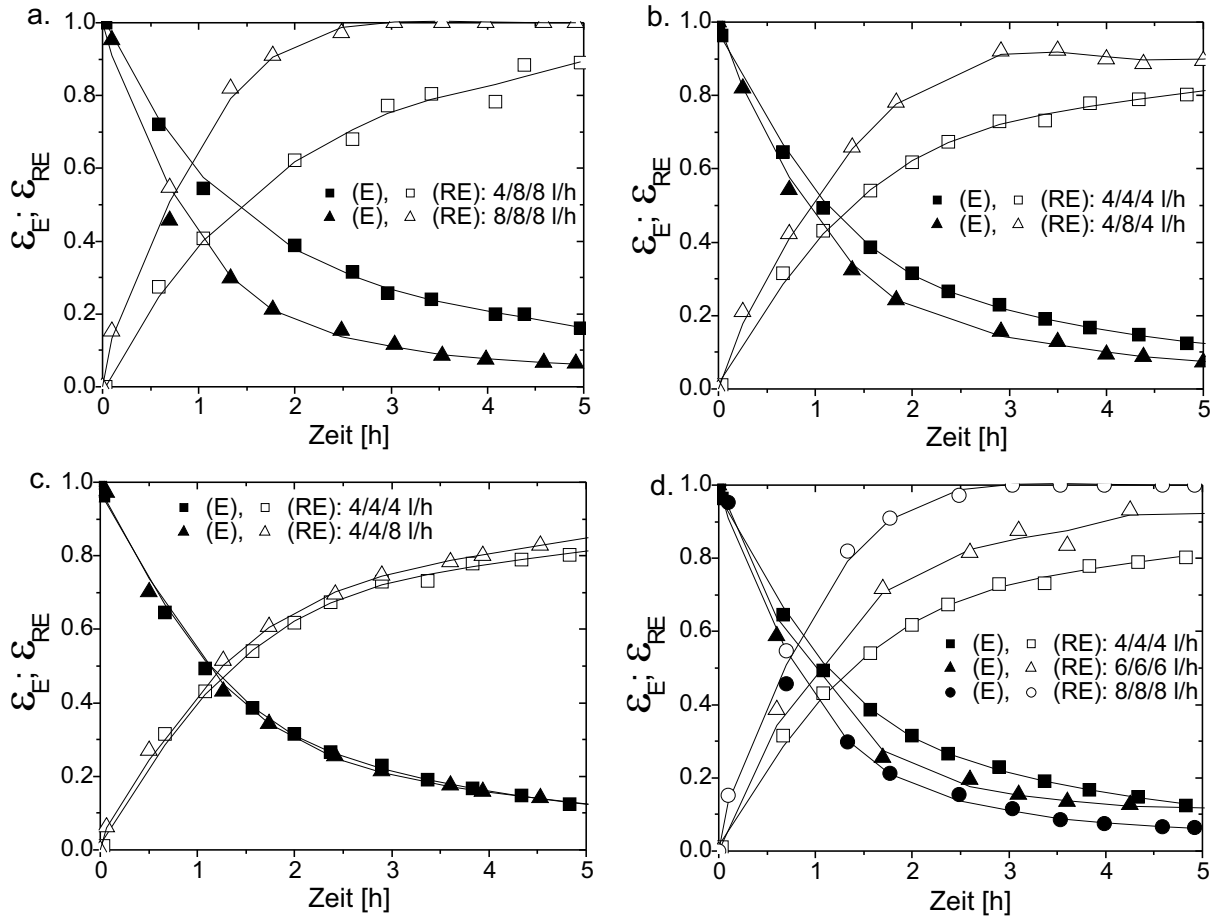


Abb. 7.5: Einfluss des Volumenstroms a. der Donatorphase; b. der organischen Phase; c. der Akzeptorphase; d. der Höhe der Volumenströme insgesamt auf die Effizienz von Extraktion und Rückextraktion, Angabe der Volumenströme in der Reihenfolge $\dot{V}_D/\dot{V}_O/\dot{V}_A$

scheinlich durch einen verdoppelten Volumenstrom gesteigert, weil die Lösung in der gleichen Zeit ungefähr doppelt so oft durch die Zentrifuge geführt wurde. Dadurch wurde mehr Carrier beladen und entsprechend mehr Carrier wieder durch den Akzeptor entladen.

Bei einer Erhöhung des Volumenstroms der organischen Phase wurde die Effizienz der Extraktion und der Rückextraktion um $\approx 10\text{--}15\%$ erhöht. Dabei war die gleiche Extraktionsleistung bei höherem Volumenstrom ungefähr eine Stunde früher erreicht. Dieses Ergebnis unterschied sich von der Extraktion in Hohlfasermembranmodulen, bei denen der Stoffübergang bei Extraktion und Rückextraktion mit abnehmendem Volumenstrom der organischen Phase zunahm [Maaß u. a. 2002]. Dieser Unterschied konnte nur durch die unterschiedlichen Strömungsverhältnisse zustande kommen. In den Hohlfasermembranmodulen herrschte laminare Strömung und durch eine Veränderung der Volumenströme änderte sich die Phasengrenzfläche nicht. Dagegen nahm die Turbulenz in den Zentrifugen bei einem höheren Volumenstrom zu und die Phasengrenzfläche wurde größer. Dadurch wurde wahrscheinlich mehr Carrier beladen und entladen.

Anders sah das Bild bei einer Erhöhung des Volumenstroms der Akzeptorphase aus, da keine Veränderung der Extraktion oder Rückextraktion festzustellen war. Ein Einfluss auf die Rückextraktion wäre dem Einfluss der Erhöhung der organischen Phase zufolge eher

zu erwarten gewesen. Da kein Einfluss festzustellen war, wurde der Carrier scheinbar bei niedrigem Volumenstrom im gleichen Maß entladen wie bei hohem Volumenstrom.

Bei weiteren Experimenten waren die Volumenströme aller Phasen jeweils gleich (siehe Abb. 7.5d). Die Effizienz der Extraktion und der Rückextraktion stiegen bei Erhöhung um je 2 l/h um 5–10 % an. Hier nicht dargestellt sind weitere Experimente bei 2 und 10 l/h. Bei einem Volumenstrom von 2 l/h waren sowohl Extraktion als auch Rückextraktion schlechter. Bei einem Volumenstrom von 10 l/h war keine Steigerung gegenüber $\dot{V}=8$ l/h festzustellen. Demzufolge war bei 8 l/h unter den gegebenen Bedingungen scheinbar eine Grenze der Extraktionsleistung erreicht. Nach fünf Stunden wurden maximal 93 % extrahiert. Wie bereits erwähnt, waren die Messungenauigkeiten bei diesem Experiment jedoch hoch.

Optimierung der Offline-Extraktion

Zur Optimierung der Extraktion wurde ein Experiment mit 180 mmol/l (30 g/l) L-Phenylalanin, 30 % D₂EHPA in Kerosin und 2 M Schwefelsäure durchgeführt. Die Rotor-drehzahl lag bei $\nu=2400$ Upm, die Volumenströme bei $\dot{V}=8$ l/h. Bereits nach 1,5 Stunden war das L-Phenylalanin zu ≈ 100 % extrahiert und rückextrahiert. Die Extraktion war damit vollständig reversibel. Durch die Optimierung der Extraktion konnten mögliche Limitierungen aufgehoben werden.

Aufkonzentrierung

Bei der Reaktivextraktion war die Konzentration der Gegenionen in der Akzeptorphase die treibende Kraft, nicht aber die L-Phenylalanin-Konzentration in der Donatorphase, so dass L-Phenylalanin entgegen dem Konzentrationsgradienten im Akzeptor aufkonzentriert werden konnte [Maaß 2001]. Ein Extraktionsexperiment zur Aufkonzentrierung wurde mit 20 l L-Phenylalanin-Lösung (90 mmol/l ≈ 15 g/l) und 1 l 10 % D₂EHPA in Kerosin sowie 2 l Schwefelsäure (1 M) durchgeführt (siehe Abb 7.6). Der Volumenstrom aller Phasen lag bei 4 l/h.

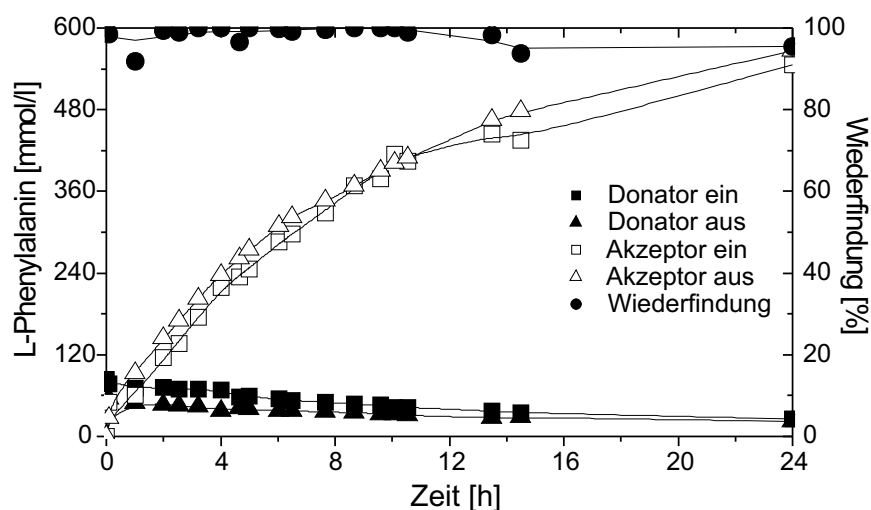


Abb. 7.6: Verlauf der L-Phenylalanin-Konzentration und der „Wiederfindung“ in einem Experiment zur Aufkonzentrierung im Akzeptor

Dabei wurde nach 24 Stunden eine Konzentration von 545 mmol/l L-Phenylalanin (90 g/l) in der Akzeptorphase und 25 mmol/l (4,1 g/l) in der Donatorphase erreicht. Die Extraktionsrate nahm nur sehr langsam ab, obwohl der Akzeptor immer stärker beladen wurde. Insgesamt wurden 65 % extrahiert. Die „Wiederfindung“ lag über den größten Teil des Experimentes zwischen 98 und 100 %. Eine Aufkonzentrierung von 90 mmol/l auf 545 mmol/l, entsprechend einem Faktor sechs war somit möglich.

Einfluss der Verweilzeit und Reversibilität der Extraktion

Zur Untersuchung des Einflusses der Verweilzeit auf die Extraktion wurden Extraktionen mit unterschiedlichen Volumenströmen mit einmaligem Durchlauf der wässrigen Donator- und Akzeptorphase durch die Zentrifugen durchgeführt [Heidersdorf 2002]. Bei der Verdopplung des Volumenstroms war die Verweilzeit in der Zentrifuge ungefähr halbiert und gleichzeitig die Scherkräfte größer. Die wässrigen Phasen wurden bei den Extraktionen in Abfallgefäßen aufgefangen, die organische Phase wurde im Kreis geführt. Der als Donator verwendete proteinfreie Fermentationsüberstand enthielt 15 g/l L-Phenylalanin. Die Ergebnisse sind in Abb. 7.7 dargestellt. Der Extraktionsgrad lag bei ungefähr 50 % unabhängig vom Volumenstrom. Der Rückextraktionsgrad bezogen auf das extrahierte L-Phenylalanin lag bei niedrigerem Volumenstrom mit 83 % deutlich über dem bei höherem Volumenstrom mit 53 %. Die „Wiederfindung“ lag bei niedrigem Volumenstrom bei über 90 %, bei hohem Volumenstrom unter 80 %. Da die „Wiederfindung“ unter 100 % lag, war die Extraktion nicht vollständig reversibel. Die Rückextraktion war scheinbar unzureichend, so dass die organische Phase mit L-Phenylalanin beladen blieb. Bereits von Maaß wurde vermutet, dass die Rückextraktion, also der Übergang des L-Phenylalanins von der organischen Phase in die Akzeptorphase limitierend ist [Maaß u. a. 2002]. Bei den zuvor beschriebenen Kreislaufexperimenten waren Extraktion und Rückextraktion dagegen durch eine Erhöhung aller Volumenströme verbessert worden. Bei Kreislaufexperimenten fließt die Lösung bei einer Erhöhung des Volumenstroms in der gleichen Zeit entsprechend häufiger durch die Zentrifugen. Es war möglich, dass die organische Phase dadurch stärker beladen wurde, so dass die Rückextraktion im Vergleich zur Extraktion besser wurde und kein Unterschied mehr festzustellen war. Genauere Untersuchungen sollten dazu durchgeführt werden.

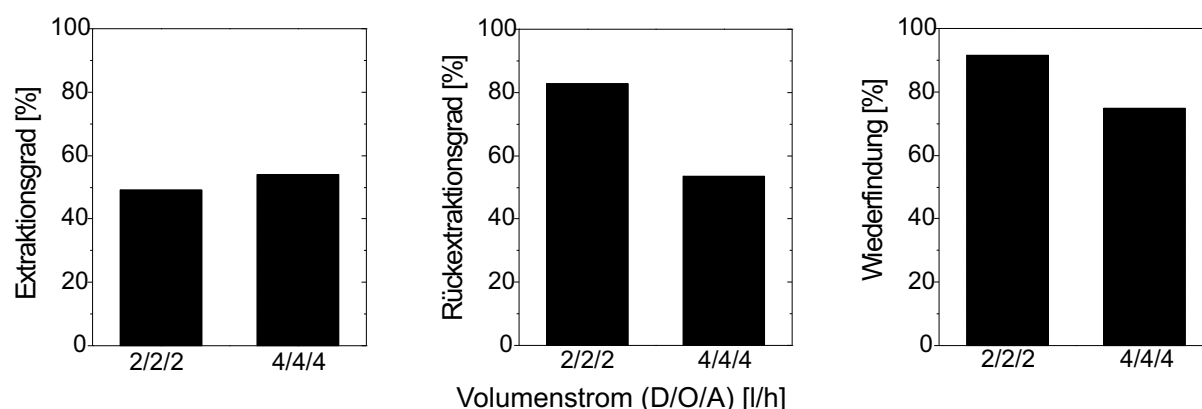


Abb. 7.7: Vergleich von Extraktions- und Rückextraktionsgrad, bezogen auf das extrahierte L-Phenylalanin bei Experimenten mit einmaligem Durchlauf von Donator- und Akzeptorphase durch die Zentrifugen bei verschiedenen Volumenströmen

Stoffübergang und Strömungsverhalten in den Flüssig-Flüssig-Zentrifugen

Die wichtigsten Ergebnisse der in den vorangegangenen Abschnitten dargestellten Kreislauf-Extraktionsexperimente sind in Tab. 7.2 zusammengefasst dargestellt.

Tab. 7.2: Einfluss auf den Stoffübergang bei Extraktion und Rückextraktion in den Zentrifugen durch die Erhöhung der Parameter (D=Donator, C=Carrier, O=organische Phase, A=Akzeptor)

Parameter	C_D	C_C	C_A	Drehzahl	High mix	$\dot{V}_D$	$\dot{V}_O$	$\dot{V}_A$
Stoffübertragung	=	↑	=	=	↑	↑	↑	=

Eine Erhöhung der Carrier-Konzentration, die Verwendung des „High-Mix“-Einsatzes, eine Erhöhung des Volumenstroms der Donatorphase und der organischen Phase hatten eine Erhöhung der Extraktionsleistung zur Folge. Die anderen Parameter hatten den Untersuchungen zufolge keinen Einfluss. Genauere Berechnungen zu Stoffübergang und Hydrodynamik in den Zentrifugen waren nicht möglich, da turbulente Strömung anzunehmen ist und die genauen Strömungsverhältnisse unbekannt sind (vgl. Abschnitt 3.3.4). Die Tropfengröße und die Phasenverteilung in den einzelnen Bereichen der Zentrifuge sind unbekannt. Zudem sind die Volumina der Phasen in den Zentrifugen nicht immer gleich, sondern abhängig von der eingesetzten Wehrscheibe, d.h. je größer die Wehrscheibe, desto kleiner das Verhältnis von wässriger zu organischer Phase. Darüber hinaus wird das Phasenvolumen vom Volumenstrom beeinflusst.

Die Extraktionsexperimente wurden zur Charakterisierung der Extraktion und zur Identifizierung von Einflüssen durchgeführt, um mit den gewonnenen Erkenntnissen eine Online-Extraktion durchführen zu können. Die für eine Online-Extraktion wichtigen Punkte eines stabilen Betriebes, sowohl mit Modelllösung als auch mit zell- und proteinfreiem Fermentationsüberstand und die mögliche Aufkonzentrierung des L-Phenylalanins im Akzeptor wurden gezeigt. Um einen Vergleich mit der Extraktion in Hohlfasermembranmodulen [Maaß 2001] durchführen zu können, wurden die im Pilotmaßstab verwendeten Volumenströme auf die Verwendung in Verbindung mit einem 20 l Bioreaktor anstelle eines 300 l Bioreaktors umgerechnet. Bei Verwendung von 10 % D₂EHPA in Kerosin und 1 M Schwefelsäure wurden demnach bei einem Volumenstrom der Donatorphase von umgerechnet 20 l/h nach einer Stunde Extraktion 32 % L-Phenylalanin extrahiert, bei einem Volumenstrom von 40 l/h wurden 42 % extrahiert. Dagegen konnten in den Zentrifugen bei nur 8 l/h im gleichen Zeitraum 70 % und bei 4 l/h immer noch 45 % extrahiert werden. Demzufolge war die Extraktionsleistung in den Zentrifugalextraktoren deutlich verbessert.

7.1.3 Parameterwahl für die Online-Extraktion

Bei einer Online-Abtrennung war eine Extraktionsrate zu gewährleisten, die mindestens der Produktbildungsrate entsprach, um die Produktkonzentration im Bioreaktor konstant zu halten. Dabei sollte der Volumenstrom jedoch nicht zu hoch sein, um Instabilitäten zu vermeiden. Eine Carrier-Konzentration von 10 % D₂EHPA wurde verwendet, da hierbei kein negativer Einfluss durch den Eintrag von Carrier festgestellt wurde [Maaß 2001].

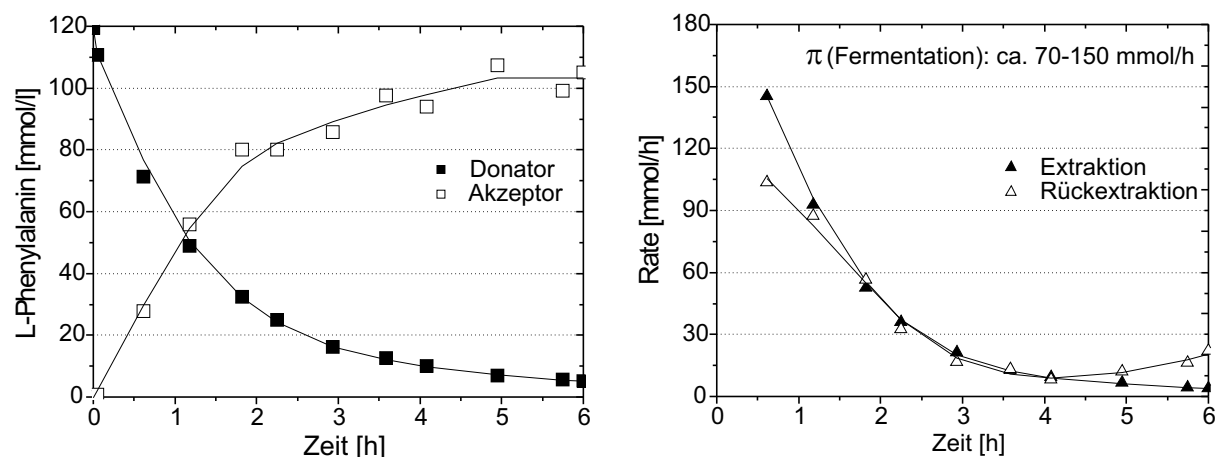


Abb. 7.8: L-Phenylalanin-Konzentrationsverlauf von Donator und Akzeptor, bezogen auf das Donatorvolumen; Verlauf der Extraktions- und Rückextraktionsraten

Die Konzentrationsverläufe und die Extraktionsraten eines Extraktionsexperimentes mit proteinfreiem Fermentationsüberstand sind in Abbildung 7.8 dargestellt. Der Volumenstrom des Donators wurde auf 3 l/h eingestellt, da der maximal zu erreichende Permeatvolumenstrom aus dem Ultrafiltrationsmodul zur Proteinerückhaltung bei $\approx 3,5$ l/h lag (vgl. Abschnitt 4.5.1). Der Volumenstrom der organischen Phase wurde auf 3,5 l/h eingestellt, da dieser den Ergebnissen der Extraktionsexperimente zufolge möglichst hoch sein sollte. Gleichzeitig sollten Unterschiede in den Volumenströmen nicht zu groß sein, um die Stabilität des Systems zu gewährleisten. Der Volumenstrom der im Kreis geführten Akzeptorphase hatte keinen Einfluss auf die Extraktion, so dass er auf ≈ 2 l/h eingestellt wurde. Durch den niedrigeren Wert sollte ein stabileres System gewährleistet und die Übertragung von Schwefelsäure in die Donatorphase durch unzureichende Phasentrennung vermieden werden.

Die L-Phenylalanin-Konzentration im Donator sank innerhalb von zwei Stunden von 120 mmol/l (20 g/l) L-Phenylalanin auf unter 30 mmol/l (5 g/l) ab, während die im Akzeptor auf über 70 mmol/l (≈ 12 g/l) stieg. Extraktions- und Rückextraktionsrate waren ungefähr gleich und nahmen mit abnehmender L-Phenylalanin-Konzentration ab. Entscheidend war, dass die Extraktionsrate bei einer L-Phenylalanin-Konzentration von 120–30 mmol/l, dem Bereich, in dem die Konzentration im Bioreaktor während einer Online-Abtrennung liegen sollte, bei 145–50 mmol/h lag. Die Produktbildungsrate in einer Fermentation lag in der Produktionsphase bei 150–70 mmol/h (≈ 5 –14 mmol/(l·h)), so dass die Einstellung für eine Online-Extraktion, bei der die L-Phenylalanin-Konzentration im Bioreaktor konstant gehalten werden sollte, geeignet sein sollte. Bei einem Arbeitsvolumen im Bioreaktor von bis zu 15 l wird die notwendige Extraktionsrate mit den hier verwendeten Zentrifugen und Volumenströmen erreicht. Bei einer Vergrößerung des Bioreaktors, aber gleicher Biomassekonzentration (≈ 30 –35 g/l) und damit einer volumetrischen Produktivität von 5–14 mmol/(l·h) könnte die notwendige Extraktionsleistung durch Dimensionierung der Zentrifuge abhängig vom notwendigen Volumenstrom für eine Abtrennung des produzierten L-Phenylalanins erfolgen. Durch Parametrisierung der Drehzahl und damit des Zentrifugalfeldes sowie des Volumenstroms und der damit verbundenen Verweilzeit wäre eine gleichbleibende Trennschärfe einzustellen.

7.2 Fermentationsprozess mit integrierter Reaktivextraktion von L-Phenylalanin

Nachdem in den Offline-Experimenten die technische Realisierbarkeit der Reaktivextraktion von L-Phenylalanin in Flüssig-Flüssig Zentrifugen gezeigt wurde, wurden Fermentationen mit Online-Abtrennung von L-Phenylalanin durchgeführt. Die Ergebnisse der Untersuchungen werden in diesem Abschnitt vorgestellt und die Auswirkungen auf den Fermentationsprozess diskutiert.

Für die Fermentationen wurde der Stamm *E. coli* 4pF81 verwendet. Generell erfolgten die Fermentationen zur Online-Abtrennung im Zulaufverfahren wie in Abschnitt 4.5 beschrieben. Umlauf und Extraktion wurden bei einer L-Phenylalanin-Konzentration von 60–90 mmol/l (10–15 g/l) während der Produktionsphase angefahren. Durch den Start nach der Wachstumsphase wurden negative Einflüsse durch Scherstress im Umlauf und die Extraktion auf das Wachstum ausgeschlossen. Die in Kapitel 6.2.2 dargestellten Untersuchungen hatten zudem gezeigt, dass die Produktbildungsraten erst nach einigen Produktionsstunden deutlich abnahmen und somit erst bei höheren Konzentrationen eine deutliche Inhibierung durch L-Phenylalanin anzunehmen war. Von Takors [Takors 2003] wurde mittels Modellierungen eine Inhibierungskonstante von $20 \pm 1,35$ g/l L-Phenylalanin ermittelt.

Für die Extraktionen wurde eine Rotordrehzahl von 2400 Upm gewählt, die sich in Offline-Experimenten als geeignet erwiesen hatte (siehe Abschnitt 7.1.2). Die Volumenströme der Extraktionsphasen werden in den jeweiligen Abschnitten angegeben. Auch die verschiedenen Ansätze zur weiteren Prozessdurchführung werden in den entsprechenden Abschnitten beschrieben.

7.2.1 Integrierte Produktabtrennung während der gesamten Produktionsphase

Der erste Ansatz einer Fermentation mit integrierter Extraktion sah eine Extraktion über annähernd die gesamte Produktionsphase vor (lange Extraktionsphase, (1))[Heidersdorf 2002]. Zum einen war die prinzipielle technische Realisierbarkeit zu untersuchen, die die kontinuierliche Bereitstellung von Permeat und die Aufrechterhaltung eines stabilen Extraktionssystems über die gesamte Extraktionsdauer beinhaltete. Zum anderen war der Einfluss der Extraktion auf die Zellen und den Gesamtprozess zu ermitteln.

Bei dieser Fermentation lag das Volumen am Anfang bei 8,5 l. Die Extraktion wurde in der Produktionsphase nach dem Ende der Wachstumsphase gestartet. Die Extraktion erfolgte online bis zum Ende der Fermentation nach 50 Stunden. Ein niedriger Volumenstrom von ≈ 2 l/h wurde sowohl für die organische als auch die Akzeptor-Phase gewählt. Durch die Wahl eines niedrigeren Volumenstroms der organischen Phase als bei der in Abschnitt 7.1.3 beschriebenen Extraktion sollte ein besonders stabiles Extraktionssystem für die lange Extraktionsphase gewährleistet werden. Der Volumenstrom des Permeats lag, bedingt durch die Filtrationsleistung der Ultrafiltrationsmodule im Umlauf, bei 3,5–1,5 l/h. Die Filtrationsraten beider Ultrafiltrationsmodule nahmen mit der Betriebsdauer des

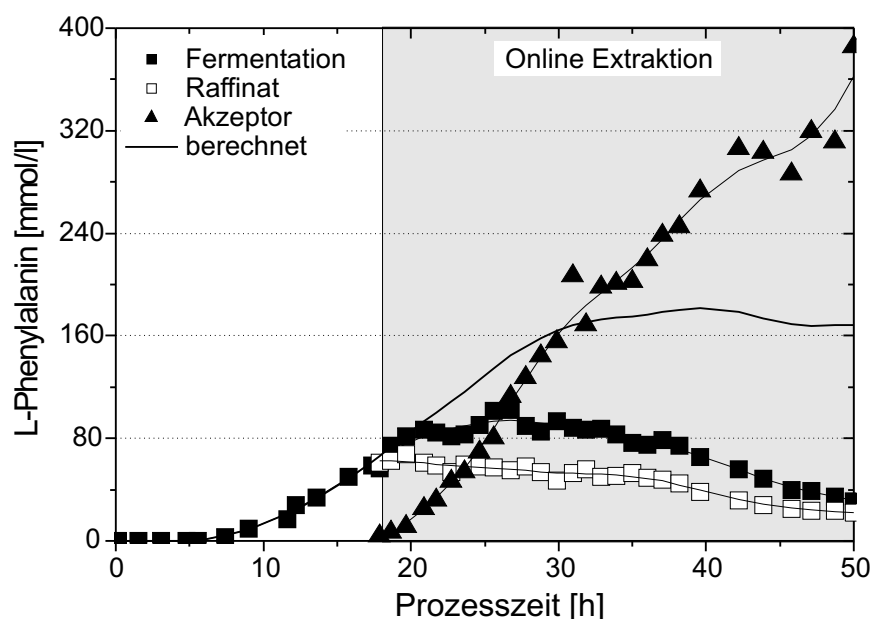


Abb. 7.9: L-Phenylalanin-Produktion in einer Fermentation mit integrierter Produktabtrennung über einen langen Abschnitt; die „berechnete“ L-Phenylalanin-Konzentration wurde aus der Summe von L-Phenylalanin im Bioreaktor und dem konzentrierten Produkt im Akzeptor bezogen auf das aktuelle Fermentationsvolumen berechnet

Umlaufs ab. Diese Abnahme war auf die Verblockung der Membranen durch Antischaum, Kerosin und D₂EHPA zurückzuführen [Gerigk 2001], [Schleicher und Schuell 2000].

Der Verlauf der L-Phenylalanin-Konzentration in der Fermentation und der Extraktion ist in Abb. 7.9 dargestellt. Zum Zeitpunkt des Starts von Umlauf und Extraktion nach 18 Stunden lag die Produktkonzentration bei ungefähr 65 mmol/l (11 g/l) L-Phenylalanin. Produktion und Extraktion liefen von diesem Zeitpunkt an parallel. Die Produktkonzentration im Bioreaktor stieg über eine Extraktionsdauer von 10 Stunden zunächst bis auf 95 mmol/l L-Phenylalanin an. Danach fiel sie erst leicht und in den letzten 12 Prozessstunden dann stärker bis auf 32 mmol/l L-Phenylalanin ab. Im Raffinat, das die Zentrifuge zur Extraktion verließ und in den Bioreaktor zurückgeführt wurde, war die L-Phenylalanin-Konzentration mehr als halb so hoch wie die im Bioreaktor. Die Konzentration im Akzeptor stieg kontinuierlich bis auf ≈ 360 mmol/l (60 g/l). Dieser Wert war deutlich höher als die L-Phenylalanin-Konzentration im Bioreaktor, da das Volumen der Schwefelsäure (Akzeptor) bei 5 l lag, während im Bioreaktor 10–15 l Fermentationsbrühe vorlagen. Das Produkt wurde wie bei der Offline-Extraktion (siehe Abschnitt 7.1.2) unter Verringerung des Volumens aufkonzentriert. Eine maximale „berechnete“ L-Phenylalanin-Konzentration von 180 mmol/l (30 g/l) wurde nach 40 Stunden erreicht. Die „berechnete“ Konzentration wurde aus der Summe von L-Phenylalanin im Bioreaktor und im Akzeptor bezogen auf das aktuelle Fermentationsvolumen ermittelt. Mit 170 mmol/l L-Phenylalanin lag die Konzentration nach 50 Stunden etwas unter der in einer Fermentation ohne Reaktivextraktion erreichten Konzentration von 206 mmol/l L-Phenylalanin (vgl. Abschnitt 5.1). Da die L-Phenylalanin-Konzentration im Bioreaktor am Ende der Extraktion niedriger lag als am Anfang der Extraktion, wurde während dieser Zeit mehr L-Phenylalanin extrahiert als in derselben Zeit produziert wurde.

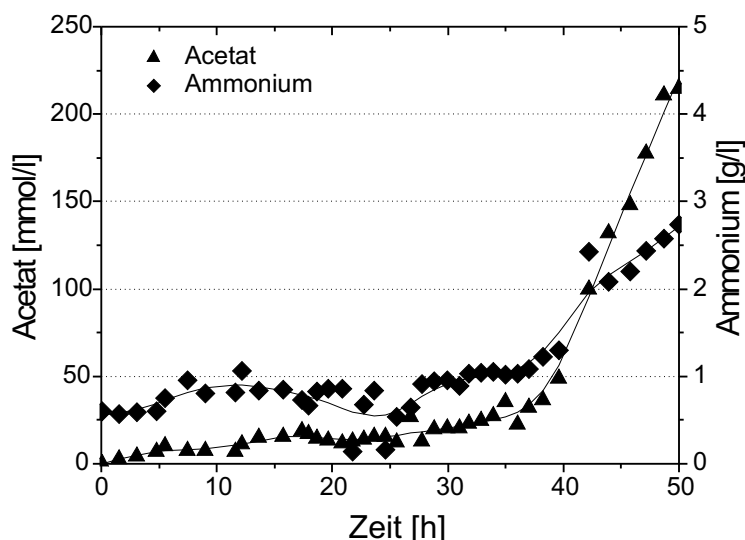


Abb. 7.10: Verlauf der Konzentrationen von Acetat und Ammonium im Bioreaktor

Die Acetat- und die Ammoniumkonzentration während der Fermentation zeigt Abb. 7.10. In den ersten 38 Prozessstunden war kaum Acetat nachweisbar. Ab $t = 38 \text{ h}$ jedoch war ein deutlicher Anstieg der Acetatkonzentration auf über 200 mmol/l (12 g/l) festzustellen. Die Ammoniumkonzentration stieg mit zunehmender Acetatkonzentration ebenfalls an, lag aber während des gesamten Prozesses unter 3 g/l und damit unter der inhibierenden Konzentration von 3,6 g/l [Thompson u. a. 1985]. Als weiteres Nebenprodukt wurden vergleichbar zu einer Fermentation ohne integrierte Extraktion bis zu 13 mmol/l Shikimat gemessen. 3-Dehydroshikimat, das in Fermentationen ohne integrierte Aufarbeitung gebildet wurde, war hier nicht nachzuweisen. Vermutlich wurde der Fluss durch die Aromatenbiosynthese durch die Extraktion verbessert, da keine Anhäufung dieses Intermediats stattfand.

Wie in Abb. 7.11 dargestellt, lag die Konzentration der Biotrockenmasse während des Fermentationsprozesses bei ungefähr 33 g/l. Die Biomasse-spezifische Produktbildungsrate lag nach der Induktion bei $t = 7 \text{ h}$ zwischen 0,43 mmol/(g·h) und 0,34 mmol/(g·h). Während der Online-Extraktion blieb die Produktbildungsrate zunächst konstant. Ab $t = 26 \text{ h}$ begann die Produktbildungsrate jedoch bis $t = 33 \text{ h}$ auf 0,11 mmol/(g·h) abzusinken und fiel nach 40 Stunden auf Null ab. Zu diesem Zeitpunkt setzte starke Acetatbildung ein. Acetatbildung, bedingt durch eine Sauerstofflimitierung der Zellen im Umlauf zur Zellrückhaltung, konnte ausgeschlossen werden, da die Bedingungen durchgehend gleich waren. Bei einer Sauerstofflimitierung hätte also bereits zu einem früheren Zeitpunkt Acetatbildung auftreten müssen. Acetatbildung wurde in Abschnitt 6.2.2 als Kriterium für die abnehmende Fähigkeit der Zellen zur L-Phenylalanin-Produktion gewertet. L-Phenylalanin war hier nicht in inhibierender Konzentration im Bioreaktor vorhanden. Stattdessen war vielmehr von einer Veränderung der Zellaktivität durch eine Schädigung der Zellen auszugehen, die zur Abnahme der Produktbildung führte. Die Zellen wurden im Ultrafiltrationsmodul im Umlauf zur Zellrückhaltung hohen Scherraten ausgesetzt. Vergleichsexperimente mit und ohne Umlauf zur Zellrückhaltung von Gerigk hatten gezeigt, dass die L-Phenylalanin-Produktion bei Umlaufbetrieb geringer war

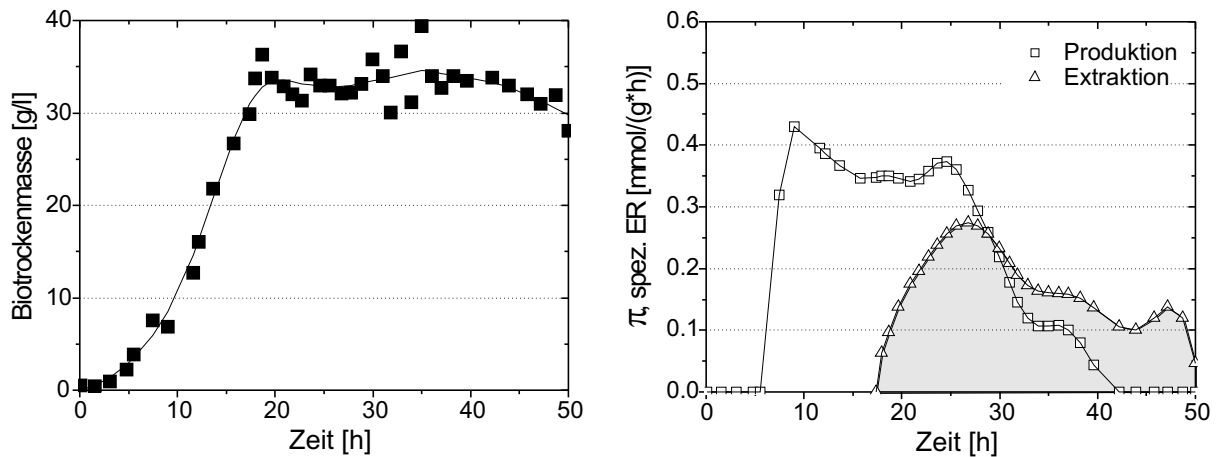


Abb. 7.11: Verlauf der Biomassekonzentration und der Biomasse-spezifischen Produktbildungs- und Extraktionsraten (spez. ER); Berechnung der Produktbildungsrate aus der „berechneten“ L-Phenylalanin-Konzentration

[Gerigk 2001]. Die Zellaktivität nahm mit zunehmender Betriebszeit immer mehr ab und die Zellen wurden geschädigt. Daneben war ein zunehmender Eintrag von organischer Phase in den Bioreaktor durch die Rückführung des die Extraktion verlassenden Raffinats wahrscheinlich. Insbesondere das in Wasser gering lösliche D₂EHPA wurde aufgrund der großen Phasengrenzfläche bei der Extraktion in Zentrifugen möglicherweise eingetragen. Eine für die Zellen kritische Konzentration wäre demzufolge nach ungefähr 20 Stunden Extraktion (≈ 38 Stunden Fermentation) erreicht gewesen.

Die Extraktionsrate, die sich aus der L-Phenylalanin-Konzentration im Akzeptor bezogen auf die Biomasse im Bioreaktor berechnete, stieg während der ersten Stunden der Extraktion auf 0,28 mmol/(g·h) an. Damit lag sie zunächst niedriger als die Produktbildungsrate, so dass die Produktkonzentration im Bioreaktor anstieg. Im weiteren Verlauf sank die Produktbildungsrate stärker als die Extraktionsrate, die bis zum Ende zwischen 0,1 mmol/(g·h) und 0,16 mmol/(g·h) lag. Dadurch nahm die Konzentration im Bioreaktor ab und das produzierte L-Phenylalanin wurde fast vollständig extrahiert (vgl. Abb. 7.9). Aufgrund der sinkenden Produktkonzentration nahm jedoch auch die Extraktionsrate ab. Dabei lag der Extraktionsgrad über die gesamte Extraktionsdauer bei ungefähr 35 %.

Die integrale Selektivität erreichte einen Maximalwert von 14,7 mol/mol % nach 29 Stunden und lag am Ende der Fermentation bei 11,6 mol/mol %. Dieser Wert lag deutlich unter dem in einer Fermentation ohne integrierte Aufarbeitung erreichten integralen Endwert der Selektivität von 14,5 %.

Mit dem Experiment konnte gezeigt werden, dass die Extraktion in den Zentrifugalextraktoren online durchführbar war [Rueffler u. a. 2002]. Es gab keine technischen Probleme bei der Permeatbereitstellung und der Extraktionsdurchführung. Das System war über die gesamte Prozesszeit stabil. Darüber hinaus war in den ersten 20 Stunden der Extraktion trotz des direkten Phasenkontaktes von Fermentationspermeat und organischer Phase kein negativer Einfluss der Extraktion auf den Fermentationsprozess festzustellen. Das L-Phenylalanin wurde im Akzeptor aufkonzentriert, so dass die Konzentration im Akzep-

tor am Ende mehr als zehnmal so hoch war wie im Bioreaktor. Insgesamt konnten mit 1,7 mol L-Phenylalanin 3/4 des produzierten L-Phenylalanins (2,26 mol) extrahiert werden.

7.2.2 Integrierte Produktabtrennung mit zwei Extraktionsphasen während der Produktionsphase

Die Online-Extraktion über mehr als 20 Stunden hatte gezeigt, dass bis zu diesem Zeitpunkt kein negativer Einfluss auf die Stoffwechselaktivität der Zellen und damit die L-Phenylalanin-Bildung festzustellen war, sondern erst bei längerer Extraktionsdauer. Daher wurde die Extraktionsdauer als Optimierungsparameter gewählt. Um einen negativen Einfluss zu vermeiden, wurde ein Experiment mit nur 18 Stunden Gesamtextraktionsdauer durchgeführt. Zusätzlich wurde dadurch die Betriebsdauer des Umlaufs und damit die Einwirkung der Scherkräfte auf die Zellen verkürzt. Um gleichzeitig die Zellaktivität nach deutlich kürzerer Online-Extraktion zu untersuchen, wurde die Extraktion in zwei Phasen von 8 und 10 Stunden aufgeteilt (zwei Extraktionsphasen (2)).

Ein Anfangsvolumen von 10 l wurde gewählt, um das Verhältnis von Fermentationsvolumen zu Umlauf-Volumen zu vergrößern. Dadurch sollte die Änderung der Biomassekonzentration im Bioreaktor, insbesondere bei Permeatverlusten durch das Abschalten und erneute Anschalten der Extraktion, minimiert werden. Dem Verlauf der in Abschnitt 7.2.1 dargestellten Fermentation zufolge, sollte eine Fermentation mit diesem relativ hohen Anfangsvolumen in dem verwendeten 20 l Bioreaktor technisch möglich sein. Die Extraktion wurde kurz nach dem Ende der Wachstumsphase in der Produktionsphase gestartet. Der Volumenstrom des Permeats lag zwischen 3,5 und 1,5 l/h. Der Volumenstrom der organischen Phase wurde mit $\approx 3,5$ l/h höher gewählt als bei der vorangegangenen Online-Extraktion, um den Extraktionsgrad zu erhöhen und entsprach damit den in Abschnitt 7.1.3 getesteten Werten. Dadurch sollte eine konstante Produktkonzentration im Bioreaktor oder sogar eine Absenkung der Konzentration erreicht werden. Dem genannten Offline-Experiment entsprechend wurde für die Akzeptorphase ein Volumenstrom von ≈ 2 l/h gewählt. Die erste Extraktionsphase lief über 8 Stunden. Danach wurde die Extraktion abgeschaltet und die Zentrifugen und der Umlauf zur Proteinrückhaltung gereinigt, während der Umlauf zur Zellrückhaltung weiter lief, um eine Verblockung der Ultrafiltrationsmembran und eine Inaktivierung der Zellen im Umlauf zu verhindern. Nach 6 Stunden wurde die Extraktion unter Verwendung neuer Akzeptorlösung erneut für 10 Stunden integriert. Danach wurde die Fermentation ohne Umlauf und Extraktion bis Stunde 50 fortgesetzt.

Wie in Abb. 7.12 dargestellt, lag die L-Phenylalanin-Konzentration bei Start der Extraktion bei 80 mmol/l (13 g/l). Während der ersten Extraktionsphase stieg die Konzentration im Bioreaktor auf 120 mmol/l (19,5 g/l) an, die im Akzeptor auf 134 mmol/l (22 g/l). Die Konzentration im Raffinat lag bei ungefähr 2/3 der Konzentration im Permeat. Die Extraktionsleistung war nicht ausreichend, um die Konzentration im Bioreaktor konstant zu halten, obwohl ein höherer Volumenstrom der organischen Phase einen höheren Extraktionsgrad zur Folge hätte haben sollen. Nach der ersten Extraktionsphase wurde jedoch Feststoff in der ersten Zentrifuge gefunden. Die Feststoffbildung war nur durch unzureichende Rückhaltung der Proteine im Ultrafiltrationsmodul zu erklären. Die

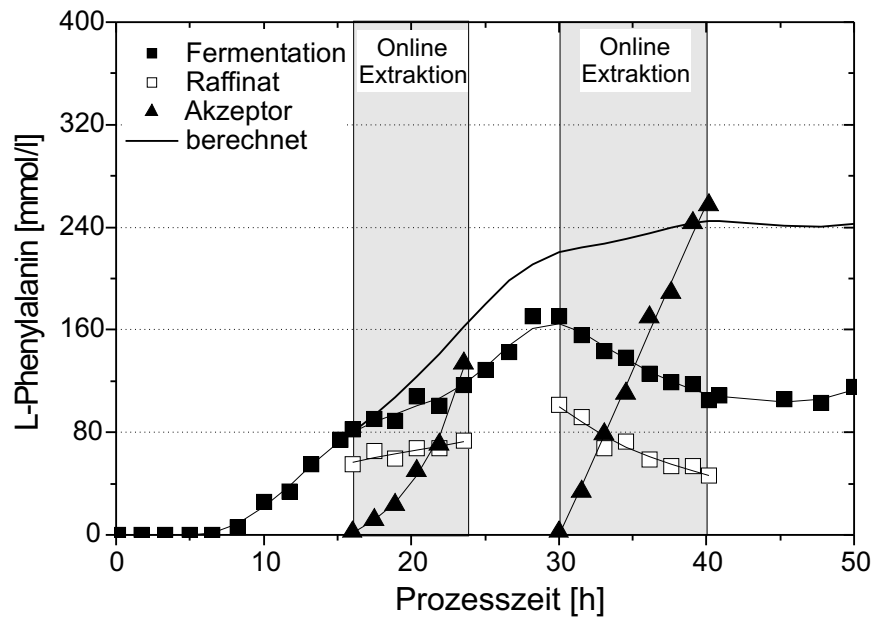


Abb. 7.12: L-Phenylalanin-Produktion in einer Fermentation mit integrierter Produktabtrennung über zwei Extraktionsphasen. Die „berechnete“ L-Phenylalanin-Konzentration berechnete sich aus der Summe von L-Phenylalanin im Bioreaktor und dem konzentrierten Produkt im Akzeptor bezogen auf das aktuelle Fermentationsvolumen

mehrfache Benutzung der Kassetten hatte diese stark beansprucht und wahrscheinlich für Proteine durchlässiger gemacht. Durch Verwendung neuer Kassetten konnte dieses Problem behoben werden. Der Einfluss der Feststoffbildung wird in Abschnitt 7.2.5 beschrieben. In der nächsten Phase ohne Extraktion konnte ein Anstieg der Produktkonzentration bis auf 170 mmol/l (28 g/l) L-Phenylalanin festgestellt werden. Die Zellen waren demzufolge noch aktiv, d.h. die Feststoffbildung sowie die Extraktion hatten bei einer Extraktionsdauer von acht Stunden offensichtlich keinen negativen Effekt auf die Zellen. Während der zweiten Extraktionsphase lag die Raffinatkonzentration ungefähr bei der Hälfte der Permeatkonzentration. Am Ende dieser Extraktionsphase waren in der Schwefelsäure 260 mmol/l (42,5 g/l) L-Phenylalanin, im Reaktor nur noch 105 mmol/l (17 g/l) L-Phenylalanin nachweisbar. In beiden Extraktionsphasen wurden bezogen auf 5 l Akzeptorvolumen insgesamt 395 mmol/l (65 g/l) L-Phenylalanin extrahiert. Wiederum hatte sich in der ersten Zentrifuge Feststoff gebildet, allerdings nur eine sehr geringe Menge im Vergleich zur ersten Extraktionsphase. In den letzten zehn Stunden fand keine weitere Produktion statt. Die theoretische Konzentration erreichte 240 mmol/l (40 g/l) und lag damit deutlich über der Konzentration von 170 mmol/l L-Phenylalanin, die im Experiment mit Extraktion über die gesamte Produktionsphase erreicht wurde.

Die Biomasse-spezifische Produktbildungsrate und Extraktionsrate dieser Fermentation zeigt Abb. 7.13. Zum Startzeitpunkt der Online-Extraktion nach 16 Stunden lag die Produktbildungsrate bei 0,43 mmol/(g·h). Während der ersten Extraktionsphase stieg die Produktbildungsrate leicht an und sank in der Phase ohne integrierte Produktabtrennung auf 0,14 mmol/(g·h). Während der zweiten Extraktionsphase blieb sie ungefähr bei diesem Wert. Erst nach dem Ende dieser Extraktionsphase nach 40 Stunden sank sie fast auf Null. Während die Abnahme in der Zeit zwischen den beiden Extraktionsphasen mit der an-

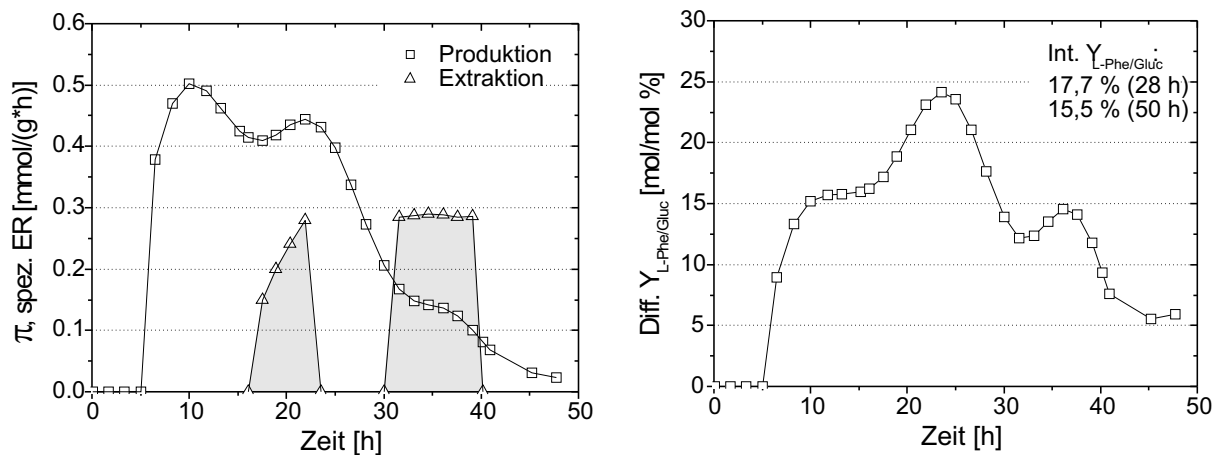


Abb. 7.13: Verlauf der Biomasse-spezifischen Produktbildungs- und Extraktionsraten (spez. ER) und der differentiellen L-Phenylalanin-Glucose-Selektivität; Berechnung der Produktbildungsrate und der Selektivität aus der „berechneten“ L-Phenylalanin-Konzentration

steigenden und zunehmend inhibierenden L-Phenylalanin-Konzentration zu erklären war, konnte die Abnahme am Ende nur auf einen negativen Einfluss der Online-Abtrennung auf die Zellaktivität zurückzuführen sein. Obwohl die L-Phenylalanin-Konzentration im Bioreaktor nur bei 17 g/l lag, wurde nicht mehr L-Phenylalanin produziert. Vergleichbar mit der in Abschnitt 7.2.1 beschriebenen Fermentation wurde in den letzten 10 Fermentationsstunden Acetat gebildet. Wiederum waren wahrscheinlich eine zu lange Scherkrafteinwirkung durch den Umlauf oder ein Eintrag zu großer Mengen organischen Lösungsmittels verantwortlich. Die Extraktionsrate lag während der ersten Extraktionsphase bei 0,15–0,28 mmol/(g·h) und damit zunächst niedriger als die Produktbildungsrate, so dass die Konzentration im Bioreaktor anstieg (vgl. Abschnitt 7.2.5). Während der zweiten Extraktionsphase lag die Extraktionsrate durchgehend bei 0,28 mmol/(g·h), deutlich über der Produktbildungsrate, wodurch sich die Abnahme der Produktkonzentration erklären ließ.

Die differentielle molare L-Phenylalanin-Glucose-Selektivität stieg nach dem Start der Extraktion bis auf einen Maximalwert von fast 25 mol/mol % bis $t = 24$ h an (siehe Abb. 7.13). In der Phase ohne Online-Extraktion sank der Wert auf ≈ 13 mol/mol %. Während der zweiten Extraktionsphase stieg die Selektivität nochmal leicht an und fiel ab $t = 40$ h auf nahe Null ab, vergleichbar mit der Produktbildungsrate. Die integrale Selektivität erreichte einen Maximalwert von 17,7 mol/mol % nach 28 Stunden und 15,5 mol/mol % am Ende der Fermentation. Gegenüber der vorangegangenen Fermentation konnte die Selektivität des Prozesses deutlich gesteigert werden und lag mit 15,5 mol/mol % am Ende über dem Wert von 14,5 mol/mol % einer Fermentation ohne Abtrennung (vgl. Abschnitt 7.2.6).

7.2.3 Integrierte Produktabtrennung über einen Abschnitt der Produktionsphase

Der Einfluss einer Online-Produktabtrennung von 18 Stunden Dauer auf den Fermentationsprozess wurde in einem weiteren Experiment genauer untersucht (kurze Extraktionsphase (3)) [Heidersdorf 2002]. Gegenüber dem in Abschnitt 7.2.2 dargestellten Experiment wurde hier 18 Stunden ununterbrochen extrahiert, so dass ein möglicher negativer Einfluss durch einen langen Betrieb des Umlaufs zur Zell-Rückhaltung und dem damit verbundenen Scherstress weiter reduziert wurde. Die Fermentation wurde nach dem Ende der Extraktion fortgesetzt, um die Stoffwechselaktivität der Zellen nach der Online-Extraktionsphase zur ermitteln.

Um einen direkten Vergleich mit dem Experiment mit zwei Extraktionsphasen zu ermöglichen, wurden 10 l Anfangsvolumen gewählt. Die Extraktion wurde aus technischen Gründen erst nach 22 Stunden gestartet. Der Volumenstrom des Permeats für die Extraktion lag auch in diesem Experiment zwischen 1,5 und 3,5 l/h, der der organischen Phase wieder bei 3,5 l/h und der des Akzeptors bei ≈ 2 l/h.

Eine erste Fermentation mit 18 Stunden Extraktion, deren Ergebnisse hier nicht dargestellt werden, hatte ergeben, dass die L-Phenylalanin-Konzentration bei Einstellung der genannten Zentrifugenparameter während der Online-Extraktion konstant gehalten werden konnte. Nach Abschaltung der Extraktion stieg die L-Phenylalanin-Konzentration von 103 mmol/l auf maximal 120 mmol/l (20 g/l) an. Somit waren die Zellen nach dem Ende der Extraktion noch etwas aktiv. Die „berechnete“ Konzentration erreichte 220 mmol/l (36,5 g/l) L-Phenylalanin, die integrale Selektivität lag bei 14,9 mol/mol %. Damit wurde keine Verbesserung gegenüber der Fermentation mit integrierter Extraktion über zwei Extraktionsphasen erreicht. Am Ende der Extraktion befand sich wenig Feststoff in den Zentrifugen. In diesem Experiment wurde wie zuvor D₂EHPA von HOECHST verwendet. Dieses wies jedoch bei den in Abschnitt 7.1.1 dargestellten Untersuchungen eine geringere Reinheit auf und die Phasentrennung war schlechter als bei dem D₂EHPA des Herstellers MERCK. Daher wurde D₂EHPA des Herstellers MERCK in dem nachfolgend beschriebenen Experiment mit den gleichen Fermentations- und Extraktionsbedingungen verwendet.

Die resultierenden L-Phenylalanin-Konzentrationen der Fermentation mit kurzer Extraktionsphase (3) sind in Abb. 7.14 dargestellt. Nach der Induktion bei $t = 7$ h stieg die L-Phenylalanin-Konzentration bis auf 90 mmol/l (15 g/l) nach 22 Stunden an. Die zu diesem Zeitpunkt vergleichsweise niedrige Konzentration war auf eine anfangs etwas niedrigere Biomassekonzentration als in den vorangegangenen Experimenten zurückzuführen. Während der Extraktionsphase von $t = 22 - 40$ h blieb die L-Phenylalanin-Konzentration im Bioreaktor konstant. Das während dieser Zeit produzierte L-Phenylalanin wurde extrahiert. Das die Zentrifuge verlassende Raffinat, das in den Bioreaktor zurückgeführt wurde, enthielt ungefähr halb so viel L-Phenylalanin wie das Eingangspereat. Die L-Phenylalanin-Konzentration in der Schwefelsäure lag am Ende bei 350 mmol/l (58 g/l). Durch den im Vergleich zu dem Experiment mit integrierter Extraktion über die gesamte Produktionsphase hohen Volumenstrom der organischen Phase wurde die Konzentration in diesem Experiment schneller erreicht.

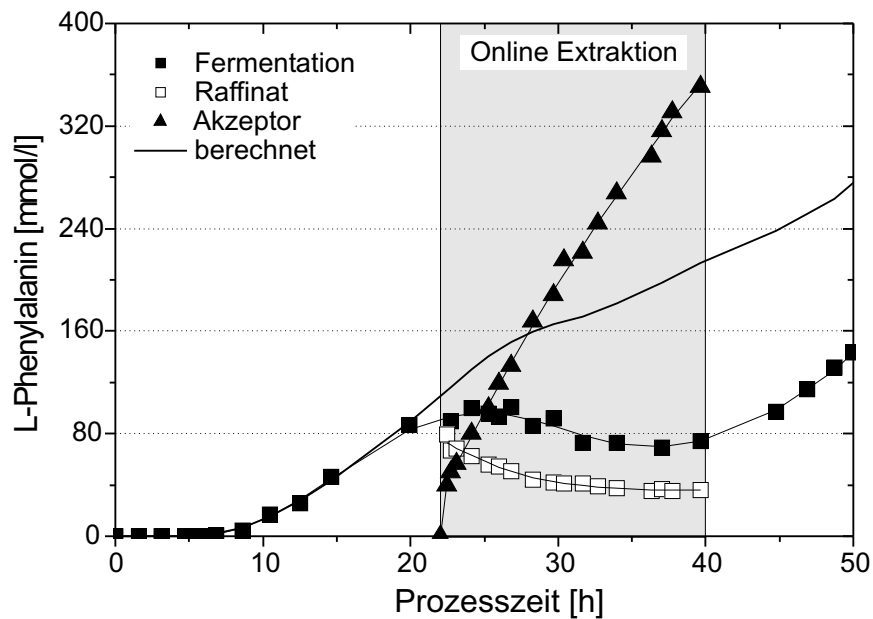


Abb. 7.14: L-Phenylalanin-Produktion in einer Fermentation mit integrierter Produktabtrennung über einen Abschnitt der Produktionsphase. Die „berechnete“ L-Phenylalanin-Konzentration berechnete sich aus der Summe von L-Phenylalanin im Bioreaktor und dem konzentrierten Produkt im Akzeptor bezogen auf das aktuelle Fermentationsvolumen

Nach 40 Stunden wurde die Extraktion beendet, die Fermentation wurde dagegen bis $t = 50 \text{ h}$ weitergeführt. Während dieses letzten Teils war noch ein deutlicher Anstieg der L-Phenylalanin-Konzentration bis auf 143 mmol/l ($23,5 \text{ g/l}$) zu erkennen. Die Zellen waren noch aktiv. Kein negativer Einfluss durch die Extraktion und den Kontakt zwischen organischer Phase und Fermentationsmedium konnte festgestellt werden. In den Zentrifugen war kein Feststoff gebildet worden. Eine „berechnete“ L-Phenylalanin-Konzentration von 275 mmol/l ($45,5 \text{ g/l}$) wurde erreicht.

Weitere Daten zur integrierten Produktabtrennung sind in Abb. 7.15 dargestellt. Die Biomasse-spezifische Produktbildungsrate, basierend auf den „berechneten“ L-Phenylalanin-Konzentrationen, erreichte Werte von $0,4 \text{ mmol/(g}\cdot\text{h)}$ während der Produktionsphase. Nach dem Beginn der Extraktion sank der Wert, wahrscheinlich aufgrund von negativen Effekten auf die produzierenden Zellen durch die Scherung im Umlauf. Im weiteren Verlauf blieb die Produktbildungsrate bei Werten zwischen $0,2\text{--}0,25 \text{ mmol/(g}\cdot\text{h)}$. Es war anzunehmen, dass dies auf den positiven Einfluss der Extraktion zurückzuführen war. L-Phenylalanin wurde mit Extraktionsraten von $0,25\text{--}0,3 \text{ mmol/(g}\cdot\text{h)}$ extrahiert. Ein Vergleich von Produktion und Extraktion zeigte eine leicht erhöhte Extraktionsrate gegenüber der Produktbildungsrate während der Extraktion. Das bedeutete, dass das gesamte während dieser Zeit produzierte L-Phenylalanin abgetrennt und die Konzentration im Reaktor sogar reduziert wurde. Der Extraktionsgrad lag bei ungefähr 48% . Insgesamt wurde ungefähr die Hälfte ($1,76 \text{ mol} = 290 \text{ g}$) des gesamten produzierten L-Phenylalanins während der Fermentation extrahiert ($3,73 \text{ mol} = 616 \text{ g}$).

Abb. 7.16 zeigt den Verlauf der differentiellen und integralen Produkt-Substrat-

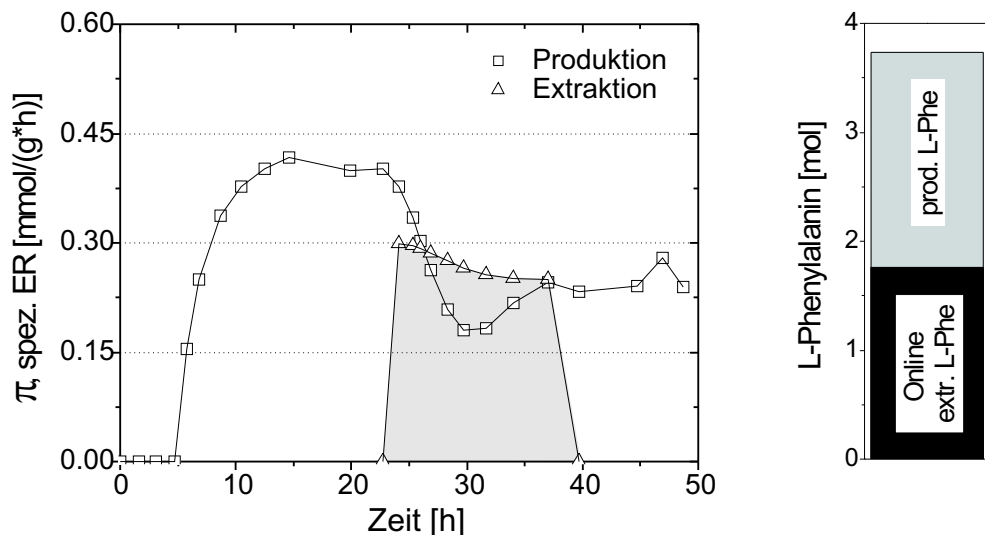


Abb. 7.15: Verlauf der Biomasse-spezifischen Produktbildungs- und Extraktionsraten (spez. ER); Berechnung der Produktbildungsrate und aus der „berechneten“ L-Phenylalanin-Konzentration; Gesamtmenge des produzierten und des extrahierten L-Phenylalanins

Selektivität. Die differentielle L-Phenylalanin-Glucose-Selektivität lag während der Online-Extraktion zwischen 17–20 mol/mol %. Nach dem Ende der Extraktion wurden über 25 mol/mol % erreicht. Die differentielle Selektivität kann jedoch nur zum Herausstellen von Tendenzen herangezogen werden, da die Werte relativ ungenau sind. Das lag in den Volumenverlusten während der Extraktion begründet, die zwar in die Berechnung der „berechneten“ L-Phenylalanin-Konzentration eingingen, die die Berechnung differentieller Größen aber dennoch ungenauer machten. Die integrale L-Phenylalanin-Glucose-Selektivität lag während der Extraktionsphase konstant bei 16,5 mol/mol % und erreichte am Ende des Fermentationsprozesses 18,6 mol/mol %.

Während dieser Fermentation wurde kaum Acetat gebildet. Die maximal erreichte Konzentration am Ende lag bei nur 90 mmol/l (5,4 g/l). Daneben wurden vor dem Start der

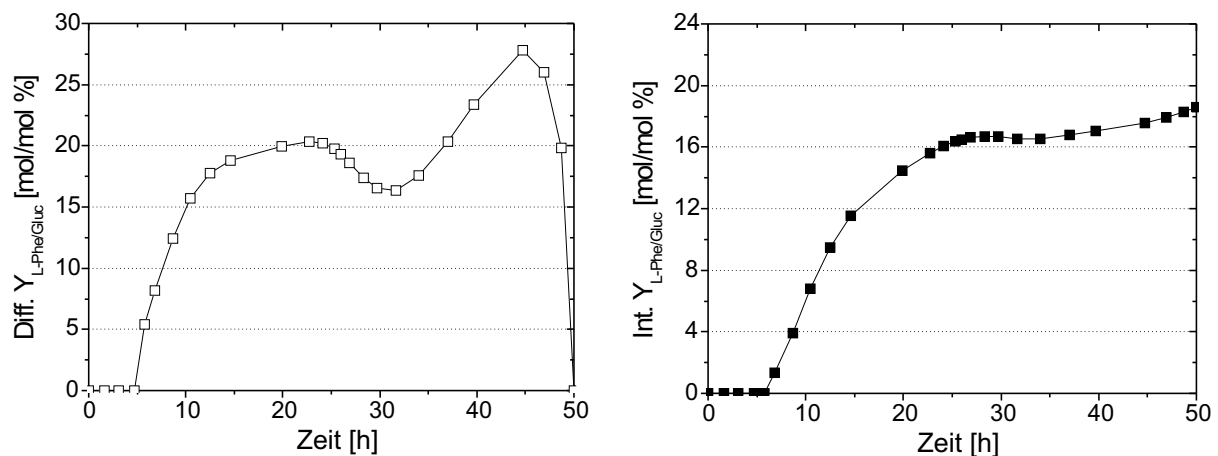


Abb. 7.16: Verlauf der differentiellen und der integralen L-Phenylalanin-Glucose-Selektivität, berechnet aus der „berechneten“ L-Phenylalanin-Konzentration

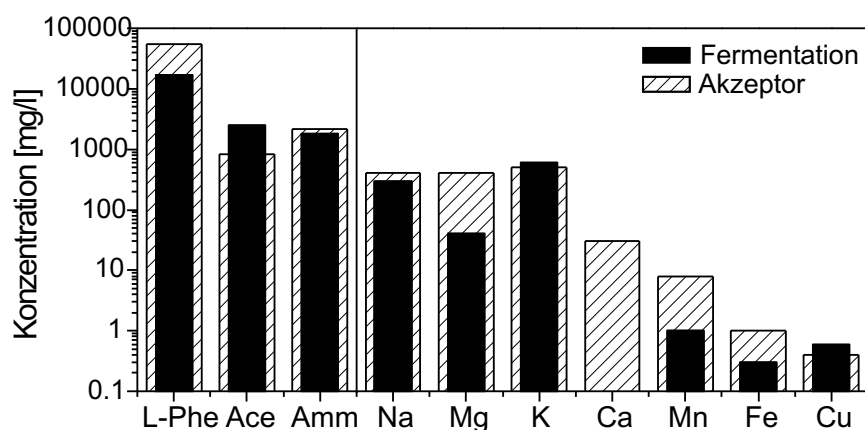


Abb. 7.17: Anteil verunreinigender organischer Säuren und Kationen im Akzeptor

Extraktion wenig Shikimat und 3-Dehydroshikimat gebildet. Ein negativer Effekt durch die Extraktion konnte in dieser Fermentation nicht festgestellt werden. Der Start der Extraktion zu einem späteren Zeitpunkt hatte keine negativen Auswirkungen, denn die L-Phenylalanin-Konzentration lag zu diesem Zeitpunkt noch niedrig. Da die Zellen am Ende der Fermentation noch sehr aktiv waren, war ein positiver Effekt durch die Extraktion anzunehmen. Weitere Untersuchungen werden in den nachfolgenden Abschnitten vorgestellt und die Einflüsse diskutiert.

7.2.4 Selektivität der Produktabtrennung

Zur Bestimmung der Selektivität der Online-Produktabtrennung wurden HPLC-Analysen für Aminosäuren und organische Säuren durchgeführt. Außerdem wurde die Kationenkonzentration in der Fermentationsbrühe und in der Akzeptorlösung am Ende einer Extraktion, die über einen Abschnitt der Produktionsphase lief, über eine Elementaranalyse mittels ICP-MS bestimmt (siehe Abb. 7.17). In der Schwefelsäure waren sehr geringe Mengen Acetat vorzufinden. Acetat konnte nur extrahiert werden, wenn es ungeladen vorlag und dadurch in organischem Lösungsmittel löslich war. Mit einem Wert von 4 lag der pH-Wert des die Extraktion verlassenden Raffinats unterhalb des pKa-Wertes von Acetat von 4,57. An der Phasengrenze zwischen wässriger und organischer Phase war der pH-Wert durch den Protonenübergang vom Carrier in die wässrige Phase im Austausch mit L-Phenylalanin-Kationen noch niedriger anzunehmen, so dass eine Extraktion von Acetat möglich war. In den weiteren Experimenten war Acetat ebenfalls kaum oder gar nicht im Akzeptor nachweisbar. Für Shikimat (pK_s 4,15) galt das gleiche wie für Acetat, doch Shikimat war im Bioreaktor nur in so geringer Konzentration vorhanden (13 mmol/l), dass es in der Schwefelsäure nicht nachgewiesen wurde. Die Ammoniumkonzentration in Akzeptor und Fermentationsbrühe war ungefähr gleich groß. Ammoniumionen konnten über den Carrier in Konkurrenz zu L-Phenylalanin extrahiert werden. Da die Konzentration an Ammonium im Vergleich zur L-Phenylalanin-Konzentration jedoch gering war, war auch der Einfluss gering. Die Konzentration der mittels ICP-MS bestimmten Kationen war im Akzeptor durchschnittlich ungefähr genauso hoch wie in der Fermentationsbrühe. Der Anteil von L-Phenylalanin an der Gesamtmenge extrahierter Kationen (ohne Ammonium) lag bei 97,6 %. Dieser Wert war vergleichbar mit dem in Hohlfaserkontakoren erreichten

Wert von 98 % [Maaß 2001]. Da die Reinheit von den Bestandteilen des für die Extraktion eingesetzten Mediums abhängig war, wäre durch eine veränderte Mediumzusammensetzung möglicherweise eine Akzeptorphase mit größerer Reinheit zu erhalten.

Die weitere Aufreinigung von L-Phenylalanin kann nach der Aufkonzentrierung in der Schwefelsäure durch Präzipitation durch pH-Verschiebung erfolgen [Maaß 2001]. Im Feststoff konnte mittels GC-MS keine Verunreinigung durch andere organische Bestandteile festgestellt werden.

7.2.5 Vergleich der Fermentationen mit integrierter Produktabtrennung

Bei den Fermentationen mit integrierter Produktabtrennung wurden, abhängig von der Prozessdurchführung, deutliche Unterschiede im Prozessverlauf festgestellt, auf die in diesem Abschnitt in einem direkten Vergleich eingegangen wird.

Die Biomasse-spezifischen Produktbildungsraten der Fermentationen mit langer Extraktionsphase (1), mit zwei Extraktionsphasen (2) und mit kurzer Extraktionsphase (3) sind in Abb. 7.18 dargestellt. Die Raten waren in den ersten Stunden der Fermentation relativ vergleichbar und lagen zwischen 0,35 und 0,5 mmol/(g·h). Ab $t = 30\text{ h}$ waren deutliche Unterschiede zu erkennen. Bei der Fermentation mit langer Extraktionsphase sank die Produktbildungsrate schnell ab und lag bereits nach ungefähr 40 Stunden bei Null. Im Vergleich dazu sank die Produktbildungsrate bei der Fermentation mit zwei Extraktionsphasen langsamer. Sobald sich die Produktbildungsrate Null näherten, war Acetatbildung festzustellen. Diese war bei der Fermentation mit langer Extraktionsphase und der mit Extraktion über zwei Abschnitte vergleichbar. Dagegen wurde in der Fermentation mit kurzer Extraktion, bei der die Produktbildungsrate bis zum Ende hoch war, kaum Acetat produziert. Dazu muss erwähnt werden, dass die Acetatmessung bei niedriger Acetatkonzentration wie in der Phase bis $t = 38\text{ h}$ sehr fehlerbehaftet war, da eine unbekannte Substanz den Acetatpeak überlagerte.

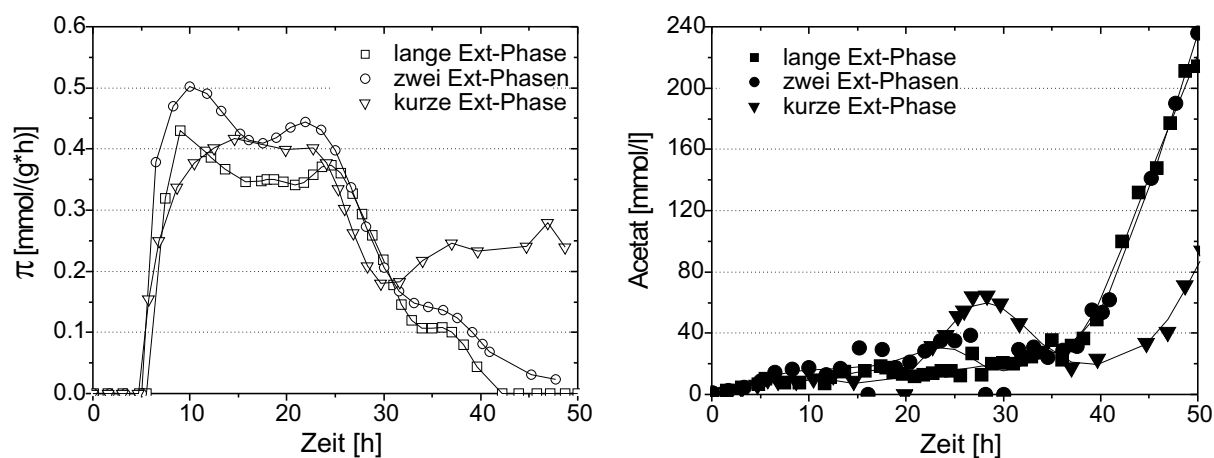


Abb. 7.18: Verlauf der Biomasse-spezifischen Produktbildungsrate und der Acetatkonzentrationen in Fermentationen mit unterschiedlichen Ansätzen zur integrierten Extraktion

In diesen Experimenten setzte wie bei der Fermentation ohne integrierte Extraktion (vgl. Abschnitt 5.1) Acetatbildung ein, sobald kein L-Phenylalanin mehr produziert wurde. Daher kann die Acetatbildung, wie bereits zuvor angenommen, als Kriterium für die abnehmende Fähigkeit der Zellen zur L-Phenylalanin-Produktion gesehen werden (vgl. Abschnitt 6.2.2). Bei den Experimenten ohne integrierte Extraktion war der Abbruch der Produktion auf zu hohe Konzentrationen an L-Phenylalanin zurückgeführt worden. Bei der integrierten Produktabtrennung lagen die L-Phenylalanin-Konzentrationen im Bioreaktor bei der Fermentation mit langer Extraktion wie auch bei der Fermentation mit zwei Extraktionsphasen jedoch deutlich niedriger. Daher war eine Abnahme der Produktbildung durch einen negativen Einfluss durch Scherkräfte, die im Umlauf auf die Zellen ausgeübt wurden oder durch Eintragung von Bestandteilen der organischen Phase anzunehmen.

Untersuchungen zum Stress auf die Zellen

Auf die Zellen konnte durch den Umlauf zur Zellrückhaltung oder durch den Eintrag organischer Substanzen Stress ausgeübt werden. Durch eine gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine im zellfreien Fermentationsüberstand wurde festgestellt, dass bei einer längeren Extraktionsdauer deutlich mehr Proteine im Überstand vorhanden waren als bei einer kürzeren Extraktionsdauer (siehe Abschnitt A.4). Bei der Fermentation mit kurzer Extraktion und der höchsten Produktkonzentration waren am wenigsten Proteine im Überstand, also die wenigsten lysierten Zellen. Ein Unterschied in der Größenverteilung der Proteine konnte nicht festgestellt werden. Dennoch war damit gezeigt, dass bei anzunehmendem stärkerem Stress mehr Zellen lysierten und Proteine frei wurden.

Ein negativer Effekt durch Eintrag von Akzeptor in die Fermentation aufgrund von unzureichender Phasentrennung in den Zentrifugen war nicht festzustellen. Der pH-Wert des in den Bioreaktor zurückgeführten Raffinats wurde kontinuierlich zur Kontrolle gemessen.

Mikroskopisch war zwischen Zellen bei einer Fermentation mit und einer Fermentation ohne integrierte Extraktion kein Unterschied zu erkennen (siehe Abschnitt A.1). Die Plasmidstabilität lag in allen Fermentationen bis zum Ende bei $\approx 80\%$ und war damit mit der Plasmidstabilität einer Fermentation ohne Extraktion vergleichbar. Daher konnte der Abbruch der Produktion nicht auf einen Plasmidverlust der Zellen zurückgeführt werden.

Extraktionsgrad

In den Fermentationen war ein Unterschied des erreichten Extraktionsgrades festzustellen, angegeben in Abb. 7.19. Der Extraktionsgrad der Fermentation mit langer Extraktion lag durchschnittlich nur bei 35% . Dieser niedrige Wert war auf den im Vergleich zu den anderen Experimenten niedrigeren Volumenstrom der organischen Phase von 2 l/h zurückzuführen. Obwohl die Volumenströme bei den anderen Fermentation gleich waren, waren auch hier Unterschiede im Extraktionsgrad festzustellen. Der Extraktionsgrad während der ersten Extraktionsphase des Experimentes mit zwei Extraktionsphasen (2) lag nur bei 26% während der Extraktionsgrad sonst bei $45\text{--}48\%$ lag. Ein Extraktionsgrad von fast 50% war so hoch, dass die L-Phenylalanin-Konzentration im Reaktor konstant gehalten oder sogar abgesenkt werden konnte, wie zur Vermeidung einer Inhibierung durch

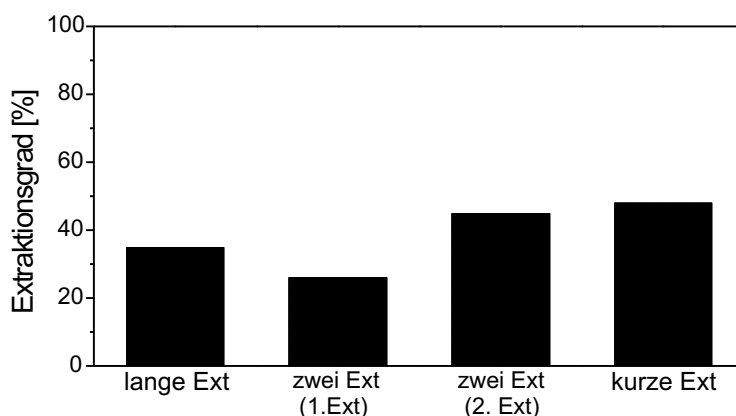


Abb. 7.19: Durchschnittlicher Extraktionsgrad in Fermentationen mit unterschiedlichen Ansätzen zur integrierten Extraktion

zu hohe L-Phenylalanin-Konzentrationen notwendig.

In den Experimenten wurde am Ende teilweise Feststoff in der Zentrifuge zur Extraktion gefunden. Am stärksten war die Feststoffbildung in der 1. Extraktionsphase der Fermentation mit zwei Extraktionsphasen. Bei der Fermentation mit kurzer Extraktion (3), bei der die höchste Produktbildung erreicht wurde, wurde hingegen kein Feststoff gefunden.

Die Trenngrenze der Ultrafiltrations-Kassetten zur Proteinrückhaltung war zwar den Herstellerangaben zufolge immer gleich, jedoch ließen sich bei einem Integritätstest⁴ selbst bei neuen Kassetten Unterschiede in der Durchlässigkeit messen. Die Werte lagen dabei immer im zulässigen Bereich. Mit der Nutzungsdauer nahm die Durchlässigkeit scheinbar zu. Zudem führten kleine Änderungen im Anpressdruck beim Zusammenbau der Ultrafiltrationseinheit zu Unterschieden in der Durchlässigkeit. Denaturierte Proteine werden abhängig von ihrer Form nicht unbedingt durch eine 10 kDa Membran zurückgehalten. Globuläre Proteine werden besser zurückgehalten als linearisierte Proteine. Somit befanden sich mehr oder weniger Proteinbruchstücke im Permeat, das für die Extraktion verwendet wurde.

In Offline-Experimenten wurde gezeigt, dass Feststoffbildung in den Zentrifugen bei Kontakt von Proteinen mit dem Carrier D₂EHPA auftrat (siehe Abschnitt 7.1.1). Da sich der Feststoff an der Phasengrenzfläche bildete, wurde die für den Stoffaustausch zur Verfügung stehende Oberfläche verringert [Weatherley 1994]. Zudem war nicht auszuschließen, dass sich ein Protein-D₂EHPA-„Komplex“ bildete und der ausgefallene Carrier nicht mehr für die Extraktion zur Verfügung stand. Durch die Feststoffbildung wurde demzufolge die Extraktionsleistung verringert. In Übereinstimmung damit lag der differentielle Extraktionsgrad während der ersten Extraktionsphase der Fermentation mit zwei Extraktionsphasen nur bei 26 % und somit unter dem bei Volumenströmen von 2 l/h erreichten Wert. In der zweiten Extraktionsphase lag der Wert bei 45 %. Je mehr Feststoff sich in der Zentrifuge

⁴Der Integritätstest besteht in der Messung der Luftdiffusion. An mit Wasser benetzte Kassetten wird ein Prüfdruck von 1 bar angelegt und der Luftdiffusionsstrom am Permeatausgang gemessen. Dieser muss <6 ml/min betragen.

bildete, desto schlechter war der Extraktionsgrad. Bei einem niedrigeren Extraktionsgrad war die L-Phenylalanin-Konzentration im Bioreaktor höher, festzustellen bei der Fermentation mit zwei Extraktionsphasen, wodurch deren inhibierender Effekt größer war. Negative Effekte der Feststoffbildung auf die Fermentation, beispielsweise durch einen stärkeren Eintrag organischer Phase in die Fermentation durch stärkere Emulsionsbildung waren nicht auszuschließen, wurden aber nicht weiter untersucht. Untersucht wurde allerdings der Eintrag von Bestandteilen der organischen Phase allgemein, vorgestellt im folgenden Abschnitt.

Einfluss der organischen Phase

Durch den direkten Kontakt von wässriger und organischer Phase in der Zentrifuge war von einem Eintrag von organischer Phase in den Bioreaktor auszugehen. Sowohl Kerosin als auch D₂EHPA sind in wässrigen Lösungen gering löslich⁵. Eine Messung des pH-Wertes am Ein- und Ausgang der Zentrifuge zur Extraktion ergab, dass dieser von pH 6,5 auf pH 4 absank, was auf den Eintrag der Säure D₂EHPA zurückzuführen war. Untersuchungen von Maaß [Maaß 2001] hatten gezeigt, dass geringe Mengen des Carriers von 12 mg/l⁶ einen positiven Effekt auf die L-Phenylalanin-Produktion hatten und der Glucoseverbrauch sank, 24 mg/l keinen Einfluss hatten, während hohe Konzentrationen in der Größenordnung der maximalen Löslichkeit einen negativen Effekt hatten. Eine Hypothese war, dass sich in niedriger Konzentration vorhandener Carrier in die Zellmembran einlagerte. Dadurch wurde die Diffusion über die Zellmembran verbessert, z.B. da der Carrier durch seine detergenten Wirkung Proteine aus der Membran löste. Lagen durch limitierte Diffusion höhere intrazelluläre L-Phenylalanin-Konzentrationen als extrazelluläre L-Phenylalanin-Konzentrationen vor, konnte der Gradient durch eine verbesserte Diffusion verringert werden. Eine Abnahme der intrazellulären Produktkonzentration hatte möglicherweise eine Reduzierung der Produktinhibierung zur Folge, durch die die Produktbildung verbessert wurde. Durch die Einwirkung zu großer Mengen des Carriers auf die Zellen war ein negativer Effekt vorstellbar.

Um den Einfluss von Kerosin und D₂EHPA genauer zu charakterisieren, wurden GC-Messungen durchgeführt. Die Identifizierung der Substanzen erfolgte mittels GC-MS-Analysen. Kerosin, eine Mischung von Alkanen (C₁₂-C₁₆), wurde in einigen Proben nachgewiesen, in anderen wurde kein Kerosin gemessen. Eine Systematik ließ sich in den Daten nicht erkennen. Es war denkbar, dass nicht nur gelöstes Kerosin, sondern auch Kerosin durch Emulsionsbildung und unzureichende Phasentrennung in die Fermentation eingetragen wurde. In diesem Fall schwamm Kerosin als schwerlösliche Alkanmischung auf der wässrigen Lösung und wurde nur durch den Rührer verteilt. Die Probenahme erfolgte im unteren Teil des Bioreaktors. Eine solche Ungleichverteilung war auch bei der Probenahme an den Zentrifugen anzunehmen. Demzufolge war eine Messung des tatsächlich vorhandenen Kerosins nicht möglich.

⁵Löslichkeit von Kerosin (C₁₂-C₁₆) in Wasser: 5-10 mg/l; Löslichkeit von D₂EHPA in Wasser: 1,2 g/l; die Löslichkeit beider Substanzen ist in komplexem Fermentationsüberstand mit organischen Bestandteilen höher als in Wasser.

⁶Wird eine Mischung von 10 % D₂EHPA in Kerosin mit Wasser hergestellt, entspricht die Menge dem daraus in Wasser löslichen Carrier bei pH 5,4; bei pH 6,8 steigt der Wert auf 17 mg/l [Maaß 2001].



Abb. 7.20: Anteil an D₂EHPA in der Fermentationsbrühe am Ende der Fermentationen mit integrierter Extraktion und im Raffinat; lange Extraktionsphase: D₂EHPA im Raffinat nach 18 h Extraktion und am Ende der Extraktionsphase; zwei Extraktionsphasen: D₂EHPA im Raffinat am Ende der 1. und der 2. Extraktionsphase; kurze Extraktionsphase: D₂EHPA am Ende der Extraktionsphase

Der Abbau von Alkanen durch Mikroorganismen wurde von Fritsche [Fritsche 1998] beschrieben⁷. Ein Abbau durch *E. coli* wurde nicht beschrieben, aber Alkane in der Größenordnung C12-C16 sind für andere Gram-negative Bakterien nicht toxisch. Zudem ist der logP-Wert von Kerosin 6 [Vermue u. a. 1993]. Lösungsmittel mit einem LogP-Wert über 3,4 sind für *E. coli* nicht toxisch [Inoue und Horikoshi 1991]. Daher war von einem negativen Effekt durch Kerosin nicht auszugehen.

Die Ergebnisse der Messungen von D₂EHPA zeigt Abb. 7.20. Hier sind die Daten bezogen auf den höchsten gemessenen Wert dargestellt, der als 100 % gesetzt wurde. Eine genaue Quantifizierung war nicht möglich, da mehrere breite, sehr ungenaue Peaks dem Carrier zugeordnet wurden. Insgesamt war die Löslichkeit von D₂EHPA in Fermentationsbrühe mit organischen Bestandteilen gegenüber der Löslichkeit in reinem Wasser wahrscheinlich erhöht. Ein relativer Vergleich ergab, dass die Konzentration an D₂EHPA bei einer längeren Extraktionsdauer höher war. Zudem war die Konzentration im Raffinat, das in die Fermentation zurückgeführt wurde, höher als in Fermentationsproben, wie zu erwarten war. Am niedrigsten war die Konzentration in der Fermentation mit kurzer Extraktion (3) und hohen Produktbildungsraten bis zum Ende.

Am Anfang der Fermentationen konnte durch den Eintrag des Carriers eher ein positiver Effekt festgestellt werden, denn die Produktbildungsraten blieben auch nach dem Start von Umlauf und Extraktion hoch. Gerigk konnte zeigen, dass der Betrieb des Umlaufs ohne Extraktion einen sehr negativen Einfluss auf die Fermentation hatte, der durch Zuschaltung eines Extraktionsprozesses aufgehoben wurde [Gerigk 2001]. Im weiteren Verlauf wurde

⁷Kurzkettige Alkane wie Hexan sind gut löslich und haben dadurch eine hohe Affinität zu den Zellmembranen und sind demzufolge in hohen Konzentrationen toxisch. Alkane mittlerer Kettenlänge (C12-C20) sind gut abbaubar. Mit zunehmender Kettenlänge nimmt die Bioverfügbarkeit und damit die Abbaubarkeit ab.

der Carrier in der Fermentation mit langer Extraktionsphase (1) wie auch der Fermentation mit zwei Extraktionsphasen (2) wahrscheinlich in Mengen eingetragen, die am Ende einen negativen Einfluss auf die Zellaktivität hatten. In der Fermentation mit kurzer integrierter Extraktion (3) und hoher Produktbildungsrate bis zum Ende war dagegen kein negativer Einfluss durch den Eintrag des Carriers festzustellen. Hier wurde D₂EHPA eines anderen Herstellers verwendet. Dieses führte zu besserer Phasentrennung und war weniger verunreinigt (siehe Abschnitt 7.1.1).

7.2.6 Vergleich von Fermentationen ohne und mit integrierter Produktabtrennung

Die Integration der Produktabtrennung mittels der Zentrifugalextraktoren hatte einen deutlichen Einfluss auf die Produktion von L-Phenylalanin. Die Auswirkungen auf die Produktion durch die integrierte Abtrennung gegenüber einer Fermentation ohne Abtrennung werden in diesem Abschnitt aufgezeigt.

Zum Vergleich sind die Glucoseaufnahmeraten und die Biomasse-spezifischen Produktbildungsrate einer Fermentation ohne integrierte Extraktion (Referenz) und der Fermentation mit kurzer Extraktionsphase (3) in Abb. 7.21 dargestellt. Die Glucoseaufnahmerate der Fermentation mit integrierter Extraktion lag während des größten Teils der Produktionsphase unter der der Referenzfermentation. Die Produktbildungsrate sank bei der Fermentation ohne Extraktion bereits nach 35 Stunden auf nahe Null ab. Dagegen lag die Produktbildungsrate bei integrierter Extraktion bis zum Ende bei fast 0,25 mmol/(g·h).

Die Kohlenstoffverteilung der Fermentation mit und ohne integrierte Extraktion zeigt Abb. 7.22. Die Bilanz konnte in beiden Experimenten zu ungefähr 95-100 % geschlossen werden. Es ist zu erkennen, dass der Anteil, der in Biomasse umgesetzt wurde, bei der Fermentation mit Produktabtrennung größer war als bei der Referenzfermentation. In beiden Fällen war der Kohlendioxidanteil nahezu gleich. Ein großer Unterschied zeigte sich bei dem Anteil von L-Phenylalanin und dem Anteil von Acetat. Während bei der

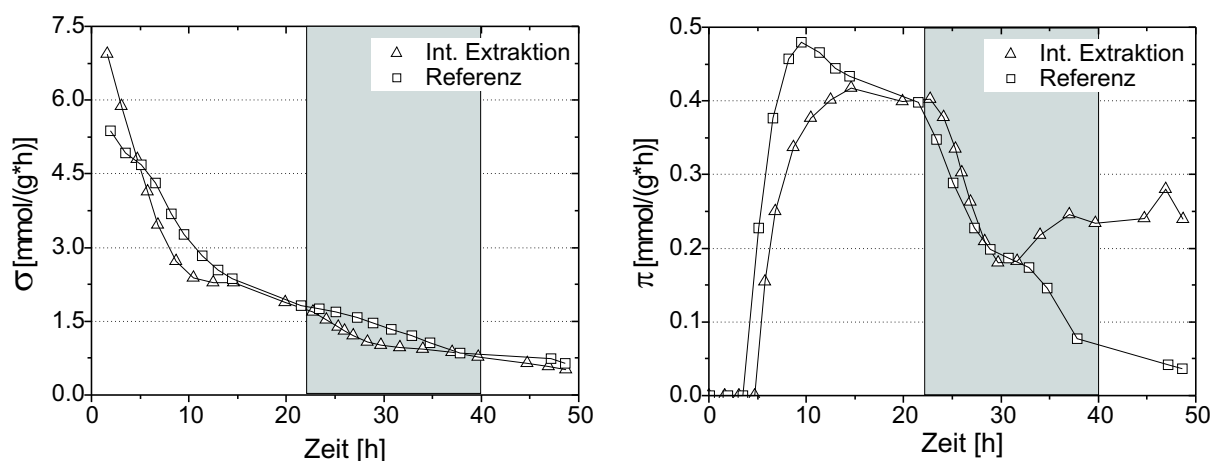


Abb. 7.21: Verlauf der Biomasse-spezifischen Glucoseaufnahmeraten und der Produktbildungsrate in einer Fermentation ohne (Referenz) und einer Fermentation mit integrierter Extraktion (kurze Extraktion (3), die Extraktionsphase ist markiert)

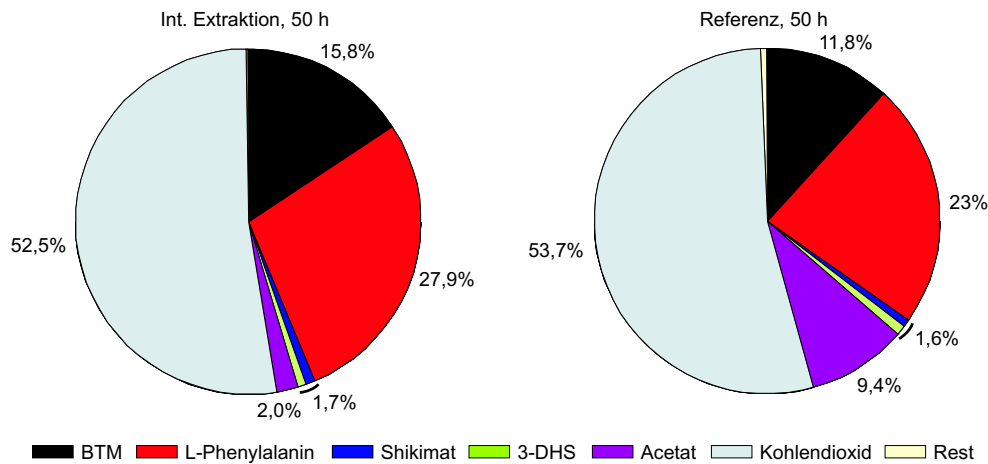


Abb. 7.22: Vergleich der Kohlenstoffanteile bei einer Fermentation ohne und einer Fermentation mit integrierter Extraktion (kurze Extraktionsphase (3))

Referenzfermentation nur 23 % in L-Phenylalanin umgesetzt wurden, aber 9,4 % in Acetat, waren es bei integrierter Extraktion 27,9 % L-Phenylalanin und nur 1,9 % Acetat. Die Acetatbildung wurde demzufolge durch die integrierte Extraktion im Vergleich zur Referenzfermentation ohne Abtrennung deutlich verringert.

In Abb. 7.23 sind die differentielle Selektivität und die integrale Raum-Zeit-Ausbeute der Referenzfermentation und der Fermentation mit integrierter Abtrennung über zwei Phasen (2) dargestellt. Bei dem Vergleich dieser Fermentationen wird der Einfluss durch die Zuschaltung der Extraktion deutlich. Während die differentielle Selektivität bei der Referenzfermentation auf einen Maximalwert von 20,8 mol/mol % nach 21,5 Stunden anstieg und danach abfiel, nahmen die Werte bei Integration der Abtrennung während der Extraktionsphase bis auf 24,4 mol/mol % zu, sanken in der Phase ohne Extraktion in der Zeit von $t = 24 - 30$ h ab und stiegen während der zweiten Extraktionsphase von $t = 30 - 40$ h erneut an. Nach der Extraktion sank die Selektivität auch hier ab. Die

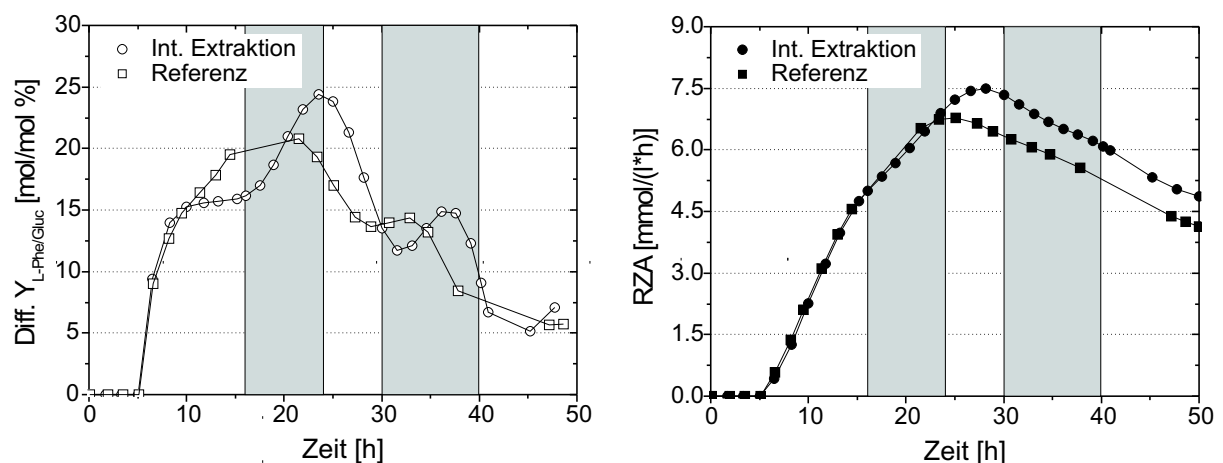


Abb. 7.23: Verlauf der differentiellen Selektivität und der integralen Raum-Zeit-Ausbeute in einer Fermentation ohne und einer Fermentation mit integrierter Extraktion (zwei Extraktionsphasen (2), die Extraktionsphasen sind markiert)

Extraktion schien einen positiven Effekt auf die Selektivität zu haben. Die differentiellen Größen der Fermentationen mit integrierter Extraktion können allerdings nur zur Herausstellung von Tendenzen herangezogen werden. Die maximalen Werte sind relativ ungenau, da Volumenverlusten während der Extraktion zwar in die Berechnung der „berechneten“ L-Phenylalanin-Konzentration eingingen, aber die Berechnung differentieller Größen dennoch ungenauer machten als bei Fermentationen ohne integrierte Abtrennung.

Der Verlauf der integralen Raum-Zeit-Ausbeute war während der Wachstumsphase bei beiden Fermentationen gleich, ein Unterschied wurde erst ab $t = 23 \text{ h}$ deutlich. Aufgrund der Abnahme der Produktbildung bei der Fermentation ohne Produktabtrennung durch zu diesem Zeitpunkt bereits relativ hohe L-Phenylalanin-Konzentration nahm die Raum-Zeit-Ausbeute ab. Dagegen stieg die Raum-Zeit-Ausbeute bei integrierter Extraktion weiter an und fiel erst zu einem späteren Zeitpunkt ab. Das Absinken der Raum-Zeit-Ausbeute war wahrscheinlich auf einen zu hohen Carrier-Eintrag im Verlauf der zweiten Extraktionsphase zurückzuführen (vgl. Abschnitt 7.2.5). Durch die Extraktion konnte in diesem Experiment jedenfalls schneller eine höhere L-Phenylalanin-Konzentration erreicht werden.

In Tab. 7.3 sind die wichtigsten Größen verschiedener Fermentationsexperimente zusammenfassend dargestellt. Die L-Phenylalanin-Konzentration konnte in den Experimenten mit integrierter Abtrennung von L-Phenylalanin gegenüber der Referenz ohne integrierte Abtrennung gesteigert werden. Nur die Konzentration am Ende der Fermentation mit Extraktion über 32 Stunden (1) lag darunter, verursacht durch einen zu negativen Einfluss durch den Eintrag von Carrier in die Fermentation. Technisch interessant ist, dass die L-Phenylalanin-Konzentration im Bioreaktor durch die integrierte Abtrennung bis auf 31 mmol/l gesenkt werden konnte, entsprechend 76 % des gesamten produzierten L-Phenylalanins. In 18 Stunden Extraktion wurden 50 % des insgesamt produzierten L-Phenylalanins extrahiert. Die integrale Raum-Zeit-Ausbeute lag am Ende der Fermentationen mit integrierter Extraktion über 18 Stunden (3) ebenfalls höher als bei der Fermentation ohne Abtrennung. Die integrale molare L-Phenylalanin-Glucose-Selektivität wies nach 30 Stunden, solange auch in der Referenzfermentation noch Produktion stattfand, keine großen Unterschiede zwischen den Fermentationen auf. Deutlich wurde der Unterschied am Ende der Fermentation. Durch die Abtrennung konnte die L-Phenylalanin-Glucose-Selektivität am Ende der Fermentation von 14,5 mol/mol % in der Referenzfermentation auf 18,6 mol/mol % in dem Ansatz mit integrierter Reaktivextraktion über eine kurze Phase gesteigert werden.

Tab. 7.3: Vergleich wichtiger Prozessgrößen von Fermentationen mit und ohne integrierte Extraktion

Fermentation	L-Phe [g/l]	ext./prod. L-Phe [%]	Int. RZA (50 h) [g/(l·h)]	Int. Y_{PS} (30 h) [mol/mol %]	Int. Y_{PS} (50 h) [mol/mol %]
Referenz	34		0,68	16,7	14,5
lange Ext-Phase (1)	28,9	76	0,58	14,7	11,6
zwei Ext-Phasen (2)	40,1	50	0,81	17,7	15,5
kurze Ext-Phase (3)	45,5	47	0,91	16,7	18,6

Die Experimente zeigten, dass sich eine integrierte Extraktion positiv auf die Produktion von L-Phenylalanin auswirkte, wenn ein zu hoher Eintrag an Carrier vermieden wurde. Einerseits konnte die Steigerung der Selektivität und die Verlängerung der Produktbildungsphase durch die positive Wirkung von D₂EHPA auf die Zellen ausgelöst werden. Andererseits konnte dies auf die Abtrennung des L-Phenylalanins, die dadurch niedrige Konzentration im Bioreaktor und folglich eine verbesserte Aktivität der DAHP-Synthase zurückzuführen sein. Wahrscheinlich war eine Kombination von beidem verantwortlich für die Verbesserungen.

Verglichen mit dem Ansatz von Maaß u. a. [Maaß u. a. 2002] und Gerigk u. a. [Gerigk u. a. 2002b], bei dem Hohlfasermembranmodule anstelle von Zentrifugalextraktoren eingesetzt wurden, wurde eine vergleichbare Steigerung der Selektivität um 28 % (relativ) erreicht. Die Produktkonzentration konnte mit dem hier dargestellten Ansatz von 34 g/l auf 45,5 g/l gesteigert werden (34 % relativ), wohingegen bei dem Ansatz mit Hohlfasermembranmodulen annähernd keine Steigerung erreicht werden konnte (von 29 g/l auf 32 g/l). Bei der Extraktion in Zentrifugen wurde eine höhere Konzentration im Akzeptor erreicht (60 g/l anstelle von 38 g/l). Damit war das Volumen für die weitere Aufarbeitung relativ betrachtet niedriger. Insgesamt wurde hier die Hälfte des produzierten L-Phenylalanins extrahiert, während bei der Extraktion in Hohlfasermembranmodulen nur 27 % extrahiert wurden. Überdies war die volumetrische Extraktionsrate mit Zentrifugalextraktoren deutlich höher als bei dem Ansatz mit Hohlfasermembranmodulen: 1,19–1,47 g/(l·h) im Vergleich zu 0,3–0,5 g/(l·h). Dies entsprach einem Faktor von drei.

Verglichen mit einem von Konstantinov u. a. [Konstantinov u. a. 1990] beschriebenen Fermentationsprozess zur L-Phenylalanin-Produktion konnte in dem integrierten Ansatz die gleiche L-Phenylalanin-Konzentration mit ungefähr 25 % niedriger Biomasse erreicht werden. Die Raum-Zeit-Ausbeute lag mit 0,91 g/(l·h) über den veröffentlichten Werten von 0,85 g/(l·h). Darüber hinaus ist der Vorteil des integrierten Prozesses in der simultanen Produktaufarbeitung zu sehen. Die Hälfte des produzierten L-Phenylalanin lag nach 50 Stunden bereits relativ aufgereinigt und aufkonzentriert in Schwefelsäure vor.

7.3 Zusammenfassung

Zur Vermeidung der Inhibierung der Produktion durch hohe L-Phenylalanin-Konzentrationen wurde die Abtrennung aus dem Bioprozess durch integrierte Reaktivextraktion in Flüssig-Flüssig-Zentrifugen untersucht. Die Extraktion erfolgte mit dem Kationen-selektiven Carrier D₂EHPA in Kerosin, die Rückextraktion zur Regenerierung des Carriers und Aufkonzentrierung des Produkts mit Schwefelsäure. Um geeignete Einstellungen für eine Online-Extraktion zu ermitteln, wurden Offline-Experimente zur Charakterisierung der Extraktion in Flüssig-Flüssig-Zentrifugen durchgeführt. Anschließend wurde die Reaktivextraktion in den Fermentationsprozess integriert und die Einflüsse auf die L-Phenylalanin-Produktion untersucht.

- In Offline-Experimenten wurden die folgenden Einflüsse festgestellt:
 - Stabilität des Systems: Das System war stabiler, wenn L-Phenylalanin aus Salzlösung oder aus Fermentationsüberstand extrahiert wurde, als wenn es aus Wasser extrahiert wurde. In diesem Fall traten eher Emulsionen auf. Wenn für leichte und schwere Phase ungleiche Volumenströme eingestellt wurden, war das System hingegen instabiler. Höhere Volumenströme führten eher zu Instabilitäten als niedrigere. Die Fermentationsbrühe musste vor dem Einsatz filtriert werden, um Zellen und Proteine zu entfernen, da andernfalls Proteine an der Phasengrenze zwischen wässriger und organischer Phase präzipitierten.
 - Extraktionsbestandteile: Verschiedene L-Phenylalanin- (60–120 mmol/l), Carrier- (10–20 %) und Schwefelsäurekonzentrationen (1–2 M) wurden untersucht. Die Carrier-Konzentration wurde als die einflussreichste Größe identifiziert. Eine Erhöhung führte zu einer verbesserten Extraktion. Unter Verwendung von 1 M Schwefelsäure wurde eine sechsfache L-Phenylalanin-Konzentrierung von 15 g/l im Donator auf 90 g/l im Akzeptor erreicht.
 - Scherkraft und Rotordrehzahl: Durch die Verwendung eines „High-Mix“-Einsatzes in den Zentrifugen wurde die Extraktion verbessert. Die Rotordrehzahl hatte im Bereich von 2400–3600 Upm keinen Einfluss auf die Extraktion. Höhere Drehzahlen führten zu Emulsionsbildung.
 - Volumenstrom: Volumenströme von 2 l/h–10 l/h wurden untersucht. Der Stoffübergang bei Extraktion und Rückextraktion wurde durch erhöhte Volumenströme der wässrigen Donatorphase und der organischen Phase erhöht. Eine maximale Extraktion wurde bei Volumenströmen von 8 l/h erreicht.
- Mit den Offline-Experimenten wurde die technische Realisierbarkeit der Extraktion in Flüssig-Flüssig-Zentrifugen gezeigt und geeignete Parameter für eine Online-Extraktion ermittelt. Auf der Basis dieser Experimente wurde die Extraktion in den Fermentationsprozess integriert. Die Permeatgewinnung funktionierte verbunden mit der Reaktivextraktion. Zudem konnte ein stabiles Extraktionssystem während einer Fermentation über 32 Stunden online aufrecht erhalten werden.
- Bei einer Online-Extraktion über 32 Stunden stieg die L-Phenylalanin-Konzentration im Akzeptor bis auf 360 mmol/l an und war damit zehnmal so hoch wie im Bioreaktor. Dieses hoch konzentrierte L-Phenylalanin im Akzeptor konnte durch Präzipitation

weiter aufgereinigt werden. Negative Einflüsse der Extraktion auf den Fermentationsprozess durch den Eintrag toxischer Mengen organischer Bestandteile waren in den ersten 20 Stunden der Extraktion nicht festzustellen; L-Phenylalanin wurde weiter produziert. Nach 38 Stunden nahm die Stoffwechselaktivität jedoch ab, was sich in der abnehmenden L-Phenylalanin-Konzentration widerspiegelte und wahrscheinlich auf einen zu großen Eintrag des Carriers zurückzuführen war.

- Durch eine Verringerung der Extraktionsdauer auf 18 Stunden wurde bis zum Ende der Fermentation eine hohe Produktbildungsrate von 0,25 mmol/(l·h) aufrecht erhalten. Dabei wurde die Hälfte des gesamten produzierten L-Phenylalanins in 18 Stunden extrahiert. Durch die Extraktion wurde die L-Phenylalanin-Konzentration im Reaktor niedrig gehalten und gleichzeitig L-Phenylalanin im Akzeptor aufkonzentriert.
- Durch die integrierte Produktabtrennung wurde die Acetatbildung minimiert und die Selektivität des Prozesses gegenüber einem Fermentationsprozess ohne integrierte Extraktion von 14,5 % auf 18,6 % gesteigert. Die maximale „berechnete“ L-Phenylalanin-Konzentration lag mit 45,5 g/l deutlich über der Konzentration von 34 g/l bei der Referenzfermentation.
- Die volumetrischen Extraktionsraten waren im Vergleich zur integrierten Extraktion in Hohlfasermembranmodulen in diesem Prozess besser. Hier wurden 1,19–1,47 g/(l·h) extrahiert, während im Membran-basierten Prozess mit 0,3–0,5 g/(l·h) nur 1/3 dessen erreicht wurde (vgl. [Gerigk u. a. 2002b], [Maaß u. a. 2002]).

Damit wurde gezeigt, dass durch die integrierte Produktabtrennung in Zentrifugalextraktoren eine Akkumulation von L-Phenylalanin verhindert und die L-Phenylalanin-Produktion sowohl gegenüber der Referenzfermentation ohne Abtrennung als auch gegenüber der Extraktion in Hohlfasermembranmodulen deutlich verbessert werden konnte.

8 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden verschiedene prozesstechnische Ansätze zur Verbesserung des bestehenden Prozesses zur Produktion von L-Phenylalanin mit rekombinanten *Escherichia coli* verfolgt. Die L-Phenylalanin-Produktion wurde mit unterschiedlichen Stämmen untersucht. Weitere Untersuchungen wurden zum Einfluss von Prozessparametern sowie zu Limitierungen oder Inhibierungen bei der L-Phenylalanin-Produktion durchgeführt. Darüber hinaus wurde ein Verfahren zur Produktabtrennung mittels Reaktivextraktion in Zentrifugalextraktoren zur Vermeidung einer Produktinhibierung und Verbesserung des Produktionsprozesses entwickelt.

Basierend auf einem von Gerigk entwickelten Prozess wurden Fermentationen zur L-Phenylalanin-Produktion im Zulaufverfahren im Rührkesselreaktor durchgeführt [Gerigk 2001]. Dazu wurden rekombinante L-Tyrosin-auxotrophe *E. coli* Stämme mit Deregulierungen im Aromatenbiosyntheseweg und plasmidkodierter Überexpression von Enzymen aus dem Aromatenbiosyntheseweg verwendet. Die Glucose- und L-Tyrosin-Zufuhr wurden geregelt. Das Verfahren zur Produktabtrennung wurde basierend auf der Reaktivextraktion von L-Phenylalanin in Hohlfasermembranmodulen entwickelt [Maaß 2001].

L-Phenylalanin-Produktion mit *E. coli* Stämmen mit unterschiedlichen Glucoseaufnahmesystemen

Zur Identifizierung des am besten geeigneten Stamms für die L-Phenylalanin-Produktion wurden Stämme mit unterschiedlichen Glucoseaufnahmesystemen stoffwechselphysiologisch charakterisiert und die Produktion untersucht. Die Glucoseaufnahme erfolgte bei dem Stamm *E. coli* 4pF81 über das Phosphotransferase-System (PTS(+)), bei dem Stamm *E. coli* 20pMK12 über den Glucose-Facilitator aus *Zymomonas mobilis* (PTS(-)), bei dem die Bereitstellung von Phosphoenolpyruvat, einem Vorläufermetaboliten der Aromatenbiosynthese, verbessert sein sollte, da bei der Glucoseaufnahme kein Phosphoenolpyruvat verbraucht wird.

Mit dem (PTS(+))-Stamm wurden in einer Fermentation 206 mmol/l (34 g/l) L-Phenylalanin produziert. Am Ende der Fermentation war die Produktbildungsrate nur noch gering und mit 380 mmol/l wurden große Mengen Acetat gebildet. Mit dem PTS(-)-Stamm 20pMK12 wurden unter gleichen Prozessbedingungen 171 mmol/l L-Phenylalanin produziert. Untersuchungen zum Einfluss der Glucosekonzentration auf die L-Phenylalanin-Produktion mit dem Stamm 20pMK12 ergaben, dass für die Produktion eine Mindestkonzentration oberhalb des K_m -Wertes von 4,1 mmol/l notwendig war. Im Gegensatz zur Produktion mit dem PTS(+)-Stamm 4pF81 war kein Überschussstoffwechsel mit der Bildung von Acetat festzustellen, was auf eine geringere Glucoseaufnahmekapazität

des Systems aus Glucose-Facilitator und *E. coli*-eigener Glucokinase hinwies. Die geringe Acetatbildung stellt einen Vorteil für die Prozessführung dar. Eine genaue Glucoseregulation wäre bei ausreichend vorhandener Glucose voraussichtlich nicht notwendig.

Die L-Phenylalanin-Produktion mit dem PTS(-)-Stamm wurde im Vergleich zu der mit dem PTS(+)-Stamm nicht verbessert, obwohl die Bereitstellung von Phosphoenolpyruvat verbessert sein sollte. Sowohl eine zu starke Belastung der Zellen durch das heterologe System und die Ausschaltung des Phosphotransferase-Systems als auch eine Energielimittierung waren möglich. Ansätze zur Verbesserung der Produktion mit dem PTS(-)-Stamm wären wahrscheinlich eine höhere Induktorkonzentration, aber auch die Entwicklung eines Stamms mit verbesserter Bereitstellung des zweiten Vorläufermetaboliten E4P und verbessertem Fluss durch den Aromatenbiosyntheseweg [Chandran u. a. 2003]. Durch eine Optimierung der Stämme wäre auch ein Ansatz zur Verbesserung der L-Phenylalanin-Glucose-Selektivität gegeben, die sowohl bei dem PTS(+)-Stamm als auch bei dem PTS(-)-Stamm deutlich unterhalb dem theoretisch maximal möglichen Wert lag.

Da die Produktion mit dem PTS(+)-Stamm 4pF81 von den in dieser Arbeit zur Verfügung stehenden Stämmen am besten war, wurde dieser für die weitere Prozessentwicklung verwendet.

Einfluss der Prozessbedingungen und Identifizierung einer Limitierung oder Inhibierung der L-Phenylalanin-Produktion

Um den Fermentationsprozess zu verbessern und Einflüsse auf den Prozessverlauf und die Produktion zu identifizieren, wurden Parameter wie Temperatur, pH-Wert und Medium untersucht.

Der pH-Wert hatte den Fermentationen zufolge keinen Einfluss auf die L-Phenylalanin-Produktion. Die Produktion bei einer Temperatur von 33 °C anstelle von 37 °C führte zu einer verlängerten Produktionsphase, vermutlich durch die bei 33 °C stabilere und aktivere DAHP-Synthase. Die L-Phenylalanin-Konzentration wurde um 10 %, die L-Phenylalanin-Glucose-Selektivität von 14,5 mol/mol % auf 16,2 mol/mol % gesteigert. Aufgrund der insgesamt höheren Zellaktivität bei höherer Temperatur war die Produktion bei 37 °C jedoch schneller und die Raum-Zeit-Ausbeute lag größtenteils über der bei $T = 33\text{ °C}$. Daher wurde die weitere Prozessentwicklung bei $T = 37\text{ °C}$ und pH 6,5 durchgeführt.

Allerdings nahm die Produktbildungsrate bei einer Temperatur von 37 °C gegen Ende der Fermentation bei Erreichen einer Produktkonzentration von 180–200 mmol/l L-Phenylalanin stark ab und Acetatbildung setzte ein. Eine Untersuchung des Einflusses verschiedener Medienbestandteile wie Phosphat und Ammonium, sowie der Biomassekonzentration und damit der Mediumverfügbarkeit insgesamt führte nicht zur Identifizierung einer Limitierung oder Inhibierung. Daher war nicht von einem Einfluss durch Medienbestandteile auszugehen.

Eine Inhibierung durch eine hohe Produktkonzentration wurde untersucht. Eine Fermentation mit Zugabe von hochkonzentrierter L-Phenylalanin-Suspension in der Produktionsphase hatte ein sofortiges Absinken der Produktbildungsrate zur Folge. Eine Inhibierung der Produktion durch L-Phenylalanin war anzunehmen. Mit der Abnahme der L-Phenylalanin-Produktion nahm die Acetatbildung zu. Die Acetatbildung konnte damit als Maß für die verringerte Fähigkeit der Zellen zur L-Phenylalanin-Produktion gesehen werden und könnte als Abbruchkriterium verwendet werden. Eine Inhibierung durch hohe L-Phenylalanin-Konzentrationen kann prozesstechnisch durch eine Reduzierung der L-Phenylalanin-Konzentration im Bioreaktor vermieden werden.

Integrierte Produktabtrennung und Aufkonzentrierung mittels Reaktivextraktion in Flüssig-Flüssig-Zentrifugen

Zur Online-Abtrennung und Aufkonzentrierung von L-Phenylalanin aus einem Fermentationsprozess im Zulaufverfahren wurde ein neues Verfahren entwickelt. Die Reaktivextraktion in Flüssig-Flüssig-Zentrifugen mit dem Kationen-selektiven Carrier D₂EHPA in Kerosin und Schwefelsäure im Akzeptor zur Rückextraktion und Regeneration des Carriers wurde dazu in den Fermentationsprozess integriert.

In Offline-Extraktionen wurde die technische Realisierbarkeit, insbesondere die Phasentrennung und die Stabilität des Systems sowie die Extraktionsleistung des Systems abhängig von verschiedenen Parametern untersucht, um geeignete Einstellungen für eine Online-Extraktion zu ermitteln. Dabei stellte sich heraus, dass die Fermentationsbrühe vor dem Einsatz filtriert werden musste, um Zellbruchstücke und Proteine zu entfernen. Andernfalls trat eine Protein-Präzipitation an der Phasengrenze zwischen wässriger und organischer Phase auf. Zudem war das System bei ungleichen Volumenströmen und bei hohen Volumenströmen instabiler. Die Extraktion wurde durch Verwendung des „High-Mix“-Einsatzes und damit erhöhten Scherkräften, eine Erhöhung des Volumenstroms von Donatorphase oder organischer Phase sowie durch eine Erhöhung der Carrier-Konzentration verbessert. Unter Verwendung von 1 M Schwefelsäure wurde L-Phenylalanin sechsfach bis auf 90 g/l aufkonzentriert. Bei entsprechender Wahl der Parameter und ausreichender Betriebsdauer konnte L-Phenylalanin nahezu vollständig extrahiert werden, was das Verfahren technisch interessant macht.

Die technische Realisierbarkeit der Extraktion von L-Phenylalanin in Flüssig-Flüssig-Zentrifugen war damit gezeigt. Zudem wurden Parameter für eine Online-Extraktion ermittelt, bei Verwendung derer die Extraktionsrate ungefähr der Produktbildungsrate im Bioreaktor entsprach, um die L-Phenylalanin-Konzentration im Bioreaktor konstant halten zu können.

Auf der Basis dieser Experimente wurde die Extraktion in den Fermentationsprozess integriert. Dazu wurde kontinuierlich zell- und proteinfreies Permeat aus dem Bioreaktor über Ultrafiltrationseinheiten gewonnen, extrahiert und das die Extraktion verlassende Raffinat mit reduzierter L-Phenylalanin-Konzentration in den Bioreaktor zurückgeführt. Mit diesem Aufbau konnte eine stabile Extraktion während einer Fermentation über 32 Stunden online aufrecht erhalten werden.

In den ersten 20 Stunden der Extraktion wurde L-Phenylalanin produziert, was darauf schließen ließ, dass die Extraktion keinen negativen Einfluss auf den Fermentationsprozess durch den Eintrag toxischer Mengen organischer Bestandteile hatte. Nach 38 Stunden nahmen die Stoffwechselaktivität und die L-Phenylalanin-Produktion jedoch ab. Wahrscheinlich waren zu große Mengen Carrier eingetragen worden. Durch eine Verringerung der Extraktionsdauer auf 18 Stunden wurde bis zum Ende der Fermentation eine hohe Produktbildungsrate von 0,25 mmol/(g·h) aufrecht erhalten. Dabei wurde eine Produktakkumulation verhindert und dadurch die Acetatbildung minimiert. Infolgedessen wurde die L-Phenylalanin-Glucose-Selektivität gegenüber einem Fermentationsprozess ohne integrierte Extraktion von 14,5 % auf 18,6 % gesteigert. Die maximale „berechnete“ L-Phenylalanin-Konzentration lag mit 45,5 g/l deutlich über der Konzentration von 34 g/l bei der Referenzfermentation. Um zu hohe Carrier-Konzentrationen in der Fermentationsbrühe zu vermeiden, musste bei den hier gewählten Prozessparametern eine maximale Extraktionsdauer von 18-20 Stunden eingehalten werden.

Mit diesem Ansatz konnte, soweit bekannt, erstmals eine Integration der Reaktivextraktion in Flüssig-Flüssig-Zentrifugen in einen Bioprozess gezeigt werden. Die Integration führte zu einer deutlichen Verbesserung des gesamten Prozesses.

Im Vergleich zur Reaktivextraktion in Hohlfasermembranmodulen war die Aufkonzentrierung von L-Phenylalanin im Akzeptor bei der Extraktion in Zentrifugen deutlich besser und die Konzentration im Akzeptor mit 60 g/l fast verdoppelt. Damit wurde auch das Volumen für die weitere Aufarbeitung, z.B. durch Präzipitation, reduziert. Die Hälfte des gesamten produzierten L-Phenylalanins wurde online in 18 Stunden extrahiert. Die volumetrischen Extraktionsraten waren in diesem Prozess ebenfalls besser als bei der Extraktion in Hohlfasermembranmodulen. Hier wurden 1,19–1,47 g/(l·h) extrahiert. Dagegen wurde im Membran-basierten Prozess mit 0,3-0,5 g/(l·h) nur 1/3 dessen erreicht (vgl. [Maaß u. a. 2002], [Gerigk u. a. 2002b]).

Gegenüber der Reaktivextraktion in Hohlfasermembranmodulen hat die Reaktivextraktion in Zentrifugalextraktoren den Vorteil einer vereinfachten Handhabung und höherer L-Phenylalanin-Stoffübertragung bei der Extraktion. Beide Punkte sollten ein Scale-up vereinfachen. Allerdings wäre bei einem Scale-up der Extraktion zu beachten, dass sowohl die Druckverhältnisse als auch die Strömungsverhältnisse und die Beschleunigung in größeren Zentrifugalextraktoren anders sind und sich Stabilität, Phasentrennung und Extraktionsleistung verändern können.

Mit den Untersuchungen wurde gezeigt, dass durch die integrierte Produktabtrennung in Zentrifugalextraktoren eine Akkumulation von L-Phenylalanin verhindert und die L-Phenylalanin-Produktion sowohl gegenüber der Referenzfermentation ohne Abtrennung als auch gegenüber der Extraktion in Hohlfasermembranmodulen deutlich verbessert werden konnte. Gleichzeitig konnte der erste Aufarbeitungsschritt realisiert werden. Daher stellt die integrierte Reaktivextraktion mit Flüssig-Flüssig-Zentrifugen einen interessanten und vielversprechenden Ansatz für die Kationen-selektive Online-Abtrennung von inhibitorischen Substanzen dar.

9 Ausblick

Zur Verbesserung der L-Phenylalanin-Produktion mit rekombinanten *Escherichia coli* wurden verschiedene prozesstechnische Ansätze untersucht, wie die L-Phenylalanin-Produktion mit unterschiedlichen Produktionsstämmen und der Einfluss von Prozessparametern auf die Produktion. Durch die Entwicklung eines Verfahrens zur integrierten Produktabtrennung mittels Reaktivextraktion in Zentrifugalextraktoren wurde eine Produktinhibierung vermieden und der Prozess insgesamt deutlich verbessert.

Sowohl im Bereich der Stammentwicklung als auch im Bereich der Fermentationsprozessentwicklung mit integrierter Aufarbeitung scheint das Potential noch nicht ausgeschöpft. Weitere Arbeiten sind auch deshalb als lohnenswert einzustufen, weil über den Aromatenbiosyntheseweg zahlreiche interessante Substanzen synthetisiert werden können. Neben den aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan, das als Futtermitteladditiv verwendet wird, kann beispielsweise Indigo aus L-Tryptophan [Murdock u. a. 1993] oder L-DOPA, ein Mittel gegen Parkinson, aus L-Tyrosin hergestellt werden. Darüber hinaus können Produkte wie Shikimat, Chinasäure, p-Hydroxybenzoesäure [Barker und Frost 2001], Adipinsäure oder Catechol [Frost und Draths 1995] aus Intermediaten des Aromatenbiosyntheseweges synthetisiert werden. Damit ist dieser ein sowohl biologisch als auch wirtschaftlich interessanter Stoffwechselweg.

Ansätze zur Stammverbesserung liegen in der Verbesserung der Bereitstellung von Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-Phosphat, beispielsweise durch einen Stamm mit heterologer Glucoseaufnahme über den Glucose-Facilitator und Überexpression der Transketolase. Zusätzlich müssten Enzyme des Aromatenbiosyntheseweges überexprimiert werden. Dies könnte durch die chromosomale Integration von Genen als auch die Integration in Plasmide und Expression unter einem starken Promotor erreicht werden. Um eine Inhibierung durch L-Phenylalanin zu vermeiden, könnte alternativ zur integrierten Produktabtrennung ein Stamm mit entsprechenden genetischen Veränderungen, wie einer gegen Feedback-Inhibierung durch L-Phenylalanin resistenten Variante des Gens *aroF* für die DAHP-Synthase, entwickelt werden.

Um das Verständnis der Stoffwechselvorgänge und des Einflusses von L-Phenylalanin in den unterschiedlichen Stämmen zu verbessern, könnten Stoffwechselanalysemethoden eingesetzt werden („Metabolomics“). Dabei wäre die Quantifizierung von Metaboliten aus dem Zentralstoffwechsel wie PEP oder Pyruvat aber auch der intrazellulären L-Phenylalanin-Konzentration interessant. Intrazelluläre Metabolitanalysen mittels schneller Probenahmetechnik, Inaktivierung der Zellen und anschließender LC-MS [Oldiges 2003] oder auch Flussanalysen mittels ^{13}C -Markierungsexperimenten sind dafür

ein vielversprechendes Werkzeug. Um den Energiehaushalt in unterschiedlichen Produktionsstämmen zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch Quantifizierung phosphorylierter Metabolite und Energieäquivalente wie ATP oder NADPH zu charakterisieren, könnte die ^{31}P -NMR-Messung eingesetzt werden. Aus diesen Untersuchungen könnten Ansätze zur weiteren Stamm- und Prozessverbesserung entwickelt werden.

Weitergehende Ansätze gibt es insbesondere für die Verbesserung des Prozesses mit integrierter Produktabtrennung. Der Eintrag des bei der Reaktivextraktion verwendeten Carriers D_2EHPA in den Fermentationsprozess wurde als ein sehr kritischer Parameter identifiziert. Deshalb wäre die Quantifizierung der kritischen Konzentration wichtig, was mit der verwendeten Methode der Gaschromatographie nicht möglich war. Daher müsste entweder eine Methode zur Quantifizierung des Carriers gefunden werden oder Reihenuntersuchungen mit Zugabe unterschiedlicher Mengen des Carriers in den Fermentationsprozess durchgeführt werden. Damit könnte gleichzeitig untersucht werden, inwieweit die Extraktion, bzw. der Eintrag von D_2EHPA für den positiven Effekt auf Produktbildung und Selektivität des integrierten Prozesses verantwortlich ist. Um den Eintrag des Carriers zu vermeiden, wäre der Einsatz eines Aktivkohlefilters vor der Rückführung des Raffinats in den Bioreaktor denkbar. Dabei könnte sich jedoch die ungewollte Rückhaltung von L-Phenylalanin oder anderen Medienbestandteilen zusätzlich zu den organischen Bestandteilen Kerosin und D_2EHPA als Problem erweisen. Eine Zuführung neuer Medienbestandteile in die Fermentation zum Ausgleich würde den Prozess wiederum komplizierter machen.

Neben dem Eintrag von Carrier war die Präzipitation von Proteinen in der Zentrifuge ein kritischer Faktor. Um die Abtrennung von Proteinen zu verbessern, könnte ein Modul mit kleinerer Porengröße, z.B. 5 kDa verwendet werden. Obwohl auch dieses Modul durchlässig für denaturierte Proteine wäre, könnte eine Akkumulation von Proteinen in den Zentrifugen wahrscheinlich deutlich verlangsamt werden. Alternativ dazu könnten zwei Zentrifugen parallel betrieben werden, wodurch sich die Möglichkeit zur Reinigung jeweils einer Zentrifuge ergeben würde. Da die Extraktionsleistung durch Feststoffbildung reduziert wird, wäre eine vollständige Abtrennung der Proteine vor der Extraktion zu bevorzugen.

Der Fermentationsprozess könnte möglicherweise durch Verringerung der L-Phenylalanin-Konzentration im Bioreaktor weiter verbessert werden, was durch eine Erhöhung der Extraktionsrate zu erreichen wäre. Eine höhere Extraktionsrate wäre jedoch mit einem höheren Volumenstrom der organischen Phase oder auch der wässrigen Donatorphase, also des Fermentationspermeats verbunden, beispielsweise durch Rezirkulation vor der Rückführung in den Bioreaktor. Durch den dabei stärkeren Kontakt von wässriger und organischer Phase wäre ein negativer Effekt auf die Fermentation allerdings nicht auszuschließen. Zudem sinkt die Extraktionsrate bei geringer Produktkonzentration ab. Daher müssten Vor- und Nachteile abgewogen werden.

Der entwickelte Produktionsprozess lässt sich als Basis für die Produktion diverser Metabolite aus dem Aromatenbiosyntheseweg verwenden. Mit dem Verfahren zur integrierten Reaktivextraktion in Zentrifugalextraktoren können Produkte oder inhibierende Substanzen Kationen-selektiv aus Fermentationsprozessen abgetrennt werden.

A Anhang

A.1 Fehlerbetrachtung

Bei der Auswertung der Daten von Fermentation und Reaktivextraktion sind die Fehler, die bei Probenvorbereitung, Datenerfassung und Analytik auftraten, zu berücksichtigen. Eine Betrachtung der Ergebnisse ist daher nur unter Einbeziehung der Fehlerquellen möglich, die im folgenden Abschnitt angegeben werden.

A.1.1 Fehlerquellen

- Das Volumen im Reaktor war insbesondere durch die Probenahme ungenau, selbst wenn Probenahmeholumina abgerechnet wurden. Ein Fehler von $\approx 10\%$ war anzunehmen. Überprüft wurde dies durch eine Bestimmung des Volumens im Bioreaktor am Ende von Fermentationen im Vergleich zu den eingesetzten Volumina von Medium und Substraten.
- Die Abgasanalytik wurde vor jedem Experiment kalibriert. Dennoch war von Fehlern auszugehen, da die Abluft über mehrere Flaschen und einen Abluftkühler zur Kondensation des enthaltenen Wassers geleitet wurde. Insbesondere bei niedrigen Kohlendioxidkonzentrationen war aufgrund der Sensitivität des Systems ein relativ großer Fehler anzunehmen.
- Die Berechnung der volumetrischen Sauerstoffaufnahme zur Steuerung der L-Tyrosin-Zufuhr erfolgte online aus dem Gewicht des Reaktors, den Abgaswerten und der Zuluft. Fehler bei der Zuluftregelung waren nicht auszuschließen. Insbesondere das Gewicht des Reaktors war jedoch sehr ungenau, wie bei Kontrollmessungen festgestellt wurde, so dass auch die berechnete Sauerstoffaufnahme fehlerbehaftet war.
- Auch für die Berechnung der Sauerstoffaufnahme und der Kohlendioxidbildungsrate war den oben genannten Fehlern zufolge von Ungenauigkeiten auszugehen.
- Die Biotrockenmassekonzentration war ebenfalls fehlerbehaftet. Durch Mehrfachbestimmungen konnte der Fehler mit $\approx 10\%$ bestimmt werden. Insbesondere bei geringen Biomassekonzentrationen war der Fehler sehr groß. Das Verhältnis von optischer Dichte zu Biomasse, das generell als ungefähr konstant angenommen werden kann, war in diesem Bereich viel geringer als bei hohen Biomassekonzentrationen.
- Für die Online- und die Offline-Messung der Glucosekonzentration wurde ebenfalls von einem Fehler von bis zu 10% ausgegangen. Die Offline-Messung mittels des

Accutrend®Sensors war im Messbereich von 0,1–6,0 g/l genau. Bei höheren Glucosekonzentrationen musste das Medium verdünnt werden, wodurch das Gerät bis zu 10 % niedrigere Glucosekonzentrationen anzeigte als aktuell vorhanden waren. Dies ergab ein Vergleich mit den mittels Process Trace und einem weiteren enzymatischen Nachweis¹ gemessenen Werten. Zudem wurde bei der Offline-Messung noch Glucose verbraucht bis die Zellen abzentrifugiert waren, so dass die gemessenen Werte niedriger waren als die tatsächlich vorliegenden Werte. Dazu kamen Verdünnungsfehler. Bei der Online-Messung musste der Fehler durch die Drift der Messwerte der Dialysesonde berücksichtigt werden.

- Die Fehler der Zulaufdaten waren relativ gering, wie ein Vergleich der tatsächlichen und der theoretischen Werte zeigte, bzw. glichen sich über die Fermentationsdauer relativ gut aus.
- Die quantitative Bestimmung von Aminosäuren, Ammonium und organischen Säuren mittels HPLC war ebenfalls fehlerbehaftet. Mehrfachmessungen ergaben Abweichungen von bis zu 8 %, die auf die Fehler bei der Verdünnung, schwankende Standardqualität und die Fehler bei der HPLC-Messung selbst zurückzuführen waren. Besonders zu erwähnen ist die Bestimmung der Acetatkonzentration, die bei geringer Acetatproduktion nur ungenau ermittelt werden konnte, da der Peak durch eine unbekannte Substanz verunreinigt wurde. Dementsprechend war die Acetatkonzentration insbesondere bei niedrigen Werten sehr fehlerbehaftet. Daneben war auch die Bestimmung der Ammoniumkonzentration nur angenähert möglich, da der Peak bei der verwendeten, für Aminosäuren optimalen Methode, in die Länge gezogen war.

Damit ergaben sich insbesondere für die Berechnung der aus den oben genannten Parametern abgeleiteten Prozessgrößen wie Raten, differentieller Selektivität, Raum-Zeit-Ausbeute oder auch Extraktionseffizienz größere Fehler. Bei den Fermentationen mit integrierter Extraktion sind die differentiellen Werte nur als Anhaltspunkte zu sehen, da die Berechnung aus der „berechneten“ Konzentration erfolgte und die Berechnung durch Volumenverluste bei der Extraktion ungenauer wurde.

Zwei Größen, die nicht in die weitere Berechnung von Prozessgrößen eingingen, aber dennoch erwähnt werden sollen, waren die Messung von pH-Wert und Sauerstoffgehalt im Bioreaktor. Auch hier waren Ungenauigkeiten anzunehmen. Das Gleiche galt für die optische Dichte, die über die Verdünnungsfehler hinaus aufgrund von Störeinflüssen durch das Medium oder unterschiedliche Zellgrößenverteilung schwankte, z.B. bestehen alte Kulturen aus runderen Zellen, wodurch die Optische Dichte geringer als bei normalen länglichen Zellen ist.

¹Enzymatischer Nachweis von Glucose, siehe [Anderlei 2002]

A.1.2 Datenauswertung

Für die grafische Darstellung der Daten wurde eine Ausgleichskurve durch die Datenreihen gelegt. Dazu wurde ein Spline-Programm verwendet. Dieses Programm verwendet einen nichtparametrischen kubischen Ausgleichsspline mit vorgegebener 2. Randableitung.

Die Splinefunktion zu den Messwerten $(x_i, u_i), i = 0(1)n, n \geq 2$, mit monoton angeordneten Knoten wird definiert wie folgt:

1. S ist in $[a, b]$ zweimal stetig differenzierbar.

2. S ist in jedem Intervall $[x_i, x_{i+1}], i = 0(1)n-1$, durch ein kubisches Polynom S_i gegeben:

$$S(x) \equiv S_i(x) = a_i + b_i(x - x_i) + c_i(x - x_i)^2 + d_i(x - x_i)^3$$

für $x \in [x_i, x_{i+1}], i = 0(1)n-1$.

3. $S(x_i) = y_i, i = 0(1)n$.

4. $w_i(u_1 - y_i) = r_i, i = 0(1)n, w_i > 0, w_i = \text{Gewichte}$. Es gilt:

$$r_0 = S_0'''(x_0),$$

$$r_i = S_i'''(x_i) - S_{i-1}'''(x_i), i = 1(1)n-1,$$

$$r_n = -S_{n-1}'''(x_n)$$

5. Randbedingungen

$$S''(x_0) = \alpha, S'(x_n) = \beta$$

für $\alpha = \beta = 0$ ergibt sich der natürliche Ausgleichsspline.

Mittels dieser Splinefunktion wird ein Polynom zwischen jeweils zwei Messpunkten berechnet. An den Messpunkten müssen die Intervallgrenzen übereinstimmen, so dass sich eine stetige Funktion ergibt.

In die Berechnung geht die Gewichtung w_i ein. Für $w_i \rightarrow \infty$ ergibt sich die interpolierende kubische Splinefunktion zu den Wertepaaren (x_i, u_i) , für $w_i \rightarrow 0$ ergibt sich die nach der Fehlerquadratmethode ausgleichende Gerade. Bei großen Werten w_i verläuft die Splinefunktion nahe an den Messwerten, bei kleinen Werten w_i findet ein stärkerer Ausgleich statt und die Kurve schneidet die Messpunkte nicht.

Um die Experimente besser vergleichen zu können, wurde für einen Parameter in den verschiedenen Experimenten eine gleichbleibende Gewichtung gewählt, selbst wenn sich die Güte der Daten unterschied. Die gewählten Gewichtungen sind im folgenden angegeben:

Parameter	Gewichtung
Biotrockenmassekonzentration	0,1
Volumen	0,1
Substratkonzentration	0,5
Produkt-/Nebenproduktkonzentration	0,1
OUR/CER	1,0
Extraktion	10

Aus den gesplinten Werten wurden die abgeleiteten Größen berechnet. Dazu gehörten die Wachstums-, Substratverbrauchs- und Produktbildungsraten sowie die differentielle Selektivität und Raum-Zeit-Ausbeute. Diese Werte waren bei Berechnung aus den Originaldaten aufgrund von Schwankungen in den einzelnen Parametern so wenig aussagekräftig, dass nur bei Berechnung aus gesplinten Werten eine Aussage möglich war. In einigen Fällen mit dennoch vorhandenen eindeutigen Ausreißern wurden die berechneten Größen nochmals unter Verwendung großer Gewichtungswerte gesplint.

Die Berechnung von Raten und differentiellen Größen erfolgte über jeweils drei Messwerte, so dass der erste Wert (Startzeitpunkt der Fermentationen) und der letzte Wert (meist nach 50 Stunden Fermentationsdauer) nicht rechnerisch ermittelt werden konnten und infolgedessen in den Grafiken nicht vorhanden sind.

A.2 Materialien

A.2.1 Medien und Lösungen

LB-Medium

Hefeextrakt	10 g/l
Trypton Pepton	10 g/l
NaCl	5 g/l
Agar Agar	18 g/l
Ampicillin	0,1 g/l

Die Substanzen wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit NaOH auf 7,2 eingestellt. Für die Herstellung von Agarplatten wurde Agar Agar zugegeben. Das Medium wurde 20 Min. bei 121 °C autoklaviert. Ampicillin wurde nach Abkühlung auf 60 °C zugegeben. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Stammlösungen der Medienbestandteile

MgSO ₄ * 7 H ₂ O	300 g/l
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	15 g/l
KH ₂ PO ₄	150 g/l
K ₂ HPO ₄	600 g/l
NaCl	100 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	250 g/l
FeSO ₄ * 7 H ₂ O/Na-Citrat	7,5/100 g/l
Glucose	500 g/l
Ampicillin	100 g/l

Die Medienbestandteile wurden in bidestilliertem Wasser gelöst, die Salze bei Raumtemperatur gelagert. Die Ampicillinlösung wurde bei -20 °C eingefroren. Die Glucoselösung wurde nach dem Autoklavieren bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Spurenelementlösung

Al ₂ (SO ₄) ₃ * 18 H ₂ O	2,0 g/l
CoSO ₄ * 7 H ₂ O	0,75 g/l
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	2,5 g/l
H ₃ BO ₃	0,5 g/l
MnSO ₄ * 1 H ₂ O	24 g/l
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	3,0 g/l
NiSO ₄ * 6 H ₂ O	2,5 g/l
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	15,0 g/l

Die Salze wurden in bidestilliertem Wasser bei pH 1-2² gelöst und bei Raumtemperatur gelagert.

Vorkulturmedium

MgSO ₄ *7 H ₂ O	0,3 g/l
CaCl ₂ *2 H ₂ O	0,015 g/l
KH ₂ PO ₄	3,0 g/l
K ₂ HPO ₄	12 g/l
NaCl	0,1 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0 g/l
FeSO ₄ *7 H ₂ O/Na-Citrat	0,075/1,00 g/l
Spurenelementlösung	1,5 ml/l
Vitamin B ₁ (Thiamin * HCl)	0,0075 g/l
L-Tyrosin	0,08 g/l
Glucose	5,0 g/l
Ampicillin	0,1 g/l

Die Stammlösungen der Bestandteile wurden in bidestilliertes Wasser gegeben, so dass die angegebene Endkonzentration erreicht wurde. Vitamin B₁ und L-Tyrosin wurden in fester Form zugegeben. Um das L-Tyrosin zu lösen, wurde das Medium eine Stunde gerührt. Der

²Der pH-Wert wurde mit konz. HCl eingestellt.

pH-Wert dieses gepufferten Mediums war 7,2. Das Medium wurde in eine autoklavierte Vorratsflasche sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

Hauptkulturmedium

MgSO ₄ *7 H ₂ O	3,0 g/l
CaCl ₂ *2 H ₂ O	0,015 g/l
KH ₂ PO ₄	3,0 g/l
NaCl	1,0 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0 g/l
FeSO ₄ *7 H ₂ O/Na-Citrat	0,1125/1,5 g/l
Spurenelementelösung	1,5 ml/l
Vitamin B ₁ (Thiamin * HCl)	0,075 g/l
L-Tyrosin	0,3 g/l
Glucose	15,0 g/l
Ampicillin	0,1 g/l

Die Stammlösungen der Bestandteile wurden in bidestilliertes Wasser gegeben, so dass die angegebenen Endkonzentrationen nach Inokulation mit 10 % Vorkultur erreicht wurden. Vitamin B₁ und L-Tyrosin wurden in fester Form zugegeben. Um das L-Tyrosin zu lösen, wurde das Medium vier Stunden gerührt. Der pH-Wert des Mediums war 5,2. Das Medium wurde vor der Fermentation durch ein Mikrofiltrationsmodul (0,2 µm) in den zuvor autoklavierten Bioreaktor sterilfiltriert. Der pH-Wert wurde über die pH-Regelung des Bioreaktors auf 6,5 eingestellt. Ampicillin wurde erst kurz vor dem Start der Fermentation über einen 0,2 µm Einweg-Sterilfilter in den Bioreaktor gegeben.

Das Medium für die Fermentationen im Sixfors Vario unterschied sich in der Menge der Spurenelemente (1 ml/l), in der L-Tyrosin-Konzentration (0,25 g/l) und in der Glucosekonzentration (13,64 g/l).

Zulaufmedien Glucose und Tyrosin

Glucose	700 g/l
L-Tyrosin	25 g/l

Die Glucose wurde in bidestilliertem Wasser angesetzt und 20 Min. bei 121 °C autoklaviert. L-Tyrosin wurde in 5 % (NH₄)OH-Lösung gelöst. Die Lösung war autosteril.

IPTG-Lösung

Die IPTG-Lösung wurde in bidestilliertem Wasser mit einer Konzentration von 200 mM angesetzt und bei -20 °C gelagert. Zur Induktion wurde eine der gewünschten Endkonzentration der Lösung entsprechende Menge über einen 0,2 µm Einweg-Sterilfilter in den Bioreaktor gespritzt.

pH-Korrekturmittel und Antischaum

Zur Einstellung des pH-Wertes im Bioreaktor wurde autosterile 25 % (NH₄)OH-Lösung verwendet.

Als Antischaummittel wurde Sigma 289 unverdünnt und zuvor autoklaviert (20 Min. bei 121 °C) eingesetzt.

Lösungen für die Online-Glucoseanalyse

Puffer für die Verwendung des OLGA:

Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	8,36 g/l
KH ₂ PO ₄	2,28 g/l
NaCl	5,84 g/l

Die Salze wurden in bidestilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert mit HCl auf 7,35–7,4 eingestellt und 0,1 ml/l TWEEN 20 zugegeben. Zum Entgasen wurde der Puffer über Nacht bei 80 °C und anschließend bei 4 °C gelagert.

Zur Messung mit dem Process Trace wurden die mitgelieferten Puffer, Kalibrierlösungen (4 g/l und 20 g/l Glucose) und Reinigungslösung verwendet.

Proteinbestimmung

Bradford-Reagenz:

Coomassie brilliant blue G-250	100 mg/l
Ethanol abs.	50 ml/l
H ₃ PO ₄ 85 %	100 ml/l

Die Substanzen wurden zusammengegeben und eine Stunde gerührt, mit bidestilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt und durch einen Faltenfilter filtriert. Die Lösung wurde unter Lichtausschluss gelagert.

SDS-Gelelektrophorese

Probenpuffer:

Tris/HCl	60 mmol/l, pH 6,8
Glycerin	10 % (v/v)
SDS	3 % (w/v)
β-Mercaptoethanol	5 % (v/v)
Bromphenolblau	0,0025 % (w/v)

Laufpuffer:

Tris/HCl	25 mmol/l
Glycin	192 mmol/l
SDS	0,1 % (w/v)

Fixierlösung für Rasterelektronenmikroskopie

Glutardialdehyd 25 % _w	20 ml/l
NaH ₂ PO ₄	4,1 g/l
Na ₂ HPO ₄ * H ₂ O	12,5 g/l

Die Substanzen wurden in bidestilliertem Wasser gelöst. Bei dem Waschpuffer wurde kein Glutardialdehyd zugegeben.

Lösungen für die Reaktivextraktion

L-Phenylalanin	10–30 g/l
D ₂ EHPA in Kerosin	10–30 % (v/v)
H ₂ SO ₄	1–2 M

Dichte der Phasen

Fermentationsüberstand	1,018 kg/l
10 % D ₂ EHPA in Kerosin	0,813 kg/l
1 M H ₂ SO ₄	1,054 kg/l

Stoffdaten von L-Phenylalanin [Weast und Astle 1979]

Summenformel	C ₉ H ₁₁ NO ₂
molare Masse	165,19 g/mol
Löslichkeit in Wasser	29,6 g/l bei 25 °C; 99 g/l bei 100 °C
Isoelektrischer Punkt	5,5
pK _s	1,83
pK _b	9,13

A.2.2 Geräteparameter des OLGA**5 g/l Glucose**

Sensormessbereich	1,0–30 mM			
Kalibrierlösung 1	2,0 g/l			
Kalibrierlösung 2	10,0 g/l			
Injektionen pro Probe	1			
Injektionen pro Standard	2			
Auswertung	Signalhöhe			
Zyklen bis Rekalibrierung	30			
Zyklen bis Isopropanol	60			
Standardinjektionszyklus	Vorspülen	20 s	25 µl/s	
	Injektion	2 s	5 µl/s	
	Zelle vorspülen	10 s	30 µl/s	
	Messung	40 s	50 µl/s	
	Injektionspause	3 s	3 µl/s	
	Messzyklenpause	3 s	3 µl/s	
	Isopropanol	5 s	25 µl/s	
	Nachspülen	60 s	25 µl/s	
	Bioreaktor	Ansaugen	10 s	25 µl/s
		Ausspülen	15 s	25 µl/s
Kalibrierung	Ansaugen	5 s	15 µl/s	
	Ausspülen	8 s	20 µl/s	

30 g/l Glucose

Sensormessbereich	10–30 mM		
Kalibrierlösung 1	25 g/l		
Kalibrierlösung 2	35 g/l		
Auswertung	Signalhöhe,-Fläche		
Standardinjektionszyklus	Injektion	20 s	5 µl/s

0,5 g/l Glucose

Sensormessbereich	1–10 mmol/l		
Kalibrierlösung 1	0,1 g/l		
Kalibrierlösung 2	1,0 g/l		
Auswertung	Signalhöhe,-Fläche		
Standardinjektionszyklus	Injektion	5 s	10 µl/s

A.2.3 Geräteparameter des Process TRACE

5 g/l Glucose		
Sensormessbereich 5 – 40 g/l		
Kalibrierlösung 1	4,0 g/l	
Kalibrierlösung 2	20,0 g/l	
Intervall zwischen den Messungen	0	
Rekalibrierzyklus	nach 150 Messungen	
Messungen pro Standard	2	
Temperatur	30 °C	
Verstärkung	2000 nA	
Signalausgabe	analog, 0–25 g/l	
Messzyklus	Equilibrierung	30 s
	Vorlauf	240 s
	Basislinie 1	2 s
	Akkumulation Diffusionsmodul	30 s
	Akkumulation Dialysesonde	45 s
	Peakdetektionsfenster	60 s
	Basislinie 2	48 s
	zugelassener Kalibrierungsfehler	5 %

A.2.4 Geräteparameter der HPLC

Aminosäuren

Gerät	Hersteller
HPLC	Sycam
Säule: Lichrospher 100, RP 18-5 EC, 125 x 4 mm	Merck
Fluoreszenzdetektor: RF-535	Shimadzu

Puffer und Methode

Eluent A	10 mmol/l Phosphatpuffer, pH 7,2 mit 0,5 % (v/v) Tetrahydrofuran
Eluent B	50 % (v/v) 10 mmol/l Phosphatpuffer, pH 7,2, 35 % (v/v) Methanol, 15 % (v/v) Acetonitril
Säulentemperatur	40 °C
Probevolumen	5 µl
Flussrate	0,9 ml/Min.
Vorsäulenderivatisierung	90 s
Gradient	0 Min. 75 % B
	7 Min. 90 % B
	8,5 Min. 100 % B
	13,5 Min. 100 % B
	14,5 Min. 75 % B
Detektion	Fluoreszenz: Excitation $\lambda=330$ nm, Emission $\lambda=450$ nm

Organische Säuren

Gerät	Hersteller
HPLC	Sycam
Säule: Aminex HPX-87H, 300 x 7,8 mm	BioRad
UV-Detektor: UVD 340S	Dionex

Puffer und Methode

Eluent	0,1 M H ₂ SO ₄
Säulentemperatur	40 °C
Probevolumen	100 µl
Flussrate	isokratisch, 0,5 ml/Min.
Detektion	DAD: Excitation $\lambda=215$ nm

A.2.5 Geräteparameter der GC

Technische Daten	Typ	Hersteller
Gaschromatograph	HP5890 Serie B	Agilent, Palo Alto, USA
Injektor	Kaltaufgabegerät KAS3	Gerstel, Mülheim
Detektor	FID	Agilent, Palo Alto, USA
Trennsäule	BPX5, 50 m x 0,22 mm ID, 0,25 μ m Filmdicke	SGE, Australien
Datensystem	Multichrom Chromatographiedatensystem	Fisons
Temperaturprogramm	90 °C (2 min) -3 °C/min – 310 °C (20 min)	
Trägergas	Helium, 28,9 Psi Vordruck	

A.2.6 Ultrafiltrationsmodule

Kontinuierliche Probenahme für die Messung mit dem OLGA:

Hohlfasermodul	UFP-500-E-1A
Gehäusematerial	Polysulfon
Membranmaterial	Polysulfon
Länge	0,185 m
Faserdurchmesser	1,0 mm
Anzahl der Fasern	6
Filtrationsfläche	0,0023 m ²
Trenngrenze	500 kDa
max. Eingangsdruck	3,5 bar
max. Temperatur	autoklavierbar
pH-Stabilität	2–13
max. Fördervolumen	180 l/h

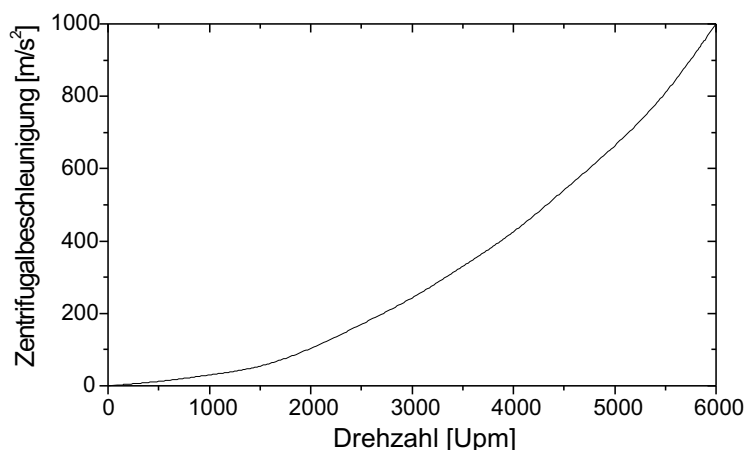
Bereitstellung von zell- und proteinfreiem Permeat für die Reaktivextraktion:

Hohlfasermodul	UFP-500-E-8A
Gehäusematerial	Polysulfon
Membranmaterial	Polysulfon
Länge	34,9
Faserdurchmesser	1,0 mm
Anzahl der Fasern	550
Filtrationsfläche	0,36 m ²
Trenngrenze (NMWC)	500 kDa
Scherrate	$\approx 2000 \text{ s}^{-1}$ (bei 6,3 l/Min.)
max. Eingangsdruck	3,5 bar
max. Temperatur	autoklavierbar
pH-Stabilität	2–13
max. Fördervolumen	180 l/h
Modulvolumen	422,5 ml
Membrankassette	Ultran-Lab Filterkassette
Trenngrenze (NMWC)	10 kDa
max. Eingangsdruck	6 bar
max. Betriebstemperatur	55 °C
Rezirkulationsrate	0,2–0,9 l/Min.
pH-Bereich	1–14
Membranfläche	0,07 m ²

A.2.7 Technische Daten der Flüssig-Flüssig-Zentrifugen

Zentrifuge	Model V2
Rotor Durchmesser	5,08 cm
max. Durchfluss	2 l/Min.
max. Druck	3,1 bar
Höhe	64 cm

Korrelation zwischen Beschleunigung und Drehzahl



A.2.8 Chemikalien und Enzyme

Substanz	Hersteller
Agar Agar	Difco, Detroit, USA
Ampicillin	Roth GmbH, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue	BioRad Laboratories, München
D ₂ EHFA	Hoechst AG (Hostarex PA216), Frankfurt; Merck kGaA, Darmstadt; Fluka
Glucosemonohydrat	Roquette Italia S.P.A.
Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit, USA
IPTG	Roth GmbH, Karlsruhe
Kerosin	Fluka
Protein-Molekulargewichtsstandard	New England Biolabs, Schwalbach
Trypton Pepton	Difco Laboratories, Detroit, USA
TSP	Lanchaster

Alle weiteren verwendeten Chemikalien waren von den Firmen Merck kGaA (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen).

A.2.9 Geräte und Labormaterialien

Gerät	Typ	Hersteller
A/D Wandler	SMP Interface	Siemens AG, München
Abgasanalytik	Binos100 2M	Fisher-Rosemount GmbH, Hasselroth
Dosiertechnik	YFC01Z	Sartorius AG, Göttingen
Dosiersystem (Sixfors)	Fed-batch-Pro	DASGIP AG, Jülich
Bioreaktor	ISF 200	Infors AG, Basel
Bioreaktor	Sixfors Vario	Infors AG, Basel
Brooks Zuluftdosierung	5851 E	Brooks Instruments B.V.
Dosimaten	665	Metrohm, Filderstadt
Gelelektrophoresekammer	Minigel Twin	Biometra, Göttingen
Glucosemessung	Accutrend Sensor®	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Glucoseanalytik	OLGA GL2b	IBA GmbH, Göttingen
Glucoseanalytik	Process Trace	Trace GmbH, Braunschweig
Hohlfasermodule (OLGA)	UFP-500-E-1A	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Hohlfasermodule (Umlauf)	UFP-500-E-8A	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Kassettenmodul	Ultran-Lab Filterkassette	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel

Gerät	Typ	Hersteller
pH-Elektrode	F-615-B139-DH	Broadley James, USA
pH-Elektrode (Sixfors)	Gelektrode	Mettler Toledo, Giessen
pH-Elektrode (Lösungsmittel stabil)	Unitrode Metrosensor	Metrohm, Filderstadt
Photometer	UV160	Shimadzu
Photometer (Proteinbest.)	Ultrospec 3000 pro	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Inkubator für Platten		Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Lyophilisation	Lyovac GT 20	Leibold-Heraeus
Pipetten	0,01–2,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Pumpen	101U, 501U, 503U, 504U, 604 U/R	Watson-Marlow GmbH, Rommerskirchen
Pumpe	621 F/L mit Pumpenkopf 605 L	Watson-Marlow GmbH, Rommerskirchen
Rasterelektronenmikroskop	JSM-6300F	JEOL
Reflektometer	RQflex plus	Merck KGaA, Darmstadt
Sauerstoffelektrode	12 mm OxyProbe	Broadley James, USA
Sauerstoffelektrode (Sixfors)		Mettler Toledo, Giessen
Schüttelinkubator	3033	GLF
Substratdosierung	Fed-Batch Pro	DASGIP AG, Jülich
Trockenschrank		Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Vakuumzentrifuge	Speed Vac Concentrator	Backofer
Waagen	IP65	Sartorius AG, Göttingen
Waage	3807 MP	Sartorius AG, Göttingen
Zentrifuge	Avanti TM J-20 XP	Beckmann Coulter GmbH, München
Zentrifuge	Biofuge pico	Heraeus GmbH, Hanau
Zentrifugalextraktoren	Model V2	CINC Deutschland GmbH, Brakel
Ammoniumtest	Reflectoquant®, 20–180 mg/l	Merck KGaA, Darmstadt
Eichgas	10 % CO ₂ , 15 % O ₂	Linde, Höllriegelskreuth
Filter (BTM)	Porengröße 0,2 µm	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Manometer	24013 ND	Wika GmbH
pH-Kalibrierlösungen	pH 4,0, pH 7,0	Qualilab, VWR, Darmstadt
Phosphattest	Reflektoquant plus®, 0,1–5,0 mg/l	Merck KGaA, Darmstadt
Pumpenschläuche	Marpren	Watson-Marlow GmbH, Rommerskirchen
Spritzenfilter	0,2 µm	Schleicher & Schüll GmbH
Sterilfilter	Acrodisc 25, 0,2 µm Porengröße	Pall Gelman Laboratory, USA
Sterilfilter (Mediumfiltration)	Sartobran	Sartorius AG, Göttingen
Ventile		Swagelok GmbH

A.2.10 Software zur Datenaufnahme und -auswertung

Programm	Hersteller	Verwendung
Fed-batch-Pro	DASGIP AG, Jülich	Datenerfassung und Steuerung
LabView	National Instruments Corp., USA	Datenerfassung
Medusa	Forschungszentrum Jülich GmbH; IBT 2	Datenerfassung und Regelung
Chromeleon	Dionex	HPLC-Auswertung
Excel	Microsoft Inc.	Auswertung
Origin	Microcal Software Inc.	Auswertung
Corel	Corel Corporation	Auswertung
Latex	Freeware	Textverarbeitung

A.3 Methoden

A.3.1 Offline-Analysemethoden

Biotrockenmasse

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse wurden 2,5–10 ml Fermentationsprobe durch einen getrockneten und gewogenen Einweg-Sterilfilter (0,2 μm) filtriert. Das Volumen war abhängig von der optischen Dichte. Der Filter wurde mit dem gleichen Volumen 0,9 % NaCl-Lösung gespült. Anschließend wurden die Filter bei 80 °C für 24 Stunden getrocknet. Nach dem Abkühlen im Exikator wurden die Filter erneut gewogen und die Biotrockenmassekonzentration aus der Differenz berechnet.

Optische Dichte

Die optische Dichte wurde nach geeigneter Verdünnung mit 0,9 % NaCl-Lösung in einem Zweistrahl-Spektralphotometer (Shimadzu UV-160) bei einer Wellenlänge von $\lambda=620$ nm gemessen. Dem Lambert-Beer'schen Gesetz zufolge ist die Absorptionsstärke von der Zelldichte abhängig.

Glucose

Zur Offline-Bestimmung der Glucosekonzentration wurde der Accutrend®Sensor (Roche Diagnostics) verwendet. Zur Vorbereitung wurden die Biomasse enthaltenden Proben zentrifugiert (10 Min., 13.000 Upm), der zellfreie Überstand entsprechend dem Messbereich des Sensors von 0,1–6 g/l Glucose verdünnt mit 0,9 % NaCl oder unverdünnt auf einen Teststreifen aufgetragen. Die Glucose wird durch das immobilisierte Enzym Glucoseoxidase in Gluconolacton umgewandelt. Das dabei äquimolar freiwerdende H_2O_2 wird amperometrisch gemessen.

Phosphat und Ammonium

Zur Bestimmung des Phosphat- und Ammoniumgehalts wurden Fermentationsproben abzentrifugiert (10 Min., 13.000 Upm) und der Biomasse-freie Überstand geeignet verdünnt.

Zur Bestimmung von Phosphationen wurde der Reflectoquant plus Phosphat-Test (Merck) verwendet. Orthophosphationen bilden in schwefelsaurer Lösung mit Molybdatationen Molybdatphosphorsäure. Diese wird mit Ascorbinsäure zu Phosphormolybdänblau reduziert und dessen Konzentration reflektometrisch bestimmt. Zu 5 ml Probe wurden fünf Tropfen Reagenz 1 und ein Mikrolöffel Reagenz 2 gegeben und die Probe in einer Küvette im Reflektometer RQflex plus (Merck) gegen eine Wasserprobe gemessen. Der Messbereich lag zwischen 0,1–5 mg/l Phosphat.

Ammoniumionen wurden mit dem Reflectoquant Ammonium-Test (Merck) bestimmt. Sie bilden dabei mit Neßlers Reagenz eine gelbbraune Verbindung, deren Konzentration reflektometrisch bestimmt wird. Zu 5 ml Probe wurden zehn Tropfen Reagenz gegeben, die Probe auf ein Messstäbchen aufgetragen und im Reflektometer RQflex plus gemessen. Der Messbereich lag zwischen 20–180 mg/l Ammonium.

Plasmidstabilität

Die Plasmidstabilität wurde bei Fermentationen regelmäßig überprüft. Dazu wurden die Proben mit 0,9 % NaCl-Lösung verdünnt (10^{-5} – 10^{-8} , abhängig von der optischen Dichte). Von mindestens zwei Verdünnungen wurden je 100 μ l auf LB-Platten mit und ohne Ampicillin als Selektionsmarker für Plasmide enthaltende Zellen ausgestrichen, über Nacht bei 37 °C inkubiert und die Kolonien gezählt. Aus dem Verhältnis der Koloniezahlen auf den Platten mit und ohne Ampicillin wurde der Anteil an Zellen mit Plasmiden bestimmt.

Aminosäuren

Die Konzentrationen der Aminosäuren L-Phenylalanin, L-Tyrosin, L-Alanin und L-Glutamat sowie von Ammonium wurden mittels Reversed-Phase-HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) bestimmt. Vor der Messung wurden die Proben entsprechend des linearen Messbereichs der HPLC von 10 bis 600 μ M verdünnt. Eine Vorsäulenderivatisierung der Proben erfolgte mit ortho-Phtaldialdehyd und Mercaptoethanol. Im alkalischen reagieren primäre Amine zu stark fluoreszierenden Isoindolen. Nach Gradientenelution (siehe Abschnitt A.2.4) wurden die Substanzen mit einem Fluoreszenzsensor gemessen. Die Auswertung der Peakflächen erfolgte mittels der Software Chromeleon.

Organische Säuren

Die Konzentrationen der organischen Säuren Acetat, DAH, Shikimat, 3-DHS, Lactat, Fumarat, Pyruvat, Uracil und Orotsäure wurden mittels Ionenausschluss-HPLC bestimmt. Die Detektion erfolgte spektrophotometrisch durch einen UV-Detektor bei einer Wellenlänge von $\lambda=215$ nm. Die Proben wurden dem linearen Messbereich von 0,001–2,0 mM entsprechend verdünnt. Die Auswertung der Peakflächen erfolgte mittels der Software Chromeleon.

^1H -NMR

Die ^1H -NMR-Messungen wurden mit einem mit Puls-Fourier-Transform-Technik ausgestatteten NMR-Spektrometer mit einer Betriebsfrequenz von 300 MHz durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden 400 μ l Probe zwei Stunden in der Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in 800 μ l 4 mM 3-Trimethyl-Silyl-Propion-2,2,3,3-d-säure (TSP) in D_2O gelöst. TSP wurde als Referenzverbindung zur Quantifizierung zugegeben. Das Singulett-Signal entsprach neun Protonen. Zur Quantifizierung wurde die Fläche unter dem Signal verwendet. Die Nachweisgrenze lag bei ungefähr 0,5–1,0 g/l (siehe [Zaja 2001]).

A.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration in Lösungen wurde nach der Methode von Bradford bestimmt [Bradford 1976], die auf einer ionischen Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue an die basischen Aminogruppen der Proteine beruht, wodurch das Absorptionsmaximum des Farbstoffs verschoben wird. Die mit Rinderserumalbumin erstellte Kalibriergerade war im Bereich von 25–300 mg/l linear. Zur Messung wurden 50 μ l Probe in 950 μ l Bradfordreagenz gegeben und inkubiert. Bei einer Wellenlänge von $\lambda=595$ nm wurde die Absorption und damit der Proteingehalt photometrisch (Ultrospec 3000 pro) gemessen.

A.3.3 TCA-Proteinfällung

Um Proteine aus zellfreiem Fermentationsüberstand zu entfernen (zur Extraktion) oder zu konzentrieren (für die Gelelektrophorese), wurden diese mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Die Probe wurde dazu mit 10 % (v/v) TCA versetzt und 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proteine abzentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet mit 200 μ l 80 % Aceton gewaschen und 2 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet.

A.3.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen im Fermentationsüberstand nach dem Molekulargewicht erfolgte mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli [Laemmli 1970]. 8 %ige Trenngele, überschichtet mit 5 %igen Sammelgelen wurden verwendet [Sambrook u. a. 1989]. Die Proben (siehe Abschnitt A.3.3) wurden mit Probenpuffer versetzt, zur Denaturierung 5 Min. auf 95 °C erhitzt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100–180 V in der Mini-Gel Apparatur (Minigel Twin) in Laufpuffer. Die Größe der Proteine wurde über einen Molekulargewichtsstandard abgeschätzt.

A.3.5 Rasterelektronenmikroskopie

Zur Vorbereitung für Aufnahmen mit dem Raster-Elektronen-Mikroskop wurden 500 μ l Probe durch einen Celluloseacetatfilter filtriert und die Zellen für 12 Stunden in Fixierlösung gelegt. Anschließend wurde der Filter in Pufferlösung gewaschen und für jeweils zwei Stunden in 40 %, 60 %, 80 % und 100 % Aceton in Wasser gelegt. Die Filter mit den entwässerten Zellen wurden bei 4 °C in Aceton gelagert.

Die Proben auf den Filtern wurden in einem Bal-Tek CPD030 (Critical Point Dryer) mit flüssigem Kohlendioxid am kritischen Punkt getrocknet und nach dem Aufbringen auf einen Objektträger sofort im Bal-Tek MED020 mit einer Goldschicht belegt, d.h. vergoldet. Die Dicke der Beschichtung wurde während des Vorgangs von einem MES010 (Bal-Tek) kontrolliert. Danach wurden Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop (JEOL JSM-6300F, Beschleunigerspannung 5kV) gemacht und die Bilddaten elektronisch gespeichert.

A.3.6 Präzipitation von L-Phenylalanin zur Aufreinigung

Die mit L-Phenylalanin aufkonzentrierte Schwefelsäure aus der Reaktivextraktion wurde bei 10 °C in einem gekühlten Becherglas gerührt. Die Probe wurde unter langsamer Zugabe konzentrierter Natronlauge auf pH 3,5 titriert. Das ausgefallene Präzipitat wurde zunächst filtriert und anschließend lyophilisiert.

A.3.7 GC-MS und ICP-MS-Analytik

Die Analysen wurden extern durchgeführt (Dr. Weßling Laboratorien GmbH).

A.3.8 GC-Analytik

Die Bestimmung von Kerosin und D₂EHPA in Fermentationsüberstand erfolgte mittels Gaschromatographie (GC). Zur Vorbereitung mussten die organischen Bestandteile der Proben in Dichlormethan extrahiert werden. Dazu wurden 4 ml Probe zweimal mit 1 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die GC-Messungen und vorab erfolgte GC-MS-Messungen zur Identifizierung der Substanzen wurden im ICG IV der Forschungszentrum Jülich GmbH durchgeführt.

A.3.9 Regelung der Glucosekonzentration

Als Ergänzung zu der in Abschnitt 4.3.5 dargestellten Glucoseregulation werden die durch den Kalman-Filter abgeschätzten Werte angegeben. Abgeschätzt werden die Substratkonzentration c_s , die Substratverbrauchsrate r_s und die Änderung der Substratverbrauchsrate α_s . Für diese Werte gilt:

$$\frac{dc_s^*}{dt} = (c_s^{ein} - c_s^*) \cdot \frac{F_R}{V_R} - r_s^* \quad (\text{A.1})$$

$$\frac{dr_s^*}{dt} = \alpha_s^* \quad (\text{A.2})$$

$$\frac{d\alpha_s^*}{dt} = \alpha_s^* \cdot \frac{F_R}{V_R} \quad (\text{A.3})$$

mit:

F_R Substratzufuhr
 V_R Volumen des Reaktors

A.4 Abbildungen

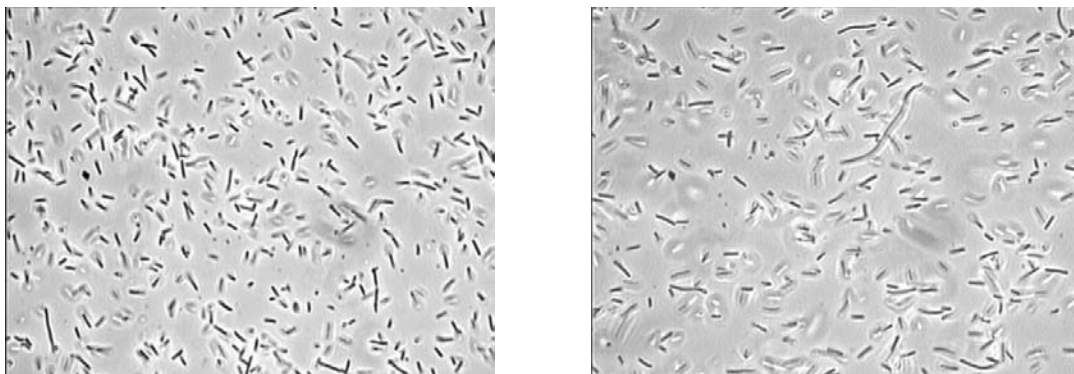


Abb. A.1: Mikroskopaufnahmen: *E. coli* während einer Fermentation ohne (links) und mit integrierter Reaktivextraktion (rechts), Vergrößerung: 1:1000

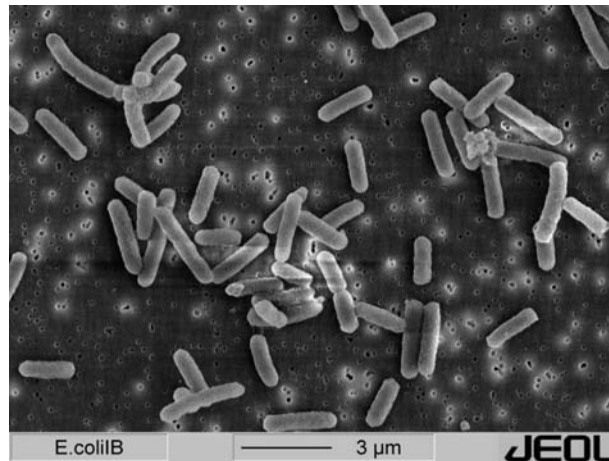


Abb. A.2: Rasterelektronenmikroskopaufnahme: *E. coli* während einer Fermentation

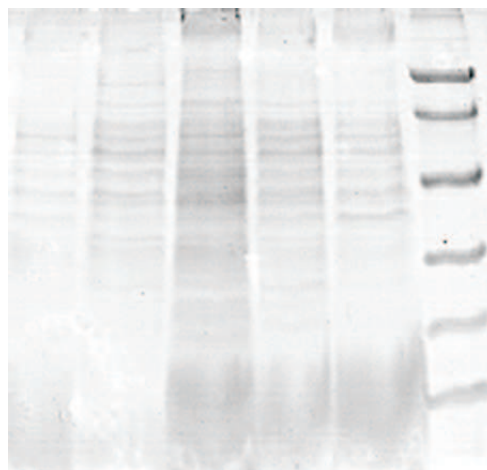
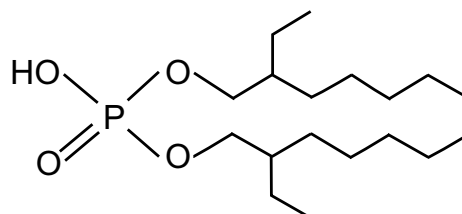


Abb. A.3: Proteinverteilung im Polyacrylamid-Gel



Bis-(2-Ethylhexyl)-Phosphat (D_2EHPA): $C_{16}H_{35}O_4P$

Abb. A.4: D_2EHPA -Struktur

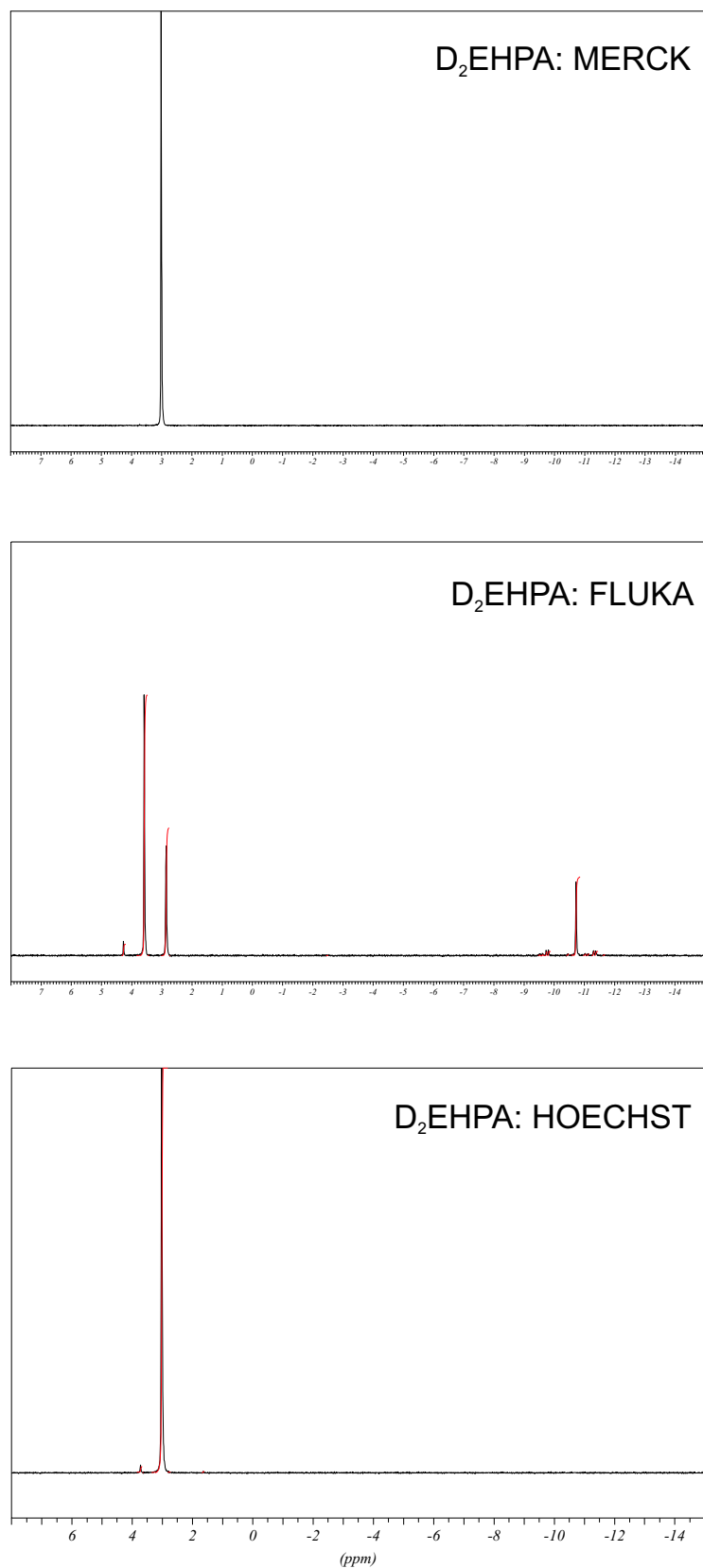


Abb. A.5: ^{31}P -NMR-Spektren von D_2EHPA . Die ^{31}P -NMR-Analytik wurde von der DSM durchgeführt.

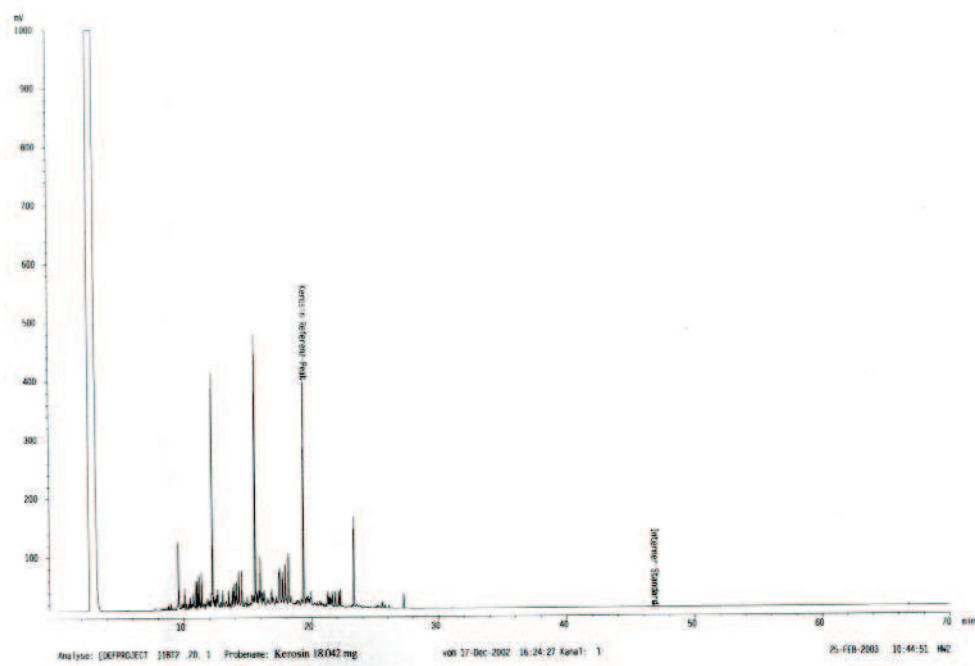


Abb. A.6: GC-Chromatogramm von Kerosin. Die GC-Analytik wurde vom ICG 4 durchgeführt.

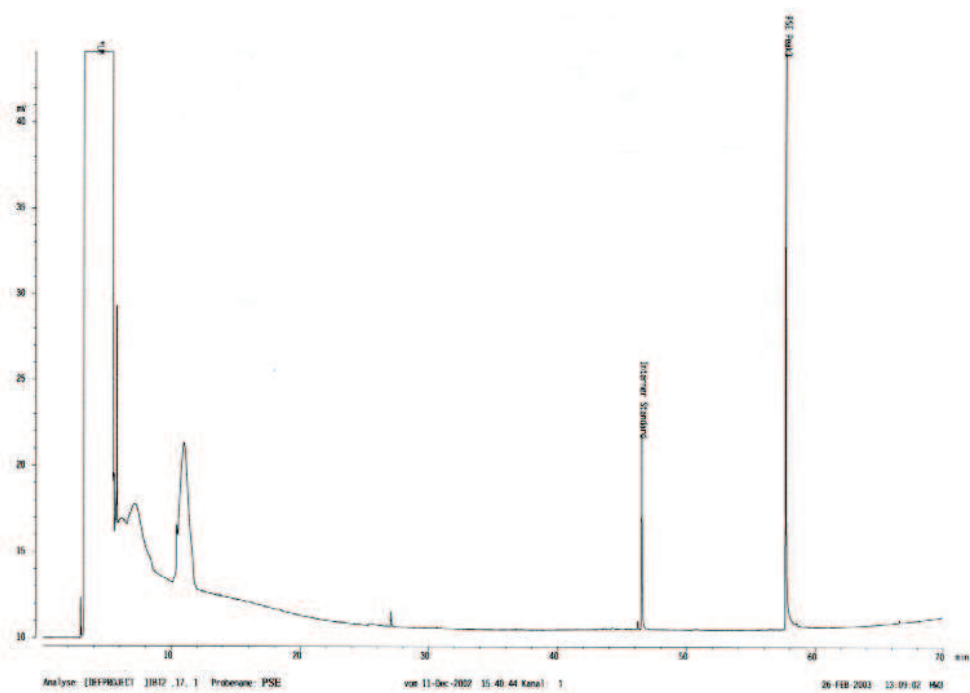


Abb. A.7: GC-Chromatogramm von D₂EHPA. Die GC-Analytik wurde vom ICG 4 durchgeführt.

B Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

Parameter und Symbole

β	Stoffübergangskoeffizient	[m/s]
δ	Dicke der Diffusionsschicht	[m]
$\epsilon_{E,RE}$	Effizienz der Extraktion, Rückextraktion	[-]
η	dynamische Viskosität	[Pa s]
λ	Wellenlänge	[m]
μ	spezifische Wachstumsrate	[h ⁻¹]
ν	kinematische Viskosität	[m ² /s]
ω	Winkelgeschwindigkeit	[m/s]
π	spezifische Produktbildungsrate	[mol/(g·h)]
ρ	Dichte	[kg/m ³]
σ	spezifische Substratverbrauchsrate	[mol/(g·h)]
τ	Verweilzeit	[h]
A	Fläche	[m ²]
c	Konzentration	[g/l]
d	Durchmesser	[m]
CER	Kohlendioxidbildungsrate	[mol/(l·h)]
D	Durchflussrate	h ⁻¹
D	Diffusionskoeffizient	[m ² /s]
E	Extraktionsgrad	[%]
ER	Extraktionsrate	[mol/h]
RER	Rückextraktionsrate	[mol/h]
g	Erdbeschleunigung	[m/s ²]
J	Fluss	[mol/(m ² ·s)]
K _M	Michaelis Menten Konstante	[mmol/l]
L	Länge	[cm]
OUR	Sauerstoffaufnahme	[mol/(l·h)]
p	Druck	[bar]
pO ₂	Gelöstsauerstoffkonzentration	[%]
pH	negativ-dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration	[-]
r	spez. Reaktionsgeschwindigkeit	[mmol/(l·h)]
r	Radius	[m]
RE	Rückextraktionsgrad	[%]
RQ	Respirationsquotient	[-]
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute	[mol/(l·h)]
t	Zeit	[h]

T	Temperatur	[°C]
TMP	Transmembrandruck	[bar]
V	Volumen	[l]
$\dot{V}$	Volumenstrom	[m ³ /s]
Y_{XS}	Biomasse-Substrat-Selektivität	[mol/mol]
Y_{PS}	Produkt-Substrat-Selektivität	[mol/mol]
Y_{PX}	Produkt-Biomasse-Selektivität	[mol/mol]

Einheiten

Bar	Bar
cm	Zentimeter
g	Gramm
h	Stunden
Hz	Hertz
kDa	Kilodalton
l	Liter
m	Meter
M	mol/l
Min.	Minute
s	Sekunde
Upm	Umdrehungen pro Minute

Abkürzungen

A	Akzeptor
a	aus
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
A/D	Analog/Digital
<i>amp^R</i>	Ampicillinresistenzgen
AroA	3-Enolpyruvylshikimat-5-Phosphat-Synthase
AroB	3-Dehydroquinat-Synthase
AroC	Chorismat-Synthase
AroD	3-Dehydroquinat-Dehydratase
AroE	Shikimat-Dehydrogenase
AroF	DAHP-Synthase (L-Tyrosin)
AroG	DAHP-Synthase (L-Phenylalanin)
AroH	DAHP-Synthase (Tryptophan)
AroL	Shikimatkinase II
ATP	Adenosintriphosphat
bidest	bidestilliertes Wasser
BTM	Biotrockenmasse
C	Carrier
C	Kohlenstoff
ca.	circa
CINC	Costner Industries Nevada Corporation
CoA	Coenzym A
D	Donator

DAD	Dioden-Array-Detektor
D ₂ EHPA	Bis-2-Ethylhexyl-Phosphorsäure
diff.	differentiell
DAH(P)	3-Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat(-7-Phosphat)
DHQ	3-Dehydroquinat
DHS	Dehydroshikimat
DSP	Down Stream Processing
E	Erwartungswert
e	ein
e	Abweichungsgröße
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E4P	Erythrose-4-Phosphat
EPSP	5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat
F	Zufuhr
FADH	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FDA	Fließdiffusions-Analyse
FIA	Fließinjektions-Analyse
FID	Flammenionisationsdetektor
g	Gas
GC	Gaschromatographie
GlF	Glucose-Facilitator
Glk	Glucokinase
HPLC	High-performance liquid chromatography
I	Gütekriterium
i	Komponente
Int.	integral
IPTG	1-Isopropyl- β -D-thiogalactosid
k	Verteilungskoeffizient
K	Gleichgewichtskonstante
K12	<i>E. coli</i> Stamm
L	Extraktionssmittel
l	leicht
LB	Luria-Bertani Medium
LC	Liquid Chromatography
max.	maximal
MGA	Marker of Glucose Accumulation
MS	Massenspektrometrie
MV	Minimalvarianz
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NMWC	Nominal Molecular Weight Cut-off
NP	Nebenprodukt
O	organisch
OD	Optische Dichte
OLGA	OnLine-General-Analyser
OPA	ortho-Phthaldialdehyd
org.	organisch
OTR	Sauerstofftransferrate
P	Produkt
PEP	Phosphoenolpyruvat

Pck	Pyruvatcarboxykinase
Phe	Phenylalanin
PheA	Chorismatmutase/Prephenatdehydratase
P _i	Phosphat
PID	Proportional-Integrativ-Differentiell
pK _s	Säurenkonstante
pK _b	Basenkonstante
Ppc	Phosphoenolpyruvatcarboxylase
Pps	Phosphoenolpyruvatsynthase
P _{tac}	Promotor
PTS	Phosphotransferasesystem
Pyk	Pyruvatkinase
R	Reaktor
R	Extraktionsgut
r	Gewichtung
REM	Raster-Elektronenmikroskop
RP	Reversed Phase
S	Substrat
s	schwer
S3P	Shikimat-3-Phosphat
SDS-PAGE	Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SIA	Sequential Injection Analyser
spez.	spezifisch
Tkt	Transketolase
Tal	Transaldolase
TCA	Trichloressigsäure
TCS-Zyklus	Tricarbonsäure-Zyklus
Tyr	L-Tyrosin
TyrA	Chorismatmutase/Prephenatdehydrogenase
TyrB	Aminotransferase
TyrR	L-Tyrosin-Regulon
u	Stellgröße
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen/Volumen
w	Sollwert
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen
X	Biomasse
y	Regelgröße
z	Störgröße
<i>Z. mobilis</i>	<i>Zymomonas mobilis</i>
z.B.	zum Beispiel

Literaturverzeichnis

- [Adarkar u. a. 1997] ADARKAR, J.A. ; SAWANT, S.B. ; JOSHI, J.B. ; PANGARKAR, V.G.: Extraction of amino acids using immobilized liquid membranes. In: *Biotechnology Progress* 13 (1997), S. 493–495
- [Ager u. a. 1998] AGER, D.J. ; PANTALEONE, D.P. ; HENDERSON, S.A. ; KATRIZKA, A.R. ; PRAKASH, I. ; WALTERS, D.E.: Synthetische nicht nutritive Süßstoffe. In: *Ange wandte Chemie* 110 (1998), Nr. 13/14, S. 1910–1916
- [Akesson u. a. 2001] AKESSON, M. ; HAGANDER, P. ; AXELSSON, J.P.: Avoiding Acetate Accumulation in *Escherichia coli* Cultures Using Feedback Control of Glucose Feeding. In: *Biotechnology and Bioengineering* 73 (2001), Nr. 3, S. 223–230
- [Altenbach-Rehm 2000] ALTENBACH-REHM, J.: *Entwicklung und Einsatz einer miniaturisierten Versuchstechnik für die Bioprozessentwicklung*, Forschungszentrum Jülich, Dissertation, 2000
- [Anderlei 2002] ANDERLEI, B.: *Untersuchungen zur Rolle der Pyruvatcarboxylase als neuer anaplerotischer Reaktion in Escherichia coli*, Universität Düsseldorf, Dissertation, 2002
- [Andersen und von Meyenburg 1980] ANDERSEN, K.B. ; MEYENBURG, K. von: Are Growth Rates of *Escherichia coli* in Batch Cultures Limited by Respiration. In: *Journal of Bacteriology* 144 (1980), Nr. 1, S. 114–123
- [Axe und Bailey 1995] AXE, D.D. ; BAILEY, J.E.: Transport of Lactate and Acetate Through the Energized Cytoplasmic Membrane of *Escherichia coli*. In: *Biotechnology and Bioengineering* 47 (1995), S. 8–19
- [Backman u. a. 1990] BACKMAN, K. ; CONNOR, M.J. O. ; MARUYA, A. ; RUDD, E. ; MCKAY, D. ; BALAKRISHNAN, R. ; RADJAI, M. ; DIPASQUANTONIO, V. ; SHODA, D. ; AL., R. H.: Genetic Engineering of Metabolic Pathways Applied to the Production of Phenylalanine. In: *Annals New York Academy of Sciences* 89 (1990), Nr. 5, S. 16–24
- [Baez u. a. 2001] BAEZ, J.L. ; BOLIVAR, F. ; GOSSET, G.: Determination of 3-Deoxy-D-Arabino-Heptulosonate 7-Phosphate Productivity and Yield from Glucose in *Escherichia coli* devoid of the Glucose Phosphotransferase Transport System. In: *Biotechnology and Bioengineering* 73 (2001), Nr. 6, S. 530–535
- [Baier 1999] BAIER, G.: *Liquid-liquid extraction based on a new flow pattern: two fluid Taylor-Couette flow*, University of Wisconsin, Dissertation, 1999

- [Bailey 1991] BAILEY, J.E.: Towards a science of metabolic engineering. In: *Science* 252 (1991), S. 1668–1675
- [Barker und Frost 2001] BARKER, J.L. ; FROST, J.W.: Microbial synthesis of p-hydroxybenzoic acid from glucose. In: *Biotechnology and Bioengineering* 76 (2001), Nr. 4, S. 376–390
- [Bart 2001] BART, H.-J.: *Reactive extraction*. Berlin, Heidelberg : Springer Verlag, 2001
- [Berry 1996] BERRY, A.: Improving production of aromatic compounds in *Escherichia coli* by metabolic engineering. In: *TIBTECH* 14 (1996), S. 250–256
- [Blattner u. a. 1997] BLATTNER, F.R. ; PLUNKETT, G. ; BLOCH, C.a. ; PERNA, N.T. ; BURLAND, V. ; RILEY, M. ; COLLADO-VIDES, J. ; GLASNER, J.D. ; RODE, C.K. ; AL., G.F. M.: The complete genome sequence of *Escherichia coli* k-12. In: *Science* 277 (1997), S. 1453–1474
- [Boeck und Sawers 1996] BOECK, A. ; SAWERS, G.: Fermentation. In: NEIDHARDT, F.C. (Hrsg.) ; CURTIS, R. (Hrsg.) ; INGRAHAM, J.L. (Hrsg.) ; LIN, E.C.C. (Hrsg.) ; LOW, K.B. (Hrsg.) ; MAGANSNIK, B. (Hrsg.) ; REZNIKOFF, W.S. (Hrsg.) ; RILEY, M. (Hrsg.) ; SCHAECHTER, M. (Hrsg.) ; UMBARGER, H.E. (Hrsg.): *Escherichia coli and Salmonella - Cellular and Molecular Biology* Bd. 1. Washington DC : ASM Press, 1996
- [Bongaerts u. a. 2001] BONGAERTS, J. ; KRÄMER, M. ; MÜLLER, U. ; RAEVEN, L. ; WUBBOLTS, M.: Metabolic Engineering for Microbial Production of Aromatic Amino Acids and Derived Compounds. In: *Metabolic Engineering* 3 (2001), S. 289–300
- [Boyadzhiev und Atanassova 1994] BOYADZHIEV, L. ; ATANASSOVA, I.: Extraction of phenylalanine from dilute solutions by rotating film pertraction. In: *Process Biochemistry* 29 (1994), S. 237–243
- [Boychyn u. a. 2001] BOYCHYN, M. ; YIM, S. ; AYZA, S. ; SHAMLOU, P. ; BLUMER, M. ; MORE, J. ; HOARE, M.: Characterization of flow intensity in continuous centrifuges for the development of laboratory mimics. In: *Chemical Engineering Sciences* 56 (2001), Nr. 16, S. 4759–4770
- [Bradford 1976] BRADFORD, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. In: *Analytical Biochemistry* 72 (1976), S. 248–254
- [Bröer und Krämer 1991] BRÖER, S. ; KRÄMER, R.: Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum*. 1. Identification of a specific secretion carrier system. In: *European Journal of Biochemistry* 202 (1991), S. 131–135
- [Budzinski 2001] BUDZINSKI, A.: Aminosäure, Peptide und die Chemie dazu. In: *Chemische Rundschau* 6:10 (2001)
- [Bujnicki 2001] BUJNICKI, R.: *Untersuchung reaktionstechnischer Parameter zur Produktion von L-Phenylalanin mit Escherichia coli im Fed-Batch Verfahren*, Forschungszentrum Jülich, Diplomarbeit, 2001

- [Burkovski und Krämer 2002] BURKOVSKI, A. ; KRÄMER, R.: Bacterial amino acid transport proteins: occurrence, functions, and significance for biotechnological applications. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 58 (2002), Nr. 3, S. 265–274
- [Cameron und Husson 2001] CAMERON, T. ; HUSSON, S.M.: Recovery of Amino Acids From Aqueous Solution by Reversible Complexation with Mixed Organic Extractants. In: *Separation Science and Technology* 36 (2001), Nr. 5, 6, S. 849–866
- [Cascaval u. a. 2001] CASCAVAL, D. ; ONISCU, C. ; GALACTION, A.-I.: Selective separation of amino acids by reactive extraction. In: *Biochemical Engineering Journal* 7 (2001), S. 171–176
- [Chandran u. a. 2003] CHANDRAN, S.S. ; YI, J. ; DRATHS, K.M. ; DAENIKEN, R. von ; WEBER, W. ; FROST, J.W.: Phosphoenolpyruvate Availability and the Biosynthesis of Shikimic Acid. In: *American Chemical Society and American Institute of Chemical Engineers ASAP Article* (2003), S. 1–7
- [Chao u. a. 1999] CHAO, Y.-P. ; LAI, Z.J. ; CHEN, P. ; CHERN, J.-T.: Enhanced Conversion Rate of L-Phenylalanine by Coupling Reactions of Aminotransferases and Phosphoenolpyruvate Carboxykinase in *Escherichia coli* K-12. In: *Biotechnology Progress* 15 (1999), S. 453–458
- [Chen u. a. 1997] CHEN, R. ; HATZIMANIKATIS, V. ; YAP, W.M.G.J. ; POSTMA, P.W. ; BAILEY, J.E.: Metabolic Consequences of Phosphotransferase (PTS) Mutation in a Phenylalanine-Producing Recombinant *Escherichia coli*. In: *Biotechnology Progress* 13 (1997), S. 768–775
- [Cheryan 1998] CHERYAN, M.: *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*. Lancaster : Technomic Publishing Company, Inc., 1998
- [Choi und Tribe 1982] CHOI, Y.J. ; TRIBE, D.E.: Continuous production of phenylalanine using an *Escherichia coli* regulatory mutant. In: *Biotechnology Letters* 4 (1982), Nr. 4, S. 223–228
- [Cinc 2001] CINC: *Flüssig-Flüssig Zentrifugal Separator V2 Handbuch*. Brakel : CINC Deutschland GmbH, 2001
- [Convery u. a. 2002] CONVERTY, A. ; PEREGO, P. ; SORDI, A. ; TORRE, P.: Effect of starting xylose concentration on the microaerobic metabolism of *Debaryomyces hansenii* - The use of carbon material balances. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology* 101 (2002), Nr. 1, S. 15–29
- [Curtis und Epstein 1975] CURTIS, S.J. ; EPSTEIN, W.: Phosphorylation of D-glucose in *Escherichia coli* mutants defective in glucosephosphotransferase, mannosephosphotransferase, and glucokinase. In: *Journal of Bacteriology* 122 (1975), S. 1189–1199
- [Dell und Frost 1993] DELL, K.A. ; FROST, J.W.: Identification and Removal of Impediments to Biocatalytic Synthesis of Aromatics from D-Glucose: Rate-Limiting Enzymes in the Common Pathway of Aromatic Amino Acid Biosynthesis. In: *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993), S. 11581–11589

- [Diaz u. a. 2001] DIAZ, E. ; FERRANDEZ, A. ; PRIETO, M.A. ; GARCIA, J.L.: Biodegradation of Aromatic Compounds by *Escherichia coli*. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65 (2001), Nr. 4, S. 523–569
- [Donovan u. a. 1996] DONOVAN, R.S. ; ROBINSON, C.W. ; GLICK, B.R.: Review: Optimizing inducer and culture conditions for the expression of foreign proteins under control of the lac promotor. In: *Journal of Industrial Microbiology* 16 (1996), S. 145–154
- [Draths u. a. 1992] DRATHS, K.M. ; POMPLIANO, D.L. ; CONLEY, D.L. ; FROST, J.W. ; BERRY, Y. ; DISBROW, G.L. ; STAVERRY, R.J. ; LIEBENSE, J.C.: Biocatalytic Synthesis of Aromatics from D-Glucose: The Role of Transketolase. In: *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992), S. 3856–3962
- [Drauz u. a. 2002] DRAUZ, K.H. ; HOPPE, B. ; KLEEMANN, A. ; KRIMMER, H.P. ; LEUCHTENBERGER, W. ; WECKBECKER, C.: Amino Acids. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 6. Weinheim, Deutschland : Wiley-VCH, 2002
- [Ely und Pittard 1979] ELY, B. ; PITTARD, J.: Aromatic Amino Acid Biosynthesis: Regulation of Shikimate Kinase in *Escherichia coli* K-12. In: *Journal of Bacteriology* 138 (1979), Nr. 3, S. 933–943
- [Enfors u. a. 2003] ENFORS, S.-O. ; WIELEN, L. V. ; STOCKAR, U. von: Process Integration Challenges in Biotechnology Yesterday, Today and Tomorrow. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 80 (2003), S. IX–XV
- [Escalante u. a. 1998] ESCALANTE, H. ; ALONSO, A.I. ; ORTIZ, I. ; IRABIEN, A.: Separation of L-phenylalanine by nondispersive extraction and backextraction. Equilibrium and kinetic parameters. In: *Separation Science and Technology* 33 (1998), S. 119–139
- [Farmer und Liao 1997] FARMER, W.R. ; LIAO, J.C.: Reduction of Aerobic Acetate Production by *Escherichia coli*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 63 (1997), Nr. 8, S. 3205–3210
- [Ferenci 1996] FERENCI, T.: Adaptation to life at micromolar nutrient levels: the regulation of *Escherichia coli* glucose transport by endoinduction and cAMP. In: *FEMS Microbiology* 18 (1996), S. 301–317
- [Ferenci 1999] FERENCI, T.: Growth of bacterial cultures 50 years on: towards an uncertainty principle instead of constants in bacterial growth kinetics. In: *Res. Microbiol.* 150 (1999), Nr. 7, S. 431–438
- [Fletcher 1999] FLETCHER, M.: Biofilms and Biocorrosion. In: DEMAIN, A.L. (Hrsg.): *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2. Auflage. Washington : ASM Press, 1999, S. 704–714
- [Flores u. a. 1996] FLORES, N. ; XIAO, J. ; BERRY, A. ; BOLIVAR, F. ; VALLE, F.: Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. In: *Nature Biotechnology* 14 (1996), S. 620–623

- [Foerberg u. a. 1988] FOERBERG, C. ; ELIAESON, T. ; HAEGGSTROEM, L.: Correlation of theoretical and experimental yields of phenylalanine from non-growing cells of a rec *Escherichia coli* strain. In: *Journal of Biotechnology* 7 (1988), S. 319–332
- [Foerberg und Haeggstroem 1987] FOERBERG, C. ; HAEGGSTROEM, L.: Effects of cultural conditions on the production of phenylalanine from a plasmid-harboring *E. coli* strain. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 26 (1987), S. 136–140
- [Foerberg und Haeggstroem 1988] FOERBERG, C. ; HAEGGSTROEM, L.: Phenylalanine production from a rec *Escherichia coli*-strain in fed-batch culture. In: *Journal of Biotechnology* 8 (1988), S. 291–300
- [Fraenkel 1996] FRAENKEL, D.G.: Glycolysis. In: NEIDHARDT, F.C. (Hrsg.): *Escherichia coli and Salmonella Typhimurium - Cellular and Molecular Biology*. Washington DC : ASM Press, 1996, S. 189–198
- [Freeman u. a. 1993] FREEMAN, A. ; WOODLEY, J.M. ; LILLY, M.D.: In Situ Product Removal as a Tool for Bioprocessing. In: *Bio/Technology* 11 (1993), S. 1007–1012
- [von Frieling und Schuegerl 1999] FRIELING, P. von ; SCHUEGERL, K.: Recovery of lactic acid from aqueous model solutions and fermentation broths. In: *Process Biochemistry* 34 (1999), S. 685–696
- [Fritsche 1998] FRITSCH, W.: *Umwelt-Mikrobiologie: Grundlagen und Anwendungen*. Jena : Gustav Fischer Verlag, 1998
- [Frost und Draths 1995] FROST, J.W. ; DRATHS, K.M.: BIOCATALYTIC SYNTHESIS OF AROMATICS FROM D-GLUCOSE: Renewable microbial Sources of Aromatic Compounds. In: *Annual Rev. Microbiol.* 94 (1995), S. 557–579
- [Frost und Lievense 1994] FROST, J.W. ; LIEVENSE, J.: Prospects for biocatalytic synthesis of aromatics in the 21st century. In: *New Journal of Chemistry* 18 (1994), S. 341–348
- [Gebauer u. a. 1982] GEBAUER, K. ; STEINER, L. ; HARTLAND, S.: Zentrifugalextraktion - eine Literaturübersicht. In: *Chemical Engineering Technology* 54 (1982), S. 476–496
- [Gerigk 2001] GERIGK, M.: *Integrierte Prozessentwicklung zur Herstellung von L-Phenylalanin mit Escherichia coli*, Forschungszentrum Jülich, Dissertation, 2001
- [Gerigk u. a. 2002a] GERIGK, M. ; BUJNICKI, R. ; GANPO-NKWENKWA, E. ; BONGAERTS, J. ; SPRENGER, G. ; TAKORS, R.: Process Control for Enhanced L-Phenylalanine Production using Different Recombinant *Escherichia coli* Strains. In: *Biotechnology and Bioengineering* 80 (2002), Nr. 7, S. 746–754
- [Gerigk u. a. 2002b] GERIGK, M. ; MAASS, D. ; KREUTZER, A. ; SPRENGER, G. ; BONGAERTS, J. ; WUBBOLTS, M. ; TAKORS, R.: Enhanced pilot-scale fed-batch L-phenylalanine production with recombinant *Escherichia coli* by fully integrated reactive extraction. In: *Bioprocess and Biosystems Engineering* 25 (2002), S. 43–52

- [Gibson u. a. 2001] GIBSON, J.M. ; THOMAS, P.S. ; THOMAS, J.D. ; BARKER, J.L. ; CHANDRAN, S. ; HARRUP, M.K. ; DRATHS, K.M. ; FROST, J.W.: Benzene-free synthesis of phenol. In: *Angewandte Chemie, int. Ed.* 40 (2001), S. 1945–1948
- [Gil u. a. 1985] GIL, G.H. ; KOM, S.R. ; BAE, J.C. ; LEE, J.H.: Pilot-scale production of L-phenylalanine from D-glucose. In: *Enzyme Microb. Technol.* 7 (1985), S. 370–372
- [Gosset u. a. 1996] GOSSET, G. ; YONG-XIAO, J. ; BERRY, A.: A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. In: *Journal of Industrial Microbiology* 17 (1996), S. 47–52
- [Grinter 1998] GRINTER, N.J.: Developing an L-phenylalanine process. In: *CHEMTECH* (1998), Nr. July, S. 33–37
- [Hafez 1983] HAFEZ, M.: Centrifugal Extractors. In: LO, T.C. (Hrsg.) ; BAIRD, M.H.I. (Hrsg.) ; HANSON, C. (Hrsg.): *Handbook of Solvent Extraction*. New York : John Wiley, Inc., 1983, S. 459–474
- [Heidersdorf 2002] HEIDERSDORF, U.: *Untersuchungen zur integrierten Extraktion von L-Phenylalanin aus Fermentationen mit rekombinanten Escherichia coli*, Forschungszentrum Jülich, Diplomarbeit, 2002
- [Hitzmann u. a. 2000] HITZMANN, B. ; BROXTERMANN, O. ; CHA, Y.-L. ; SOBIEH, O. ; STAERK, E. ; SCHEPER, T.: The control of glucose concentration during yeast fed-batch cultivation using a fast measurement complemented by an extended Kalman filter. In: *Bioprocess Engineering* 23 (2000), S. 337–341
- [Holms 1996] HOLMS, H.: Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. In: *FEMS Microbiological Reviews* 19 (1996), S. 85–116
- [Holms 1986] HOLMS, W.H.: The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: Relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. In: HORECKER, B.L. (Hrsg.) ; STADTMAN, E.R. (Hrsg.): *Current Topics in Cellular Regulation* Bd. 28. New York : Academic Press, 1986, S. 69–105
- [Honda u. a. 1995] HONDA, H. ; TOYAMA, Y. ; TAKAHASHI, H. ; NAKAZEKO, T. ; KOBAYASHI, T.: Effective lactic acid production by two-stage extractive fermentations. In: *Journal of Fermentation and Bioengineering* 79 (1995), S. 589–593
- [Hummel u. a. 1987] HUMMEL, W. ; SCHUTTE, H. ; SCHMITDT, E. ; WANDREY, C. ; KULLA, M.R.: Isolation of L-Phenylalanine Dehydrogenase from *Rhodococcus sp.* M4 and its Application for the Production of L-Phenylalanine. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 26 (1987), S. 409–416
- [Hwang u. a. 1985] HWANG, S.O. ; GIL, G.H. ; Y.J. CHO, K.R. Lee J. ; BAE, J.C.: The fermentation process for L-phenylalanine production using an auxotrophic regulatory mutant of *Escherichia coli*. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22 (1985), S. 108–113
- [IBA 1999] IBA: *Anleitung: OLGA GL2B*. Göttingen : IBA GmbH, 1999

- [Ikeda u. a. 1993] IKEDA, M. ; OZAKI, A. ; KATSUMATA, R.: Phenylalanine production by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* with the pheA gene of *Escherichia coli*. (1993)
- [Ingraham und Marr 1996] INGRAHAM, J.L. ; MARR, A.J.: Effect of Temperature, pH, Pressure, and Osmotic Stress on Growth. In: NEIDHARDT, F.C. (Hrsg.) ; CURTIS, R. (Hrsg.) ; INGRAHAM, J.L. (Hrsg.) ; LIN, E.C.C. (Hrsg.) ; LOW, K.B. (Hrsg.) ; MAGANSNIK, B. (Hrsg.) ; REZNIKOFF, W.S. (Hrsg.) ; RILEY, M. (Hrsg.) ; SCHAECHTER, M. (Hrsg.) ; UMBARGER, H.E. (Hrsg.): *Escherichia coli and Salmonella Typhimurium - Cellular and Molecular Biology* Bd. 1. 2. Washington DC : ASM Press, 1996
- [Inoue und Horikoshi 1991] INOUE, A. ; HORIKOSHI, K.: Estimation of Solvent-Tolerance of Bacteria by Solvent Parameter LogP. In: *Journal of Fermentation and Bioengineering* 71 (1991), S. 194–196
- [Jander und Blasius 1990] JANDER, G. ; BLASIUS, E.: *Einführung in das anorganisch chemische Praktikum: einschließlich der quantitativen Analyse*. Bd. 13. Auflage. Stuttgart : Hirzel, 1990
- [Javed 1992] JAVED, K.H.: Mass transfer coefficients, interfacial effects, and surface renewal. In: THORNTON, J.D. (Hrsg.): *Science and practice of liquid-liquid extraction* Bd. 1. Oxford : Clarendon Press, 1992, S. 210–243
- [Jossek 2000] JOSSEK, R. *Mündliche Mitteilungen*. 2000
- [Katikaneni und Cheryan 2002] KATIKANENI, S.P.R. ; CHERYAN, M.: Purification of Fermentation-Derived Acetic Acid By Liquid-Liquid Extraction and Esterification. In: *Ind. Eng. Chem. Res.* 41 (2002), S. 2745–2752
- [Kelle u. a. 1996] KELLE, R. ; HERMANN, T. ; WEUSTER-BOTZ, D. ; EGGELING, L. ; KRÄMER, R. ; WANDREY, C.: Glucose-controlled L-isoleucine fed-batch production with recombinant strains of *Corynebacterium glutamicum*. In: *Journal of Biotechnology* 50 (1996), S. 123–136
- [Kelly u. a. 1998] KELLY, N.A. ; LUKHEZO, M. ; REUBEN, B.G. ; DUNNE, L.J. ; VERRALL, M.S.: Reactive Solvent Extraction of Amino Acids with Cationic Extractants. In: *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 72 (1998), S. 347–355
- [Kleman u. a. 1991a] KLEMAN, G.L. ; CHALMERS, J.J. ; LULI, G.W. ; STROHL, W.R.: Glucose-Stat, a Glucose-Controlled Continuous Culture. In: *Applied and Environmental Microbiology* 57 (1991), Nr. 4, S. 918–923
- [Kleman u. a. 1991b] KLEMAN, G.L. ; CHALMERS, J.J. ; LULI, W.G. ; STROHL, W.R.: A Predictive and Feedback Control Algorithm Maintains a Constant Glucose Concentration in Fed-Batch Fermentations. In: *Applied and Environmental Microbiology* 57 (1991), Nr. 4, S. 910–917
- [Ko u. a. 1993] KO, Y.F. ; BENTLEY, W.E. ; WEIGAND, A.: An integrated metabolic modelling approach of *E. coli* fermentations under oxygen-limited conditions: cellular energetics, carbon flux and acetate production. In: *Biotechnology and Bioengineering* 42 (1993), S. 843–853

- [Kole u. a. 1985] KOLE, M.M. ; THOMPSON, B.G. ; GERSON, D.F.: Controlled-batch fermentations of *Escherichia coli* at low ammonium concentrations. In: *Journal of Fermentation Technology* 63 (1985), S. 211–214
- [Konstantinov u. a. 1990] KONSTANTINOV, K. ; KISHIMOTO, M. ; SEKI, T. ; YOSHIDA, T.: A Balanced DO-Stat and Its Application to the Control of Acetic Acid Excretion by Recombinant *Escherichia coli*. In: *Biotechnology and Bioengineering* 36 (1990), S. 750–758
- [Konstantinov und Yoshida 1990] KONSTANTINOV, K. ; YOSHIDA, T.: On-Line Monitoring of Representative Structural Variables in Fed-Batch Cultivation of Recombinant *Escherichia coli* for Phenylalanine Production. In: *Journal of Fermentation and Bioengineering* 70 (1990), Nr. 6, S. 420–426
- [Konstantinov u. a. 1991] KONSTANTINOV, K.B. ; NAOKI, N. ; SEKI, T. ; YOSHIDA, T.: Physiologically Motivated Strategies for Control of the Fed-Batch Cultivation of Recombinant *Escherichia coli* for phenylalanine Production. In: *Journal of Fermentation and Bioengineering* 71 (1991), Nr. 5, S. 350–355
- [Konstantinov u. a. 1990] KONSTANTINOV, K.B. ; NISHIO, N. ; YOSHIDA, T.: Glucose Feeding Strategy Accounting for the Decreasing Oxidative Capacity of Recombinant *Escherichia coli* in Fed-Batch Cultivation for Phenylalanine Production. In: *Journal of Fermentation and Bioengineering* 70 (1990), Nr. 4, S. 253–260
- [Konstantinov und Yoshida 1992] KONSTANTINOV, K.B. ; YOSHIDA, T.: The way to adequate control of microbial processes passes via real-time knowledge-based supervision. In: *Journal of Biotechnology* 24 (1992), S. 33–51
- [Kraemer 2000] KRAEMER, M.: *Untersuchungen zum Einfluss erhöhter Bereitstellung von Erythrose-4-Phosphat und Phosphoenolpyruvat auf den Kohlenstofffluss in den Aromatenbiosyntheseweg von Escherichia coli*, Universität Düsseldorf, Dissertation, 2000
- [Kretzers 2002] KRETZERS, I.: *Reaction engineering studies for reactive extraction of L-phenylalanine with liquid-liquid centrifuges*, Forschungszentrum Jülich, Bachelor Thesis, 2002
- [Kreutzer 2000] KREUTZER, A. *Mündliche Mitteilungen*. 2000
- [Laemmli 1970] LAEMMLI, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (1970), S. 680–685
- [Lawley und Pittard 1994] LAWLEY, B. ; PITTARD, A.J.: Regulation of aroL by tyrR Protein and trp Repressor in *Escherichia coli* K12. In: *Journal of Bacteriology* 176 (1994), S. 6921–6930
- [Lazarova u. a. 2002] LAZAROVA, Z. ; SYSKA, B. ; SCHÜGERL, K.: Application of large-scale hollow fiber membrane contactors for simultaneous extractive removal and stripping of penicillin G. In: *Journal of Membrane science* 202 (2002), S. 151–164
- [Lee 1996] LEE, S.Y.: High cell-density culture of *Escherichia coli*. In: *Trends in Biotechnology* 14 (1996), S. 98–105

- [Lee und Clark 1998] LEE, Y. ; CLARK, M.M.: Modeling of Flux Decline during Crossflow Ultrafiltration of Colloidal Suspensions. In: *Journal of Membrane Science* 149 (1998), Nr. 2, S. 181–202
- [Lee u. a. 2001] LEE, Y.M. ; KANG, J.S. ; NAM, S.Y. ; SHOI, C.H.: Removal of acetic acid with amine extractants from fermentation broth using hydrophobic hollow-fiber membrane contactor. In: *Separation Science and Technology* 36 (2001), Nr. 6, S. 457–371
- [Lengeler u. a. 1999] LENGELER, J.W. ; DREWS, G. ; SCHLEGEL, H.G.: *Biology of the Prokaryotes*. Stuttgart : Thieme Verlag, 1999
- [Leonard 1988] LEONARD, R.A.: Recent advances in centrifugal contactor design. In: *Separation Science and Technology* 23 (1988), S. 1473–1487
- [Leonard u. a. 1980] LEONARD, R.A. ; BERNSTEIN, G.J. ; ZEIGLER, A.A. ; PELTO, R.H.: Annular centrifugal contactors for solvent extraction. In: *Separation Science and Technology* 15 (1980), S. 925–943
- [Li und Frost 1999a] LI, K. ; FROST, J.W.: Microbial Synthesis of 3-Dehydroshikimic Acid: A Comparative Analysis of D-Xylose, L-Arabinose, and D-Glucose Carbon Sources. In: *Biotechnology Progress* 15 (1999), S. 876–883
- [Li und Frost 1999b] LI, K. ; FROST, J.W.: Utilizing Succinic Acid as a Glucose Adjunct in Fed-Batch Fermentation: Is Butane a Feedstock Option in Microbe-Catalyzed Synthesis? In: *Journal American Chemical Society* 121 (1999), S. 9461–9462
- [Li u. a. 1999] LI, K. ; MIKOLA, M.R. ; DRATHS, K.M. ; WORDEN, R.M. ; FROST, J.W.: Fed-Batch Fermentor Synthesis of 3-Dehydroshikimic Acid Using Recombinant *Escherichia coli*. In: *Biotechnology and Bioengineering* 64 (1999), Nr. 1, S. 61–73
- [Liao u. a. 1996] LIAO, J.C. ; HOU, S.Y. ; CHAO, Y.P.: Pathway analysis, engineering, and physiological considerations for redirecting central metabolism. In: *Biotechnology and Bioengineering* 52 (1996), S. 129–140
- [Likidis und Schuegerl 1987] LIKIDIS, Z. ; SCHUEGERL, K.: Recovery of Penicillin by Reactive Extraction in Centrifugal Extractors. In: *Biotechnology and Bioengineering* 30 (1987), S. 1032–1040
- [Lin u. a. 2001] LIN, H.Y. ; MATHISZIK, B. ; XU, B. ; ENFORS, S.-O. ; NEUBAUER, P.: Determination of the Maximum Specific Uptake Capacities for Glucose and Oxygen in Glucose-Limited Fed-Batch Cultivations of *Escherichia coli*. In: *Biotechnology and Bioengineering* 73 (2001), Nr. 5, S. 347–357
- [Liu und Dai 2003] LIU, Y.S. ; DAI, Y.Y.: Distribution behaviour of alpha-amino acids and aminobenzoic acid by extraction with trioctylamine. In: *Separation Science and Technology* 38 (2003), Nr. 5, S. 1217–1228
- [Liu u. a. 1999] LIU, Y.S. ; DAI, Y.Y. ; WANG, J.D.: Distribution behavior of L-phenylalanine by extraction with di(2-ethylhexyl)phosphoric acid. In: *Separation Science and Technology* 34 (1999), Nr. 11, S. 2165–2176

- [Liu u. a. 2000] LIU, Y.S. ; DAI, Y.Y. ; WANG, J.D.: Distribution behavior of L-tryptophane by extraction with di(2-ethylhexyl)phosphoric acid. In: *Separation Science and Technology* 35 (2000), Nr. 9, S. 1439–1454
- [Lo u. a. 1983] LO, T.C. ; BAIRD, M.H.I. ; HANSON, C.: *Handbook of Solvent Extraction*. New York : John Wiley, Inc., 1983
- [Lu und Liao 1997] LU, J.-L. ; LIAO, J.C.: Metabolic Engineering and Control Analysis for Production of Aromatics: Role of Transaldolase. In: *Biotechnology and Bioengineering* 53 (1997), Nr. 2, S. 132–138
- [Luli und Strohl 1990] LULI, G.W. ; STROHL, W.R.: Comparison of Growth, Acetate Production, and Acetate Inhibition of *Escherichia coli* Strains in Batch and Fed-Batch Fermentations. In: *Applied and Environmental Microbiology* 56 (1990), Nr. 4, S. 1004–1011
- [Maaß 2001] MAASS, D.: *Prozessentwicklung zur simultanen Produktabtrennung von L-Phenylalanin*, Forschungszentrum Jülich, Dissertation, 2001
- [Maaß u. a. 2002] MAASS, D. ; GERIGK, M. ; KREUTZER, A. ; WEUSTER-BOTZ, D. ; WUBBOLTS, M. ; TAKORS, R.: Membrane-Based Reactive Extraction for Integrated L-Phenylalanine Separation in an *Escherichia coli* Fed-batch Process: From Lab to Pilot Scale. In: *Bioprocess and Biosystems Engineering* 25 (2002), S. 85–96
- [Madigan u. a. 1997] MADIGAN, M.T. ; MARTINKO, J.M. ; PARKER, J.: *Brock Biology of Microorganisms*. 7. Edition. Jew Jersey : Prentice Hall International, Inc., 1997
- [Maiti und Chatterjee 1990] MAITI, T.K. ; CHATTERJEE, S.P.: Microbial Production of L-Phenylalanine: A Review. In: *Hindustan Antibiotics Bulletin* 32 (1990), Nr. 1-2, S. 3–26
- [Martak u. a. 1997] MARTAK, J. ; SABALOVA, E. ; SCHLOSSER, S.: Toxicity of Organic Solvents used in situ in Fermentation of Lactic Acid by *Rhizopus arrhizus*. In: *Biotechnology Techniques* 11 (1997), Nr. 2, S. 71–75
- [McGuire 1986] MCGUIRE, J.C.: Phenylalanine ammonia lyase-producing microbial cells. US 4598047 (1986)
- [Meikrantz 1990] MEIKRANTZ, D.H.: Method for Separating Disparate Components in a Fluid Stream. (1990)
- [Meikrantz u. a. 2002] MEIKRANTZ, D.H. ; MACALUSO, L.L. ; FLIM, W.D. ; HEALD, C.J. ; MENDOZA, G. ; MEIKRANTZ, S.B.: A new annular centrifugal contactor for pharmaceutical processes. In: *Chemical Engineering Communications* 189 (2002), S. 1629–1639
- [Meikrantz u. a. 2001] MEIKRANTZ, D.H. ; MEIKRANTZ, S.B. ; MACALUSO, L.L.: Annular centrifugal contactors for multiple stage extraction processes. In: *Chemical Engineering Communications* 188 (2001), S. 115–127

- [Miller u. a. 1987] MILLER, J.E. ; BACKMAN, I.C. ; CONNOR, M.J. O. ; HATCH, R.T.: Production of phenylalanine and organic acids by phosphoenolpyruvate carboxylase-deficient mutants of *Escherichia coli*. In: *Journal of Industrial Microbiology* 2 (1987), S. 143–149
- [Miyazawa 1991] MIYAZAWA, M.: Process For Recovering L-Amino Acids From Fermentation Liquors Containing Them. US 4997754 (1991)
- [Müller 2001] MÜLLER, A.: Hartes Gerangel um den Futtertrog. In: *Chemische Rundschau* 6 (2001), S. 1
- [Mulchandani und Basse 1995] MULCHANDANI, A. ; BASSE, A.S.: Principle and applications of biosensors for bioprocess monitoring and control. In: *Critical Reviews in Biotechnology* 15 (1995), Nr. 2, S. 105–124
- [Murdock u. a. 1993] MURDOCK, D. ; ENSLEY, B.D. ; SERDAR, C. ; THALEN, M.: Construction of metabolic operons catalyzing the de novo biosynthesis of indigo in *Escherichia coli*. In: *Biotechnology* 11 (1993), S. 381–386
- [Nakamichi u. a. 1989] NAKAMICHI, K. ; NABE, K. ; NISHIDA, Y. ; TOSA, T.: Production of L-Phenylalanine from Phenylpyruvate by *Paracoccus denitrificans* containing Aminotransferase Activity. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 30 (1989), S. 243–246
- [Neidhardt 1996] NEIDHARDT, F.C.: *Escherichia coli and Salmonella - Cellular and Molecular Biology*. 2. Washington DC : ASM Press, 1996
- [Neubauer u. a. 2003] NEUBAUER, P. ; LIN, H.Y. ; MATHISZIK, B.: Metabolic Load of Recombinant Protein Production: Inhibition of Cellular Capacities for Glucose Uptake and Respiration After Induction of a Heterologous Gene in *Escherichia coli*. In: *Biotechnology and Bioengineering* 83 (2003), Nr. 1, S. 53–64
- [Nielsen und Villadsen 1994] NIELSEN, J. ; VILLADSEN, J.: *Bioreaction Engineering Principles*. New York : Plenum Press, 1994
- [Old und Primrose 1994] OLD, R.W. ; PRIMROSE, S.B.: *Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering*. 5. Auflage. Oxford : Blackwell Science Ltd., 1994 (Studies in Microbiology)
- [Oldiges 2003] OLDIGES, M. *Laufende Dissertation*. 2003
- [de Ortiz 1992] ORTIZ, E.S. P.: Marangoni phenomena. In: THORNTON, J.D. (Hrsg.): *Science and practice of liquid-liquid extraction* Bd. 1. Oxford : Clarendon Press, 1992, S. 157–209
- [Otillinger und Blass 1985] OTILLINGER, F. ; BLASS, E.: Residence-time behaviour of two liquids in a centrifugal extractor. In: *Chemie Ingenieur Technik* 57 (1985), Nr. 9, S. 796–797
- [Pai u. a. 2002] PAI, R.A. ; DOHERTY, M.F. ; MALONE, M.F.: Design of Reactive Extraction Systems for Bioproduct Recovery. In: *AIChE Journal* 48 (2002), Nr. 3, S. 514–526

- [Park und Rogers 1986] PARK, N.H. ; ROGERS, P.L.: L-Phenylalanine Production in Continuous Culture Using a Hyperproducing Mutant of *Escherichia coli* K-12. In: *Chemical Engineering Communications* 45 (1986), S. 185–196
- [Park und Rogers 1987] PARK, N.H. ; ROGERS, P.L.: Batch and Fed-Batch Culture Studies on a Hyperproducing Mutant of *E. coli* for L-Phenylalanine Production. In: AIBA, S. (Hrsg.): *Horizons of Biochemical Engineering*. Tokyo : University of Tokyo Press, 1987, S. 171–186
- [Patnaik und Liao 1994] PATNAIK, R. ; LIAO, J.C.: Engineering of *Escherichia coli* Central Metabolism for Aromatic Metabolite Production with Near Theoretical Yield. In: *Applied and Environmental Microbiology* 60 (1994), Nr. 11, S. 3903–3908
- [Patnaik u. a. 1995] PATNAIK, R. ; SPITZER, R.G. ; LIAO, J.C.: Pathway Engineering for Production of Aromatics in *Escherichia coli*: Confirmation of Stoichiometric Analysis by Independent Modulation of AroG, TktA, and Pps Activities. In: *Biotechnology and Bioengineering* 46 (1995), S. 361–370
- [Pi u. a. 1991] PI, J. ; WOOREY, P.J. ; PITTARD, A.J.: Cloning and Sequencing of the pheP Gene, Which Encodes the Phenylalanine-Specific Transport System of *Escherichia coli*. In: *Journal of Bacteriology* 173 (1991), Nr. 12, S. 3622–3629
- [Pittard 1996] PITTARD, A.J.: Biosynthesis of the Aromatic Amino Acids. In: NEIDHARDT, F.C. (Hrsg.) ; CURTIS, R. (Hrsg.) ; INGRAHAM, J.L. (Hrsg.) ; LIN, E.C.C. (Hrsg.) ; LOW, K.B. (Hrsg.) ; MAGANSNIK, B. (Hrsg.) ; REZNIKOFF, W.S. (Hrsg.) ; RILEY, M. (Hrsg.) ; SCHAECHTER, M. (Hrsg.) ; UMBARGER, H.E. (Hrsg.): *Escherichia coli and Salmonella Typhimurium - Cellular and Molecular Biology* Bd. 1. 2. Washington DC : ASM Press, 1996
- [Podbielniak u. a. 1970] PODBIELNIAK, W.J. ; KAISER, H.R. ; ZIEGENHORN, G.J.: The history of penicillin production. In: *Chemical Engineering Progress Symposium Series* 66 (1970), S. 45–50
- [Ponce u. a. 1998] PONCE, E. ; MARTINEZ, A. ; BOLIVAR, F. ; VALLE, F.: Stimulation of Glucose Catabolism Through the Pentose Pathway by the Absence of Two Pyruvate Kinase Isoenzymes in *Escherichia coli*. In: *Biotechnology and Bioengineering* 58 (1998), Nr. 2, 3, S. 293–295
- [Postma u. a. 1993] POSTMA, P.W. ; LENGELER, J.W. ; JACOBSON, G.R.: Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate Phosphotransferase Systems of Bacteria. In: *Microbiological Reviews* 57 (1993), Nr. 3, S. 543–594
- [Pursell u. a. 2003] PURSELL, M.R. ; MENDES-TATSIS, M.A. ; STUCKEY, D.C.: Co-Extraction during Reactive Extraction of Phenylalanine using Aliquat 336: Interfacial Mass Transfer. In: *Biotechnology Progress* 19 (2003), S. 469–476
- [Raeven 2003] RAEVEN, L. *Mündliche Mitteilungen*. 2003
- [Riesenberg und Guthke 1999] RIESENBERG, G. ; GUTHKE, R.: High-cell-density cultivation of microorganisms. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 51 (1999), S. 422–430

- [Roempp 1999] ROEMPP: *Römp: Lexikon Chemie*. Bd. Version 2.0. Stuttgart : Thieme Verlag, 1999
- [Rueffer u. a. 2002] RUEFFER, N. ; TAKORS, R. ; WANDREY, C.: Integrierte Abtrennung von L-Phenylalanin mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion in Zentrifugen. (2002)
- [Rueping 2002] RUEPING, M. *Mündliche Mitteilungen*. 2002
- [Rydberg u. a. 1992] RYDBERG, J. ; MUSIKAS, C. ; CHOPPIN, G.R.: *Principles and Practice of Solvent Extraction*. New York : Marcel Dekker Inc., 1992
- [Sahm u. a. 1992] SAHM, H. ; BRINGER-MEYER, S. ; SPRENGER, G.: The genus *Zymomonas mobilis*. In: *The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg : Springer Verlag, 1992, S. 2287–2301
- [Sambrook u. a. 1989] SAMBROOK, J. ; FRITSCH, E.F. ; MANIATIS, T.: *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2. Auflage. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [Sarsero u. a. 1991] SARSERO, J.P. ; WOOKEY, P.J. ; GOLLNICK, P. ; YANOWSKY, C. ; PITTARD, A.J.: A New Family of Integral Membrane Proteins Involved in Transport of Aromatic Amino Acids in *Escherichia coli*. In: *Journal of Bacteriology* 173 (1991), Nr. 10, S. 3231–3234
- [Scarpello und Stuckey 2000] SCARPELLO, J.T. ; STUCKEY, D.C.: The Reactive Extraction of Phenylalanine with Aliquat 336: Buffer Co-Extraction Equilibrium and Mass Transfer Kinetics. In: *Biotechnology and Bioengineering* 69 (2000), Nr. 5, S. 69–77
- [Scheler u. a. 1997] SCHELER, C. ; POPOVICH, M. ; BAJPAI, R.: Reaktivextraktion von Milchsäure aus einer Fermentationsbrühe in einem Hohlfasermembranmodul. In: *Chemie Ingenieur Technik* 69 (1997), S. 951–955
- [Schell u. a. 2002] SCHELL, D.J. ; SAEZ, J.C. ; HAMILTON, J. ; THOLUDUR, A. ; MILLAN, J.D. M.: Use of measurement uncertainty analysis to assess accuracy of carbon mass balance closure for a cellulose production process. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology* 98 (2002), S. 509–523
- [Schlegel 1992] SCHLEGEL, H.G.: *Allgemeine Mikrobiologie*. 7. Auflage. Stuttgart : Thieme Verlag, 1992
- [Schleicher und Schuell 1998] SCHLEICHER ; SCHUELL: *Anleitung: Ultra- und Mikrofiltrations-Hohlfasensysteme für Bioseparationen*. Dassel, 1998
- [Schleicher und Schuell 2000] SCHLEICHER ; SCHUELL: *Anleitung: Ultra- and Microfiltration Membrane Cassettes*. Dassel, 2000
- [Schlichting u. a. 1987] SCHLICHTING, E. ; HALWACHS, W. ; SCHUEGERL, K.: Reactive Extraction of Salicylic Acid and D/L Phenylalanine in a Stirred Cell. In: *Chemical Engineering Communications* 151 (1987), S. 193–205

- [Schmid u. a. 2001] SCHMID, A. ; DORDICK, J.S. ; HAUER, B. ; KIENER, A. ; WUBBOLTS, M. ; WITHOLT, B.: Industrial biocatalysis today and tomorrow. In: *Nature* 409 (2001), Nr. 11 January, S. 258–268
- [Schmidt 1998] SCHMIDT, K. *Interner Jahresbericht*. 1998
- [Schuegerl 1994] SCHUEGERL, K.: *Solvent extraction in biotechnology: recovery of primary and secondary metabolites*. Berlin : Springer Verlag, 1994
- [Schuegerl 2000] SCHUEGERL, K.: Integrated processing of biotechnology products. In: *Biotechnology Advances* 18 (2000), S. 581–599
- [Schuegerl und Bellgardt 2000] SCHUEGERL, K. ; BELLGARDT, K.H.: *Bioreaction Engineering: Modeling and Control*. Berlin : Springer Verlag, 2000
- [Schuegerl u. a. 1994] SCHUEGERL, K. ; KRETZMER, G. ; FREITAG, R. ; SCHEPER, T.: Integrierte biotechnologische Produktionsprozesse. In: *Chemical Engineering Technology* 66 (1994), S. 1585–92
- [Schuhmann u. a. 1995] SCHUHMAN, W. ; WOHLSCHLÄGER, H. ; HUBER, J. ; SCHMIDT, H.L. ; STADLER, H.: Development of an extremely flexible automatic analyzer with integrated biosensors for on-line control of fermentation processes. In: *Analytica Chimica Acta* 315 (1995), S. 113–122
- [Shimizu u. a. 1988] SHIMIZU, N. ; FUKUZONO, S. ; FUJIMORI, K. ; NISHIMURA, N. ; ODAWARA, Y.: Fed-batch cultures of recombinant *Escherichia coli* with inhibitory substance monitoring. In: *Journal of Fermentation Technology* 66 (1988), S. 187–191
- [Shu und Liao 2002] SHU, C.-H. ; LIAO, C.-C.: Optimization of L-Phenylalanine Production of *Corynebacterium glutamicum* Under Product Feedback Inhibition by Elevated oxygen Transfer Rate. In: *Biotechnology and Bioengineering* 77 (2002), Nr. 2, S. 131–141
- [Snell u. a. 1996] SNELL, K.D. ; DRATHS, K.M. ; FROST, J.W.: Synthetic Modification of the *Escherichia coli* Chromosome: Enhancing the Biocatalytic Conversion of Glucose into Aromatic Chemicals. In: *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996), S. 5605–5614
- [Snoep u. a. 1994] SNOEP, J.L. ; ARFMAN, N. ; YOMANO, L.P. ; FLIEGE, R.K. ; CONWAY, T. ; INGRAM, L.O.: Reconstitution of Glucose Uptake and Phosphorylation in a Glucose-Negative Mutant of *Escherichia coli* by Using *Zymomonas mobilis* Genes Encoding the Glucose Facilitator Protein and Glucokinase. In: *Journal of Bacteriology* 176 (1994), Nr. 7, S. 2133–2135
- [Sprenger 2001] SPRENGER, G. *Mündliche Mitteilungen*. 2001
- [Sprenger u. a. 1998] SPRENGER, G. ; SIEWE, R. ; KARUTZ, M. ; SONKE, T.: Microbial preparation of substances from aromatic metabolism I. WO 98/18963 (1998)
- [Sprenger 1995] SPRENGER, G.A.: Genetics of pentose-phosphate pathway enzymes of *Escherichia coli* K-12. In: *Arch. Microbiol.* 164 (1995), Nr. 324–330

- [Stanbury u. a. 1995] STANBURY, P.F. ; WHITAKER, A. ; HALL, S.J.: *Principles of Fermentation Technology*. 2. Edition. Oxford : Elsevier Science, Ltd., 1995
- [Stark u. a. 2003] STARK, D. ; KORNMAN, H. ; MÜNCH, T. ; SONNLEITNER, B. ; MARISON, I.W. ; STOCKAR, U. von: Novel Type of In Situ Extraction: Use of Solvent Containing Microcapsules for the Bioconversion of 2-Phenylethanol From L-Phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Biotechnology and Bioengineering* 83 (2003), Nr. 4, S. 376–385
- [Striegel 1993] STRIEGEL, B.: *Entwurf und Implementierung von Regelungskonzepten für biotechnologische Prozesse*, RWTH Aachen, Dissertation, 1993
- [Sugimoto u. a. 1987] SUGIMOTO, S. ; YABUTA, M. ; KATO, N. ; SEKI, T. ; YOSHIDA, T. ; TAGUCHI, H.: Hyperproduction of phenylalanine by *Escherichia coli*: application of a temperature-controllable expression vector carrying the repressor-promoter system of bacteriophage lambda. In: *Journal of Biotechnology* 5 (1987), S. 237–253
- [Swings und DeLey 1977] SWINGS, J. ; DELEY, J.: The biology of *Zymomonas mobilis*. In: *Bacteriological Reviews* 41 (1977), S. 1–46
- [Takagi u. a. 1996] TAKAGI, M. ; NISHIO, Y. ; OH, G. ; YOSHIDA, T.: Control of L-Phenylalanine Production by Dual Feeding of Glucose and L-Tyrosine. In: *Biotechnology and Bioengineering* 52 (1996), S. 653–660
- [Takors 2003] TAKORS, R.: Model-Based Analysis and optimization of an ISPR Approach Using Reactive Extraction for Pilot-Scale L-Phenylalanine Production. In: *Biotechnology Progress* ASAP Artikel (2003), S. 1–8
- [Teramoto u. a. 1991] TERAMOTO, M. ; YAMASHIRO, T. ; INOUE, A. ; YAMAMOTO, A. ; MATSUYAMA, H. ; MIYAKE, Y.: Extraction of Amino Acid by Emulsion Liquid Membranes Containing Di-(2-ethylhexyl) Phosphoric Acid as Carrier. In: *Journal of Membrane Science* 58 (1991), S. 11–32
- [Then u. a. 1987] THEN, J. ; DOHERTY, A. ; NEATHERWAY, H. ; MARQUARDT, R. ; DEGER, H.-M. ; VOELSKOW, H. ; WÖHNER, G. ; PRÄVE, P.: Production of L-Phenylalanine from Phenylpyruvate using resting cells of *Escherichia coli*. In: *Biotechnology Letters* 9 (1987), Nr. 10, S. 680–684
- [Thien u. a. 1988] THIEN, M.P. ; HATTON, T.A. ; WANG, D.I.C.: Separation and concentration of amino acids using liquid emulsion membranes. In: *Biotechnology and Bioengineering* 32 (1988), S. 604–615
- [Thompson u. a. 1985] THOMPSON, B.G. ; KOLE, M.M. ; GERSON, D.F.: Control of ammonium concentration in *Escherichia coli* fermentations. In: *Biotechnology and Bioengineering* 27 (1985), S. 818–824
- [Tik u. a. 2001] TIK, N. ; BAYRAKTAR, E. ; MEHMETOGLU, Ü.: In situ reactive extraction of lactic acid from fermentation media. In: *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 76 (2001), S. 764–768

- [Tollnick und Beuse 1999] TOLLNICK, C. ; BEUSE, M.: Lückenlose Prozeßüberwachung: Online-Glucosemessung in der Biotechnologie. In: *CAV* 9 (1999), S. 104–106
- [Tsuchida u. a. 1987] TSUCHIDA, T. ; KUBOTA, K. ; MORINAGE, Y. ; MATSUI, H. ; ENEL, H. ; YOSHINAGA, F.: Production of L-Phenylalanine by a Mutant of *Brevibacterium lactofermentum* 2256. In: *Agric.Biol. Chem.* 51 (1987), Nr. 8, S. 2095–2101
- [Valle u. a. 1996] VALLE, F. ; MUNOZ, E. ; PONCE, E. ; FLORES, N. ; BOLIVAR, F.: Basic and applied aspects of metabolic diversity: the phosphoenolpyruvate node. In: *Journal of Industrial Microbiology* 17 (1996), S. 458–462
- [Vauck und Müller 1994] VAUCK, W.R.A. ; MÜLLER, H.A.: *Grundoperationen chemischer Verfahrenstechnik*. 10. Auflage. Leipzig : Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, 1994
- [Vermue u. a. 1993] VERMUE, M. ; SIKKEMA, J. ; VERHEUL, A. ; BAKKER, R. ; TRAMPER, J.: Toxicity of Homologous Series of Organic Solvents. In: *Biotechnology and Bioengineering* 42 (1993), S. 747–758
- [Verrall 1992] VERRALL, M.S.: Liquid-liquid partition in the pharmaceutical industry. In: THORNTON, J.D. (Hrsg.): *Science and practice of liquid-liquid extraction* Bd. 2. Oxford : Clarendon Press, 1992, S. 194–308
- [Verrall 1996] VERRALL, M.S.: *Downstream Processing of Natural Products - A Practical Handbook*. New York : John Wiley, 1996
- [van de Walle und Shiloach 1998] WALLE, M. van d. ; SHILOACH, J.: Proposed Mechanism of Acetate Accumulation in Two Recombinant *Escherichia coli* Strains During High Density Fermentation. In: *Biotechnology and Bioengineering* 57 (1998), Nr. 1, S. 71–78
- [Wang u. a. 1994] WANG, P.-M. ; YEH, C.-Y. ; SHU, C.-H. ; LIAO, C.-C.: A Substrate Feeding Strategy - Using An Oxystat For L-Phenylalanine Fermentation By *Corynebacterium glutamicum*. In: *Biotechnology Techniques* 8 (1994), Nr. 11, S. 843–846
- [Wasewar u. a. 2002] WASEWAR, K.L. ; HEESINK, A.B.M. ; VERSTEEG, G.F. ; PANGARKAR, V.G.: Reactive extraction of lactic acid using alamine 336 in MIBK: equilibria and kinetics. In: *Journal of Biotechnology* 97 (2002), S. 59–68
- [Weast und Astle 1979] WEAST, R.C. ; ASTLE, M.J.: *Handbook of Physics and Chemistry*. 60. Auflage. Florida : CRC Press, Inc., 1979
- [Weatherley 1994] WEATHERLEY, L.R.: *Engineering Processes for Bioseparations*. Oxford : Butterworth Heinemann, 1994
- [Weikert u. a. 1998] WEIKERT, C. ; SAUER, U. ; BAILEY, J.E.: Increased Phenylalanine Production by Growing and Nongrowing *Escherichia coli* Strain CWML2. In: *Biotechnology Progress* 14 (1998), S. 420–424
- [Weisser 1996] WEISSER, P.: *Aufnahme und Verwertung von Zuckern durch Zymomonas mobilis: Charakterisierung des Glukosefacilitators und Konstruktion eines Stoffwechselswegs für Mannose*, Forschungszentrum Jülich, Dissertation, 1996

- [Weisser u. a. 1995] WEISSER, P. ; KRÄMER, R. ; SAHM, H. ; SPRENGER, G.A.: Functional Expression of the Glucose Transporter of *Zymomonas mobilis* Leads to Restoration of Glucose and Fructose Uptake in *Escherichia coli* Mutants and Provides Evidence for Its Facilitator Action. In: *Journal of Bacteriology* 177 (1995), Nr. 11, S. 3351–3354
- [Weuster-Botz 1991] WEUSTER-BOTZ, D.: *Ethanolproduktion mit immobilisierten Zymomonas mobilis im Wirbelschichtreaktor*, Forschungszentrum Jülich, Dissertation, 1991
- [Weuster-Botz u. a. 1994] WEUSTER-BOTZ, D. ; PASCHOLD, H. ; STRIEGEL, B. ; GIEREN, H. ; KULA, M.-R. ; WANDREY, C.: Continuous Computer Controlled Production of Formate Dehydrogenase (FDH) and isolation on a Pilot Scale. In: *Chemical Engineering Technology* 17 (1994), S. 131–137
- [Wiechert 1991] WIECHERT, W.: *Interaktive Datenanalyse bei biotechnischen Prozessdaten*, Universität Bonn, Dissertation, 1991
- [Wieczorek und Brauer 1998] WIECZOREK, S. ; BRAUER, H.: Continuous production of citric acid with recirculation of the fermentation broth after product recovery. Part2: continuous production of citric acid. In: *Bioprocess Engineering* 18 (1998), Nr. 2, S. 75–77
- [Wood und Calton 1988] WOOD, L.L. ; CALTON, G.J.: Production of Phenylalanine with Immobilized Cells. US4728611 (1988)
- [Xu u. a. 1999a] XU, B. ; JAHIC, M. ; BLOMSTEN, G. ; ENFORS, S.-O.: Glucose overflow metabolism and mixed-acid fermentation in aerobic large-scale fed-batch processes with *Escherichia coli*. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51 (1999), S. 564–571
- [Xu u. a. 1999b] XU, B. ; JAHIC, M. ; ENFORS, S.-O.: Modeling of Overflow metabolism in Batch and Fed-Batch Cultures of *Escherichia coli*. In: *Biotechnology Progress* 15 (1999), S. 81–90
- [Yabannawar und Wang 1991a] YABANNAWAR, V.M. ; WANG, D.I.C.: Extractive fermentation for lactic acid production. In: *Biotechnology and Bioengineering* 37 (1991), S. 1095–1100
- [Yabannawar und Wang 1991b] YABANNAWAR, V.M. ; WANG, D.I.C.: Strategies for reducing solvent toxicity in extractive fermentations. In: *Biotechnology and Bioengineering* 37 (1991), S. 716–722
- [Yang und Cussler 2000] YANG, C. ; CUSSLER, E.L.: Reactive Extraction of Penicillin G in Hollow-Fiber and Hollow-Fiber Fabric Modules. In: *Biotechnology and Bioengineering* 69 (2000), Nr. 1, S. 66–73
- [Ye u. a. 1996] YE, K. ; JIN, S. ; SHIMIZU, K.: Performance of lactic acid fermentation by multistage extractive fermentation. In: *Journal of Fermentation and Bioengineering* 81 (1996), Nr. 3, S. 240–246
- [Yi u. a. 2002] YI, J. ; LI, K. ; DRATHS, K.M. ; FROST, J.W.: Modulation of Phosphoenolpyruvate Synthase Expression Increases Shikimate Pathway Product Yields in *E. coli*. In: *Biotechnology Progress* 18 (2002), S. 1141–1148

- [Zaja 2001] ZAJA, S.: *Entwicklung analytischer Methoden zur Quantifizierung ausgewählter Intermediate des Aromatenbiosyntheseweges in rekombinanten Stämmen des Organismus Escherichia coli*, Forschungszentrum Jülich, Diplomarbeit, 2001
- [Zeppenfeld u. a. 2000] ZEPPENFELD, T. ; LARISCH, C. ; LENGELER, J.W. ; JAHREIS, K.: Glucose transporter mutants of *Escherichia coli* K-12 with changes in substrate recognition of IICB(Glc) and induction behavior of the ptsG gene. In: *Journal of Bacteriology* 182 (2000), S. 4443–4452
- [Ziehr u. a. 1987] ZIEHR, H. ; KULA, M.R. ; SCHMIDT, E. ; WANDREY, C. ; KLEIN, J.: Continuous production of L-phenylalanine by transamination. In: *Biotechnology and Bioengineering* 29 (1987), S. 482–487

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand am Institut für Biotechnologie der Forschungszentrum Jülich GmbH in der Zeit von April 2000 bis Mai 2003.

Herrn Prof. Dr.-Ing. D. C. Hempel danke ich für die freundliche Übernahme des Hauptreferats.

Herrn Prof. Dr. C. Wandrey danke ich für seine Betreuung und Unterstützung sowie für die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen, insbesondere hinsichtlich der Ausstattung und technischer Möglichkeiten am Institut für Biotechnologie, ohne die eine Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Prof. Dr.-Ing. M. Bohnet danke ich für den Vorsitz der Promotionskommission.

Für die Betreuung der Arbeit und die hilfreichen Diskussionen bedanke ich mich bei Dr.-Ing. Ralf Takors. Besonders danken möchte ich ihm auch für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Dipl.-Ing. Robert Bujnicki, Dipl.-Ing. Ulrike Heidersdorf und Ing. Ivo Kretzers möchte ich für den im Rahmen ihrer Diplomarbeiten geleisteten Beitrag danken. Christina Kaldeweier und MSc Euloge Ganpo-Nkwenkwa danke ich für die Mithilfe während ihrer Praktika.

Für die Unterstützung bei den Fermentationen im Sixfors-Vario möchte ich mich bei Dipl.-Ing. Melanie Rüping und Dipl.-Ing. Andrea Kreutzer bedanken. Meinen Kollegen Dipl.-Chem. Marco Oldiges, Dipl.-Ing. Silvia Zaja, Ir Michel Brik Ternbach, Dipl.-Chem. Daniela Degenring, Dr.-Ing. Jürgen Hubbuch, Dr. Britta Anderlei, Dr.-Ing. Marc Gerigk, Dr.-Ing. Evelyn Wolfram und allen weiteren Mitgliedern der Fermentationsgruppe danke ich für die Diskussions- und Hilfsbereitschaft und die gute Arbeitsatmosphäre, durch die ich auch dann gerne ins Forschungszentrum kam, wenn die Arbeit mal nicht so lief wie es gedacht war.

Dipl.-Ing. Hans-Jürgen Brandt danke ich für seinen Einsatz bei allen technischen Fragen und „Notfällen“ im Technikum, Heidi Haase-Reiff für die unzähligen HPLC-Analysen und die in dringenden Fällen sofort ermöglichten Messungen.

Bei Dipl.-Ing. Andreas Franz, Horst Kiehl und Christiane Behrendt bedanke ich mich für die Hilfe bei Rechner-Fragen aller Art, sowie bei den Mitarbeitern der elektronischen und mechanischen Werkstatt für ihre Unterstützung bei all den technischen Fragen.

Prof. Dr. G. Sprenger und U. Degner danke ich für die Klonierung der Stämme und die Diskussionsbereitschaft bei mikrobiellen und genetischen Fragen.

Den Mitarbeitern der DSM Biotech GmbH und der DSM, insbesondere Dr. Leon Raeven, Dr. Johannes Bongaerts, Dipl.-Ing. Susanne Kremer, Dr. Marcel Wubbolts und Dr. Dick Schipper danke ich für die gute Zusammenarbeit im FAME-Projekt und die Möglichkeit, durch diese Kooperation sehr viel mehr dazu lernen zu können. Auch allen anderen FAMElern danke ich.

Dipl.-Ing. Helmut Willsch aus dem Institut für Erdöl und organische Geochemie (ICG 4) der Forschungszentrum Jülich GmbH danke ich für die GC-Messung der organischen Substanzen.

Dipl.-Ing. Johannes Lauche danke ich für die kritische Durchsicht von einem Teil der Arbeit und die guten Tips zu L^AT_EX.

Meinen Eltern möchte ich von ganzem Herzen für ihre unermüdliche Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung danken und meiner Schwester Christine für ihr offenes Ohr für Freuden und Probleme.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Lebensgefährten Elmar Duba für seine Geduld und sein Verständnis und seine volle Unterstützung in jeder Situation.

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Jül-4145
September 2004
ISSN 0944-2952